

17 可溶性りん酸試験法の性能調査

—バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法—

清水 昭¹, 阿部 進²

キーワード クライテリア・アプローチ, りん酸, バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法, 肥料等試験法

1. はじめに

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

しかしながら, 肥料の試験法に要求される性能規準は, 食品とは異なるため, 新たに設定する必要がある. 近年, 新たに開発された方法についてはこれらの性能を調査して肥料等試験法³⁾に順次収載している. ただし, 肥料分析法 (1992 年版)⁴⁾の記載様式を書き替えた試験法には定量下限等が記載されていないため, それらの性能を調査する必要がある. このことから, 筆者らは肥料等試験法に収載されている試験法のうち, 主要な成分のりん酸 (P_2O_5) として規定^{5, 6)}されているうち, 可溶性りん酸 (S- P_2O_5) のバナドモリブデン酸アンモニウム法の精確さ等の性能を調査したので報告する.

2. 材料及び方法

1) 試料の調製

流通している肥料原料の中にはりん酸が含まれているおそれがあることから, 試料の調製にあたっては表 1 のとおり出来る限り各肥料原料の主成分に対応する JIS 規格に規定されている試薬特級を用いた. なお, 使用した試薬のうちりん酸二水素カルシウム一水和物は JIS 規格に規定されている試薬がなかったため, JIS 規格に規定されていない試薬特級を用いた. 流通している肥料の配合割合を参考に表 2 のとおり試薬を混合し, りん酸 (P_2O_5) として 0.02 % ~ 20 % (表示値 90 % を用いた) 含有する試料を調製した.

2) 装置及び器具

- (1) 紫外可視吸光光度計: 島津製作所 UVmini-1240
- (2) ウォーターバス: (ヤマト科学 BM 200, アズワン KS-1)

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター (現仙台センター)

表1 試料の調製に使用する試薬

使用する試薬		対応する原材料名	
名称	規格	名称又は種類名(材料)	慣用名
硫酸アンモニウム	JIS K8960 特級	硫酸アンモニア	硫安
硝酸ナトリウム	JIS K8562 特級	硝酸ソーダ	硝酸ソーダ
尿素	JIS K8731 特級	尿素	尿素
りん酸水素カルシウム一水和物	特級	重過りん酸石灰	重過石
硫酸カリウム	JIS K8962 特級	硫酸加里	硫加
塩化カリウム	JIS K8121 特級	塩化加里	塩加
エチレンジアミン四酢酸二水素 二ナトリウム二水和物	JIS K8107 特級	組成均一化促進材	EDTA-Na

表2 試験に用いた試料の配合割合

(質量分率:%)

使用する試薬						定量下限確認用試料	
	P ₂ O ₅ -20	P ₂ O ₅ -15	P ₂ O ₅ -10	P ₂ O ₅ -5	P ₂ O ₅ -1	P ₂ O ₅ -0.2	P ₂ O ₅ -0.02
硫酸アンモニウム	5.51	20	20	20	25	20	20
硝酸ナトリウム		5		5			
尿素	25	10	25	15	25	20	20
りん酸水素カルシウム一水和物	39.46	29.6	19.73	9.87	1.97	0.39	0.04
硫酸カリウム	10	15		5	15	15	15
塩化カリウム	10	10	25	25	5	15	15
EDTA-Na ¹⁾	10.03	10.4	10.27	20.13	28.03	29.61	29.96
P ₂ O ₅ 含有量(表示90%)	20	15	10	5	1	0.2	0.02
P ₂ O ₅ 含有量(純度98.9%)	22	16.5	11	5.5	1.1	0.2	0.02

1) エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物

3) 試薬の調製

(1) 水: 水精製装置(Merck Millipore Elix Advantage5)を用いて精製した JIS K 0557 に規定する A3 相当の水を使用した。

(2) アンモニア水: JIS K 8085 に規定する特級(NH₃ 28%)を使用した。

(3) ペーテルマンくえん酸溶液: JIS K 8283 に規定するくえん酸一水和物 173 g を水に溶かして、窒素 42 g に相当するアンモニア水を冷却しながら徐々に加え放冷した後、1 mL 当たりの窒素量が 42 mg になるように調製した。

