

6 吸光光度法による肥料中の尿素性窒素の測定

高橋伸英¹

キーワード 尿素性窒素, 吸光光度法

1. はじめに

尿素は、植物の窒素源としての速効性を有することから、複合肥料の原料として広く使用されており、堆肥等においては発酵促進材として利用されている。また、肥料取締法の公定規格¹⁾においてはアセトアルデヒド縮合尿素等の制限事項として、尿素性窒素の残存量が公示されており、その分析法として、ウレアーゼ法及び高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法が肥料等試験法 (2017)²⁾に収載されている。これら分析法については、ウレアーゼ法はその操作に熟練を要し、HPLC 法は測定機器の保有が必要とされている。そこで、分析操作が簡便な第二改訂詳解肥料分析法³⁾に参考法として掲載されているジメチルアミノベンズアルデヒドによる吸光光度法について、単一試験室における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) 供試試料

供試試料は、流通している尿素が含まれている普通肥料 18 点、尿素が含まれていない普通肥料 3 点及び特殊肥料 (堆肥) 4 点を用いた (Table 1)。また、JIS 規格に規定されている試薬特級を混合した配合試料を尿素が含まれないものとして用いた。供試試料のうち、固形のものには粉砕機で目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉砕し、水分の多いものは十分に乾燥させたのち、目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉砕した。

Table 1 Fertilizers used in this study

• Fertilizers containing urea			
Urea	3	Coated urea	3
CDU (Cyclo-Di-Urea)	1	Compound fertilizer	4
IB (Isobutylidene diurea)	1	Mixed fertilizer	3
UF (Ureaform)	1	Designated mixed fertilizer	2
• Non-urea fertilizers			
Compound fertilizer	1	Ground crustacean fertilizer	1
Composted sludge fertilizer	1	Compost	4

2) 装置及び器具

- (1) マグネチックスターラー: AS ONE HS-6AN
- (2) 分光光度計: SHIMADZU UV-1800

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 (現)消費安全情報部

- (3) 高速液体クロマトグラフ (HPLC): SHIMADZU Prominence シリーズ
 (4) カラム: Asahipak ES-502C 7C: 長さ 100 mm L×内径 7.5 mm I.D., 粒径 9 μm
 Hamilton PRP-X200: 長さ 150 mm×内径 4.1 mm, 粒径 10 μm

