

16 ほう素試験法の性能調査

—アゾメチンH法—

清水 昭¹

キーワード クライテリア・アプローチ, ほう素, アゾメチンH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, 主要な成分のほう素(B_2O_3)^{5, 6)}として規定されているく溶性ほう素(C- B_2O_3)及び水溶性ほう素(W- B_2O_3)のアゾメチンH法の精確さ等の性能規準を調査したので報告する.

2. 材料及び方法

1) 試料の調製

流通している肥料又は肥料中には, ほう素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肥料中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四ほう酸ナトリウム(無水)はJIS規格に規定されていない試薬であったため, 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, ほう素(B_2O_3)として0.01%~10%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) 上下転倒式恒温回転振り混ぜ機: 三喜製作所 RS-12
- (3) ホットプレート: 柴田科学 NP-6

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 (現)肥飼料安全検査部

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
尿素	JIS K8731 特級	尿素	尿素
りん酸二水素カリウム	JIS K9017 特級	化成肥料	
硫酸カリウム	JIS K8962 特級	硫酸加里	硫加
硫酸マグネシウム七水和物	JIS K8995 特級	硫酸苦土肥料	
硫酸マンガン五水和物	JIS K8997 特級	硫酸マンガン肥料	
四ほう酸ナトリウム(無水)		ほう酸塩肥料	
ほう酸	JIS K8863 特級	ほう酸肥料	
硫酸カルシウム二水和物	JIS K8107 特級	組成均一化促進材	石こう
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	沈殿防止材	EDTA-Na

表2-1 試験に用いた試料の配合割合(く溶性ほう素) (質量分率%)

使用する試薬	真度試験		定量下限確認用試料
	C-B ₂ O ₃ -10	C-B ₂ O ₃ -0.05	C-B ₂ O ₃ -0.01
硫酸アンモニウム	23.703	47.406	47.406
りん酸二水素カリウム	9.915	24.788	24.788
硫酸カリウム	3.158	12.577	12.577
硫酸マグネシウム七水和物	12.294	6.147	6.147
硫酸マンガン五水和物	35.036	0.357	0.357
四ほう酸ナトリウム(無水)	15.045	0.075	0.015
硫酸カルシウム二水和物	0.85	8.65	8.71
B ₂ O ₃ 含有量	10	0.05	0.01

表2-2 試験に用いた試料の配合割合(水溶性ほう素) (質量分率%)

使用する試薬	真度試験		定量下限確認用試料
	W-B ₂ O ₃ -10	W-B ₂ O ₃ -0.05	W-B ₂ O ₃ -0.01
尿素	10.826	21.653	21.653
りん酸二水素カリウム	12.394	24.788	24.788
硫酸カリウム	6.279	12.577	12.577
硫酸マグネシウム七水和物	30.735	30.735	30.735
硫酸マンガン五水和物	17.518	0.35	0.35
ほう酸	17.851	0.089	0.018
EDTA-Na ¹⁾	4.4	9.81	9.88
水			
B ₂ O ₃ 含有量	10	0.05	0.01

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) 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 1,000 mL とした。
- (3) エチレンジアミン四酢酸塩溶液: JIS K 8107 に規定するエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 37.2 g を水に溶かして 1,000 mL とした。
- (4) 酢酸アンモニウム溶液: 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 に調整した。
- (5) アズメチン H 溶液: アズメチン 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、 $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ に加温して溶かし、冷却後水を加えて 100 mL とした。
- (6) ほう素標準液(B_2O_3 2.5 mg/mL): 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、全量フラスコ 1,000 mL に移し入れ、標線まで水を加えた。
- (7) ほう素標準液(B_2O_3 0.05 mg/mL): ほう素標準液(B_2O_3 2.5 mg/mL) の一定量を水で正確に 50 倍に希釈した。
- (8) 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

く溶性ほう素(C- B_2O_3)及び水溶性ほう素(W- B_2O_3)の抽出及び測定は表 3 のとおり肥料等試験法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 1~2)を示した。