(4) 発色試薬溶液: JIS K 8747 に規定するバナジン(V)酸アンモニウム 1.12 g を水に溶かし、硝酸 150 mL を加えた後、JIS K 8905 に規定する七モリブデン酸六アンモニウム四水和物 50 g を水に溶かして加え、更に水を加えて 1,000 mL とした。

(5) りん酸標準液(P₂O₅ 10 mg/mL): JIS K9007 に規定するりん酸二水素カリウムを 105±2 °C で約 2 時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、19.17 g をひょう量皿にはかりとる。少量の水で溶かし、全量フラスコ 1,000 mL に移し入れ、硝酸 2 mL~3 mL を加え、標線まで水を加えた。

(6) りん酸標準液(P₂O₅ 0.5 mg/mL): りん酸標準液(P₂O₅ 10 mg/mL) 50 mL を全量フラスコ 1,000 mL にとり、硝酸 2 mL~3 mL を加え、標線まで水を加えた。

(7) 検量線用りん酸標準液: りん酸標準液(P₂O₅ 0.5 mg/mL) を全量フラスコ 100 mL に段階的にとり、ペー

テルマンくえん酸溶液 2 mL, 硝酸(1+1) 4mL を加え加熱し煮沸した. 放冷後発色試薬溶液 20 mL を加え, 標線まで水を加えて検量線用りん酸標準液 (P_2O_5 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$) を調製した.

- (8) 別の全量フラスコ 100 mL に(7)と同様に操作を行い, 検量線用空試験液を調製した.
- (9) その他の試薬: 肥料等試験法³⁾に従った.

4) 試験成分及び試験方法

可溶性りん酸(S- P_2O_5)の抽出及び測定は表3のとおり肥料等試験法³⁾の試験方法を用いた. なお, 参考のため, 試験法のフローシート(図 1)を示した.

表3 試験成分及び試験方法

試験成分	肥料等試験法の項目	試料溶液の調製方法
可溶性りん酸(S- P_2O_5)	4.2.2.a バナドモリブデン酸アンモニウム吸光光度法	(4.1) 水抽出後ペーテルマンくえん酸溶液加温(65℃)