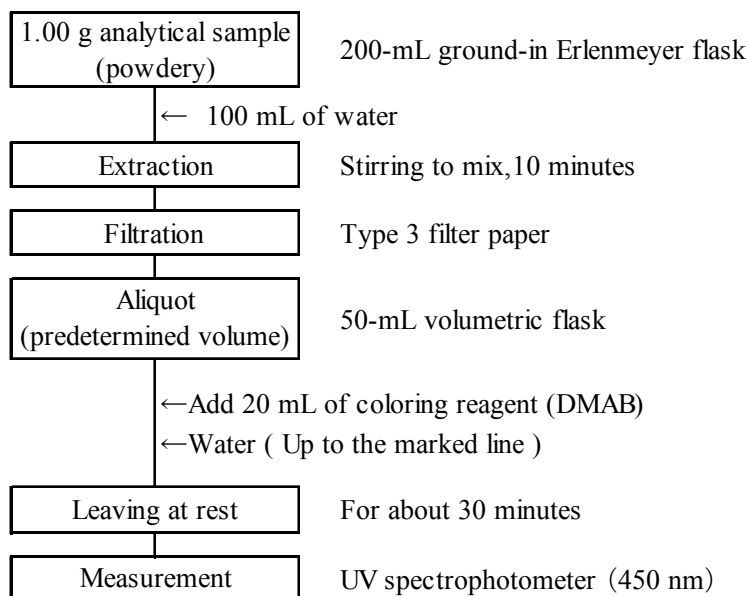
3) 試薬等の調製

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水
 (2) 発色試薬溶液: JIS K 8496 に規定する *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 20 g を JIS K 8101 に規定するエタノール (99.5) 1000 mL 及び JIS K 8180 に規定する塩酸 100 mL に溶かした。
 (3) 尿素性窒素標準液 (200 μg/mL): JIS K 8731 に規定する尿素 0.2145 g を水に溶かして 500 mL とした。
 (4) 検量線用尿素性窒素標準液 (10 μg/mL ~ 100 μg/mL): 尿素性窒素標準液の一定量を水で希釈して 10 μg/mL, 20 μg/mL, 30 μg/mL, 40 μg/mL, 60 μg/mL, 80 μg/mL 及び 100 μg/mL の検量線用尿素性窒素標準液を調製した。
 (5) リン酸塩緩衝液: JIS K 9007 に規定するリン酸二水素カリウム (KH₂PO₄) 3.92 g 及び JIS K 9005 に規定するリン酸 (H₃PO₄) 0.12 g を水に溶かして 1000 mL とした。

4) 試験操作

(1) 吸光光度法

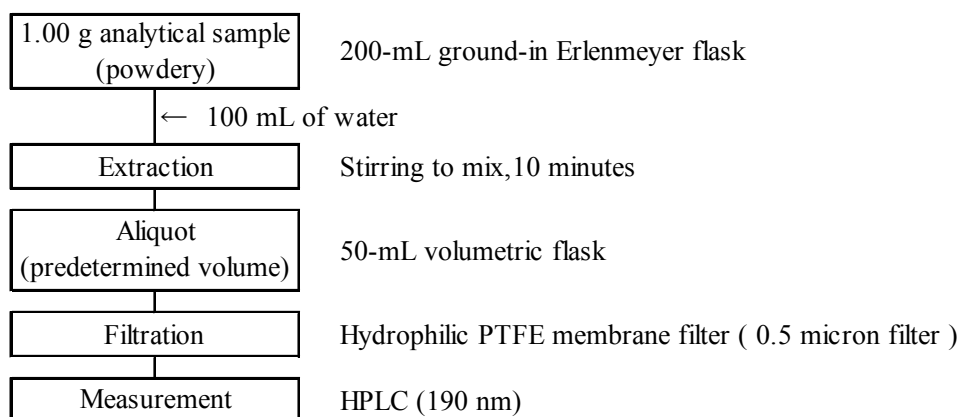
分析試料 1.00 g をはかり取り, 三角フラスコ 200 mL に入れ, 水 100 mL を加え, マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜた後, ろ紙 3 種でろ過したものを抽出液とした。抽出液の一定量を全量フラスコ 50 mL に入れ, 発色試薬溶液を加え, 標線まで水を加えた後, 約 30 分間放置し測定用試料溶液とした (Scheme 1-1)。なお, 試料溶液が着色して定量に影響を及ぼすおそれのある場合は, ろ紙 3 種の上に活性炭約 0.5 g を加えろ過した。



Scheme 1-1 The method flow sheet for Urea Nitrogen (U-N) in fertilizer by UV spectrophotometry

(2) HPLC 法

肥料等試験法に従った。なお、遠心分離はせずに親水性 PTFE メンブレンフィルター(孔径 0.5 μm)でろ過した(Scheme 1-2)。



Scheme 1-2 The method flow sheet for Urea Nitrogen (U-N) in fertilizer by HPLC

3. 結果及び考察

1) 測定条件の検討

(1) 発色試薬溶液の添加量

尿素性窒素 50 $\mu\text{g/mL}$ に発色試薬溶液 5 mL, 10 mL 及び 20 mL を加え吸光度を測定した(Fig. 1)。添加量は吸光度が十分に得られる 20 mL とした。

