

10 尿素性窒素試験法(ウレアーゼ法)の性能調査

藤田敏文¹, 加藤公栄¹, 新見豊和¹, 木村康晴³, 伊藤浩平², 白井裕治²

キーワード 尿素性窒素, ウレアーゼ法, 単一試験室の妥当性確認

1. はじめに

公定規格¹⁾においてアセトアルデヒド縮合尿素等の緩効性肥料の制限事項に尿素の最大含有量が規定されている。また、尿素性窒素は速効性成分であり、肥料としての性格を明らかにする上では複合肥料中の尿素性窒素の定量は重要である²⁾。したがって、公定規格に制限事項が規定されていない肥料の尿素性窒素の定量法も性能調査が必要とされていることから、高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素の測定法³⁾が開発された。しかしながら、HPLCを保有していない試験室もあることから、従来のウレアーゼ法^{4, 5)}について試験法の性能調査を実施した。また、ウレアーゼ法で用いている回転振り混ぜ機は肥料の分析特有の抽出機器であることから、HPLC法で用いている汎用的抽出機器(マグネチックスターラー)の適用を確認したので、その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 試料の収集及び調製

流通肥料のうち、尿素及び尿素を含む複合肥料として計15点(尿素3点、被覆窒素肥料3点、化成肥料4点、配合肥料3点及び指定配合肥料2点)、尿素化合物及び尿素化合物を含む複合肥料として計10点(アセトアルデヒド縮合尿素(以下、「CDU」という。)2点、イソブチルアルデヒド縮合尿素(以下、「IB」という。)1点、ホルムアルデヒド加工尿素(以下、「UF」という。)2点及び化成肥料5点)を試験品として収集し、それぞれ粉砕機で目開き500 µmの網ふるいを通過するまで粉砕して分析用試料を調製した。添加回収試験及び定量下限の確認に用いたIB及びCDUは、分析用試料約10 gをそれぞれはかりとり、ロート上ろ紙(3種)に入れ、抽出溶媒のりん酸塩溶液を(3L)を加えて洗浄し、ろ紙上に残った残留物を乾燥し、洗浄済みIB及び洗浄済みCDUとした。

2) 装置及び器具

- (1) 回転振り混ぜ機: 上下転倒式回転振り混ぜ機
- (2) マグネチックスターラー: AS ONE HS-6AN
- (3) 恒温水槽: THERMO F-0030
- (4) 電位差滴定装置: 京都電子工業 AT-510
- (5) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): Waters alliance シリーズ

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

- (6) カラム: Asahipak ES-502C 7C: 長さ 100 mm L×内径 7.5 mm I.D., 粒径 9 μm
 ハミルトン PRP-X200: 長さ 150 mm L×内径 4.1 mm I.D., 粒径 10 μm

3) 試薬

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 相当の水
 (2) リン酸塩溶液: JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム 3.63 g 及び JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 5.68 g を水 1000 mL に溶かした
 (3) 水酸化ナトリウム溶液 (5 g/L): JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム 5 g を水に溶かして 1000 mL とした
 (4) 塩酸: JIS K 8180 に規定する試薬
 (5) メチルレッド溶液 (0.1 g/100 mL): JIS K 8896 に規定するメチルレッド 0.1 g を JIS K 8102 エタノール (95) 100 mL に溶かした
 (6) 硫酸: JIS K 8951 に規定する試薬
 (7) ウレアーゼ: 和光純薬工業製
 (8) 酸化マグネシウム: JIS K 8432 に規定する試薬
 (9) 尿素: JIS K 8731 に規定する試薬
 (10) 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液: 関東化学製容量分析用滴定液
 (11) 0.25 mol/L 硫酸: 関東化学製容量分析用滴定液

4) 試料溶液調製方法

- (1) 回転振り混ぜ機を用いる方法 (以下, 「回転振り混ぜ機法」という.)
 (1.1) 尿素及び尿素を含む複合肥料
 分析試料 5.00 g をはかりとり, 全量フラスコ 500 mL に入れ, 水約 400 mL を加え 30~40 回転/分で約 30 分間振り混ぜた後標線まで水を加えた. ろ紙 3 種でろ過し, 試料溶液とした (図 1).
 (1.2) 尿素化合物及び尿素化合物を含む複合肥料
 分析試料 1.00 g をはかりとり, 全量フラスコ 250 mL に入れ, リン酸塩溶液 200 mL を加え 30~40 回転/分 (25 °C) で約 30 分間振り混ぜた後標線まで水を加えた. ろ紙 3 種でろ過し, 試料溶液とした (図 2).