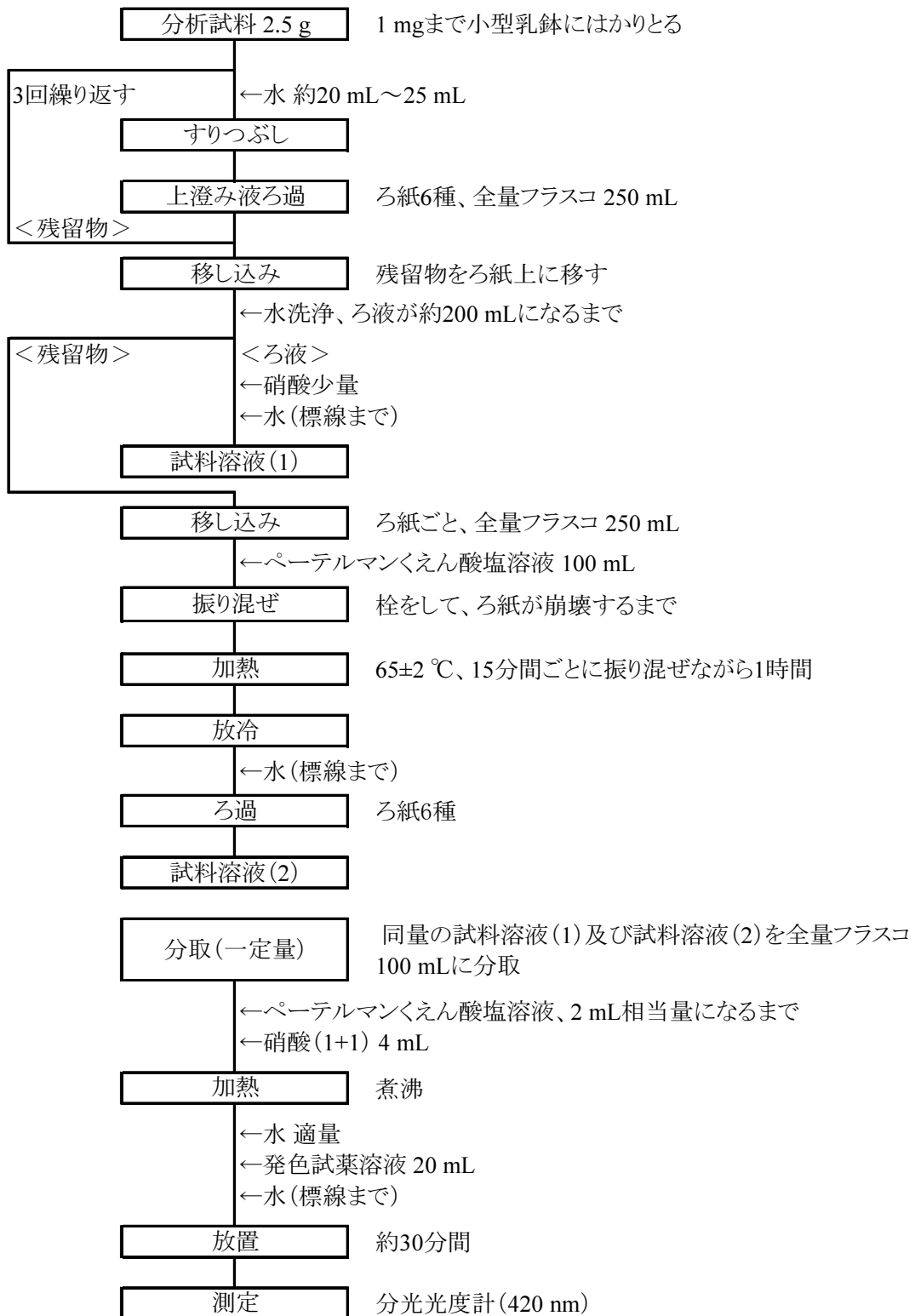


図1 肥料中の可溶性りん酸試験法フローシート

3. 結果及び考察

1) 試料の調製に用いたりん酸水素カルシウム一水和物中のりん酸の含有量

試料の調製に用いたりん酸水素カルシウム一水和物中のりん酸の含有量を肥料等試験法(可溶性りん酸)により3点併行で測定した結果を表4に示した. 平均値より算出した純度は98.9%と試薬の表示値(min. 90%)を満たしており, その相対標準偏差は0.2%と小さかった. 試料の調製では表示値90%を基に配合設計を行ったが, りん酸の含有量は算出した純度98.9%を用いることとした.

表4 試料の調製に用いた りん酸水素カルシウム一水和物中のりん酸の測定値

試料	理論値 ¹⁾ (%) ⁴⁾	平均値 ²⁾ (%) ⁴⁾	標準偏差 (%) ⁴⁾	純度 ³⁾ (%) ⁴⁾	相対標準偏差 (%)
りん酸水素カルシウム一水和物	56.31	55.70	0.10	98.9	0.2

1) りん酸水素カルシウム一水和物中のりん酸(P₂O₅)理論値

2) 可溶性りん酸(S-P₂O₅)の3点併行試験の平均値

3) (平均値/理論値)×100

4) 質量分率

2) 真度評価結果

真度評価用試料を用いて3点併行で可溶性りん酸(S-P₂O₅)の試験を実施した成績を表5に示した.

肥料取締法⁷⁾において, 保証成分量(含有する主成分の最小量)を生産業者保証票又は輸入業者保証票(以下,「保証票」という)に記載することを普通肥料(汚泥肥料等を除く)の生産又は輸入した業者(以下,「生産業者等」という)に義務づけている. よって, 可溶性りん酸(S-P₂O₅)の設計値と試験法の測定値の差について算出した. 可溶性りん酸(S-P₂O₅)の設計値と測定値との差及びその設計値に対する割合は, 可溶性りん酸(S-P₂O₅)含有量の少ない試料(P₂O₅-5及びP₂O₅-1)で質量分率-0.02%~0.02%及び質量分率-1.4%~0.3%であり, 可溶性りん酸(S-P₂O₅)含有量の多い試料(P₂O₅-20, P₂O₅-15及びP₂O₅-10)では質量分率-0.09%~0.13%及び質量分率-0.6%~0.6%であった. このことから, これらの試験法は, 普通肥料(指定配合肥料を含む)の可溶性りん酸(S-P₂O₅)の保証成分量の評価を得るに十分な正確さを有していることが確認された.

