

6.3 尿素性窒素

6.3.a ウレアーゼ法

(1) 概要

この試験法(記号: 6.3.a-2017、U-N.a-1)は尿素を含む肥料又はアセトアルデヒド縮合尿素等の尿素化合物に適用する。ただし、加熱により分解する石灰窒素等の化合物を含む肥料には適用できない場合がある。

水を分析試料に加えて抽出し、ウレアーゼを抽出液の一定量に加えて尿素をアンモニウムイオンに加水分解する。水酸化ナトリウム溶液を加えて溶液をアルカリ性にして水蒸気蒸留する。分離したアンモニアを 0.25 mol/L 硫酸で捕集し、余剰の硫酸を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で(中和)滴定し、別途ウレアーゼ空試験及びウレアーゼ未分解空試験の滴定値を補正して分析試料中の尿素性窒素(U-N)を求める。又は、分離したアンモニアをほう酸溶液で捕集し、アンモニウムイオンを 0.25 mol/L 硫酸で(中和)滴定し、同様に補正して分析試料中のアンモニア性窒素(A-N)を求める。なお、この試験法の性能は備考 11 に示す。

(2) 試薬 試薬は、次による。

a) **0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液⁽¹⁾**: 水約 30 mL をポリエチレン瓶にとり、冷却しながら JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム約 35 g を少量ずつ加えて溶かし、密栓して 4～5 日間放置する。その上澄み液 5.5 mL～11 mL を共栓保存容器にとり、水 1000 mL を加える。

標定: JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質のアミド硫酸をデシケーター中に 2 kPa 以下で約 48 時間放置して乾燥した後、約 2.5 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水で溶かし、全量フラスコ 250 mL に移し入れ、標線まで水を加える⁽¹⁾。この液一定量を三角フラスコ 200 mL～300 mL にとり、指示薬としてプロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が緑色になるまで滴定する。次の式によって 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクターを算出する。

$$0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター}(f_1) \\ = (W_1 \times A \times 0.01/97.095) \times (V_1/V_2) \times (1000/V_3) \times (1/C_1)$$

W_1 : 採取したアミド硫酸の質量(g)

A : アミド硫酸の純度(%(質量分率))

V_1 : 分取したアミド硫酸溶液の容量(mL)

V_2 : アミド硫酸溶液の定容量(250 mL)

V_3 : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

C_1 : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

b) **酸化マグネシウム**: JIS K 8432 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

c) **硫酸**: JIS K 8951 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

d) **0.25 mol/L 硫酸⁽¹⁾⁽²⁾**: 硫酸約 14 mL をあらかじめ水 100 mL を入れたビーカーに加えて良くかき混ぜ、水で 1000 mL とする。

標定: 0.25 mol/L 硫酸一定量⁽³⁾を三角フラスコ 200 mL～300 mL にとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色⁽⁴⁾になるまで滴定する。次の式(1)によって 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量を

算出する。又は、次の式(2)によって 0.25 mol/L 硫酸のファクターを算出する。

$$\begin{aligned} &0.25 \text{ mol/L 硫酸 } 1 \text{ mL に相当する } 0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(B)} \\ &= V_4/V_5 \quad \dots\dots (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &0.25 \text{ mol/L 硫酸のファクター}(f_2) \\ &= (f_1 \times C_1 \times V_4/V_5)/(C_2 \times 2) \quad \dots\dots (2) \end{aligned}$$

V_4 : 滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

V_5 : 標定に供した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

C_1 : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

C_2 : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

- e) **ほう酸溶液(40 g/L)**: JIS K 8863 に規定するほう酸 40 g を水に溶かして 1000 mL とする。
- f) **ウレアーゼ**: ウレアーゼ 0.5 g で尿素 0.25 g を完全に分解する試薬。
- g) **水酸化ナトリウム溶液(5 g/L)⁽¹⁾**: 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 とする。
- h) **塩酸**: JIS K 8180 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- i) **プロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8842 に規定するプロモチモールブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 20 mL で溶かし、水で 100 mL とする。
- j) **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 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- k) **メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8897 に規定するメチレンブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- l) **メチルレッド-メチレンブルー混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) 2 容量に対し、メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL) 1 容量を加える。
- m) **ブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)**: JIS K 8840 に規定するブロムクレゾールグリーン 0.5 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- n) **メチルレッド-ブロムクレゾールグリーン混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) に同量のブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 肥料分析法(1992年版)の標準硫酸液 0.5 M(1/2 硫酸)溶液に対応する。

(3) 5 mL~10 mL

(4) 青紫色から暗青色を経て灰緑色になった時を終点とする。

備考 1. (2)a)の 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いることもできる。

備考 2. (2)d)の 0.25 mol/L 硫酸に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.25 mol/L 硫酸を用いることもできる。

備考 3. ナタマメ由来の精製品が市販されている。冷蔵庫に保存しておいても活性が落ちることがあるので、

使用前に JIS K 8731 に規定する尿素を用いて同様に試験してその活性を確認することを推奨する。

(3) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) **抽出装置**: 次の回転振り混ぜ機又はマグネチックスターラー

aa) **回転振り混ぜ機**: 全量フラスコ 500 mL を 30~40 回転/分で上下転倒して回転させられるもの。

ab) **マグネチックスターラー**

b) **水蒸気蒸留装置**

c) **蒸留フラスコ**: 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ又は丸底フラスコ

d) **水浴**: 40 °C~45 °C に調節できるもの。

(4) **試験操作**

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

(4.1.1) **回転振り混ぜ機を用いる場合**

a) 分析試料 5.00 g をはかりとり、全量フラスコ 500 mL に入れる。

b) 水約 400 mL を加え、30~40 回転/分で約 30 分間振り混ぜる。

c) 標線まで水を加える。

d) ろ紙 3 種でろ過し、抽出液とする。

備考 4. (4.1.1) a) の操作で、分析試料 2.50 g をはかりとり、全量フラスコ 250 mL に入れても良い。

備考 5. (4.1.1) の操作は、4.2.4.a の(4.1.1.1)と同様の操作である。

(4.1.2) **マグネチックスターラーを用いる場合**

a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。

b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。

c) ろ紙 3 種でろ過し、抽出液とする。

備考 6. (4.1.2) の操作は、6.3.b の(4.1.1)と同様の操作である。

(4.2) **ウレアーゼによる加水分解** 加水分解は、次のとおり行う。

a) 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 に入れる。

b) 水を加えて液量を約 50 mL とする。

c) 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水酸化ナトリウム溶液(5 g/L)又は塩酸(1+200)を加える⁽⁶⁾。

e) 抽出液中の尿素を分解するために十分な量のウレアーゼを加え⁽⁷⁾⁽⁸⁾、密栓して 40 °C~45 °C の水浴中で加温する。

f) 放冷して試料溶液とする。

g) 抽出液空試験として、別の蒸留フラスコを用いて a) の操作を実施し⁽⁹⁾、未分解試験溶液を調製する。

h) ウレアーゼ空試験として、別の蒸留フラスコを用いて b)、e) 及び f) の操作を実施し⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾、空試験溶液を調製する。

注(6) pH 5.6～pH 5.8

- (7) ウレアーゼの添加量の一例を**備考 20**に示す。
- (8) ウレアーゼが容器の壁面についた場合、少量の水で洗い落とす。
- (9) 試料溶液の調製と同量の抽出液を分取する。
- (10) 試料溶液の調製と同量のウレアーゼを加える。

(4.3) 蒸留 蒸留は、次のとおり行う。具体的な蒸留操作は、測定に使用する水蒸気蒸留装置の操作方法による。

- a) 0.25 mol/L 硫酸の一定量⁽¹¹⁾を受器⁽¹²⁾にとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。又は、ほう酸溶液(40 g/L)の一定量⁽¹¹⁾を受器⁽¹²⁾にとり、メチルレッドーブロムクレゾールグリーン混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。
- b) 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⁽¹³⁾、この蒸留フラスコを水蒸気蒸留装置に連結する。
- c) 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 で蒸留を行う。
- d) 120 mL～160 mL が留出したら蒸留を止める。
- e) 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る。
- f) 未分解試験溶液を a)～e)と同様に操作して未分解試験溶液よりの留出液を得る。
- h) 空試験溶液を a)～e)と同様に操作して空試験溶液よりの留出液を得る。

注(11) 5 mL～20 mL

- (12) 受器は水蒸気蒸留装置の留出液の出口を 0.25 mol/L 硫酸又はほう酸溶液(40 g/L)に浸せる三角フラスコ 200 mL～300 mL 又はビーカー200 mL～300 mL を用いる。
- (13) 必要に応じて、少量のシリコーン油を加える。

備考 7. (4.3) b)の操作は、容器内のアンモニアガスが放出しないように素早く実施する。

(4.4) 測定 測定は、次のとおり行う。

(4.4.1) (4.3)で 0.25 mol/L 硫酸を用いた場合

- a) 留出液を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色⁽⁴⁾になるまで滴定する。
- b) 未分解試験溶液よりの留出液を a)と同様に操作して滴定する。
- c) 空試験溶液よりの留出液を a)と同様に操作して滴定する。
- e) 次の式によって分析試料中の尿素性窒素(U-N)を算出する。

分析試料中の尿素性窒素(U-N) (%(質量分率))

$$\begin{aligned}
 &= ((B \times V_6 - V_7) - (B \times V_6 - V_8) - (B \times V_6 - V_9)) \times C_1 \times f_1 \times (V_{10}/V_{11}) \times (14.007/W_2) \times (100/1000) \\
 &= (- (B \times V_6) - (V_7 - V_8 - V_9)) \times C_1 \times f_1 \times (V_{10}/V_{11}) \times (1.4007/W_2)
 \end{aligned}$$

B: 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量

- V_6 : (4.3) a)において受器にとった 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)
 V_7 : (4.4.1) a)において滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)
 V_8 : (4.4.1) b)において滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)
 V_9 : (4.4.1) c)において滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)
 C_1 : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)
 f_1 : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター
 V_{10} : (4.1.1) c)における抽出液の定容量(mL)又は(4.1.2) b)における水の添加量(mL)
 V_{11} : (4.2) a)において加水分解に供した抽出液の分取量(mL)
 W_2 : (4.1.1) a)又は(4.1.2) a)における分析試料の質量(g)

(4.4.2) (4.3)でほう酸溶液(40 g/L)を用いた場合

- a) 留出液を 0.25 mol/L 硫酸で溶液の色がうすい紅色⁽¹⁴⁾になるまで滴定する。
 b) 未分解試験溶液よりの留出液を a)と同様に操作して滴定する。
 c) 空試験溶液よりの留出液を a)と同様に操作して滴定する。
 e) 次の式によって分析試料中の尿素性窒素(U-N)を算出する。

分析試料中の尿素性窒素(U-N) (%(質量分率))

$$\begin{aligned}
 &= (V_{12} - V_{13} - V_{14}) \times C_2 \times 2 \times f_2 \times (V_{10}/V_{11}) \times (14.007/W_2) \times (100/1000) \\
 &= (V_{12} - V_{13} - V_{14}) \times C_2 \times f_2 \times (V_{10}/V_{11}) \times (2.8014/W_2)
 \end{aligned}$$

- V_{12} : (4.4.2) a)において滴定に要した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)
 V_{13} : (4.4.2) b)において滴定に要した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)
 V_{14} : (4.4.2) c)において滴定に要した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)
 C_2 : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)
 f_2 : 0.25 mol/L 硫酸のファクター
 V_{10} : (4.1.1) c)における抽出液の定容量(mL)又は(4.1.2) b)における水の添加量(mL)
 V_{11} : (4.2) a)において加水分解に供した抽出液の分取量(mL)
 W_2 : (4.1.1) a)又は(4.1.2) a)における分析試料の質量(g)

注(14) 緑色からうすい紅色になった時を終点とする。

備考 8. 酸化マグネシウムを用いることにより、抽出液中に炭酸塩に由来する二酸化炭素のために終点が見にくい場合は、蒸留終了後抽出液を1~2分間煮沸し、冷却後滴定するとよい。

備考 9. 自動滴定装置を用いて(2) a) **標定**、(2) d) **標定**及び(4.4)の滴定操作を実施することができる。滴定プログラム及び終点判定パラメーターの設定並びに受器等の容器は、使用する自動滴定装置の仕様及び操作方法による。

備考 10. ウレアーゼの添加量及び滴定量の一例を次に示す。

尿素有量が推定できる場合、(4.2) a)における抽出液の分取量中の尿素有量は次式により算出される。

抽出液の分取量中の尿素の推定量(mg)

$$= (D_1/100) \times W_2 \times (V_{11}/V_{10})$$

D_1 : 分析試料中の尿素の推定量(%(質量分率))

V_{10} : (4.1.1 c) 又は (4.1.2 c) における抽出液の定容量(mL)

V_{11} : (4.2 a) において加水分解に供した抽出液の分取量(mL)

W_2 : (4.1.1 a) 又は (4.1.2 a) における分析試料の質量(g)

尿素の含有量が推定できない場合は、尿素化合物の尿素性窒素の含有許容量又は表示成分量の窒素全量からアンモニア性窒素及び硝酸性窒素を差し引いた窒素量を尿素性窒素(U-N)の含有量の最大量付近として見積もる。この場合、(4.1.1) 又は (4.1.1) の操作後の (4.2 a) における抽出液の分取量中の尿素の見積量は次式により算出される。

抽出液の分取量中の尿素の見積量(mg)

$$= (D_2/100) \times (60.056/(14.007 \times 2)) \times W_2 \times (V_{11}/V_{10})$$

$$= (D_2/100) \times 2.1438 \times W_2 \times (V_{11}/V_{10})$$

D_2 : 分析試料中の尿素性窒素(U-N)の見積量(%(質量分率))

V_{10} : (4.1.1 c) 又は (4.1.2 c) における抽出液の定容量(mL)

V_{11} : (4.2 a) において加水分解に供した抽出液の分取量(mL)

W_2 : (4.1.1 a) 又は (4.1.2 a) における分析試料の質量(g)

ウレアーゼは「0.5 g 以下で尿素 0.25 g を完全に分解するもの」と規定されていることから、尿素 1 mg の分解にはウレアーゼ 2 mg 程度必要となる。抽出液の分取量中の尿素の推定量又は見積量を約 43 mg (尿素性窒素として約 20 mg) とした場合、ウレアーゼは約 86 mg 必要となる。ウレアーゼ(力価 130 unit~150 unit) 0.2 g を加えた場合、尿素性窒素(U-N)として 10 mg~100 mg 相当量を含有する抽出液を加水分解することができる。

なお、尿素性窒素として約 20 mg 分取した際、試料溶液からの留出液の滴定値((4.4.2 a) 又は (4.4.2 a))と未分解試験溶液よりの留出液の滴定値((4.4.2 a) 又は (4.4.2 a))の差は、滴定液として 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いた場合は 14 mL 程度、0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いた場合は 7 mL 程度、0.25 mol/L 硫酸を用いた場合は 3 mL 程度と推定される。