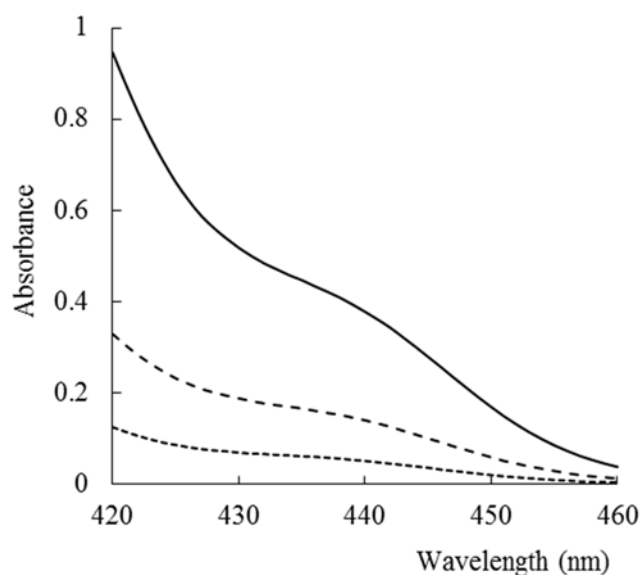


Fig. 1 Effect of coloring reagent addition amount on U-N absorbance curve

U-N concentration: 50 $\mu\text{g/mL}$

Coloring reagent solution addition amount:

— 20 mL - - - 10 mL ····· 5 mL

(2) 測定波長

尿素性窒素 0 $\mu\text{g/mL}$ 及び 10 $\mu\text{g/mL}$ の吸光度を測定した (Fig. 2). 第二改訂詳解肥料分析法では, 425 nm ~ 430 nm 範囲での測定を推奨しているが, その範囲の尿素性窒素 10 $\mu\text{g/mL}$ 吸光度が 0.2~0.4 程度であるのに対し尿素性窒素 0 $\mu\text{g/mL}$ の吸光度は 0.1~0.3 程度と高い. そこで, 尿素性窒素 0 $\mu\text{g/mL}$ の吸光度が低く, 示差率*が 7 倍程度ある 450 nm を測定波長とした.

*示差率 = (10 $\mu\text{g/mL}$ 吸光度 - 0 $\mu\text{g/mL}$ 吸光度) / 0 $\mu\text{g/mL}$ 吸光度

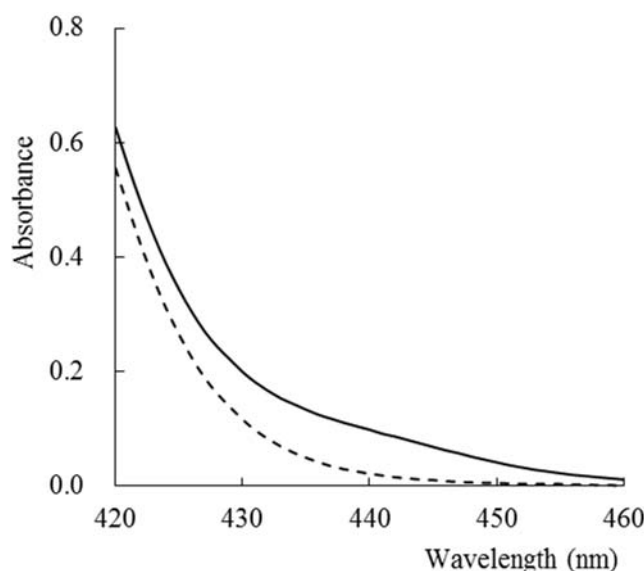


Fig. 2 Effect of coloring reagent addition amount on U-N absorbance curve

U-N concentration: — 10 $\mu\text{g/mL}$ - - - 0 $\mu\text{g/mL}$

2) 検量線の直線性確認

検量線用尿素性窒素標準液 (0 $\mu\text{g/mL}$ ~ 100 $\mu\text{g/mL}$) の吸光度から検量線を作成した (Fig. 3). 検量線は 0 $\mu\text{g/mL}$ ~ 50 $\mu\text{g/mL}$, 0 $\mu\text{g/mL}$ ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ のいずれにおいても直線性を示し, その決定係数 (r^2) は 0.999 以上で肥料等試験法に示されている推奨規準を満たした.