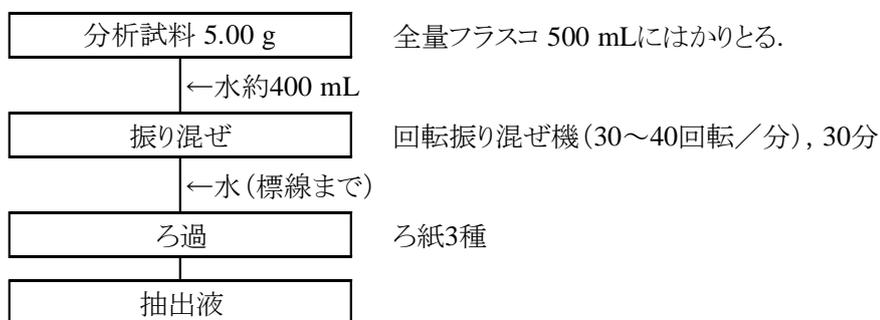


図1 回転振り混ぜ機法 (尿素及び尿素を含む複合肥料)

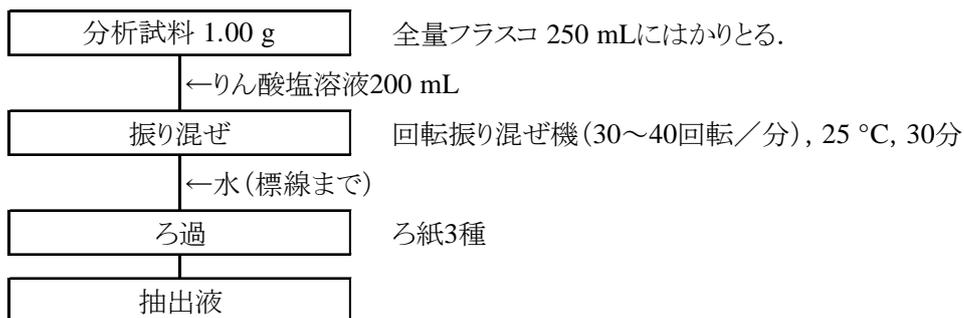


図2 回転振り混ぜ機法(尿素化合物及び尿素化合物含む複合肥料)

(2) マグネチックスターラーを用いる方法(以下、「スターラー法」という。)

分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れ、水 100 mL を加え約 10 分間かき混ぜた後、ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とした(図 3)。

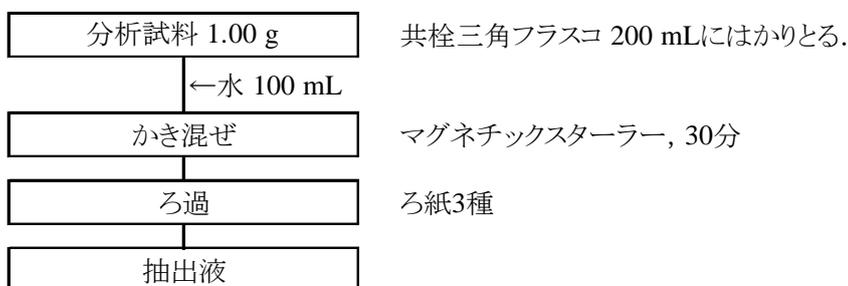


図3 スターラー法

5) 測定方法

(1) ウレアーゼ法(図 4)

(1.1) 加水分解

抽出液の一定量(U-Nとして 10 mg 相当量以上、Nとして 10 mg~100 mg 相当量)を蒸留フラスコ 300 mL に入れ、水を加えて液量を約 50 mL とした。メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)数滴加え、溶液の色がうすい黄赤色になるまで塩酸(1+200)又は水酸化ナトリウム溶液(5 g/L)を加えた。抽出液中の尿素を分解するために十分な量(0.2 g)のウレアーゼを加え、密栓して 40 °C の水浴中で 1 時間加温した後、放冷して試料溶液とした。抽出液空試験として、別の蒸留フラスコを用いてウレアーゼを加えずに同様の操作を実施し、未分解試験溶液を調製した。また、ウレアーゼ空試験として、別の蒸留フラスコを用いて抽出液を水に替えて同様の操作を実施し、空試験溶液を調製した。

(1.2) 蒸留

0.25 mol/L 硫酸を 10 mL を受器にはかりとり、この受器を水蒸気蒸留装置に連結した。試料溶液の入った蒸留フラスコに酸化マグネシウム 2 g~3 g を加え、この蒸留フラスコを水蒸気蒸留装置に連結した。水蒸気を蒸留フラスコに送り、蒸留フラスコ内の溶液を加熱し、留出速度 5 mL/min~7 mL/min で蒸留を行い、120 mL~160 mL が留出したら蒸留を止め、受器内の溶液と接した水蒸気蒸留装置の部分を少量の水で洗い、洗液を留出液と合わせた。未分解試験溶液及びウレアーゼ空試験溶液を同様に操作して空試験溶液の留出液を得た。