表5 試料中のりん酸(P₂O₅)の試験成績

試験成分	試料	設計値	測定値	設計値との差	差の割合	回収率	標準偏差	相対標準偏差
		A ¹⁾ (%) ²⁾	B ³⁾ (%) ²⁾	C ⁴⁾ (%) ²⁾	D ⁵⁾ (%)	E ⁶⁾ (%)	F ⁷⁾ (%) ²⁾	G ⁸⁾ (%)
S-P ₂ O ₅	P ₂ O ₅ -20	22	22.13	0.13	0.6	100.6	0.22	1.0
	P ₂ O ₅ -15	16.5	16.41	-0.09	-0.6	99.4	0.14	0.9
	P ₂ O ₅ -10	11	11.00	0.00	0.0	100.0	0.22	2.0
	P ₂ O ₅ -5	5.5	5.52	0.02	0.3	100.3	0.12	2.3
	P ₂ O ₅ -1	1.1	1.08	-0.02	-1.4	98.6	0.04	3.2

1) 試料中のりん酸(P₂O₅)の含有量(設計値)

2) 質量分率

3) 3点併行試験の平均値

4) C=B-A

5) D=(C/A)×100

6) E=(B/A)×100

7) 3点併行試験の標準偏差

8) G=(F/B)×100

3) 検出下限及び定量下限

定量下限確認用試料を用いて7点併行で可溶性りん酸(S-P₂O₅)の試験を実施した結果を表6に示した。

なお、定量下限は(標準偏差)×10式、また、検出下限は(標準偏差)×2×t(n-1,0.05)式を用いて算出した⁸⁾。

普通肥料の公定規格⁹⁾において普通肥料(汚泥肥料等及び家庭園芸用複合肥料を除く)のりん酸(P₂O₅)の含有すべき主成分の最小量並びに肥料取締法施行規則¹⁰⁾において指定複合肥料(家庭園芸用肥料を除く)のりん酸(P₂O₅)の保証できる最小量は質量分率1.0%と規定されている。このことから、これらの試験法は、公定規格における普通肥料(汚泥肥料等及び家庭園芸用複合肥料を除く)、指定複合肥料(家庭園芸用肥料を除く)の可溶性りん酸(S-P₂O₅)の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していたことが確認された。

また、普通肥料の公定規格において家庭園芸用複合肥料のりん酸(P₂O₅)の含有すべき主成分の最小量並びに肥料取締法施行規則において指定複合肥料の家庭園芸用肥料のりん酸(P₂O₅)の保証できる最小量は質量分率0.1%と規定されている。このことから、これらの試験法は、公定規格における家庭園芸用複合肥料、指定複合肥料(家庭園芸用肥料に限る)の可溶性りん酸(S-P₂O₅)の含有量の評価を得るに十分な定量範囲を有していることが確認された。

表6 定量下限確認試験の成績

(質量分率:%)

試験成分	試料	設計値 ¹⁾	平均値 ²⁾	標準偏差	推定定量下限値 ³⁾	推定検出下限値 ⁴⁾
S-P ₂ O ₅	P ₂ O ₅ -0.2	0.2	0.209	0.024	0.24	0.09
	P ₂ O ₅ -0.02	0.02	0.0166	0.0079	0.079	0.031

1) 試料中の加里(K₂O)の含有量(設計値)

2) 7点併行試験の平均値

3) 標準偏差×10

4) 標準偏差×2×t(n-1,0.05)

4) 室間再現精度

クライテリア・アプローチにおける性能規準では室間再現精度が要求されるが、試験法の妥当性確認のための共同試験の実施には大きな労力がかかる。このことから、該当する試験法で実施された既報の外部精度管理試験¹⁴⁾及び認証標準物質の値付けのための共同試験¹⁵⁾の成績^{16~21)}を適用することとし、それらの成績を表7及び表8に示した。なお、外部精度管理試験では、ロバスト法を用いて報告値の中央値及び標準化された四分位範囲(NIQR)が算出されている。中央値及びNIQRは正規分布において平均値及び標準偏差に一致する。

可溶性りん酸(S-P₂O₅)の中央値又は平均値質量分率 6.37 %~17.44 %の範囲でその標準化された四分位範囲又は室間再現標準偏差は質量分率 0.06 %~0.23 %、その相対標準偏差は 0.8 %~1.9 %であった。また、可溶性りん酸(S-P₂O₅)の試験成績の HorRat 値は 0.26~0.63 であった。