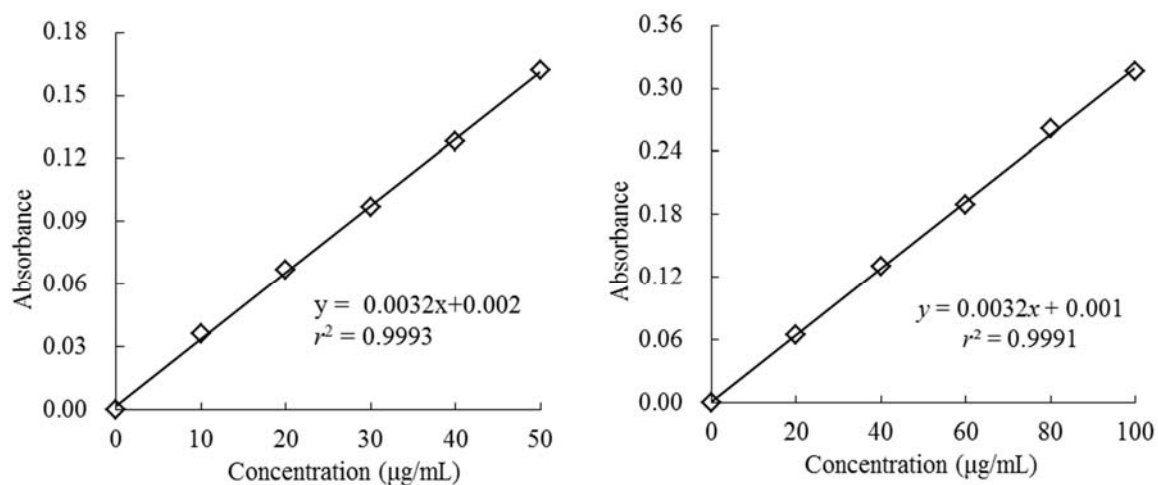


Fig.3 Calibration curves for U-N

3) 着色の影響確認

試料溶液の着色による影響を確認するため、堆肥及び汚泥発酵肥料の吸光度を測定した (Table 2)。なお、供試肥料に使用されている原料は Table 3 のとおりである。いずれも活性炭を加えろ過した溶液を測定したが、堆肥 A, B 及び汚泥発酵肥料で測定に妨害を及ぼす吸光度が確認された。このことから、堆肥及び汚泥肥料は本検討の対象外とした。

Table 2 Filtration test results		Table 3 Materials used in sample	
Sample	Absorbance	Sample	Materials
Compost A	0.032	Compost A	cattle dung
Compost B	0.013	Compost B	cattle dung, poultry dung
Compost C	0.003	Compost C	cattle dung
Compost D	0.002	Compost D	straw, wood
Composted sludge fertilizer	0.079	Composted sludge fertilizer	sludge, food waste, bark

4) 添加回収試験による真度確認

尿素が含まれていない化成肥料、甲殻類質肥料粉末及び調合した配合試料に尿素性窒素として質量分率 3 %、10 % 及び 20 % となるように尿素を加え、3 点併行で添加回収試験を行った (Table 4)。回収率は 98.9 % ~ 103.3 % であり、肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける真度の目標を満たした。

Table 4 Spiking and recovery tests				
Sample	Spike level ^{a)}	recovery ^{c)}	RSD ^{d)}	Criteria of the trueness ^{e)}
	(%) ^{b)}	(%)	(%)	(%)
Compound fertilizer	3	98.9	4.0	96~104
	10	102.0	3.6	97~103
	20	101.3	1.4	97~103
Ground crustacean fertilizer	3	98.0	0.8	96~104
	10	100.8	0.6	97~103
	20	100.0	2.4	97~103
Mixtures (reagent grade materials)	3	103.3	2.3	96~104
	10	100.5	2.6	97~103
	20	102.4	1.2	97~103

a) Spike as U-N

b) Mass fraction

c) Mean recovery ($n=3$)

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of trueness (recovery) show in Testing Methods for Fertilizers (2017)

5) 方法間比較による真度確認

流通している普通肥料 18 点を本法及び肥料等試験法に掲載されている HPLC 法で測定した (Table 5)。発色試薬溶液の *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドはウレイド基に反応して発色するため、イソブチルアルデヒド縮

合尿素及びホルムアルデヒド加工尿素も反応し、両肥料中の尿素性窒素は測定できなかったが、アセトアルデヒド縮合尿素肥料中の尿素性窒素は測定可能であった。また、本法及びHPLC法の分析値の相関図(Fig. 4)を作成したところ、回帰直線の相関係数(r)は 0.999、傾き(b)及び切片(a)の 95 %信頼区間は 0.96~0.99、-0.22~0.46 であり、肥料等試験法の推奨規準をほぼ満たした。