備考 11. 真度の評価のため、硫黄、化成肥料、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入り複合肥料各 1 点に尿素を添加して調製した試料を用いて添加回収試験を行った結果、1.58 %(質量分率)~39.96 %(質量分率)の添加レベルでの平均回収率は 98.7 %~103.7 %であった。

精度の評価のため、尿素及び UF 入り化成肥料各 1 点を用いて、日を変えての反復試験の試験成績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 に示す。

この試験法の定量下限は、質量分率 0.4 %程度である。

表1 日を変えての反復試験成績解析

試験品	反復試験		併行精度		中間精度	
	日数 $T^{1)}$	平均値 ²⁾ (%) ³⁾	$s_r^{4)}$ (%)	$RSD_r^{5)}$ (%)	$s_{1(T)}^{6)}$ (%)	$RSD_{1(T)}^{7)}$ (%)
尿素	5	43.17	0.36	0.8	0.43	1.0
UF入り化成肥料	5	2.39	0.07	2.9	0.12	5.2

1) 総平均値(試験日数(5)×2点併行分析)

4) 併行標準偏差

2) 平均値(試験日数(T)×併行試験数(2))

5) 併行相対標準偏差

3) 質量分率

6) 中間標準偏差

7) 中間相対標準偏差

参考文献

1) 越野正義：第二改訂詳解肥料分析法, p.56~59, 養賢堂, 東京 (1988)

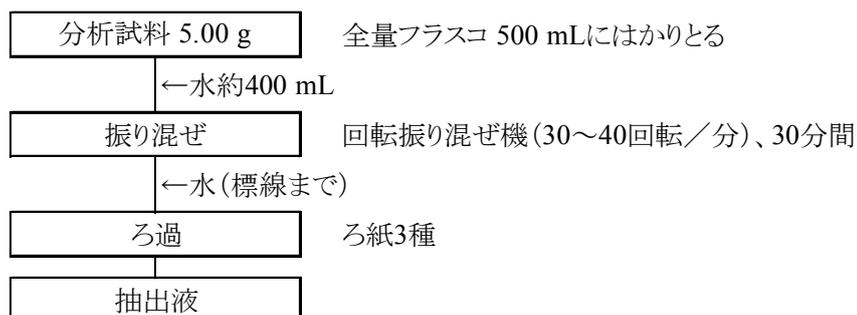
(5) **尿素性窒素試験法フローシート** 肥料中の尿素性窒素試験法のフローシートを次に示す。

図1-1 尿素性窒素試験法フローシート(抽出操作(4.1.1))

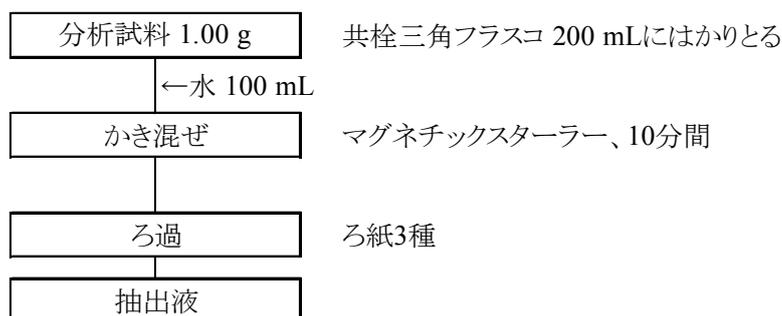


図1-2 尿素性窒素試験法フローシート(抽出操作(4.1.2))

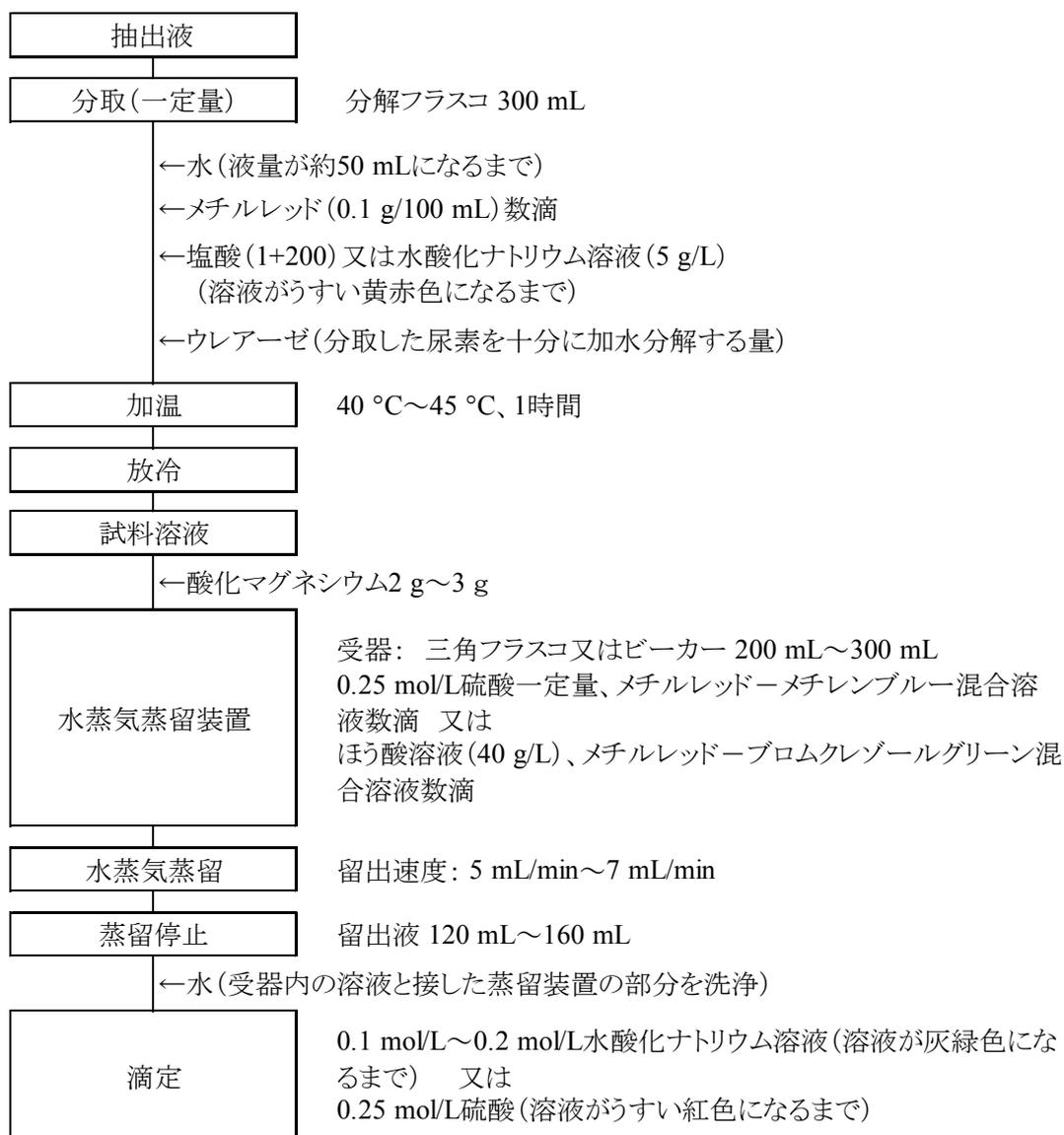


図2 尿素性窒素試験法フローシート(ウレアーゼによる加水分解、蒸留及び測定操作)

6.3.b 高速液体クロマトグラフ法

(1) 概要

この試験法(記号: 6.3.b-2017、U-N.b-1)は肥料に適用する。

分析試料に水を加えて尿素を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、弱酸性イオン交換カラムで分離し、波長 190 nm で測定し、分析試料中の尿素性窒素(U-N)を求める。この方法の性能は備考 5 に示す。

この方法によって、ビウレット性窒素(B-N)ジシアンジアミド性窒素(Dd-N)、グアニジン性窒素(Gd-N)及びグアニル尿素性窒素(GU-N)が同時に測定できる(備考 4 参照)。

(2) 試薬 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) リン酸二水素カリウム: JIS K 9007 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- c) リン酸: JIS K 9005 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- d) 尿素性窒素標準液(U-N 2 mg/mL)⁽¹⁾: JIS K 8731 に規定する尿素 0.429 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで水を加える。
- e) 検量線用尿素性窒素標準液(U-N 200 µg/mL): 尿素性窒素標準液(U-N 2 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- f) 検量線用尿素性窒素標準液(U-N 50 µg/mL~100 µg/mL): 尿素性窒素標準液(U-N 200 µg/mL) 25 mL~50 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- g) 検量線用尿素性窒素標準液(U-N 1 µg/mL~50 µg/mL): 使用時に尿素性窒素標準液(U-N 0.1 mg/mL)を 1 mL~50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
 - 1) カラム: 内径 7.5 mm、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5 µm~10 µm の弱酸性イオン交換樹脂を充てんしたもの。
 - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
 - 3) 検出器: 吸光光度検出器で波長 190 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 1. カラムは Asahipak ES-502C 7C の名称で市販されている。

(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 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。

- c) 静置後、上澄み液⁽²⁾を共栓遠心沈殿管⁽³⁾1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁴⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注 (2) 試料溶液中の尿素性窒素(U-N)濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(3) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(4) 回転半径 7.2 cm \sim 8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 $8100 \times g \sim 10000 \times g$ 程度となる。

(4.1.2) 液状分析用試料

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 100 mL に入れる。
- b) 水約 50 mL を加えて、振り混ぜる。
- c) 標線まで水を加え⁽⁵⁾、共栓遠心沈殿管⁽³⁾1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁴⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注 (5) 試料溶液中の尿素性窒素(U-N)濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、定容した溶液の一定量を水で希釈する。

備考 2. (4.1.1)c)~d) 又は(4.1.2)c)~d)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフの測定条件:** 測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** 弱酸性イオン交換樹脂カラム(内径 7.5 mm、長さ 100 mm、粒径 5 $\mu\text{m} \sim 10 \mu\text{m}$)
- 2) **カラム槽温度:** 40 $^{\circ}\text{C}$
- 3) **溶離液⁽¹⁾:** りん酸二水素カリウム 3.92 g 及びりん酸 0.12 g を水に溶かして 1000 mL とする。親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過する。
- 4) **流量:** 0.6 mL/min
- 5) **注入量:** 10 μL
- 6) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 190 nm

備考 3. 溶離液は、りん酸二水素カリウム 19.6 g 及びりん酸 0.584 g を水に溶かして 500 mL とし、冷蔵保存し、使用時にその一定量を 10 倍に希釈し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過して調製してもよい。

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 10 μL を HPLC に注入し、波長 190 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク高さを求める。
- 2) 各検量線用標準液の尿素性窒素(U-N)濃度と波長 190 nm のピーク高さとの検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10 μL を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) ピーク高さから検量線より尿素性窒素 (U-N) 量を求め、分析試料中の尿素性窒素 (U-N) を算出する。

備考 4. この試験法ではビウレット性窒素 (B-N)、尿素性窒素 (U-N)、ジシアンジアミド性窒素 (Dd-N)、グアニジン性窒素 (Gd-N) 及びグアニル尿素性窒素標準液 (GU-N) の同時測定が可能である。その場合は、**5.10.a 備考 5** を参照のこと。

なお、ホルムアルデヒド加工尿素 (UF) を含む複合肥料中の尿素性窒素 (U-N) の分析に HPLC 用カラムとして Asahipak ES-502C 7C を用いた場合、尿素性窒素 (U-N) のピークと UF 由来の成分の夾雑成分のピークが分離されず、尿素性窒素 (U-N) の測定ができない。この場合、HPLC 用カラムを PRP-X200 に変更することによって尿素性窒素 (U-N) のピークと夾雑成分のピークが分離され、UF を含む複合肥料中の尿素性窒素 (U-N) を分析できる。ただし、HPLC 用カラムとして PRP-X200 カラムを用いた場合、尿素性窒素 (U-N) とビウレット性窒素 (B-N) 等との同時測定はできない。

備考 5. 真度の評価のため、アセトアルデヒド縮合尿素肥料、化成肥料、配合肥料、液状複合肥料及び家庭園芸用複合肥料各 1 銘柄を用いて添加回収試験を実施した結果、6 % (質量分率)、3 % (質量分率) 及び 0.6 % (質量分率) の添加レベルでの平均回収率はそれぞれ 98.3 %~102.9 %、98.9 %~105.2 % 及び 92.3 %~99.9 % であった。

精度の評価のため、配合肥料、化成肥料及び家庭園芸用複合肥料を用いて日を変えての反復試験の試験成績について一元配置分散分析を用いて解析し、中間精度及び併行精度を算出した結果を表 1 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 0.03 % (質量分率) 程度である。

表1 日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験		併行精度		中間精度	
	回数 $T^{1)}$	平均値 ²⁾ (%) ³⁾	$s_r^{4)}$ (%) ³⁾	$RSD_r^{5)}$ (%)	$s_{I(T)}^{6)}$ (%) ³⁾	$RSD_{I(T)}^{7)}$ (%)
配合肥料	5	6.24	0.03	0.5	0.05	0.8
化成肥料	5	3.01	0.03	0.7	0.04	1.4
家庭園芸用複合肥料	5	0.315	0.003	0.9	0.005	0.9

1) 2点併行試験を実施した試験回数

2) 平均値 (試験回数 T) \times 併行試験数 (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2 尿素性窒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⁾ (%)
化成肥料1	8	0.296	0.011	3.6	0.012	4.1
化成肥料2	10	0.589	0.015	2.6	0.024	4.1
化成肥料3	10	3.08	0.04	1.1	0.06	2.0
化成肥料4	10	6.03	0.11	1.7	0.20	3.4
化成肥料5	10	46.5	0.6	1.4	1.3	2.8

- | | |
|----------------------------|---------------|
| 1) 解析に用いた試験室数 | 5) 併行相対標準偏差 |
| 2) 平均値 (n =試験室数×試料数(2)) | 6) 室間再現標準偏差 |
| 3) 質量分率 | 7) 室間再現相対標準偏差 |
| 4) 併行標準偏差 | |

(5) 試験法フローシート 肥料中の尿素性窒素試験法のフローシートを次に示す。

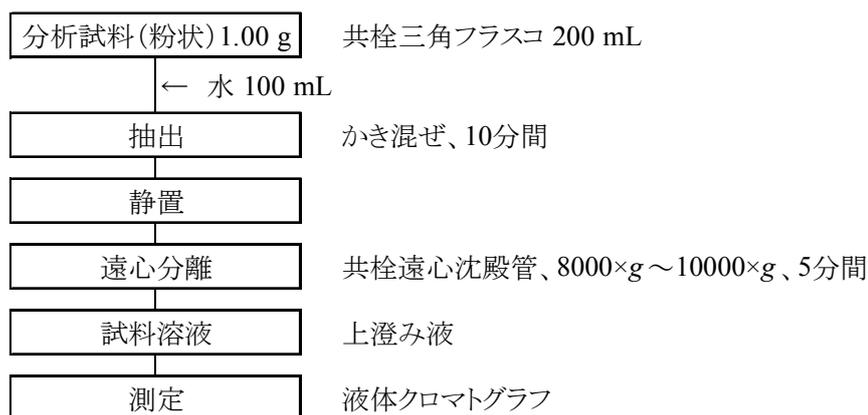


図1 肥料中の尿素性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.1)及び測定)