なお、AOAC(OMA)⁹⁾における濃度レベルにおける室間再現精度の目安は質量分率 100 %で 2 %、質量分率 10 %で 3 %、質量分率 1 %で 4 %及び質量分率 0.1 %で 6 %であり、可溶性りん酸(S-P₂O₅)の室間再現標準偏差はこれらの目安を下回った。

表7 外部精度管理試験成績

試験成分	試料の種類	試験年度	試験室数	中央値 A ¹⁾ (%) ²⁾	NIQR B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C ⁴⁾ (%)	SD(P) D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
S-P ₂ O ₅	普通化成肥料	2009	124	6.37	0.12	1.9	0.19	0.63
	高度化成肥料	2011	114	17.44	0.23	1.3	0.42	0.56

- 1) ロバスト法により求めた中央値(正規分布において平均値と一致する)
- 2) 質量分率
- 3) ロバスト法により求めた標準化された四分位範囲(正規分布において標準偏差と一致する)
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = B/D$

表8 肥料認証標準物質の値付けのための共同試験成績

試験成分	試料の種類	試験年度	試験室数	平均値 A ¹⁾ (%) ²⁾	SD _R B ³⁾ (%) ²⁾	RSD _R C ⁴⁾ (%)	SD(P) D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
S-P ₂ O ₅	普通化成肥料	2008	13	8.15	0.07	0.8	0.24	0.28
	普通化成肥料	2010	10	8.10	0.06	0.8	0.24	0.26

- 1) 認証値
- 2) 質量分率
- 3) 室間再現標準偏差
- 4) 室間再現相対標準偏差 $C = (B/A) \times 100$
- 5) Horwitz修正式から算出された室間再現標準偏差
- 6) HorRat値 $E = B/D$

4. まとめ

可溶性りん酸(S-P₂O₅)のバナドモリブデン酸アンモニウム法の真度及び定量・検出下限を調査したところ、次の結果を得た。

(1) 可溶性りん酸(S-P₂O₅)として質量分率1%~20%含有する試料について測定したところ、設計値と測定値との差はりん酸(P₂O₅)含有量の少ない試料(P₂O₅ 5%及び1%)で質量分率-0.02%~0.02%であり、りん酸(P₂O₅)含有量の多い試料(P₂O₅ 20%, 15%及び10%)では質量分率-0.09%~0.13%であった。また、設計値に対する回収率は98.6%~100.6%であった。

(2) りん酸(P₂O₅)含有量(P₂O₅ 0.2%及び0.02%)を用いて定量下限及び検出下限を確認したところ、質量分率0.24%, 0.079%及び質量分率0.09%, 0.031%程度と推定された。

(3) 外部精度管理試験及び肥料認証標準物質の値付けのための共同試験より室間再現精度を調査したところ、可溶性りん酸(S-P₂O₅)は、中央値又は平均値が質量分率6.37%~17.44%の範囲でその標準化された四分位範囲又は室間再現標準偏差は質量分率0.06%~0.23%, その相対標準偏差は0.8%~1.9%であった。

(1)~(3)の成績は、肥料等試験法に記載された試験法が主要な成分としての可溶性りん酸(S-P₂O₅)の含有量を評価することができる性能を有していると示しており、クライテリア・アプローチにおける試験法の性能規準の資料に適用できると考えられた。

文 献

- 1) ISO/IEC 17025 (2005): “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” (JIS Q 17025 :2006, 「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」)
- 2) Codex Alimentarius Commission: “PROCEDURAL MANUAL, Twentieth edition, (2011)
<ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20e.pdf>
- 3) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料等試験法 (2012)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 4) 農林水産省農業環境技術研究所: 肥料分析法(1992年版), 日本肥糧検定協会, 東京(1992)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 5) 肥料取締法施行令, 昭和25年6月20日, 政令第198号, 最終改正平成18年3月23日, 政令第51号 (2006)
- 6) 農林水産省告示: 肥料取締法施行令第一条の二の規定に基づき農林水産大臣の指定する有効石灰等を指定する件, 昭和59年3月16日, 農林水産省告示第695号, 最終改正平成11年5月13日, 農林水産省告示第704号 (1999)
- 7) 肥料取締法: 昭和25年5月1日, 法律第127号, 最終改正平成23年8月30日, 法律第105号 (2011)
- 8) 農林水産省告示: 特殊肥料の品質表示基準, 平成12年8月31日, 農林水産省告示第1163号, 最終改正平成17年2月28日, 農林水産省告示第364号 (2005)
- 9) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2002)
- 10) Codex: “Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009 (2009)
<www.codexalimentarius.net/download/standards/11357/cxg_072e.pdf>
- 11) 農林水産省告示: 肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件, 昭和61年2月22日, 農林水産省告示第284号, 最終改正平成22年4月9日, 農林省告示第589号 (2010)
- 12) 農林水産省令: 肥料取締法施行規則, 昭和25年6月20日, 農林水産省令第64号, 最終改正平成20年2月29日, 農林水産省令第11号 (2008)