(1.3) 滴定

留出液を電位差滴定装置を用いて 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。0.25 mol/L 硫酸空試験, 未分解試験溶液及びウレアーゼ空試験溶液も同様に滴定した。

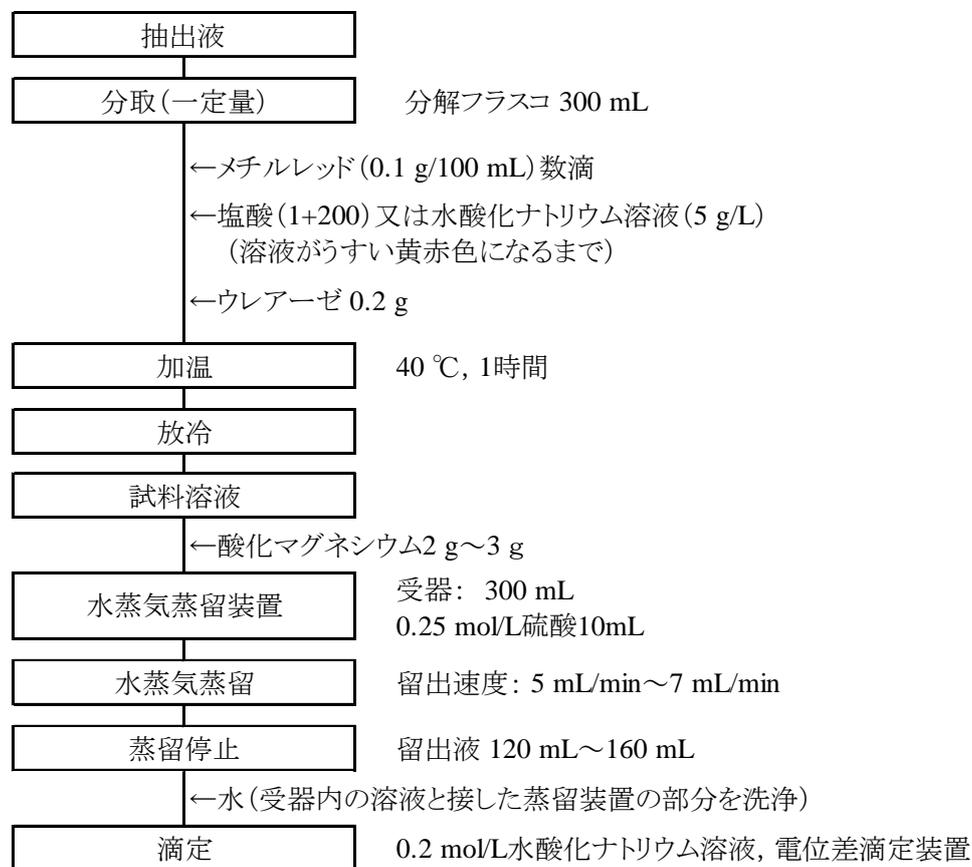


図4 加水分解、蒸留及び滴定操作

(2) HPLC 法

分析試料 1.00 g をはかりとり, 共栓三角フラスコ 200 mL に入れ, 水 100 mL を加え, マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜた。静置後, 上澄み液を共栓遠心沈殿管 1.5 mL にとり, 遠心力 8000×g~10000×g で約 5 分間遠心分離し, 上澄み液を試料溶液とした。この試料溶液を HPLC により測定した(図 5)。

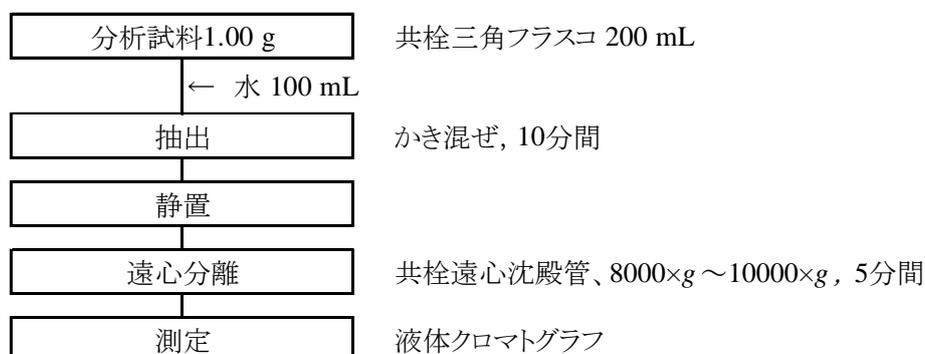


図5 HPLC法

3. 結果及び考察

1) 試験操作の確認

(1) ウレアーゼによる加水分解操作

ウレアーゼは加水分解酵素の一つであり、尿素に対して選択的に作用し、以下に示す化学反応式により二酸化炭素とアンモニアに分解する。したがって、尿素性窒素の定量は試料溶液中の尿素を完全に分解するのに十分なウレアーゼを添加する必要がある。