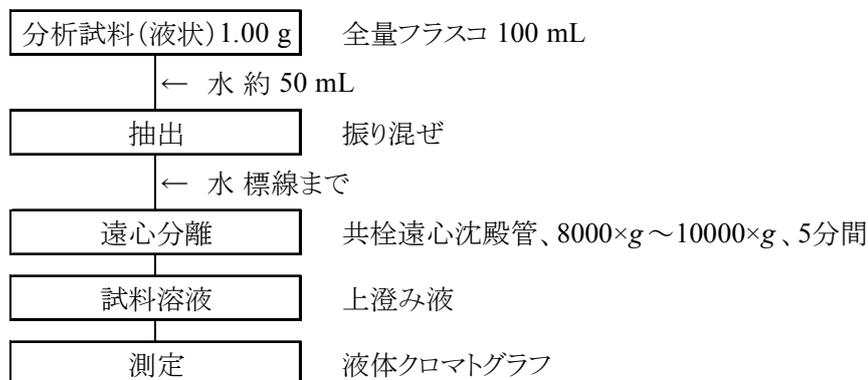
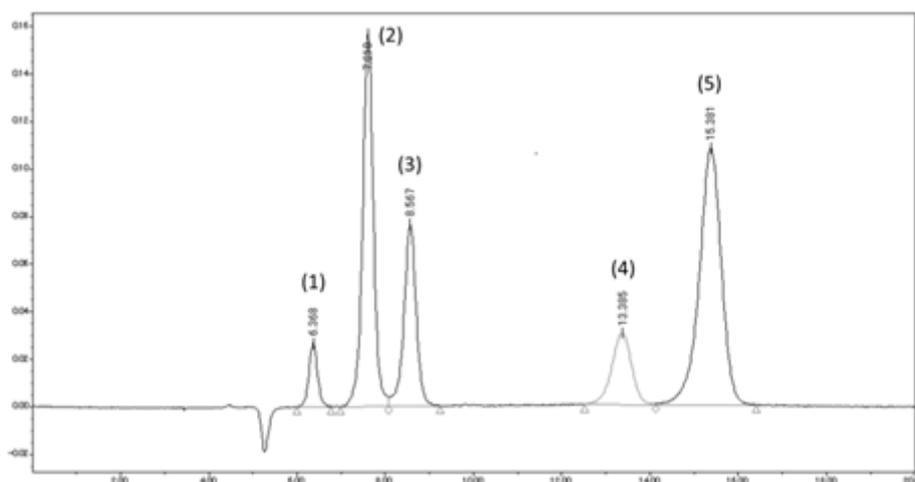


図2 肥料中の尿素性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.2)及び測定)

参考 尿素性窒素の検量線用標準液のクロマトグラムを次に示す。



参考図1 検量線用混合標準液(各 10 mg/L)の HPLC クロマトグラム

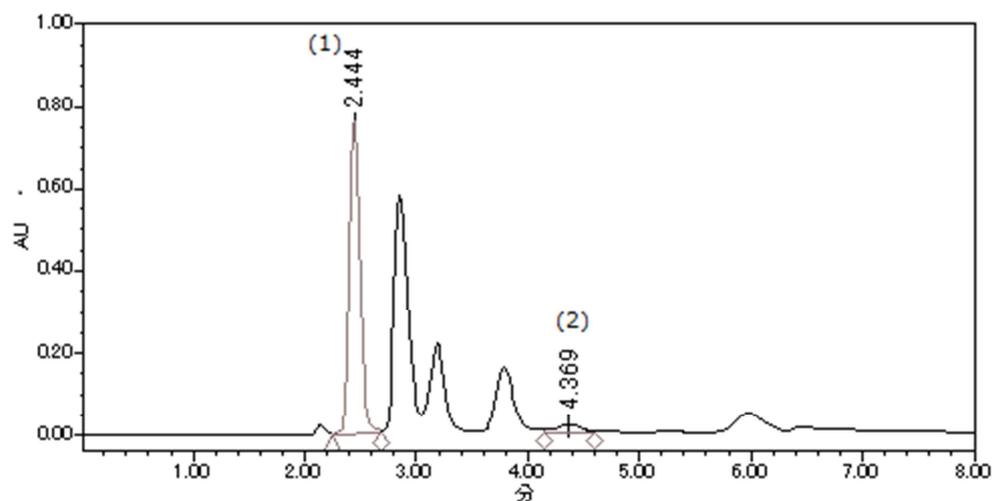
ピーク名

- (1)尿素性窒素 (2)ビウレット性窒素 (3)ジシアンジアミド性窒素
(4)グアニジン性窒素 (5)グアニル尿素性窒素

HPLC の測定条件

カラム: Asahipak ES-502C 7C(内径 7.5 mm、長さ 100 mm、粒径 9 μm)

その他の条件は(4.2) a)HPLC 測定条件の例示のとおり



参考図2 検量線用尿素性窒素標準液(20 mg/L)及びホルムアルデヒド加工尿素肥料の

HPLC クロマトグラム

ピーク名

- (1)尿素性窒素 (2)ビウレット性窒素

HPLC の測定条件

カラム: PRP-X200(内径 4.1 mm、長さ 150 mm、粒径 10 μm)

その他の条件は(4.2) a)HPLC 測定条件の例示のとおり

6.4 グアニジン性窒素

6.4.a 高速液体クロマトグラフ法

(1) 概要

この試験法(記号: 6.4.a-2017、Gd-N.a-1)は肥料に適用する。

分析試料に水を加えてグアニジンを抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、弱酸性イオン交換カラムで分離し、波長 190 nm で測定し、分析試料中のグアニジン性窒素(Gd-N)を求める。この方法の性能は備考 6 に示す。

この方法によって、ピウレット性窒素(B-N)、ジシアンジアミド性窒素(Dd-N)、尿素性窒素(U-N)及びグアニル尿素性窒素(GU-N)が同時に測定できる(備考 5 参照)。

(2) 試薬 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) リン酸二水素カリウム: JIS K 9007 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- c) リン酸: JIS K 9005 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- d) グアニジン性窒素標準液(Gd-N 2 mg/mL)⁽¹⁾: グアニジン硫酸塩[C₂H₁₀N₆・H₂SO₄]⁽²⁾ 0.515 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで水を加える。
- e) 検量線用グアニジン性窒素標準液(Gd-N 200 µg/mL): グアニジン性窒素標準液(Gd-N 2 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- f) 検量線用グアニジン性窒素標準液(Gd-N 50 µg/mL~100 µg/mL): グアニジン性窒素標準液(Gd-N 200 µg/mL) 25 mL~50 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- g) 検量線用グアニジン性窒素標準液(Gd-N 1 µg/mL~50 µg/mL): 使用時にグアニジン性窒素標準液(Gd-N 100 µg/mL) を 1 mL~50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) グアニジン硫酸塩として 98 % (質量分率) 以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. グアニジン硫酸塩は和光純薬工業及び関東化学及び東京化成工業より市販されている。

(3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
 - 1) カラム: 内径 7.5 mm、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5 µm~10 µm の弱酸性イオン交換樹脂を充てんしたもの。
 - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
 - 3) 検出器: 吸光光度検出器で波長 190 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Asahipak ES-502C 7C の名称で市販されている。

(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 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液⁽³⁾を共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾ 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁵⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注 (3) 試料溶液中のグアニジン性窒素 (Gd-N) 濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(4) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(5) 回転半径 7.2 cm \sim 8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 $8100 \times g \sim 10000 \times g$ 程度となる。

(4.1.2) 液状分析用試料

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 100 mL に入れる。
- b) 水約 50 mL を加えて⁽⁶⁾、振り混ぜる。
- c) 標線まで水を加え、共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾ 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁵⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注 (6) 試料溶液中のグアニジン性窒素 (Gd-N) 濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、定容した溶液の一定量を水で希釈する。

備考 3. (4.1.1)c)～d) 又は(4.1.2)c)～d)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μ m 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) 測定 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフの測定条件:** 測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** 弱酸性イオン交換樹脂カラム(内径 7.5 mm、長さ 100 mm、粒径 5 μ m \sim 10 μ m)
- 2) **カラム槽温度:** 40 $^{\circ}$ C
- 3) **溶離液⁽¹⁾:** りん酸二水素カリウム 3.92 g 及びりん酸 0.12 g を水に溶かして 1000 mL とする。親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μ m 以下)でろ過する。
- 4) **流量:** 0.6 mL/min
- 5) **注入量:** 10 μ L
- 6) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 190 nm

備考 4. 溶離液は、りん酸二水素カリウム 19.6 g 及びりん酸 0.584 g を水に溶かして 500 mL とし、冷蔵保存し、使用時にその一定量を 10 倍に希釈し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μ m 以下)でろ過して調製してもよい。

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 10 μL を HPLC に注入し、波長 190 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク高さを求める。
- 2) 各検量線用標準液のグアニジン性窒素 (Gd-N) 濃度と波長 190 nm のピーク高さとの検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10 μL を b) 1) と同様に操作する。
- 2) ピーク高さから検量線よりグアニジン性窒素 (Gd-N) 量を求め、分析試料中のグアニジン性窒素 (Gd-N) を算出する。

備考 5. この試験法ではビウレット性窒素 (B-N)、尿素性窒素 (U-N)、ジシアンジアミド性窒素 (Dd-N)、グアニジン性窒素 (Gd-N) 及びグアニル尿素性窒素標準液 (GU-N) の同時測定が可能である。その場合は、5.10.a 備考 5 を参照のこと。

備考 6. 真度の評価のため、グアニル尿素肥料様調製試料 1 銘柄を用いて添加回収試験を実施した結果、3.71 % (質量分率)、1.85 % (質量分率) 及び 0.371 % (質量分率) の添加レベルでの平均回収率はそれぞれ 91.2 %、94.0 % 及び 100.0 % であった。

精度の評価のため、グアニル尿素肥料を用いて日を変えての反復試験の試験成績について一元配置分散分析を用いて解析し、中間精度及び併行精度を算出した結果を表 1 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 0.02 % (質量分率) 程度である。

表1 日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験		併行精度		中間精度	
	日数	平均値 ²⁾	s_r ⁴⁾	RSD_r ⁵⁾	$s_{I(T)}$ ⁶⁾	$RSD_{I(T)}$ ⁷⁾
	T ¹⁾	(%) ³⁾	(%) ³⁾	(%)	(%) ³⁾	(%)
グアニル尿素肥料	5	1.81	0.01	0.8	0.04	2.0

1) 2点併行試験を実施した試験日数

2) 平均値 (試験日数 (T) \times 併行試験数 (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2 グアニジン性窒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⁾ (%)
化成肥料1	12	4.91	0.18	3.7	0.29	5.8
化成肥料2	12	3.94	0.16	4.2	0.27	6.8
化成肥料3	11	3.03	0.06	2.0	0.12	4.0
化成肥料4	11	2.05	0.05	2.6	0.09	4.2
グアニル尿素肥料	11	5.13	0.21	4.0	0.19	3.6

- | | |
|----------------------------|---------------|
| 1) 解析に用いた試験室数 | 5) 併行相対標準偏差 |
| 2) 平均値 (n =試験室数×試料数(2)) | 6) 室間再現標準偏差 |
| 3) 質量分率 | 7) 室間再現相対標準偏差 |
| 4) 併行標準偏差 | |

(5) 試験法フローシート 肥料中のグアニジン性窒素試験法のフローシートを次に示す。

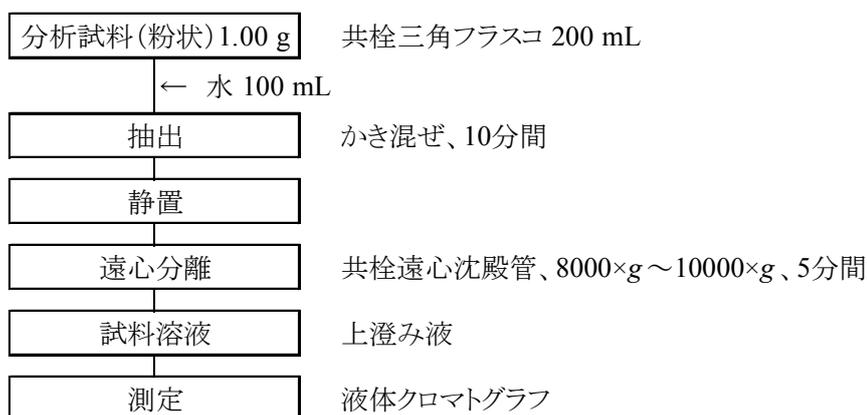


図1 肥料中のグアニジン性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.1)及び測定)

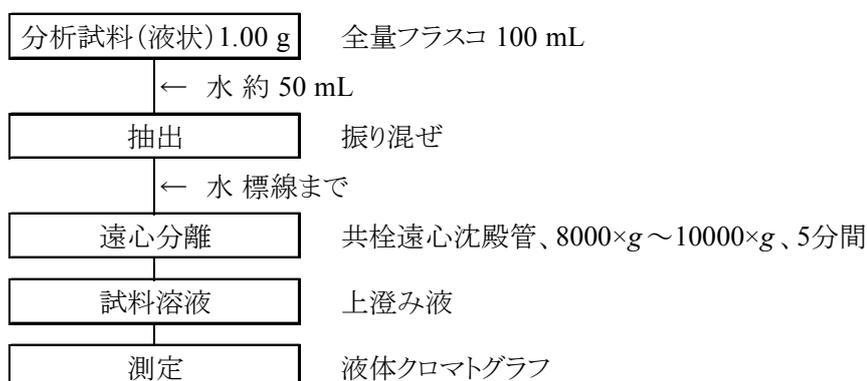
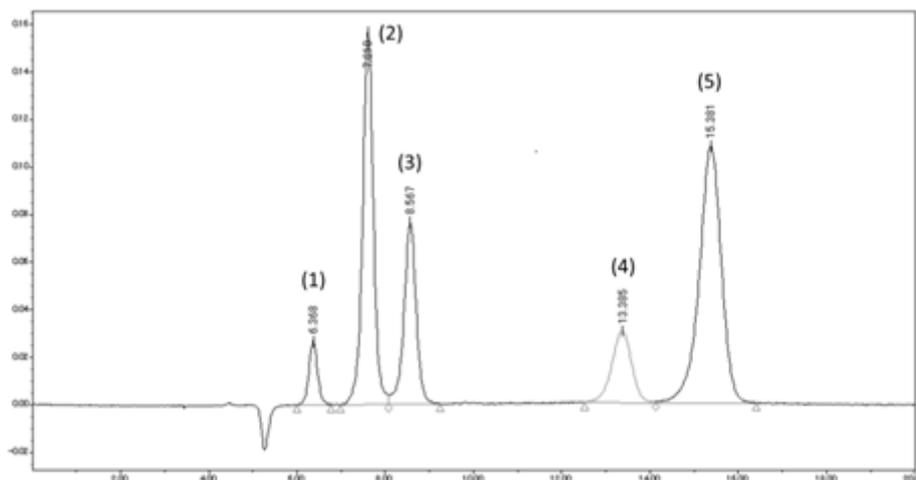