- 13) 農林水産省告示:肥料取締法第十七条第一項第三号の規定に基づき, 肥料取締法第四条第一項第三号に掲げる普通肥料の保証票にその含有量を記載する主要な成分を定める件, 平成12年1月27日, 農林水産省告示第96号, 最終改正平成13年3月15日, 農林水産省告示第337号 (2001)
- 14) ISO/IEC Guide 43-1 (1997): “Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1 : Development and operation of proficiency testing schemes” (JIS Q 0043-1 : 1998, 「試験所間比較による技能試験 第1部:技能試験の開発及び運営」)
- 15) ISO Guide 35 (2006): “Reference materials – General and statistical principles for certification” (JIS Q 0035 : 2008, 「標準物質 – 認証のための一般的及び統計学的な原則」)
- 16) 高橋雄一, 白澤優子, 井塚進次郎, 清水 昭, 井上智江, 内山 丈, 白井裕治, 上沢正志:2008年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **2**, 97~115 (2009)
- 17) 高橋雄一, 廣井利明, 秋元里乃, 添田英雄, 高橋佐貴子, 相澤真理子, 加藤公栄, 義本将之, 白澤優子, 白井裕治, 柴田政人:2008年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **2**, 116~129 (2009)
- 18) 八木寿治, 白澤優子, 相澤真理子, 清水 昭, 井上智江, 八木啓二, 白井裕治, 上沢正志:2009年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **3**, 73~94 (2010)
- 19) 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 関根優子, 及川裕美, 添田英雄, 白井裕治, 柴田政人:2009年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **3**, 95~106 (2010)
- 20) 八木寿治, 白澤優子, 相澤真理子, 清水 昭, 福中理絵, 八木啓二, 白井裕治, 上沢正志:2010年度 外部精度管理のための全国共通試料を用いた肥料の共同試験成績の解析, 肥料研究報告, **4**, 85~106 (2011)
- 21) 高橋佐貴子, 廣井利明, 八木寿治, 井塚進次郎, 山西正将, 秋元里乃, 白井裕治, 柴田政人:2010年度 肥料認証標準物質の開発, 肥料研究報告, **4**, 107~106 (2011)

Verification of Performance Characteristics of Testing Method for Citrate-Soluble Phosphorus Content by Ammonium Vanadomolybdate Absorption Photometry

Akira SHIMIZU¹ and Shin ABE²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center

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

We verified performance characteristics of testing method for citrate-soluble phosphorus (S-P₂O₅) by ammonium vanadomolybdate absorption photometry described in Testing Method for Fertilizers. The accuracy testing method for the citrate-soluble phosphorus was assured from 3 replicate determinations of 5 fertilizer samples containing 1 % ~ 20 % phosphorus (as P₂O₅) which were prepared each test. As a result, the mean recoveries ranged from 98.6 % ~ 100.6 %. On the basis of 10 replicate measurements of each testing method of a solid sample, the limit of quantitative value (LOQ) was estimated at 0.079 % and 0.24 %, respectively. Reported in Research Report of Fertilizer, medians, normalize ranges (NIQR) and relative standard deviations (RSD_R) for reproducibility of S-P₂O₅ obtained by proficiency testings were 6.37 % ~ 17.44 %, 0.06 % ~ 0.23 % and 0.8 % ~ 1.9 %, respectively. And mean values, standard deviations(RSD_R) for reproducibility and RSD_R of S-P₂O₅ obtained by collaborative studies were 8.10 % ~ 8.15 %, 0.06 % ~ 0.07 % and 0.8 %, respectively. These results indicated that the method performance characteristic was available in establishing criteria for a determination method of citrate-soluble phosphorus.

Key words criteria approach, phosphorus, ammonium vanadomolybdate method, Testing Methods of Fertilizers

(Reserch Report of Fertilizer, **5**, 180~189, 2012)