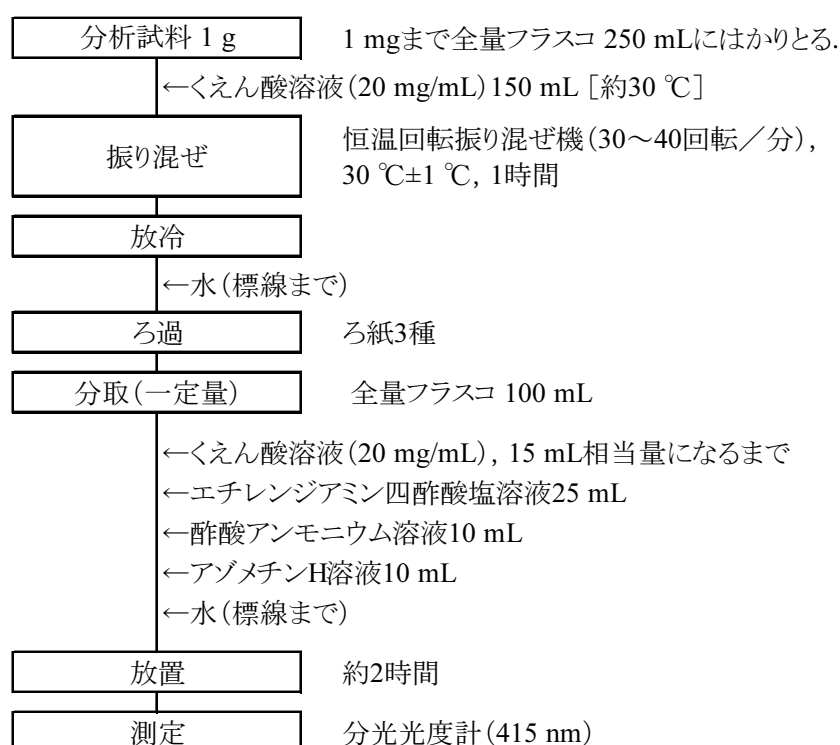


図 1 肥料中のく溶性ほう素試験法フローシート

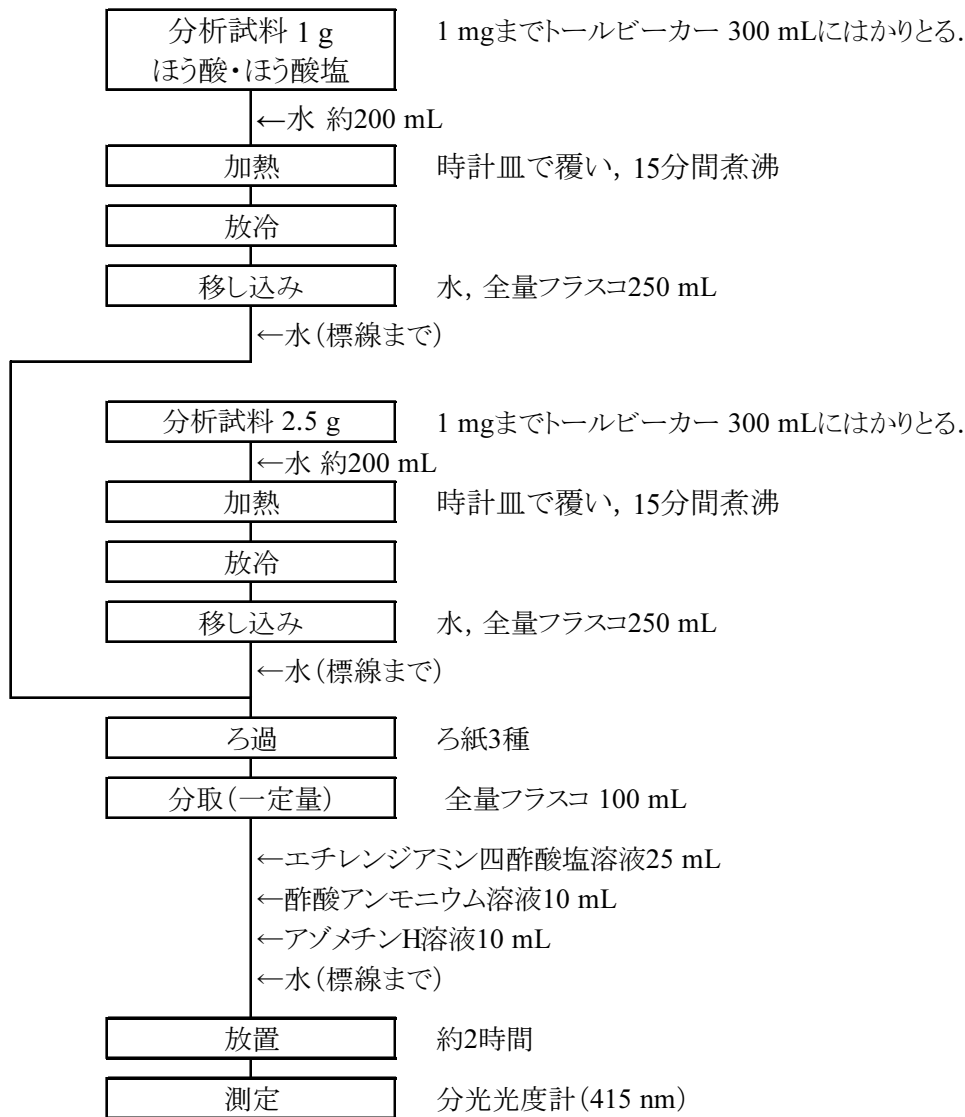


図2 肥料中の水溶性ほう素試験法フローシート

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
く溶性ほう素(C-B ₂ O ₃)	4.8.1.a アゾメチンH法	(4.1) くえん酸溶液(20 mg/mL)回転振とう(30℃)
水溶性ほう素(W-B ₂ O ₃)	4.8.2.a アゾメチンH法	(4.1)煮沸