図2 肥料中のグアニジン性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.2)及び測定)

参考 グアニジン性窒素の検量線用標準液のクロマトグラムを次に示す。



参考図 検量線用混合標準液(各 10 mg/L)の HPLC クロマトグラム

ピーク名

- (1)尿素性窒素 (2)ビウレット性窒素 (3)ジシアンジアミド性窒素
 (4)グアニジン性窒素 (5)グアニル尿素性窒素

HPLC の測定条件

カラム: Asahipak ES-502C 7C(内径 7.5 mm、長さ 100 mm、粒径 9 μm)

その他の条件は(4.2) a)HPLC 測定条件の例示のとおり

6.5 冷緩衝液可溶性窒素(水に溶ける窒素)

6.5.a 冷緩衝液法

(1) 概要

この試験法(記号: 6.5.a-2017、Buf(C)-N.a-1)はホルムアルデヒド加工尿素肥料に適用する。

りん酸塩溶液(冷緩衝液)を分析試料に加えて抽出し、硫酸銅(Ⅱ)五水和物、硫酸及び硫酸カリウムを加え、ケルダール法で前処理して冷緩衝液可溶性窒素をアンモニウムイオンにし、水酸化ナトリウム溶液を加えて水蒸気蒸留する。分離したアンモニアを0.25 mol/L 硫酸で捕集し、余剰の硫酸を0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で(中和)滴定し、分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素(水に溶ける窒素)を求める。又は、分離したアンモニアをほう酸溶液で捕集し、アンモニウムイオンを0.25 mol/L 硫酸で(中和)滴定し、分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素(水に溶ける窒素)を求める。

(2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液⁽¹⁾**: 水約 30 mL をポリエチレン瓶にとり、冷却しながら JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム約 35 g を少量ずつ加えて溶かし、密栓して4～5 日間放置する。その上澄み液 5.5 mL～11 mL を共栓保存容器にとり、水 1000 mL を加える。

標定: JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質のアミド硫酸をデシケーター中に 2 kPa 以下で約 48 時間放置して乾燥した後、約 2.5 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水で溶かし、全量フラスコ 250 mL に移し入れ、標線まで水を加える⁽¹⁾。この液一定量を三角フラスコ 200 mL～300 mLにとり、指示薬としてプロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が緑色になるまで滴定する。次の式によって0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクターを算出する。

$$\begin{aligned} &0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター}(f_1) \\ &= (W_1 \times A \times 0.01/97.095) \times (V_1/V_2) \times (1000/V_3) \times (1/C_1) \end{aligned}$$

W_1 : 採取したアミド硫酸の質量(g)

A : アミド硫酸の純度(%(質量分率))

V_1 : 分取したアミド硫酸溶液の容量(mL)

V_2 : アミド硫酸溶液の定容量(250 mL)

V_3 : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

C_1 : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

- b) **硫酸**: JIS K 8951 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

- c) **0.25 mol/L 硫酸⁽¹⁾⁽²⁾**: 硫酸約 14 mL をあらかじめ水 100 mL を入れたビーカーに加えて良くかき混ぜ、水で 1000 mL とする。

標定: 0.25 mol/L 硫酸一定量⁽³⁾を三角フラスコ 200 mL～300 mLにとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色⁽⁴⁾になるまで滴定する。次の式(1)によって0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量を算出する。又は、次の式(2)によって0.25 mol/L 硫酸のファクターを算出する。

$$0.25 \text{ mol/L 硫酸 } 1 \text{ mL に相当する } 0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(B)} \\ = V_4/V_5 \quad \dots\dots (1)$$

$$0.25 \text{ mol/L 硫酸のファクター}(f_2) \\ = (f_1 \times C_1 \times V_4/V_5)/(C_2 \times 2) \quad \dots\dots (2)$$

V_4 : 滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

V_5 : 標定に供した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

C_1 : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

C_2 : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

- d) **ほう酸溶液(40 g/L)**: JIS K 8863 に規定するほう酸 40 g を水に溶かして 1000 mL とする。
- e) **水酸化ナトリウム溶液(200 g/L~500 g/L)⁽¹⁾**: JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム 100 g~250 g を水に溶かして 500 mL とする。
- f) **ブロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8842 に規定するブロモチモールブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 20 mL で溶かし、水で 100 mL とする。
- g) **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 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- h) **メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8897 に規定するメチレンブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- i) **メチルレッド-メチレンブルー混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) 2 容量に対し、メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL) 1 容量を加える。
- j) **ブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)**: JIS K 8840 に規定するブロムクレゾールグリーン 0.5 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- k) **メチルレッド-ブロムクレゾールグリーン混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) に同量のブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)を加える。
- l) **りん酸塩溶液**: 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 に溶かす⁽⁵⁾。使用に際して、液温を約 25 °C に調整する(冷緩衝液)

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 肥料分析法(1992年版)の標準硫酸液 0.5 M(1/2 硫酸)溶液に対応する。

(3) 5 mL~10 mL

(4) 青紫色から暗青色を経て灰緑色になった時を終点とする。

(5) pH 7.0±pH 0.2

備考 1. (2)a)の 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いることもできる。

備考 2. (2)c)の 0.25 mol/L 硫酸に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.25 mol/L 硫酸を用いることもできる。

(3) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) **回転振り混ぜ機**: 全量フラスコ 250 mL を 30~40 回転/分で上下転倒して回転させられるもの。
- b) **水蒸気蒸留装置**
- c) **分解フラスコ**: 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ

(4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料⁽⁶⁾ 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 250 mL に入れる。
- b) リン酸塩溶液 200 mL を加え、30~40 回転/分で 30 分間振り混ぜる。
- c) 放冷後、標線まで水を加える。
- d) ろ紙 3 種でろ過し、抽出液とする。

注(6) 分析用試料は**備考 3**により調製する。

備考 3. 目開き 850 μm のふるいを通過するまで、試験品を乳鉢、乳棒等を用いて押し砕く。

備考 4. 加水分解のおそれのない分析試料の場合は、リン酸溶液に代えて水を用いてもよい。

備考 5. (4.1) b)~d) の操作における溶液の温度は 26 $^{\circ}\text{C}$ 以下とする。

(4.2) **ケルダール分解** 分解は、次のとおり行う。

- a) 試料溶液の一定量(冷緩衝液可溶性窒素として 0.5 g 相当量以下)を分解フラスコ 300 mL に入れる。
- b) JIS K 8962 に規定する硫酸銅(II)五水和物⁽⁷⁾ 0.1 g を加え、更に硫酸 5 mL を加えて振り混ぜ、徐々に加熱して水分を蒸発させる。
- c) 放冷後、JIS K 8962 に規定する硫酸カリウム 1 g を加え、加熱して分解する。
- d) 更に 30 分間強熱する。
- e) 放冷後、液量が約 30 mL になるまで振り混ぜながら水を加え、放冷して分解液とする。

注(7) 必要に応じて粉末にする。

(4.3) **蒸留** 蒸留は、次のとおり行う。具体的な蒸留操作は、測定に使用する水蒸気蒸留装置の操作方法による。

- a) 0.25 mol/L 硫酸の一定量⁽⁸⁾を受器⁽⁹⁾にとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。又は、ほう酸溶液(40 g/L)の一定量⁽⁸⁾を受器⁽⁹⁾にとり、メチルレッドーブロムクレゾールグリーン混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。
- b) 水酸化ナトリウム溶液(200 g/L~500 g/L)適量⁽¹⁰⁾を分解液に加え、この分解フラスコを水蒸気蒸留装置に速やかに連結する。
- c) 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 で蒸留を行う。
- d) 120 mL~160 mL が留出したら蒸留を止める。
- e) 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る。

注(8) 5 mL~20 mL

- (9) 受器は水蒸気蒸留装置の留出液の出口を 0.25 mol/L 硫酸又はほう酸溶液(40 g/L)に浸せる三角フラスコ 200 mL～300 mL 又はビーカー200 mL～300 mL を用いる。
- (10) 溶液を強アルカリ性にするために十分な量。青色が生ずる。

(4.4) 測定 測定は、次のとおり行う。

(4.4.1) (4.2)で 0.25 mol/L 硫酸を用いた場合

- a) 留出液を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色⁽⁴⁾になるまで滴定する。
- b) 次の式によって分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素を算出する。

$$\begin{aligned} & \text{分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素(\% (質量分率))} \\ & = (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (14.007/W_2) \times (100/1000) \\ & = (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (1.4007/W_2) \end{aligned}$$

B : 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量

V_6 : (4.2) a)において受器にとった 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

V_7 : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

C_1 : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

f_1 : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター

V_8 : (4.1) c)における抽出液の定容量(mL)

V_9 : (4.2) a)においてケルダール分解に供した抽出液の分取量(mL)

W_2 : 分析試料の質量(g)

(4.4.2) (4.2)でほう酸溶液(40 g/L)を用いた場合

- a) 留出液を 0.25 mol/L 硫酸で溶液の色がうすい紅色⁽¹¹⁾になるまで滴定する。
- b) 次の式によって分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素を算出する。

$$\begin{aligned} & \text{分析試料中の冷緩衝液可溶性窒素(\% (質量分率))} \\ & = V_{10} \times C_2 \times 2 \times f_2 \times (V_{11}/V_{12}) \times (14.007/W_2) \times (100/1000) \\ & = V_{10} \times C_2 \times f_2 \times (V_{11}/V_{12}) \times (2.8014/W_2) \end{aligned}$$

V_{10} : 滴定に要した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

C_2 : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

f_2 : 0.25 mol/L 硫酸のファクター

V_{11} : (4.1) c)における抽出液の定容量(mL)

V_{12} : (4.2) a)においてケルダール分解に供した抽出液の分取量(mL)

W_2 : 分析試料の質量(g)

注(11) 緑色からうすい紅色になった時を終点とする。

備考 6. 自動滴定装置を用いて(2) a) 標定、(2) c) 標定及び(4.4)の滴定操作を実施することができる。滴定

プログラム及び終点判定パラメーターの設定並びに受器等の容器は、使用する自動滴定装置の仕様及び操作方法による。

参考文献

- 1) 越野正義：第二改訂詳解肥料分析法, p.67~68, 養賢堂, 東京 (1988)

(5) 冷緩衝液可溶性窒素試験法フローシート ホルムアルデヒド加工尿素肥料中の冷緩衝液可溶性窒素試験法のフローシートを次に示す。

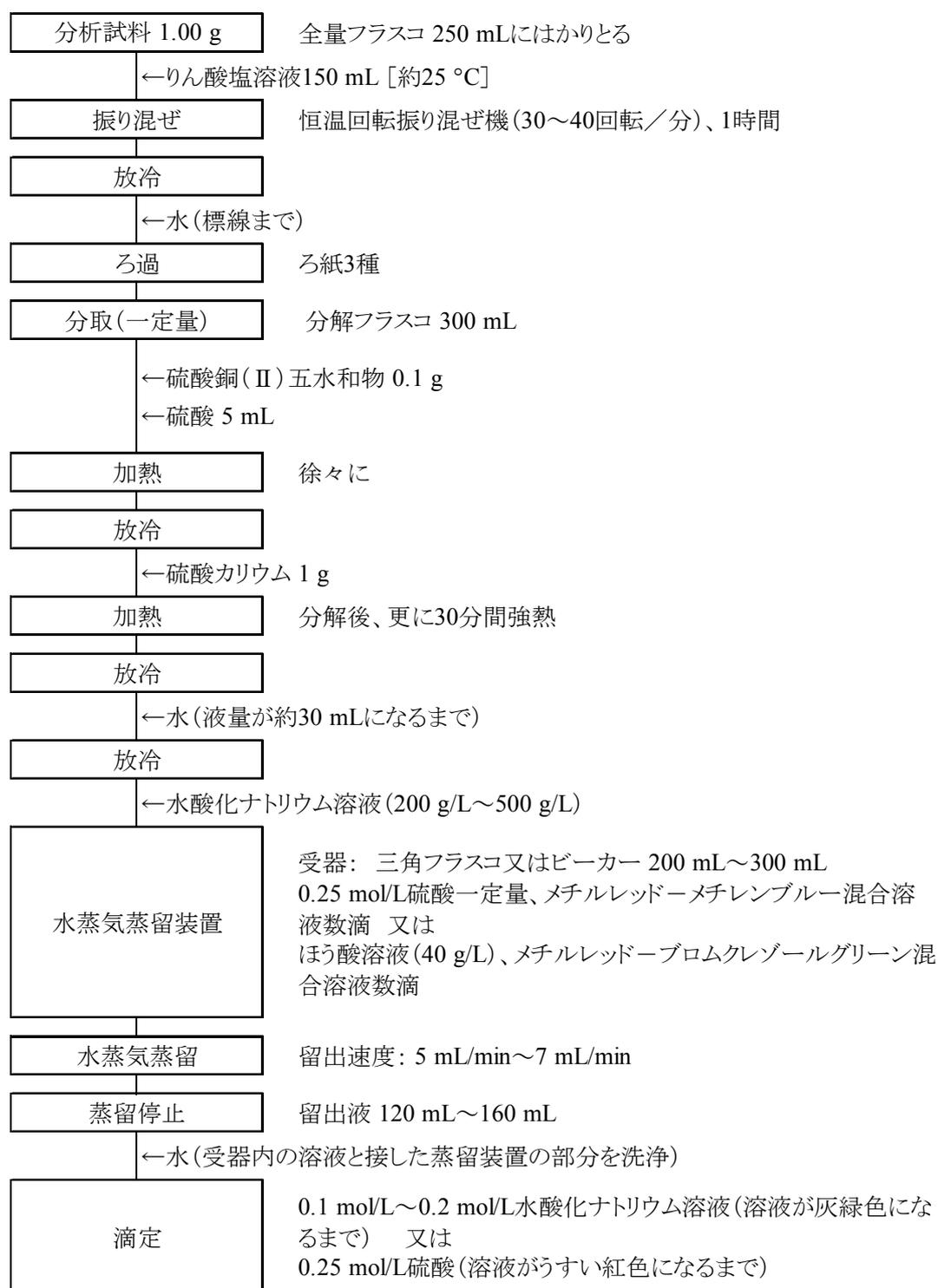


図 ホルムアルデヒド加工尿素肥料中の冷緩衝液可溶性窒素試験法フローシート

6.6 熱緩衝液可溶性窒素(熱水に溶出する窒素)