しかし、市販品のウレアーゼは活性が一定でないものがあり、保存中に低下しやすいことから添加量は、「尿素を分解するのに十分な量のウレアーゼ(約 0.2 g)⁶⁾、温度 40 °C 反応時間 1 時間の場合尿素態窒素 50 mg～60 mg を分解するにウレアーゼ 0.3 g が安全であった。」⁷⁾、「0.1 g～0.5 g⁸⁾又は「0.5 g 以下で尿素 0.25 g を完全に分解するもの」^{2～4, 8)}と概算的に示されているに過ぎず、分析を行う前にウレアーゼの活性又は加水分解能力を測定する必要がある。

近年、和光純薬工業(株)が、あらかじめウレアーゼの活性値を保証したウレアーゼを販売していることから、試料中の尿素を完全に分解するウレアーゼの最小添加量を確認するために、ウレアーゼ(活性値 140 Unit)をそれぞれ 0.1 g, 0.2 g 及び 0.3 g 加えて、回転振り混ぜ機法により CDU を用いて測定したところ、ウレアーゼの添加量が 0.1 g の場合は定量できなかったが、0.2 g 及び 0.3 g では測定値間に大きな差違は認められなかった(表 1)。また、ウレアーゼは製造ロットごとに活性値が異なることから、異なる活性値間の比較が必要である。このため、活性値 130 Unit～150 Unit のウレアーゼを用いて同様に測定したところ大きな差違は認められなかった(表 2)。

表1 ウレアーゼ添加量別定量値

ウレアーゼ添加量 (g)	定量値 ^{a)b)} (%) ^{c)}
0.1	N.D.
0.2	1.63
0.3	1.59

- a) ウレアーゼ活性値 140 Unit
- b) 2点併行試験の平均値
- c) 質量分率

表2 ウレアーゼ活性値別定量値

ウレアーゼ活性値 (Unit)	定量値 ^{a)b)} (%) ^{c)}
130	1.59
140	1.65
150	1.63

- a) ウレアーゼ添加量 0.2 g
- b) 2点併行試験の平均値
- c) 質量分率

(2) 抽出操作方法

ウレアーゼ法が昭和 32 年(1957 年)公定法⁸⁾(試験法 I(表 3))に採用されて以降、試料溶液の抽出方法に種々の改良が加えられていた。「詳解肥料分析法」⁸⁾(試験法 I(表 3))では採用当時の分析法の解説が記述されており、いずれの肥料も水で抽出している。山添らの報告(試験法 II(表 3))⁹⁾では、尿素化合物又は尿素化合物を含む複合肥料の試料の抽出に加水分解を防止するために、20 °C 雰囲気下で抽出溶媒にりん酸塩溶液(冷緩衝液)を使用していた。「第二改訂詳解肥料分析法」²⁾(試験法 III(表 3))では抽出温度を 25 °C に変更している。また、「肥料分析法(1992 年版)」⁴⁾(試験法 IV(表 3))には尿素化合物及び尿素化合物を含む複合肥料の抽出方法が記載されていないが、「肥料等試験法(2016)」⁵⁾のウレアーゼ法(試験法 V(表 3))では試験法

III 及び試験法 IV を参考に書き替えられた方法が記載されている。ウレアーゼ法の抽出方法は、対象とする肥料別に抽出操作が多岐にわたっており、抽出装置として肥料の分析に特有な回転振り混ぜ機を用いている。このことから、ウレアーゼ法においても「肥料等試験法(2016)」の高速液体クロマトグラフ法(試験法 VI(表 3))による抽出操作(抽出装置:マグネチックスターラー, 抽出溶媒:水, 抽出温度:室温)をウレアーゼ法へ適用することの適否を確認することとした。