3. 結果及び考察

1) 試料の調製に用いた四ほう酸ナトリウム(無水)及びほう酸中のほう素の含有量

試料の調製に用いた四ほう酸ナトリウム(無水)及びほう酸中のほう素の含有量を肥料等試験法(く溶性ほう素及び水溶性ほう素:表3)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理論値に対する割合は質量分率99.7%及び101.3%であり、その相対標準偏差は0.4%~0.9%と小さかった。試料の調製には理論値を用いて配合設計を行ったが、ほう素(B₂O₃)の含有量は算出した純度を用いることとした。

表4 試料の調製に用いた四ほう酸ナトリウム(無水)及びほう酸中のほう素の測定値

試料	理論値 ¹⁾ (%) ⁴⁾	平均値 ²⁾ (%) ⁴⁾	標準偏差 (%) ⁴⁾	理論値に 対する割合 ³⁾ (%)	相対標 準偏差 (%)
四ほう酸ナトリウム(無水)	67.82	67.61	0.59	99.7	0.9
ほう酸	56.30	57.01	0.21	101.3	0.4

- 1) く溶性ほう素試験に用いた四ほう酸ナトリウム(無水)中及び水溶性ほう素試験に用いたほう酸中のほう素(B₂O₃)の理論値
- 2) く溶性ほう素(C-B₂O₃)または水溶性ほう素(W-B₂O₃)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 点併行でく溶性ほう素(C-B₂O₃)及び水溶性ほう素(W-B₂O₃)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、ほう素(B₂O₃)の設計値と各試験法の測定値の差について算出した。ほう素(B₂O₃)として0.05%~10%含有する試料についてそれぞれの試験法で測定したところ、設計値と測定値との差は質量分率0%~0.18%であり、設計値に対する回収率は、95.7%~107.1%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)のほう素(B₂O₃)の保証成分量の評価を得るのに十分な正確さを有していることが確認された。

なお、AOAC⁸⁾における濃度レベルにおける回収率の許容範囲は濃度10%で95%~102%、0.1%で90%~108%及び0.01%で85%~110%であり、参考のため比較したところほう素(B₂O₃)のいずれの回収率もこれらの許容範囲内であった。

表5 試料中のほう素(B₂O₃)の試験成績

試験成分	試料	設計値 A ¹⁾ (%) ²⁾	測定値 B ³⁾ (%) ²⁾	設計値と の差 C ⁴⁾ (%) ²⁾	差の割合 D ⁵⁾ (%)	回収率 E ⁶⁾ (%)	標準偏差 F ⁷⁾ (%) ²⁾	相対 標準偏差 G ⁸⁾ (%)
C-B ₂ O ₃	B ₂ O ₃ -10	10	10.15	0.15	1.5	101.5	0.09	0.9
	B ₂ O ₃ -0.05	0.05	0.048	-0.002	-4.3	95.7	0.00	0.3
W-B ₂ O ₃	B ₂ O ₃ -10	10	10.18	0.18	1.8	101.8	0.03	0.3
	B ₂ O ₃ -0.05	0.05	0.054	0.004	7.1	107.1	0.00	1.0

- 1) 試料中のほう素(B₂O₃)の含有量(設計値)
- 2) 質量百分率
- 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 点併行でく溶性ほう素 (C-B₂O₃) 及び水溶性ほう素 (W-B₂O₃) 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.

普通肥料の公定規格において普通肥料(窒素質肥料, 配合肥料, 液状複合肥料, 液体微量要素複合肥料, 家庭園芸用複合肥料を除く)のほう素 (B₂O₃) 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配合肥料(家庭園芸用肥料を除く)のほう素 (B₂O₃) の保証できる最小量は 0.05 % 又は 0.10 % と規定されている. く溶性ほう素 (C-B₂O₃) 及び水溶性ほう素 (W-B₂O₃) の定量下限値はいずれも 0.02 % と推定されたことから, この試験法はそれらの肥料の含有量の評価を得るの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⁾
C-B ₂ O ₃	B ₂ O ₃	0.01	0.0113	0.0024	0.02	0.009
W-B ₂ O ₃	B ₂ O ₃	0.01	0.0091	0.0018	0.02	0.007

1) 試料中のほう素 (B₂O₃) 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, 既報の外部精度管理試験¹²⁾のうち該当する試験法で実施された成績^{13~16)}及び認証標準物質の値付けのための共同試験¹⁷⁾の成績¹⁸⁾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ロバスト標準偏差 (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.