6.6.a 熱緩衝液法

(1) 概要

この試験法(記号: 6.6.a-2017、Buf(H)-N.a-1)はメチロール尿素重合肥料に適用する。

熱りん酸塩溶液(熱緩衝液)を分析試料に加えて熱緩衝液可溶性窒素を溶離し、不溶解物を硫酸カリウム及び硫酸銅(II)五水和物及び硫酸を加え、ケルダール法で前処理して熱緩衝液不溶性窒素をアンモニウムイオンにし、水酸化ナトリウム溶液を加えて水蒸気蒸留する。分離したアンモニアを 0.25 mol/L 硫酸で捕集し、余剰の硫酸を 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で(中和)滴定し、分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素を求める。又は、分離したアンモニアをほう酸溶液で捕集し、アンモニウムイオンを 0.25 mol/L 硫酸で(中和)滴定し、分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素を求める。別途 4.1.1 により測定した窒素全量(T-N)から熱緩衝液不溶性窒素を差し引き、熱緩衝液可溶性窒素(熱水に溶出する窒素)を算出する。

(2) 試薬 試薬は、次による。

a) **0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液⁽¹⁾**: 水約 30 mL をポリエチレン瓶にとり、冷却しながら JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム約 35 g を少量ずつ加えて溶かし、密栓して 4~5 日間放置する。その上澄み液 5.5 mL~11 mL を共栓保存容器にとり、水 1000 mL を加える。

標定: JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質のアミド硫酸をデシケーター中に 2 kPa 以下で約 48 時間放置して乾燥した後、約 2.5 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水で溶かし、全量フラスコ 250 mL に移し入れ、標線まで水を加える⁽¹⁾。この液一定量を三角フラスコ 200 mL~300 mLにとり、指示薬としてプロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)数滴を加え、0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が緑色になるまで滴定する。次の式によって 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクターを算出する。

$$0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター}(f_1) \\ = (W_1 \times A \times 0.01/97.095) \times (V_1/V_2) \times (1000/V_3) \times (1/C_1)$$

W_1 : 採取したアミド硫酸の質量(g)

A : アミド硫酸の純度(%(質量分率))

V_1 : 分取したアミド硫酸溶液の容量(mL)

V_2 : アミド硫酸溶液の定容量(250 mL)

V_3 : 滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

C_1 : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

b) **硫酸**: JIS K 8951 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

c) **0.25 mol/L 硫酸⁽¹⁾⁽²⁾**: 硫酸約 14 mL をあらかじめ水 100 mL を入れたビーカーに加えて良くかき混ぜ、水で 1000 mL とする。

標定: 0.25 mol/L 硫酸一定量⁽³⁾を三角フラスコ 200 mL~300 mLにとり、メチルレッド~メチレンブルー混合溶液数滴を加え、0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色⁽⁴⁾になるまで滴定する。次の式(1)によって 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量を算出する。又は、次の式(2)によって 0.25 mol/L 硫酸のファクターを算出する。

$$0.25 \text{ mol/L 硫酸 } 1 \text{ mL に相当する } 0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(B)} \\ = V_4/V_5 \quad \dots\dots (1)$$

$$0.25 \text{ mol/L 硫酸のファクター}(f_2) \\ = (f_1 \times C_1 \times V_4/V_5)/(C_2 \times 2) \quad \dots\dots (2)$$

V_4 : 滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

V_5 : 標定に供した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

C_1 : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

C_2 : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

- d) **ほう酸溶液(40 g/L)**: JIS K 8863 に規定するほう酸 40 g を水に溶かして 1000 mL とする。
- e) **分解促進剤⁽⁵⁾**: JIS K 8962 に規定する硫酸カリウムと JIS K 8983 に規定する硫酸銅(Ⅱ)五水和物⁽⁶⁾を 9 対 1 の割合で混合する。
- f) **水酸化ナトリウム溶液(200 g/L~500 g/L)⁽¹⁾**: JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム 100 g~250 g を水に溶かして 500 mL とする。
- g) **プロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8842 に規定するプロモチモールブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 20 mL で溶かし、水で 100 mL とする。
- h) **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 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- i) **メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8897 に規定するメチレンブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- j) **メチルレッド-メチレンブルー混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) 2 容量に対し、メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL) 1 容量を加える。
- k) **ブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)**: JIS K 8840 に規定するブロムクレゾールグリーン 0.5 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- l) **メチルレッド-ブロムクレゾールグリーン混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) に同量のブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)を加える。
- m) **熱りん酸塩溶液**: 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 に溶かす⁽⁷⁾。使用に際して、沸騰するまで加熱する(熱緩衝液)。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 肥料分析法(1992年版)の標準硫酸液 0.5 M(1/2 硫酸)溶液に対応する。

(3) 5 mL~10 mL

(4) 青紫色から暗青色を経て灰緑色になった時を終点とする。

(5) 錠剤が市販されている。

(6) 必要に応じて粉末にする。

(7) pH 7.0±pH 0.2

備考 1. (2)a)の 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いることもできる。

備考 2. (2)c)の 0.25 mol/L 硫酸に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.25 mol/L 硫酸を用いることもできる。

(3) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) **水浴:** 水を沸騰させることができるもの。

b) **水蒸気蒸留装置**

c) **分解フラスコ:** 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ

d) **蒸留フラスコ:** 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ又は丸底フラスコ

(4) **試験操作**

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

a) 分析試料⁽⁸⁾ 1.00 g をはかりとり、トールビーカー 300 mL に入れる。

b) 熱りん酸塩溶液 100 mL を加え、静かにかき混ぜる。

c) トールビーカーを時計皿で覆い、沸騰水浴中で 10 分ごとにかき混ぜながら 30 分間加熱する。

d) 直ちにろ紙 3 種でろ過し、容器を熱りん酸塩溶液 100 mL で不溶解物を全てろ紙上に移し、更に熱水で不溶解物を洗浄する。

注(8) 分析用試料は**備考 3**により調製する。

備考 3. 目開き 850 μm のふるいを通すまで、試験品を乳鉢及び乳棒を用いて押し砕く。

(4.2) **ケルダール分解** 分解は、次のとおり行う。

a) (4.1)d)の不溶解物をろ紙ごとを分解フラスコ 300 mL～500 mL に入れる。

b) 分解促進剤 5 g～10 g を加え、更に硫酸 20 mL～40 mL を加えて振り混ぜ、穏やかに加熱する。

c) 泡が生じなくなってから硫酸の白煙が発生するまで加熱する。

d) 有機物が完全に分解するまで強熱する⁽⁹⁾。

e) 放冷後、少量の水を加えて良く振り混ぜ、水で全量フラスコ 250 mL～500 mL に移し⁽¹⁰⁾、更に振り混ぜる。

f) 放冷後、標線まで水を加え、分解液とする。

注(9) 溶液の色が変化しなくなってから、更に 2 時間以上加熱する。

(10) 測定で試料溶液を全量使用する場合は、全量フラスコに移す操作は必要ない。

(4.3) **蒸留** 蒸留は、次のとおり行う。具体的な蒸留操作は、測定に使用する水蒸気蒸留装置の操作方法による。

a) 0.25 mol/L 硫酸の一定量⁽¹¹⁾を受器⁽¹²⁾にとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。又は、ほう酸溶液(40 g/L)の一定量⁽¹¹⁾を受器⁽¹²⁾にとり、メチルレッドーブロムクレゾールグリーン混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。

b) 分解液の一定量を蒸留フラスコ 300 mL にとり、水酸化ナトリウム溶液(200 g/L～500 g/L)適量⁽¹³⁾を加え、この蒸留フラスコを水蒸気蒸留装置に速やかに連結する。

- c) 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 で蒸留を行う。
- d) 120 mL～160 mL が留出したら蒸留を止める。
- e) 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る。

注(11) 5 mL～20 mL

- (12) 受器は水蒸気蒸留装置の留出液の出口を 0.25 mol/L 硫酸又はほう酸溶液(40 g/L)に浸せる三角フラスコ 200 mL～300 mL 又はビーカー 200 mL～300 mL を用いる。
- (13) 溶液を強アルカリ性にするために十分な量。青色が生ずる。

(4.4) 測定 測定は、次のとおり行う。

(4.4.1) (4.3)で 0.25 mol/L 硫酸を用いた場合

- a) 留出液を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色⁽⁴⁾になるまで滴定する。
- b) 次の式によって分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素を算出する。
- c) 別途 4.1.1 により測定した窒素全量(T-N)から熱緩衝液不溶性窒素を差し引いて熱緩衝液可溶性窒素を求める⁽¹⁴⁾。

分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素(% (質量分率))

$$= (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (14.007/W_2) \times (100/1000)$$

$$= (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (1.4007/W_2)$$

B: 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量

*V*₆: (4.2) a)において受器にとった 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

*V*₇: 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

*C*₁: 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

*f*₁: 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター

*V*₈: (4.2) f)における分解液の定容量(mL)

*V*₉: (4.3) b)において蒸留に供した抽出液の分取量(mL)

*W*₂: 分析試料の質量(g)

注(14) 窒素全量(T-N)及び熱緩衝液不溶性窒素は数値の丸めを実施しない生データを用いる。

(4.4.2) (4.3)でほう酸溶液(40 g/L)を用いた場合

- a) 留出液を 0.25 mol/L 硫酸で溶液の色がうすい紅色⁽¹⁵⁾になるまで滴定する。
- b) 次の式によって分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素を算出する。
- c) 別途 4.1.1 により測定した窒素全量(T-N)から熱緩衝液不溶性窒素を差し引いて熱緩衝液可溶性窒素を求める。

分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素(% (質量分率))

$$= V_{10} \times C_2 \times 2 \times f_2 \times (V_{11}/V_{12}) \times (14.007/W_2) \times (100/1000)$$

$$=V_{10} \times C_2 \times f_2 \times (V_{11}/V_{12}) \times (2.8014/W_2)$$

V_{10} : 滴定に要した 0.25 mol/L 硫酸の容量 (mL)

C_2 : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度 (0.25 mol/L)

f_2 : 0.25 mol/L 硫酸のファクター

V_{11} : (4.2 f) における分解液の定容量 (mL)

V_{12} : (4.3 b) において蒸留に供した抽出液の分取量 (mL)

W_2 : 分析試料の質量 (g)

注(15) 緑色からうすい紅色になった時を終点とする。

備考 4. 自動滴定装置を用いて(2) a) 標定、(2) c) 標定及び(4.4)の滴定操作を実施することができる。滴定プログラム及び終点判定パラメーターの設定並びに受器等の容器は、使用する自動滴定装置の仕様及び操作方法による。

参考文献

- 1) 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.68~69, 養賢堂, 東京 (1988)

(5) 熱緩衝液可溶性窒素試験法フローシート メチロール尿素重合肥料中の熱緩衝液可溶性窒素試験法のフローシートを次に示す。

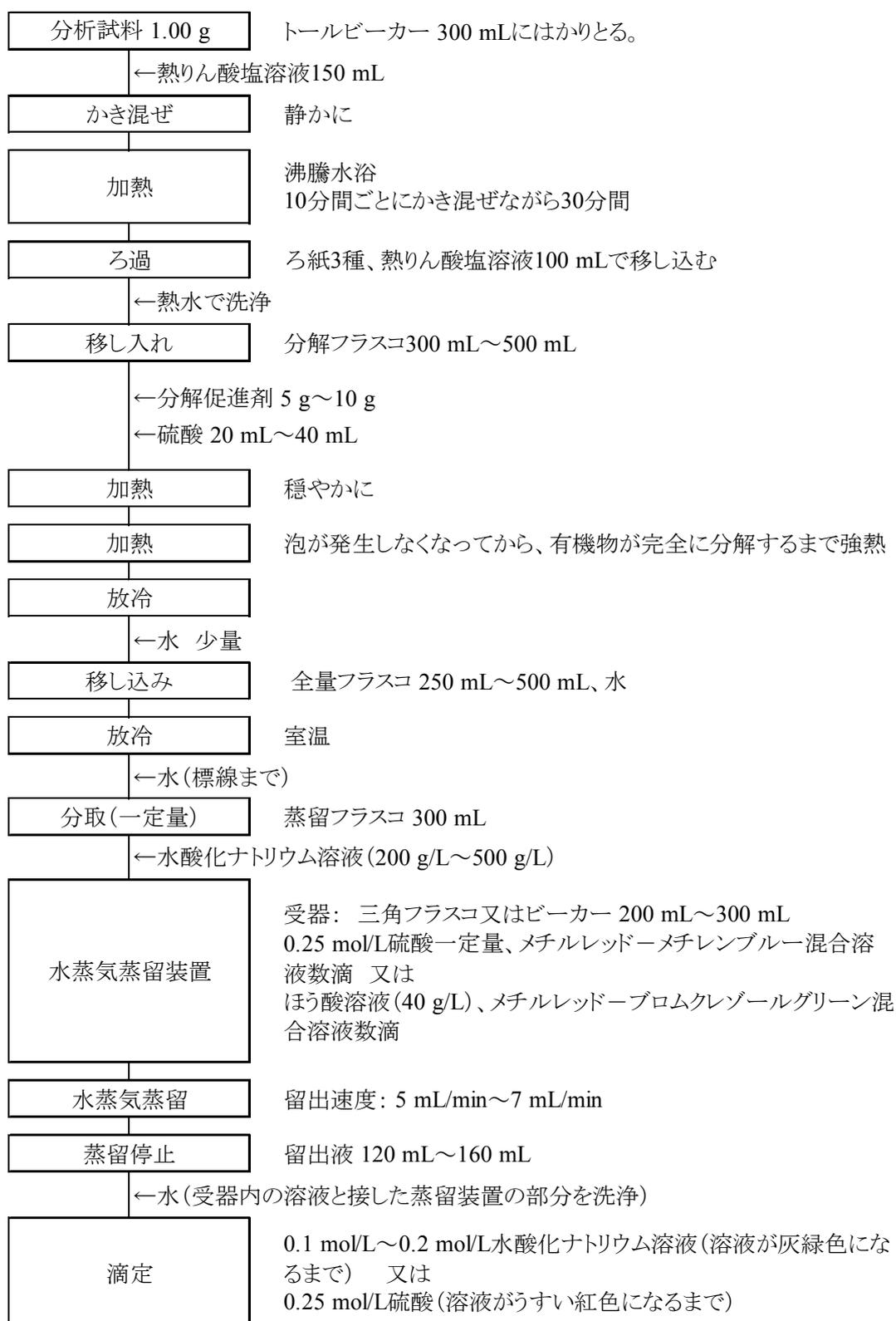


図 メチロール尿素重合肥料中の熱緩衝液可溶性窒素試験法フローシート

6.7 窒素の活性係数

6.7.a 緩衝液法

(1) 概要

この試験法(記号: 6.7.a-2017、AI-N.a-1)はホルムアルデヒド加工尿素肥料に適用する。

分析試料に水を加えて冷水可溶性窒素を溶離し、不溶解物を硫酸カリウム及び硫酸銅(Ⅱ)五水和物及び硫酸を加え、ケルダール法で前処理して冷水不溶性窒素をアンモニウムイオンにし、水酸化ナトリウム溶液を加えて水蒸気蒸留する。分離したアンモニアを 0.25 mol/L 硫酸で捕集し、余剰の硫酸を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で(中和)滴定し、分析試料中の冷水不溶性窒素を求める。又は、分離したアンモニアをほう酸溶液で捕集し、アンモニウムイオンを 0.25 mol/L 硫酸で(中和)滴定し、分析試料中の冷水可溶性窒素を求める。別途、熱りん酸塩溶液(熱緩衝液)を分析試料に加えて熱緩衝液可溶性窒素を溶離し、以下同様の操作を行って分析試料中の熱緩衝液不溶性窒素を求める。冷水不溶解物から熱緩衝液不溶性窒素を差し引いた値を冷水不溶解物で除して窒素の活性係数を算出する。