表3 各試験法の抽出操作

分析法 ^{a)}	対象肥料 ^{b)}	抽出機器	抽出溶媒	抽出温度	抽出時間
試験法I	A	—	水	—	—
	B	回転振り混ぜ機	水	—	30分間
	C	—	水	—	—
	D	—	—	—	—
試験法II	A, B	—	—	—	—
	C, D	回転振り混ぜ機	りん酸塩溶液	20 °C	30分間
試験法III	A	—	水	—	—
	B	回転振り混ぜ機	水	—	30分間
	C, D	回転振り混ぜ機	りん酸塩溶液	25 °C	30分間
試験法IV	A	—	水	—	—
	B	回転振り混ぜ機	水	—	30分間
	C, D	—	—	—	—
試験法V	A, B	回転振り混ぜ機	水	—	30分間
	C, D	回転振り混ぜ機	りん酸塩溶液	—	30分間
試験法VI	A~D	マグネチックスターラー	水	—	10分間

a) 試験法I: 詳解肥料分析法(1962年)

試験法II: 緩効性窒素肥料の分析法に関する研究(第1報)尿素性窒素および可溶性窒素の定量について(1965年)

試験法III: 第二改訂詳解肥料分析法(1988年)

試験法IV: 肥料分析法(1992年版)

試験法V: 肥料等試験法(2016) 6.3.a ウレアーゼ法

試験法VI: 肥料等試験法(2016) 6.3.b 高速液体クロマトグラフ法

b) A: 尿素

B: 尿素を含む複合肥料

C: 尿素化合物

D: 尿素化合物を含む複合肥料

回転振り混ぜ機法は、(A)尿素及び(B)尿素を含む複合肥料は①抽出溶媒として水を用い室温、また、(C)尿素化合物及び(D)尿素化合物を含む複合肥料は②抽出溶媒としてりん酸塩溶液を用い 25 °Cで振り混ぜた。マグネチックスターラー法はいずれの試料も抽出溶媒として水を用い室温でかき混ぜた。尿素について回転振り混ぜ機法とスターラー法の測定値の関係及びそれら測定値の対応のある t 検定により求めた t 絶対値を表 4 に示した。その結果、有意水準 5 % で抽出法方法間の測定値に有意な差は認められなかった。

表4 異なる抽出方法による測定値の比較

試料の種類	回転振り混ぜ機 ^{a)}	スターラー ^{c)}
	(%) ^{b)}	(%) ^{b)}
被覆窒素肥料	38.63	38.66
被覆窒素肥料	39.61	39.53
尿素	43.23	43.78
尿素	44.34	44.82
尿素	44.03	44.44
被覆窒素肥料	35.44	35.01
平均値	40.88	41.04
<i>t</i> 値 ^{d)}		1.014
<i>t</i> 境界値 ^{e)}		2.571

a) 回転振り混ぜ機を用いて抽出した測定値

b) 質量分率

c) スターラーを用いて抽出した測定値

d) 対応のある測定値の平均値の差の検定により求めた *t* 絶対値

e) 5%有意水準(両側)の *t* 境界値

尿素性窒素として質量分率 10%以下の尿素を含む複合肥料並びに尿素化合物及び尿素化合物を含む複合肥料について回転振り混ぜ機法とスターラー法の測定値の関係を図 6 に示した。その回帰式の回帰係数の 95%信頼区間は 1 を含み、切片の 95%信頼区間は 0(原点)を含んでいた。相関係数は $r=0.995$ であり、いずれも肥料等試験法の推奨規準を満たしていた。また、回転振り混ぜ機法の抽出条件①の測定値はプロット「□」、また、抽出条件②の測定値はプロット「○」で図 6-2 に示した。スターラー法の測定値に対する回転振り混ぜ機法の抽出条件別の分布に差は認められなかった。山添ら⁹⁾は、IB(1 点)を水で抽出した尿素性窒素の測定値がりん酸塩溶液で抽出した測定値よりも高かったため、抽出溶媒中で加水分解を起こした結果、測定値に正の誤差を与えていると報告している。IB は、水への溶解度が 0.09 g/100 g 水 (25 °C)¹⁰⁾ であり、pH 4 以下の酸性領域において急速に加水分解が起きる¹¹⁾。しかしながら、化成肥料等の水での抽出は、中性領域であり、抽出時間が 10 分間と比較的短いことから、定量値への影響は認められなかった。