Table 5 U-N measurements in fertilizers

Sample	UV (%) ^{a)}	HPLC (%) ^{a)}
Urea A	46.71	45.20
Urea B	47.54	45.65
Urea C	46.18	45.38
CDU	2.23	x ^{b)}
IB	x ^{b)}	- ^{c)}
UF	x ^{b)}	- ^{c)}
Coated urea A	40.40	40.67
Coated urea B	42.31	41.15
Coated urea C	38.33	37.44
Compound fertilizer A	1.14	1.10
Compound fertilizer B	2.50	2.48
Compound fertilizer C	6.18	6.19
Compound fertilizer D	3.87	3.89
Mixed fertilizer A	2.50	2.39
Mixed fertilizer B	2.04	2.06
Mixed fertilizer C	2.22	2.20
Designated mixed fertilizer A	7.45	7.54
Designated mixed fertilizer B	5.65	5.78

a) Mass fraction

b) Interference of coexisting elements

c) No analysis

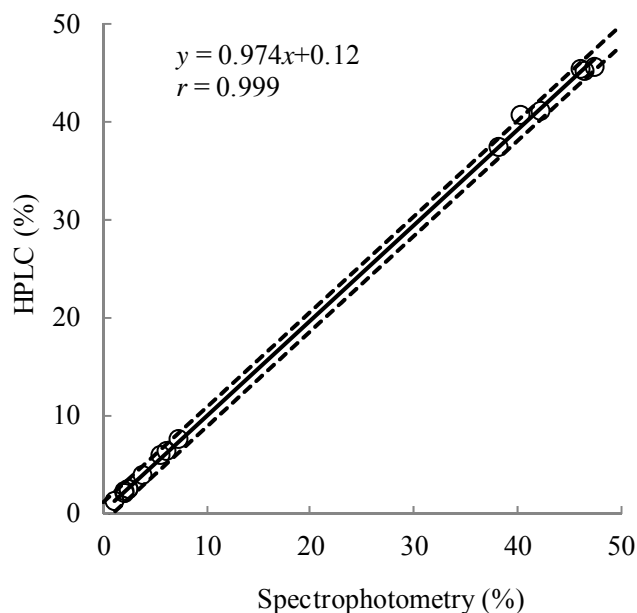


Fig.4 Comparison of HPLC and spectrophotometry for U-N in fertilizers

— Regressin line

- - - Upper and Lower limit of 95 % prediction interval

6) 精度確認

尿素、指定配合肥料及び化成肥料について、2点併行で7日間行った反復試験の分析結果を Table 6-1 に示した。この結果について一元配置分散分析を行い単一試験室における併行精度及び中間精度を求めた (Table 6-2)。各肥料の総平均値は質量分率 1.12 %~45.9 %、その併行精度の併行相対標準偏差は 1.9 %~2.2 %であり、肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける精度の目安の許容値(目安の 2.0 倍)を満たした。また、中間精度の中間相対標準偏差は 2.0 %~2.9 %であり、各濃度レベルにおける精度の目安を満たした。

Table 6-1 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation
(% (Mass fraction))

Test day	Urea		Designated mixed fertilizer		Compound fertilizer	
1	44.60	45.79	7.11	7.14	1.15	1.09
2	46.15	47.07	7.73	7.61	1.18	1.17
3	45.65	45.83	7.53	7.30	1.11	1.08
4	45.71	47.62	7.81	7.29	1.16	1.11
5	46.69	44.57	7.52	7.54	1.08	1.10
6	46.55	46.03	7.50	7.39	1.14	1.11
7	44.72	45.31	7.40	7.39	1.11	1.14

Table 6-2 Statistical analysis of repetition test result for evaluating precision

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)} (%)
Urea	45.9	0.889	1.9	1	0.912	2.0	2
Designated mixed fertilizer	7.45	0.157	2.1	2	0.204	2.7	3.5
Compound fertilizer	1.12	0.024	2.2	2	0.032	2.9	3.5

a) $n=14$ (7 test days \times duplicate measurement)