(2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液⁽¹⁾**: 水約 30 mL をポリエチレン瓶にとり、冷却しながら JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム約 35 g を少量ずつ加えて溶かし、密栓して 4～5 日間放置する。その上澄み液 5.5 mL～11 mL を共栓保存容器にとり、水 1000 mL を加える。

標定: JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質のアミド硫酸をデシケーター中に 2 kPa 以下で約 48 時間放置して乾燥した後、約 2.5 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水で溶かし、全量フラスコ 250 mL に移し入れ、標線まで水を加える⁽¹⁾。この液一定量を三角フラスコ 200 mL～300 mLにとり、指示薬としてプロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が緑色になるまで滴定する。次の式によって 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクターを算出する。

$$0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター}(f_1) \\ = (W_1 \times A \times 0.01/97.095) \times (V_1/V_2) \times (1000/V_3) \times (1/C_1)$$

W_1 : 採取したアミド硫酸の質量(g)

A : アミド硫酸の純度(%(質量分率))

V_1 : 分取したアミド硫酸溶液の容量(mL)

V_2 : アミド硫酸溶液の定容量(250 mL)

V_3 : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

C_1 : 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

- b) **硫酸**: JIS K 8951 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

- c) **0.25 mol/L 硫酸⁽¹⁾⁽²⁾**: 硫酸約 14 mL をあらかじめ水 100 mL を入れたビーカーに加えて良くかき混ぜ、水で 1000 mL とする。

標定: 0.25 mol/L 硫酸一定量⁽³⁾を三角フラスコ 200 mL～300 mLにとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色⁽⁴⁾になるまで滴定する。次の式(1)によって 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量を

算出する。又は、次の式(2)によって 0.25 mol/L 硫酸のファクターを算出する。

$$\begin{aligned} &0.25 \text{ mol/L 硫酸 } 1 \text{ mL に相当する } 0.1 \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量 (B)} \\ &= V_4/V_5 \quad \dots\dots (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &0.25 \text{ mol/L 硫酸のファクター } (f_2) \\ &= (f_1 \times C_1 \times V_4/V_5)/(C_2 \times 2) \quad \dots\dots (2) \end{aligned}$$

V_4 : 滴定に要した 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

V_5 : 標定に供した 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

C_1 : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

C_2 : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

- d) **ほう酸溶液(40 g/L)**: JIS K 8863 に規定するほう酸 40 g を水に溶かして 1000 mL とする。
- e) **分解促進剤⁽⁵⁾**: JIS K 8962 に規定する硫酸カリウムと JIS K 8983 に規定する硫酸銅(II)五水和物⁽⁶⁾を 9 対 1 の割合で混合する。
- f) **水酸化ナトリウム溶液(200 g/L~500 g/L)⁽¹⁾**: JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム 100 g~250 g を水に溶かして 500 mL とする。
- g) **プロモチモールブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8842 に規定するプロモチモールブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 20 mL で溶かし、水で 100 mL とする。
- h) **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 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- i) **メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL)**: JIS K 8897 に規定するメチレンブルー 0.1 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- j) **メチルレッド-メチレンブルー混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL) 2 容量に対し、メチレンブルー溶液(0.1 g/100 mL) 1 容量を加える。
- k) **ブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)**: JIS K 8840 に規定するブロムクレゾールグリーン 0.5 g を JIS K 8102 に規定するエタノール(95) 100 mL に溶かす。
- l) **メチルレッド-ブロムクレゾールグリーン混合溶液**: メチルレッド溶液(0.1 g/100 mL)に同量のブロムクレゾールグリーン溶液(0.5 g/100 mL)を加える。
- m) **熱りん酸塩溶液**: JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム 1.43 g 及び JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 9.10 g を水 1000 mL に溶かす⁽⁷⁾。使用に際して、沸騰するまで加熱する(熱緩衝液)。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 肥料分析法(1992年版)の標準硫酸液 0.5 M(1/2 硫酸)溶液に対応する。

(3) 5 mL~10 mL

(4) 青紫色から暗青色を経て灰緑色になった時を終点とする。

(5) 錠剤が市販されている。

(6) 必要に応じて粉末にする。

(7) pH 7.5±pH 0.2

備考 1. (2) a) の 0.1 mol/L ~ 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いることもできる。

備考 2. (2) c) の 0.25 mol/L 硫酸に換えて、ISO/IEC 17025 対応の 0.25 mol/L 硫酸を用いることもできる。

(3) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) **水浴:** 水を沸騰させることができるもの。
- b) **水蒸気蒸留装置**
- c) **分解フラスコ:** 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ
- d) **蒸留フラスコ:** 水蒸気蒸留装置に連結できるケルダールフラスコ又は丸底フラスコ

(4) **試験操作**

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。(4.1.1) f) 及び(4.1.2) d) の不溶解物をそれぞれ(4.2) **ケルダール分解** に供する。

(4.1.1) **冷水による抽出**

- a) 分析試料⁽⁸⁾ 1.00 g をはかりとり、ビーカー 50 mL に入れる。
- b) 少量の JIS K 8101 に規定するエタノールを加えて潤し、25 °C ± 2 °C の水 20 mL を加え、かき混ぜる。
- c) 5 分間ごとにかき混ぜながら 15 分間放置する。
- d) 上澄み液をろ紙 2 種でろ過する。
- e) 不溶解物を 25 °C ± 2 °C の水で 5 回洗浄し、上澄み液をろ過する。
- f) 25 °C ± 2 °C の水で不溶解物を全てろ紙上に移し、更に同温度の水で不溶解物をろ液が 250 mL になるまで洗浄する。

注(8) 分析用試料は**備考 3** により調製する。

備考 3. 目開き 850 µm のふるいを通過するまで、試験品を乳鉢、乳棒等を用いて押し砕く。

(4.1.2) **熱りん酸塩溶液による抽出**

- a) 冷水不溶解物窒素 0.12 g 相当量の分析試料⁽⁸⁾ をはかりとり、トールビーカー 200 mL に入れる。
- b) 熱りん酸塩溶液 100 mL を加え、かき混ぜる。
- c) トールビーカーを時計皿で覆い、沸騰水浴中で 10 分ごとにかき混ぜながら 30 分間加熱する。
- d) 直ちにろ紙 2 種でろ過し⁽⁹⁾、容器を沸騰した水で不溶解物を全てろ紙上に移し、更に沸騰した水 100 mL で不溶解物を洗浄する。

注(9) ろ過操作に 4 分間以上の時間を要した場合は、新たに**備考 4** により抽出操作を実施する。

備考 4. (4.1.2) a) ~ c) の操作を実施した後、けい藻土 1 g を加えてかき混ぜ、(4.1.2) d) の操作を実施する。

(4.2) **ケルダール分解** 分解は、次のとおり行う。

- a) (4.1.1) f) 及び(4.1.2) d) の不溶解物をろ紙ごとをそれぞれの分解フラスコ 300 mL ~ 500 mL に入れる。

- b) 分解促進剤 5 g～10 g を加え、更に硫酸 20 mL～40 mL を加えて振り混ぜ、穏やかに加熱する。
- c) 泡が生じなくなってから硫酸の白煙が発生するまで加熱する。
- d) 有機物が完全に分解するまで強熱する⁽¹⁰⁾。
- e) 放冷後、少量の水を加えて良く振り混ぜ、水で全量フラスコ 250 mL～500 mL に移し⁽¹¹⁾、更に振り混ぜる。
- f) 放冷後、標線まで水を加え、分解液とする。

注(10) 溶液の色が変化しなくなってから、更に 2 時間以上加熱する。

(11) 測定で試料溶液を全量使用する場合は、全量フラスコに移す操作は必要ない。

(4.3) 蒸留 蒸留は、次のとおり行う。具体的な蒸留操作は、測定に使用する水蒸気蒸留装置の操作方法による。

- a) 0.25 mol/L 硫酸の一定量⁽¹²⁾を受器⁽¹³⁾にとり、メチルレッドーメチレンブルー混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。又は、ほう酸溶液(40 g/L)の一定量⁽¹²⁾を受器⁽¹³⁾にとり、メチルレッドーブロムクレゾールグリーン混合溶液数滴を加え、この受器を水蒸気蒸留装置に連結する。
- b) 分解液の一定量を蒸留フラスコ 300 mL にとり、水酸化ナトリウム溶液(200 g/L～500 g/L)適量⁽¹⁴⁾を加え、この蒸留フラスコを水蒸気蒸留装置に速やかに連結する。
- c) 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 で蒸留を行う。
- d) 120 mL～160 mL が留出したら蒸留を止める。
- e) 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る。

注(12) 5 mL～20 mL

(13) 受器は水蒸気蒸留装置の留出液の出口を 0.25 mol/L 硫酸又はほう酸溶液(40 g/L)に浸せる三角フラスコ 200 mL～300 mL 又はビーカー 200 mL～300 mL を用いる。

(14) 溶液を強アルカリ性にするために十分な量。青色が生ずる。

(4.4) 測定 測定は、次のとおり行う。

(4.4.1) (4.3)で 0.25 mol/L 硫酸を用いた場合

- a) 留出液を 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶液の色が灰緑色⁽⁴⁾になるまで滴定する。
- b) 次の式(3)によって分析試料中の冷水不溶性窒素(N_1)及び熱緩衝液不溶性窒素(N_2)をそれぞれ算出する。
- c) 次の式(4)によって分析試料中の窒素の活性係数を求める⁽¹⁵⁾。

分析試料中の冷水不溶性窒素(N_1)又は熱緩衝液不溶性窒素(N_2) (% (質量分率))

$$\begin{aligned}
 &= (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (14.007/W_2) \times (100/1000) \\
 &= (B \times V_6 - V_7) \times C_1 \times f_1 \times (V_8/V_9) \times (1.4007/W_2) \quad \dots\dots (3)
 \end{aligned}$$

B : 0.25 mol/L 硫酸 1 mL に相当する 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量

V_6 : (4.2) a)において受器にとった 0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

V_7 : 滴定に要した 0.1 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の容量(mL)

C_1 : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の設定濃度(mol/L)

f_1 : 0.1 mol/L~0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター

V_8 : (4.2 f)における分解液の定容量(mL)

V_9 : (4.3 b)において蒸留に供した抽出液の分取量(mL)

W_2 : 分析試料の質量(g)

窒素の活性係数(%)

$$= ((N_1 - N_2) / N_1) \times 100 \quad \dots\dots (4)$$

N_1 : 冷水不溶性窒素(%(質量分率))

N_2 : 熱緩衝液不溶性窒素(%(質量分率))

注(15) 冷水不溶性窒素(N_1)又は熱緩衝液不溶性窒素(N_2)は数値の丸めを実施しない生データを用いる。

(4.4.2) (4.3)でほう酸溶液(40 g/L)を用いた場合

a) 留出液を0.25 mol/L 硫酸で溶液の色がうすい紅色⁽¹⁶⁾になるまで滴定する。

b) 次の式(5)によって分析試料中の冷水不溶性窒素(N_1)及び熱緩衝液不溶性窒素(N_2)をそれぞれ算出する。

c) (4.4.1)の式(4)によって分析試料中の窒素の活性係数を求める⁽¹⁴⁾。

分析試料中の冷水不溶性窒素(N_1)又は熱緩衝液不溶性窒素(N_2)(%(質量分率))

$$\begin{aligned} &= V_{10} \times C_2 \times 2 \times f_2 \times (V_{11} / V_{12}) \times (14.007 / W_2) \times (100 / 1000) \\ &= V_{10} \times C_2 \times f_2 \times (V_{11} / V_{12}) \times (2.8014 / W_2) \quad \dots\dots (3) \end{aligned}$$

V_{10} : 滴定に要した0.25 mol/L 硫酸の容量(mL)

C_2 : 0.25 mol/L 硫酸の設定濃度(0.25 mol/L)

f_2 : 0.25 mol/L 硫酸のファクター

V_{11} : (4.2 f)における分解液の定容量(mL)

V_{12} : (4.3 b)において蒸留に供した抽出液の分取量(mL)

W_2 : 分析試料の質量(g)

注(16) 緑色からうすい紅色になった時を終点とする。

備考 5. 自動滴定装置を用いて(2) a) 標定、(2) c) 標定及び(4.4)の滴定操作を実施することができる。滴定プログラム及び終点判定パラメーターの設定並びに受器等の容器は、使用する自動滴定装置の仕様及び操作方法による。

参考文献

1) 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.68~69, 養賢堂, 東京 (1988)

(5) 窒素の活性係数試験法フローシート ホルムアルデヒド加工尿素肥料の窒素の活性係数試験法のフローシートを次に示す。

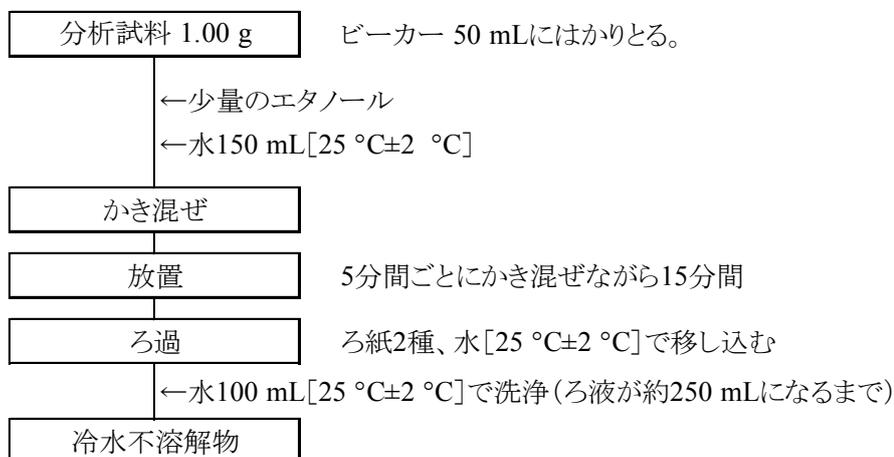


図1-1 ホルムアルデヒド加工尿素肥料の窒素の活性係数試験法フローシート
(冷水による抽出操作(4.1.1))