このことから、スターラー法を本法として、以下の真度、精度等の性能評価を実施することとした。

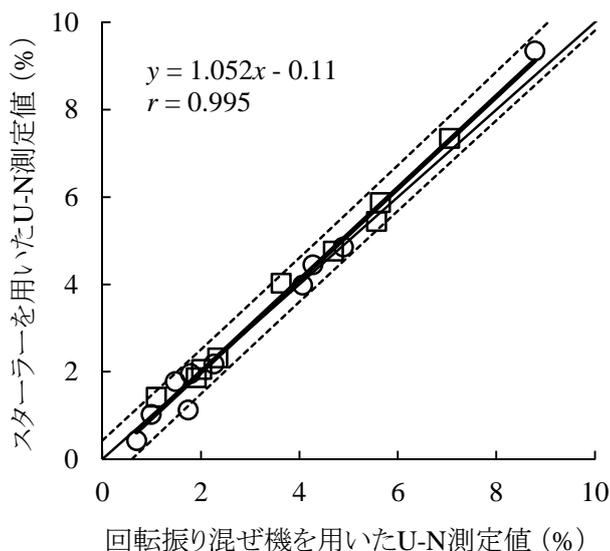


図6 回転振り混ぜ機及びスターラーを用いた抽出方法の U-N 測定値の比較

□: 尿素を含む複合肥料

回転振り混ぜ機(抽出溶媒:水)ースターラー(抽出溶媒:水)

○: 尿素化合物及びそれを含む複合肥料

回転振り混ぜ機(抽出溶媒:りん酸塩溶液)ースターラー(抽出溶媒:水)

太線: 回帰直線, 破線: 予測区間, 細線: $y=x$

(%): 質量分率

2) 調製試料による真度の評価

本法の真度を確認するため、尿素性窒素として質量分率 40 %、10 %、3 % 及び 1 % 相当量の尿素を添加した調製試料(マトリックス: 硫黄, 化成肥料, 洗浄済み IB, UF 入り化成肥料)を用い 3 点併行で尿素性窒素を試験した結果を表 5 に示した。なお、UF 入り化成肥料は尿素性窒素が質量分率 0.53 % 含有していたことから、その含量を用いて回収率を算出した。

尿素性窒素平均定量値が質量分率 1.58 % ~ 39.96 % で、回収率は 98.7 % ~ 103.7 % 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。

表5 試料中の尿素性窒素の真度確認試験成績

基材に用いた肥料	尿素添加量 ^{a)} (%) ^{b)}	尿素性窒素含有量 ^{c)} (%) ^{b)}	定量値 ^{d)} (%) ^{b)}	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)	回収率の目標 ^{e)} (%) ^{b)}
硫黄	85.7	40	39.96	99.9	1.4	98~102
化成肥料	21.4	10	9.95	99.5	2.8	97~103
洗浄済みIB	6.4	3	2.96	98.7	2.2	97~103
UF入り化成肥料 ^{f)}	2.1	1.52 ^{g)}	1.58	103.7	1.9	96~104

a) 基材として利用した肥料に試薬特級の尿素を混合した割合

b) 質量分率

c) 調製した試料中の尿素性窒素含有量

d) 3点併行試験の平均値

e) 肥料等試験法が要求する真度(回収率)の目標

f) 尿素性窒素として質量分率0.53%含有

g) 基材由来の尿素性窒及び尿素由来の尿素性窒素の含量

3) 併行精度及び中間精度の評価

本法の併行精度及び中間精度を確認するため、尿素及びUF入り化成肥料を用いて、尿素を2点併行で日を変えて5回試験して得られた結果を表6-1に示した。また、この結果から一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を表6-2に示した。尿素の平均値は質量分率43.17%で、併行相対標準偏差は0.8%、中間相対標準偏差は1.0%であった。また、UF入り化成肥料の平均値は質量分率2.39%で、併行相対標準偏差は2.9%、中間相対標準偏差は5.2%であった。

尿素の併行相対標準偏差及び中間相対標準偏差は、肥料等試験法に示されているその平均値の濃度における併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安以内の推奨範囲であり、UF入り化成肥料の併行相対標準偏差及び中間相対標準偏差は同精度の目安の1.5倍以内の許容範囲であったことから、本法は十分な精度を有していることが確認された。

表6-1 日を変えての中間精度確認試験成績 (%(質量分率))

試験日	尿素		UF入り化成肥料	
	質量分率	回収率	質量分率	回収率
1	43.32	42.59	2.54	2.46
2	43.21	42.98	2.25	2.38
3	43.95	43.58	2.37	2.29
4	43.50	42.76	2.45	2.59
5	42.97	42.80	2.27	2.27