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

7) 定量下限及び検出下限の確認

定量下限について、肥料等試験法に示されている検量線を用いて推定する方法により算出したところ、質量分率 0.2 % と推定された。そこで、尿素が含まれていない化成肥料に尿素性窒素として質量分率 0.2 % になるように尿素を加え、7 点併行で添加回収試験を行った (Table 7)。回収率は 101.0 % であり、真度の目標を満たした。また、標準偏差より算出した推定検出下限は質量分率 0.07 % と推定された。

Table 7 Spike and recovery test (limit of quantification)

Sample	Spike level ^{a)} (%) ^{b)}	Mean ^{c)} (%) ^{b)}	recovery (%)	s_r (%) ^{b)}	LOD ^{d)} (%) ^{b)}
Compound fertilizer	0.2	0.2	101.0	0.02	0.07

a) Spike as U-N

b) Mass fraction

c) Mean recovery ($n=7$)d) $s_r \times 2 \times t(n-1, 0.05)$

4. まとめ

第二改訂詳解肥料分析法に掲載されている吸光光度法による尿素性窒素の測定について、その妥当性を確認したところ、次の結果を得た。

(1) 測定波長は、第二改訂詳解肥料分析法では、425 nm～430 nm 範囲での測定を推奨しているが、示差率等から、450 nm が適していた。

(2) 堆肥及び汚泥発酵肥料は、試料溶液の着色による影響を受け、活性炭で除去できないものがあった。また、アルデヒド縮合又は加工尿素を含む肥料のうち、アセトアルデヒド縮合尿素肥料中の尿素性窒素は測定可能であることを確認した。

(3) 検量線は、0 µg/mL～100 µg/mL の範囲において直線性を示し、決定係数(r^2)は 0.999 以上で肥料等試験法の推奨規準を満した。

(4) 真度は、質量分率 3 %～20 %の範囲における添加回収試験の結果、平均回収率が 98.9 %～103.3 % であり、各濃度レベルにおける真度目標を満した。また流通している肥料の本法及び HPLC 法による測定値の回帰直線は、相関係数が 0.999, 95 %信頼区間の傾き(b)は 0.96～0.99, 切片(a)は -0.22～0.46 であり、肥料等試験法の推奨規準をほぼ満した。

(5) 精度は、日を変えての反復試験の結果、尿素性窒素の総平均値が質量分率 1.12 %～45.9 %, その併行相対標準偏差は 1.9 %～2.2 %, 中間相対標準偏差は 2.0 %～2.9 % であり、各濃度レベルにおける精度の目安の許容範囲を満した。

(6) 定量下限は、定量下限付近の添加回収試験から、質量分率 0.2 % であり、推定検出下限は質量分率 0.07 % と推定された。

以上のことから、本法は肥料中の尿素性窒素の分析法として単一試験室による妥当性が確認された。

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) 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 (2017)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikengo_2017.pdf>
- 3) 越野正義編:第二改訂詳解肥料分析法, p.60～62 (1988)

Determination of Urea Nitrogen in Fertilizer by Spectrophotometry

Shinei TAKAHASHI¹,

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

(Now) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Food Safety and Consumer Affairs Information Department

Determination of urea nitrogen (U-N) in fertilizer by spectrophotometry was developed and validated as a single-laboratory validation. Samples were extracted by stirring to mix and diluted with water. After adding *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) as coloring reagent, sample solution was analyzed using UV-VIS spectrophotometer (450 nm). As a result of 3 replicate analysis of 3 fertilizer samples spiked with U-N, the mean recoveries were 98.9 % ~ 103.3 %, respectively. In the repetition test of changing the date (7 days), the repeatability relative standard deviation were 1.9 % ~ 2.2 % and relative standard deviation were 0.8 % ~ 1.8 %. The limits of quantification were 0.2% (mass fraction). In the filtration test for compost and composted sludge fertilizer, the interference of colored compounds could not be eliminated. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of U-N in fertilizer (except compost and composted sludge fertilizer).

Key words urea nitrogen, Spectrophotometry

(Research Report of Fertilizer, **11**, 54~62, 2018)