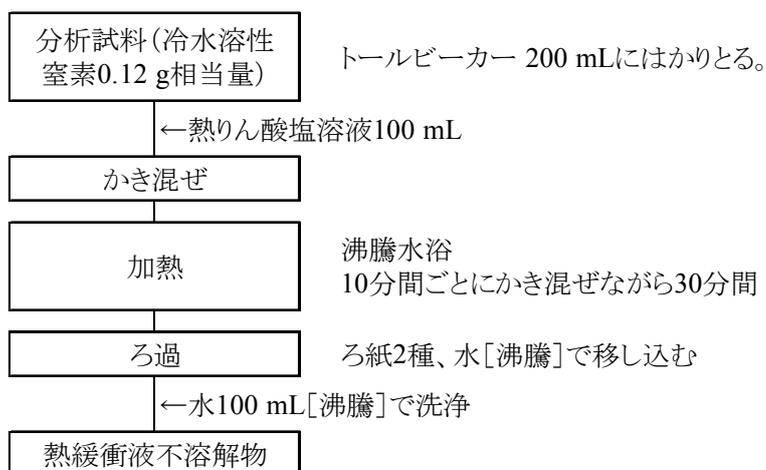


図1-2 ホルムアルデヒド加工尿素肥料の窒素の活性係数試験法フローシート
(熱りん酸塩溶液による抽出操作(4.1.2))

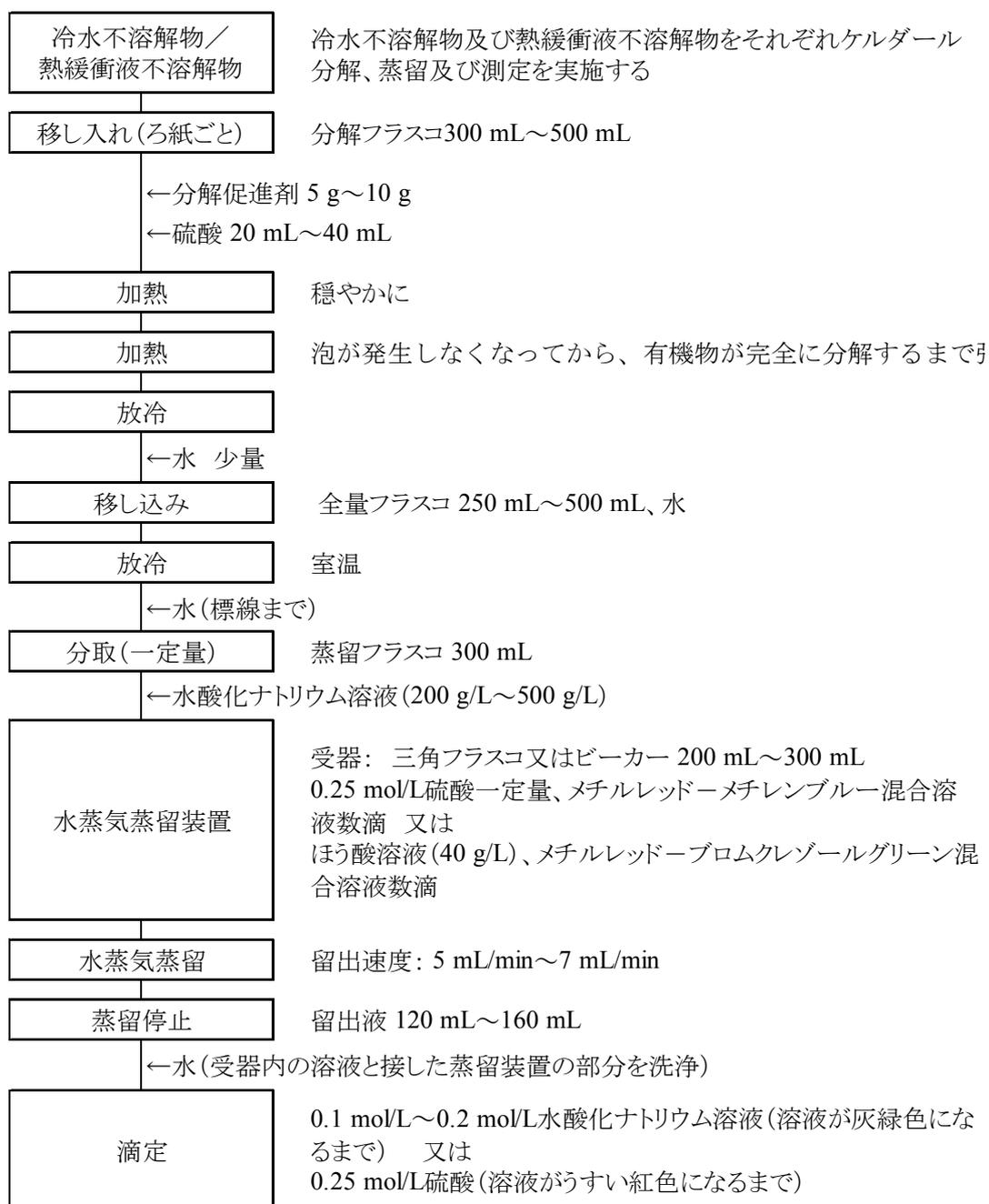


図2 ホルムアルデヒド加工尿素肥料の窒素の活性係数試験法フローシート
(ケルダール分解、蒸留及び測定操作)

6.8 初期溶出率

6.8.a 水中静置法

(1) 概要

この試験法(記号: 6.8.a-2017、SDR.a-1)は被覆肥料に適用する。初期溶出率は被覆肥料の速効性成分であり、対象成分として窒素全量(T-N)、アンモニア性窒素(A-N)、硝酸性窒素(N-N)、水溶性りん酸(W-P₂O₅)、水溶性加里(W-K₂O)及び水溶性苦土(W-MgO)がある。

試験品に水を加え、24時間30℃の水中で保温静置し、対象成分の初期溶出量を求める。別途4.1.1、4.1.2、4.1.3、4.2.4、4.3.3又は4.6.3により該当する成分量を求める。対象成分の初期溶出量を該当する成分量で除して初期溶出率を算出する。

(2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **窒素全量用試薬液**: 窒素全量を測定する場合4.1.1の各項の試薬。
- b) **アンモニア性窒素用試薬液**: アンモニア性窒素を測定する場合は4.1.2の各項の試薬。
- c) **硝酸性窒素用試薬液**: 硝酸性窒素を測定する場合は4.1.3の各項の試薬。
- d) **水溶性りん酸用試薬液**: 水溶性りん酸を測定する場合は4.2.4の各項の試薬。
- e) **水溶性加里用試薬液**: 水溶性加里を測定する場合は4.3.3の各項の試薬。
- f) **水溶性苦土用試薬液**: 水溶性苦土を測定する場合は4.6.3の各項の試薬。

(3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) **恒温器**: 30℃±1℃もの。
- b) **窒素全量**: 窒素全量を測定する場合4.1.1の各項の器具及び装置。
- c) **アンモニア性窒素**: アンモニア性窒素を測定する場合は4.1.2の各項の器具及び装置。
- d) **硝酸性窒素**: 硝酸性窒素を測定する場合は4.1.3の各項の器具及び装置。
- e) **水溶性りん酸**: 水溶性りん酸を測定する場合は4.2.4の各項の器具及び装置。
- f) **水溶性加里**: 水溶性加里を測定する場合は4.3.3の各項の器具及び装置。
- g) **水溶性苦土**: 水溶性苦土を測定する場合は4.6.3の各項の器具及び装置。

(4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 試験品12.5gをはかりとり、共栓付き三角フラスコ300mLに入れる⁽¹⁾。
- b) 30℃±1℃の水250mLを加え、30℃±1℃の恒温器に入れ、24時間静置する⁽²⁾。
- c) ろ紙3種でろ過し⁽³⁾、ろ液を振り混ぜて試料溶液とする。

注(1) 粉碎操作を実施せず、均質化されていない試験品を用いるため、3～5点併行で試験を実施し、定量値の信頼性を高めることが望ましい。

(2) 試験品が水中で振動すると初期溶出量が高く見積られるため、水は静かに加え、**c)**のろ過が終了するまで試料溶液を振り混ぜないこと。

(3) 不溶解物は三角フラスコに残すようにして、大部分の溶液をろ過する。

(4.2) 測定 対象成分の初期溶出量の測定は該当するa)～f)のそれぞれの項のとおり行う。なお、各成

分の具体的な測定操作は対応する各項による。

- a) **窒素全量**: 試料溶液の一定量をとり、**4.1.1**の各項により窒素全量を定量し、初期溶出量とする。
- b) **アンモニア性窒素**: 試料溶液の一定量をとり、**4.1.2**の各項によりアンモニア性窒素を定量し、初期溶出量とする。
- c) **硝酸性窒素**: 試料溶液の一定量をとり、**4.1.3**の各項により硝酸性窒素を定量し、初期溶出量とする。
- d) **水溶性りん酸**: 試料溶液の一定量をとり、**4.2.4**の各項により水溶性りん酸を定量し、初期溶出量とする。
- e) **水溶性加里**: 試料溶液の一定量をとり、**4.3.3**の各項により水溶性加里を定量し、初期溶出量とする。
- f) **水溶性苦土**: 試料溶液の一定量をとり、**4.6.3**の各項により水溶性苦土を定量し、初期溶出量とする。

(5) 初期溶出率の計算

- a) (4.2)で求めた対象成分の初期溶出量及び別途測定した⁽⁴⁾該当する成分量を用い、次の式によって初期溶出率(%)を算出する⁽⁵⁾。

初期溶出率(%)

$$= (C_1/C_2) \times 100$$

C_1 : 対象成分の初期溶出量(%(質量分率))

C_2 : 該当する成分量(%(質量分率))

注(4) 2.3 分析用試料の調製によって調製した分析用試料を用いて、**4.1.1**、**4.1.2**、**4.1.3**、**4.2.4**、**4.3.3** 又は **4.6.3** により窒素全量(T-N)、アンモニア性窒素(A-N)、硝酸性窒素(N-N)、水溶性りん酸(W-P₂O₅)、水溶性加里(W-K₂O)又は水溶性苦土(W-MgO)を測定する。

(5) 初期溶出量及び該当する成分量は数値の丸めを実施しない生データを用いる。

参考文献

- 1) 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.288~290, 養賢堂, 東京 (1988)

- (6) **初期溶出率試験法フローシート** 被覆肥料の初期溶出率試験法のフローシートを次に示す。

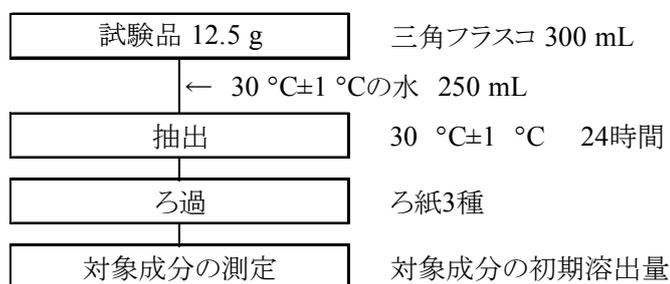


図 被覆肥料の初期溶出率試験法フローシート

6.9 腐植酸(酸不溶アルカリ可溶分)

6.9.a 重量法

(1) 概要

この試験法(記号: 6.9.a-2017、H-acid.a-1)は腐植酸塩肥料に適用する。

分析試料に塩酸(1+9)を加えて酸溶解物を溶離し、不溶解物をろ過し、不溶解物の質量を測定し、分析試料中の酸不溶解物を求める。別途分析試料に塩酸(1+9)を加えて酸溶解物を溶離し、不溶解物に水酸化ナトリウム液(10 g/L)を加えてアルカリ溶解物を溶離し、不溶解物をろ過し、分析試料中の酸不溶アルカリ不溶解物を求める。酸溶解物から酸不溶アルカリ不溶解物を差し引き、腐植酸(酸不溶アルカリ可溶分)を算出する。

(2) 試薬 試薬は、次による。

- a) 塩酸: JIS K 8180 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- b) 水酸化ナトリウム: JIS K 8576 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

(3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) 振とう機
- b) 乾燥器: 105 °C~110 °C に調節できるもの。
- c) るつぼ形ガラスろ過器: JIS R 3503 に規定するるつぼ形ガラスろ過器 1G4。予め 105 °C~110 °C の乾燥器で加熱した後、デシケーター中で放冷し、質量を 1 mg の桁まで測定しておく。
- d) 共栓はかり瓶⁽¹⁾: JIS R 3503 に規定する平形はかり瓶 50 mm×30 mm。予め 105 °C~110 °C の乾燥器で加熱乾燥した後、デシケーター中で放冷し、質量を 1 mg の桁まで測定しておく。

注(1) 飼料分析法・解説-2009-に記載されているアルミニウム製ひょう量皿を用いてもよい。

- (2) 共栓遠心沈殿管 100 mL を 30~40 回転/分で上下転倒して回転させられる回転振り混ぜ機を用いてもよい。

(4) 試験操作

(4.1) 酸不溶解物

(4.1.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、共栓遠心沈殿管 100 mL に入れる。
- b) 塩酸(1+9) 50 mL を加え、振とう機を用いて⁽²⁾1 時間振り混ぜる。
- c) 遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離し⁽³⁾、上澄み液を除去する⁽⁴⁾。
- d) 水を加えてかき混ぜ⁽⁵⁾、遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離し⁽³⁾、上澄み液を除去する⁽⁴⁾。
- e) d) の操作を 3 回繰り返す。

注(2) 回転振り混ぜ機を使用する場合は、30~40 回転/分に調整する。

- (3) 半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 1700×g 程度となる。
- (4) 駒込ピペット等を用いて取り除く。
- (5) ガラス棒を用いてかき混ぜ、ガラス棒に付着した不溶解物を水で洗浄し、洗浄液を遠心沈殿管に加える。

(4.1.2) **測定** 測定は、次のとおり行う。

- a) 水で(4.1.1)e)の不溶解物を全てるつぼ形ガラスろ過器中に移し、減圧ろ過する。
- b) 不溶解物をるつぼ形ガラスろ過器とともに乾燥器に入れ、105℃～110℃で3時間加熱する。
- c) 加熱後、速やかにデシケーターに移して放冷する。
- d) 放冷後、るつぼ形ガラスろ過器をデシケーターから取り出し、その質量を1mgの桁まで測定する。