表6-2 中間精度確認試験成績の統計解析結果

試験品	平均値 ^{a)} (%) ^{b)}	併行精度			中間精度		
		s_r ^{c)}	RSD_r ^{d)}	$CRSD_r$ ^{e)}	$s_{I(T)}$ ^{f)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)}	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)}
		(%) ^{b)}	(%)	(%)	(%) ^{b)}	(%)	(%)
尿素	43.17	0.36	0.8	1	0.43	1.0	2
UF入り化成肥料	2.39	0.07	2.9	2	0.12	5.2	3.5

a) 総平均値(試験日数(5)×2点併行分析)

b) 質量分率

c) 併行標準偏差

d) 併行相対標準偏差

e) 併行精度(併行相対標準偏差)の目安

f) 中間標準偏差

g) 中間相対標準偏差

h) 中間精度(中間相対標準偏差)の目安

4) 定量下限等の確認

本法の定量下限を確認するため、洗浄済み CDU に尿素性窒素として質量分率 0.28 % 相当量の尿素を添加した試料を用いて、7 点併行で試験した結果を表 7 に示した。尿素性窒素の平均定量値は質量分率 0.30 % であり、その標準偏差は質量分率 0.04 % であった。なお、定量下限は標準偏差×10、検出下限は標準偏差×2× $t(n-1,0.05)$ を用いて算出¹²⁾したところ、本法の定量下限は質量分率 0.4 % 程度、検出下限は質量分率 0.2 % 程度と推定された。

肥料公定規格における CDU 等のその他の制限事項には「尿素性窒素は、3.0 % 以下であること」と記述されており、推定した定量下限値(質量分率 0.4 %)はこの制限事項の記述の 1/5 以下であった。このことから、本法は、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。

表7 定量下限確認試験の成績

試験品	添加量 ^{a)} (%) ^{b)}	定量値 ^{c)} (%) ^{b)}	回収率 (%)	標準偏差 (%) ^{b)}	推定定量	推定検出
					下限値 ^{d)}	下限値 ^{e)}
					(%) ^{b)}	(%) ^{b)}
CDU	0.28	0.30	105.6	0.04	0.4	0.2

a) 尿素性窒素としての添加量

b) 質量分率

c) 7点併行試験の平均値

d) 標準偏差×10

e) 標準偏差×2× $t(n-1,0.05)$

5) 流通肥料の分析

2.1) で収集した流通肥料について 3.1) (2) の検討で本法の試験操作への適合を確認したところ、定量を阻害する現象は認められなかった。また、これらの流通肥料を用いて、HPLC 法と本法の測定値の相関を図 7 に示した。また、それぞれの定量値の関係の回帰式を求め、相関係数を算出した。また、尿素性窒素における本法の

95%予測区間を回帰直線の周囲に描いた。その結果、予測区間に若干の広がり認められたものの、回帰式の傾き(1.014)及び切片(0.10)の95%信頼区間は0.948~1.080及び-0.18~0.37であり、肥料等試験法の推奨範囲であった。このことから、HPLC法と本法の測定値は概ね一致し、同様の傾向を示すものであった。

このことから、本法は尿素を含む複合肥料及び尿素化合物中の尿素性窒素の試験に適用できるものであった。

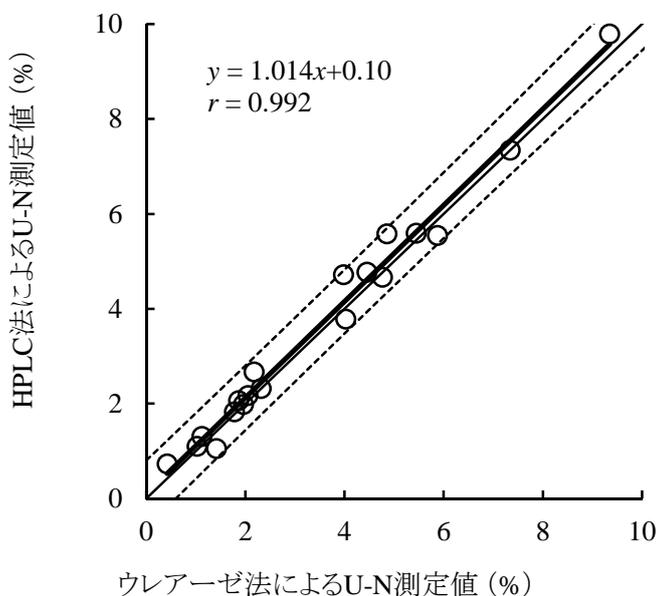


図7 ウレアーゼ法及びHPLC法によるU-N測定値の比較

○: 尿素を含む複合肥料, 尿素化合物及びそれを含む複合肥料
 太線: 回帰直線, 破線: 予測区間, 細線: $y=x$
 (%): 質量分率

4. まとめ

尿素性窒素試験法(ウレアーゼ法)について、試料溶液の調製方法を確認及び一部変更して性能調査を実施したところ、次の結果を得た。

(1) 抽出溶液の加水分解に用いるウレアーゼの必要量は、ウレアーゼ活性値 130 Unit, 140 Unit 及び 150 Unit の場合 0.2 g 以上であった。