く溶性ほう素 (C-B₂O₃) 及び水溶性ほう素 (W-B₂O₃) の中央値又は平均値が質量分率 0.209 % ~ 0.400 % 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 0.006 % ~ 0.017 %, その相対標準偏差は 2.9 % ~ 5.6 % であった. また, く溶性ほう素 (C-B₂O₃) 及び水溶性ほう素 (W-B₂O₃) の試験成績の HorRat 値は 0.59 ~ 1.16 であった.

なお, AOAC (OMA)⁸⁾における濃度レベルにおける室間再現精度の目安は濃度 1 % で 4 % 及び濃度 0.1 % で 6 % であり, 参考のため比較したところく溶性ほう素 (C-B₂O₃) 及び水溶性ほう素 (W-B₂O₃) 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⁾ (%)	PRSD D ⁵⁾ (%)	HorRat値 E ⁶⁾
C-B ₂ O ₃	普通化成肥料	2009	120	0.281	0.016	5.6	4.8	1.16
W-B ₂ O ₃	普通化成肥料	2006	132	0.400	0.017	4.2	4.6	0.91
	高度化成肥料	2008	119	0.260	0.007	2.9	4.9	0.58
	高度化成肥料	2010	116	0.291	0.010	3.4	4.8	0.70

- 1) 中央値
- 2) 質量分率
- 3) ロバスト標準偏差
- 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 $E = C/D$

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⁾
C-B ₂ O ₃	高度化成肥料	2010	11	0.209	0.006	3.1	5.1	0.61

- 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 $E = C/D$

4. まとめ

く溶性ほう素(C-B₂O₃)及び水溶性ほう素(W-B₂O₃)のアゾメチン H 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) ほう素(B₂O₃)として0.05%～10%含有する試料についてそれぞれの試験法で測定したところ、設計値と測定値との差は質量分率0.00%～0.18%であり、設計値に対する回収率は、95.3%～107.1%であった。

(2) ほう素(B₂O₃)含有量(B₂O₃ 0.01%)に調製した試料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0.02%及び0.007%～0.009%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、く溶性ほう素(C-B₂O₃)及び水溶性ほう素(W-B₂O₃)は、中央値又は平均値が質量分率0.209%～0.400%の範囲でその室間再現標準偏差は質量分率0.006%～0.017%、その相対標準偏差は2.9%～5.6%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ほう素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 <<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)
- 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, 最終改平成 23 年 8 月 30 日, 法律第 105 号(2011)
- 8) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC INTERNATIONAL (2002)
<http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf>
- 9) Codex: “Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009 (2009)
<www.codexalimentarius.net/download/standards/11357/cxg_072e.pdf>
- 10) 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 24 年 8 月 8 日, 農林省告示第 1985 号 (2012)
- 11) 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 24 年 8 月 8 日, 農林水産省令第 44 号 (2012)
- 12) ISO 13528 (2005): “Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons” (JIS Z 8405: 2008, 「試験所間比較による技能試験のための統計的方法」)
- 13) 杉村 靖, 加藤公栄, 齊木雅一, 阿部文浩, 伊藤 潤, 内山 丈, 白井裕治, 引地典雄, 杉原 進: 2006 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, **1**, 138～151 (2008)
- 14) 高橋雄一, 加藤公栄, 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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」)
- 18) 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**, 107～120 (2011)

Verification of Performance Characteristics of Testing Methods for Boron Content by Azomethine H Absorption Photometry

Akira SHIMIZU¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center
(Now) Fertilizer and Feed Inspection Department

We verified performance characteristics of testing method for citric acid-soluble boron (C-B₂O₃) and water-soluble boron (W-B₂O₃) by azomethine H absorption photometry described in Testing Method for Fertilizers. The accuracy testing method for the several form of boron was assured from 3 replicate determinations of 2 fertilizer samples containing 0.05 % ~ 10 % boron (as B₂O₃) which were prepared each test. As a result, the mean recoveries ranged from 95.3 % to 107.1 %. On the basis of 7 replicate measurements of each testing method of a solid sample, the limit of quantitative value (LOQ) was estimated at 0.02 %. Reported in Research Report of Fertilizer, medians, normalize ranges (NIQR) and relative standard deviations (RSD_R) for reproducibility of C-B₂O₃ and W-B₂O₃ obtained by proficiency testings were 0.209 % ~ 0.400 %, 0.006 % ~ 0.017 % and 2.9 % ~ 5.6 %, respectively. These results indicated that the method performance characteristic were available in establishing criteria for a determination method of boron.

Key words criteria approach, boron, azomethine H method, Testing Methods of Fertilizers

(Research Report of Fertilizer, **6**, 174~182, 2013)