(2) 試料溶液調製方法の検討を行い、既存の回転振り混ぜ機を用いる方法とマグネチックスターラーを用いる方法と比較検討した結果、十分な相関を確保できたので汎用的な複合肥料の抽出機器のマグネチックスターラーを用いることとした。なお、既存の方法では、りん酸緩衝液及び抽出温度条件が規定されていたが、水を用いて室温で十分抽出できることを確認した。

(3) 調製試料を用いて回収試験を実施した結果、尿素性窒素の平均値が質量分率 1.58 %~39.96 % の範囲で平均回収率は 98.7 %~103.7 % であり、肥料等試験法の真度の目標を満たしていた。

(4) 併行精度及び中間精度の確認を行った結果、併行相対標準偏差は 0.8 %~2.9 % , 中間相対標準偏差は 1.0 %~5.2 % であり、肥料等試験法に示されている精度の許容範囲であった。

(5) 定量下限等の確認を行った結果、本法における定量下限は質量分率 0.4 % 程度と推定された。

(6) 流通肥料について本法の試験操作への適合を確認したところ、定量を阻害する現象は認められなかつ

た。また、HPLC 法と本法の測定値は概ね一致した。このことから、本法は尿素、尿素を含む複合肥料及び尿素化合物中の尿素性窒素の試験に適用できるものであった。

文 献

- 1) 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 28 年 12 月 19 日, 農林水産省告示第 2535 号
- 2) 越野正義編:第二改訂詳解肥料分析法, p.56~59(1988)
- 3) 恵智正宏, 木村康晴, 白井裕治:高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定 -単一試験室の妥当性確認-, 肥料研究報告, **10**, 72~85(2017)
- 4) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992 年版), p.22~23, 日本肥糧検定協会, 東京 (1992)
- 5) 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 (2016)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2016.pdf >
- 6) 農林省名古屋肥飼料検査所:実用試料検査法, p.73~74(1972)
- 7) 杉野喜一郎:肥料分析法, p.44~47(1947)
- 8) 中村輝雄監修:詳解肥料分析法, p.50-52(1962)
- 9) 山添文雄, 樋口太重:緩効性窒素質肥料の分析法に関する研究(第 1 報)尿素性窒素および可溶性窒素の定量について, 農技研肥料科学資料, **97**, 1~32(1965)
- 10) 尾和尚人, 木村真人, 越野正義, 三枝正彦, 但野利秋, 長谷川功, 吉羽雅昭編集:肥料の辞典, p.136 (2006)
- 11) 加茂誠一, 石丸恒夫:IB 肥料の分析法について, 肥検回報, 1964 年第 3 号, 33~43(1964)
- 12) Codex:“Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009(2009)

Determination Method for Urea Nitrogen in Fertilizer by Urease

Toshifumi FUJITA¹, Kimie KATO¹, Toyokazu NIIMI¹, Yasuharu KIMURA³, Kohei ITO² and Yuji SHIRAI²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

An Urease method for determination of urea nitrogen in fertilizer containing urea and urea compounds was validated as a single-laboratory validation. In the case of the activity for 130, 140 and 150 Unit of the urease, the minimum additive amount for the hydrolysis of the sample solution was 0.2 g. There are two methods of extraction process of the determination for urea nitrogen. One is using the upside down rotary shaker with phosphate buffer under 25°C. The other is using magnetic starrer with water under normal temperature. The comparison tests were conducted between two methods in extraction process. The extracting instrument could substitute magnetic starrer for the upside down rotary shaker. In addition, the extracting solvent and atmosphere could also substitute phosphate water under normal temperature for buffer solution under 25°C. As a result of 3 replicate analysis of 4 fertilizer samples spiked with urea nitrogen at the range from 1.58 % to 39.96% (mass fraction), the mean recovery of urea nitrogen was 98.7 % ~ 103.7 %. In the train of duplicate analysis per 5 days, the repeatability and intermediate precision of urea nitrogen were 0.8 % ~ 2.9 % and 1.0 % ~ 5.2 %, respectively. On the basis of 7 replicate measurements of urea nitrogen added to samples, the *LOQ* value was estimated 0.4 %. These results demonstrated that this method was valid for the determination of urea nitrogen in urea and, complex fertilizer containing urea and urea compounds.

Key words urea nitrogen, urease method, single-laboratory validation

(Research Report of Fertilizer, **10**, 195~207, 2017)