(4.2) **酸不溶－アルカリ不溶解物**

(4.2.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料1gを1mgの桁まではかりとり、共栓遠心沈殿管100mLに入れる。
- b) 塩酸(1+9)50mLを加え、振とう機⁽²⁾を用いて⁽²⁾1時間振り混ぜる。
- c) 遠心力約1700×gで約5分間遠心分離し⁽³⁾、上澄み液を除去する⁽⁴⁾。
- d) 水を加えてかき混ぜ⁽⁵⁾、遠心力約1700×gで約5分間遠心分離し⁽³⁾、上澄み液を除去する⁽⁴⁾。
- e) d)の操作を3回繰り返す。
- f) 水酸化ナトリウム溶液(10g/L)50mLを加え、振とう機を用いて⁽²⁾1時間振り混ぜる。
- g) 遠心力約1700×gで約5分間遠心分離し⁽³⁾、上澄み液を除去する⁽⁴⁾。
- h) 水を加えてかき混ぜ⁽⁵⁾、遠心力約1700×gで約5分間遠心分離し⁽³⁾、上澄み液を除去する⁽⁴⁾。
- i) h)の操作を3回繰り返す。

(4.2.2) **測定** 測定は、次のとおり行う。

- a) 不溶解物を共栓はかり瓶とともに乾燥器に入れて加熱する⁽⁶⁾。
- b) 放冷後、不溶解物を共栓はかり瓶に移し替える。
- c) 不溶解物を共栓はかり瓶とともに乾燥器に入れ、105℃～110℃で3時間加熱する。
- d) 加熱後、共栓はかり瓶に蓋をし、速やかにデシケーターに移して放冷する。
- e) 放冷後、共栓はかり瓶をデシケーターから取り出し、その質量を1mgの桁まで測定する。

注(6) (4.2.2)b)の操作が可能になる程度の温度で乾燥する。

(5) **腐植酸の計算**

- a) 次の式によって腐植酸を算出する。

$$\begin{aligned} & \text{腐植酸}(\%(\text{質量分率})) \\ & = (A_1/W_1) \times 100 - (A_2/W_2) \times 100 \quad \dots\dots (1) \end{aligned}$$

A_1 : (4.1.2)d)で測定した酸不溶解物の質量(g)

W_1 : (4.1.1)a)で採取した分析試料の質量(g)

A_2 : (4.2.2)e)で測定した酸不溶アルカリ不溶解物の質量(g)

W_2 : (4.2.1)a)で採取した分析試料の質量(g)

参考文献

- 1) 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.316~317, 養賢堂, 東京 (1988)

(5) 腐植酸試験法フローシート 腐植酸試験法のフローシートを次に示す。

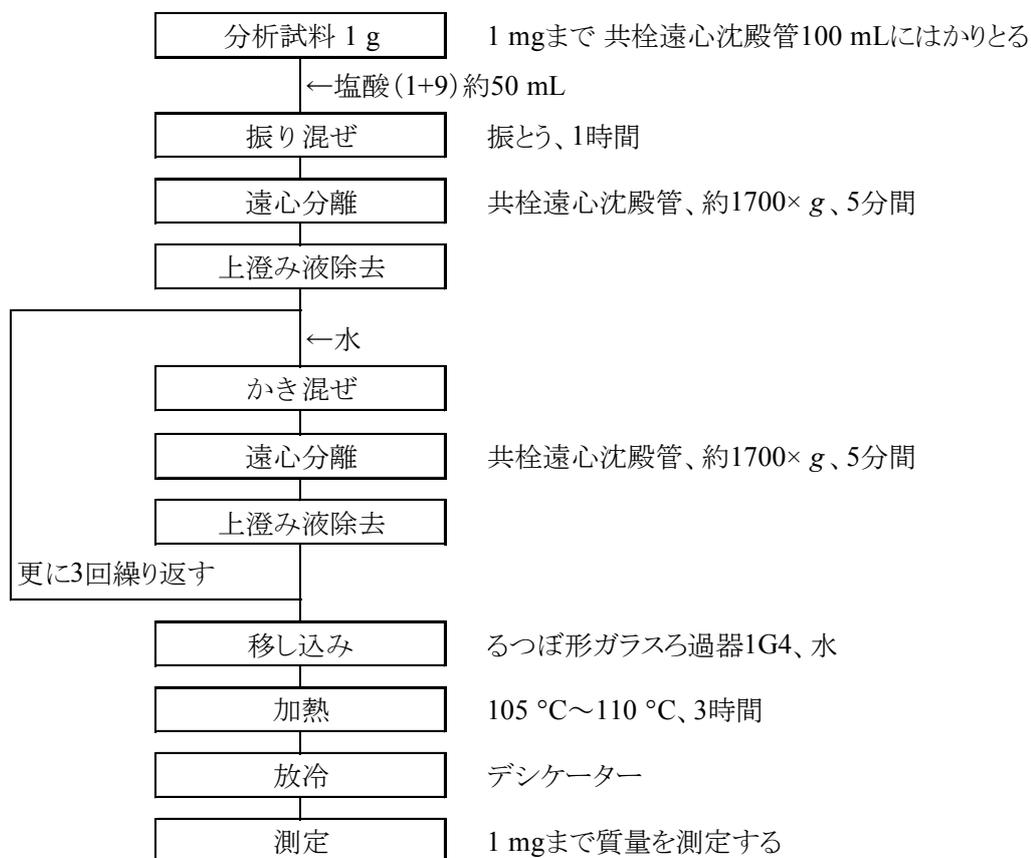


図1 腐植酸塩肥料中の腐植酸試験法フローシート
(酸不溶解物の試験操作(4.1))

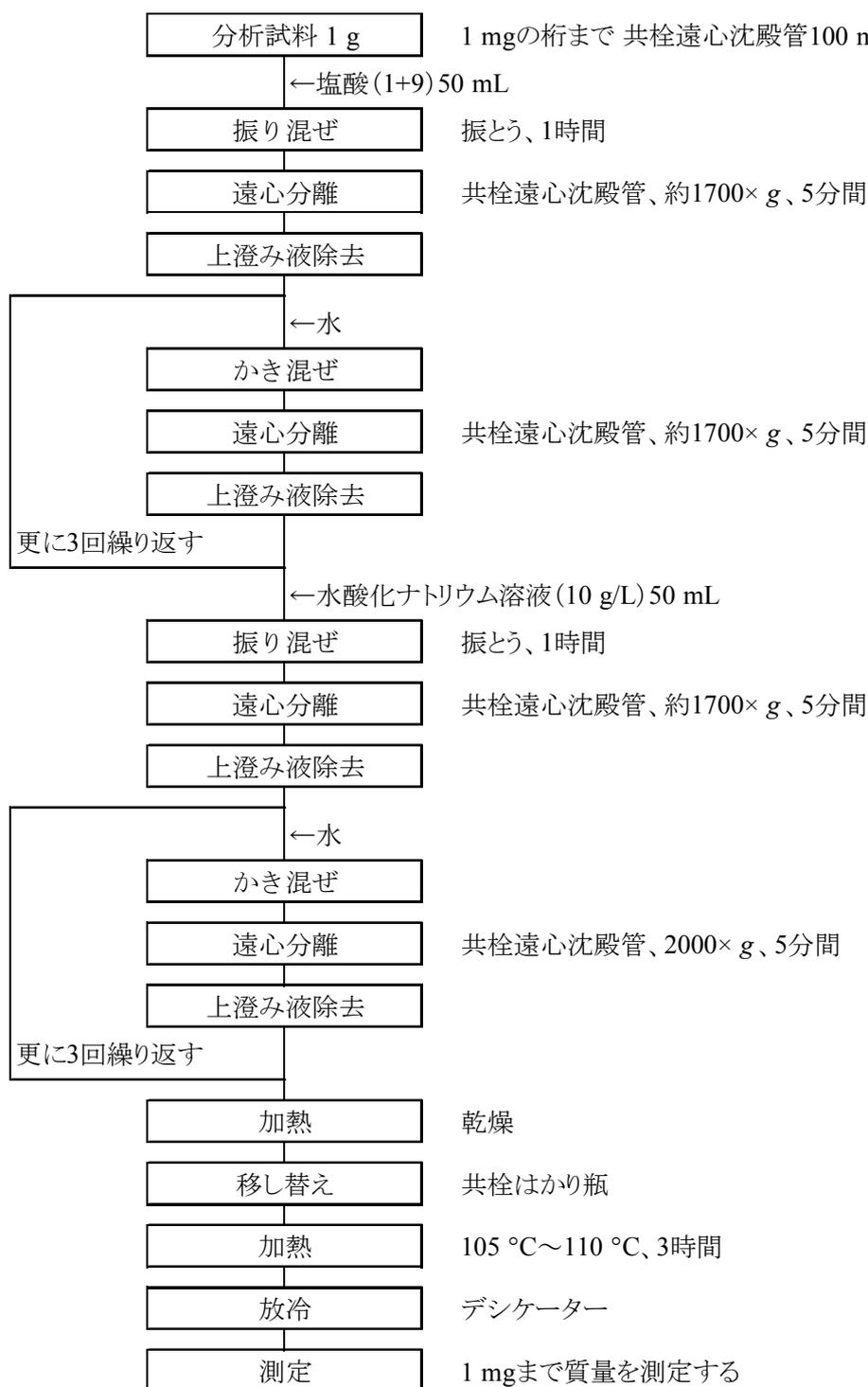


図2 腐植酸塩肥料中の腐植酸試験法フローシート
(酸不溶アルカリ不溶解物の試験操作(4.2))

6.10 硫酸塩

肥料分析法(1992年版)の5.29.2 硫酸塩の分析法による。

参考文献

- 1) 農林水産省農業環境技術研究所：肥料分析法(1992年版), p.145~147, 日本肥糧検定協会, 東京(1992)
- 2) 越野正義：第二改訂詳解肥料分析法, p.285~286, 養賢堂, 東京(1988)

6.11 二酸化炭素

肥料分析法(1992年版)の5.20 二酸化炭素の分析法による。

参考文献

- 1) 農林水産省農業環境技術研究所：肥料分析法(1992年版), p.121~123, 日本肥糧検定協会, 東京(1992)
- 2) 越野正義：第二改訂詳解肥料分析法, p.259~261, 養賢堂, 東京(1988)

7. 硝酸化成抑制材

7.1 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)

7.1.a 高速液体クロマトグラフ法

(1) 概要

この試験法(記号: 7.1.a-2017、AM.a-1)は2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)を含む肥料に適用する。

分析試料にメタノール-水(1+1)を加えて2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンを抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 295 nm で測定し、分析試料中の2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)を求める。なお、この試験法の性能は備考 6 に示す。

(2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) **メタノール**: HPLC の溶離液に使用するメタノールは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- d) **2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(1 mg/mL)⁽¹⁾**: 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン $[\text{C}_5\text{H}_6\text{ClN}_3]^{(2)}$ 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。メタノール-水(1+1)を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- e) **2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時に2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。
- f) **検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(10 µg/mL～50 µg/mL)**: 使用時に2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。
- g) **検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(1 µg/mL～10 µg/mL)**: 使用時に検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンとして 98 % (質量分率) 以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンは和光純薬工業及び関東化学より市販されている。

(3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)**: JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
 - 1) **カラム**: 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
 - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。
 - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 295 nm 付近で測定できるもの。
- b) **マグネチックスターラー**
- c) **遠心分離機**: 1700×g で遠心分離可能なもの。
- d) **高速遠心分離機**: 8000×g～10000×g で遠心分離可能なもの。

- e) **酸性アルミナカートリッジカラム**: 酸性アルミナ 500 mg~1 g を充てんしたもの⁽³⁾に注射筒 10 mL を連結し、メタノール 3 mL を入れ、流下させる。

注(3) 容量 3 mL~6 mL のカラムにシリカゲル 500 mg~1 g を充てんしたカートリッジを用いてもよい。

備考 2. カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、Puresil C₁₈、COSMOSIL 5C18-MS-II 等の名称で市販されている。

備考 3. 酸性アルミナカートリッジは Bond Elut AL-A、Sep-Pak Alumina-A、Supelclean LC-Alumina-A 等の名称で市販されている。

(4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- メタノール-水(1+1) 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 30 分間かき混ぜる。
- 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL にとる。
- 遠心力約 $1700 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁴⁾、上澄み液を抽出液⁽⁵⁾とする。

注(4) 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 $1700 \times g$ 程度となる。

(5) 試料溶液中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、抽出液の一定量をメタノール-水(1+1)で希釈する。

(4.2) **クリーンアップ** クリーンアップは、次のとおり行う。

- 抽出液を酸性アルミナカートリッジカラムに入れる。
- 初めの流出液約 3 mL を捨て、その後の流出液約 2 mL を試験管にとる。
- 流出液を共栓遠心沈殿管⁽⁶⁾ 1.5 mL にとる。
- 遠心力 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁷⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注(6) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(7) 回転半径 7.2 cm~8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 $8100 \times g \sim 10000 \times g$ 程度となる。

備考 4. (4.2)c~d)の操作に代えて、PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

備考 5. 有機物含有しない肥料の場合には、次の方法で試験することができる。

(4.1)c)~d)及び(4.2)a)~b)の操作を省略し、(4.2)c)の「流出液」を「静置後、上澄み液」に変えて操作する。

(4.3) **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

- 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件**: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム**: オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm、粒径 5 μ m)
- 2) **カラム槽温度**: 30 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C
- 3) **溶離液**: メタノール-水 (4+6)
- 4) **流量**: 1 mL/min
- 5) **検出器**: 吸光光度検出器、測定波長 295 nm

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液 10 μ L を HPLC に注入し、波長 295 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液の濃度と波長 295 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10 μ L を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線から 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン量を求め、分析試料中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)を算出する。

備考 6. 化成肥料(1点)及び配合肥料(2点)を用いて回収試験を実施した結果、2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンとして1.0%(質量分率)、0.4%(質量分率)及び0.1%(質量分率)の濃度レベルでの平均回収率は99.1%~100.5%、99.3%~101.6%及び100.2%~100.7%であった。

なお、この試験法の定量下限は0.005%(質量分率)程度である。

参考文献

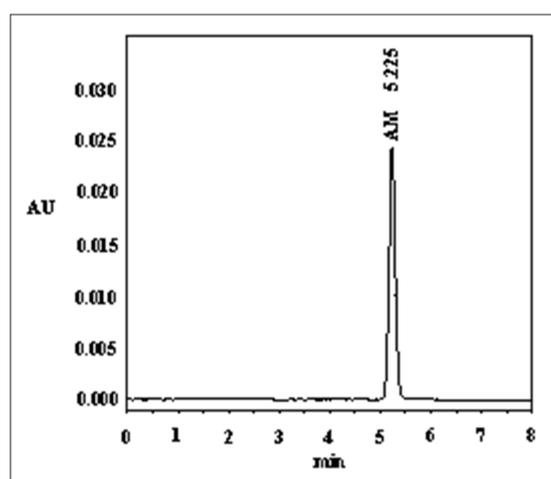
- 1) 白井裕治: 高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンの定量法について, 肥検回報, **44 (3)**, 26~41(1991)

(5) 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)試験法フローシート 肥料中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン試験法のフローシートを次に示す。

分析試料 1.00 g	共栓三角フラスコ 200 mL
	← メタノール-水(1+1) 100 mL
抽出	かき混ぜ、30分間
遠心分離	共栓遠心沈殿管、1700×g、5分間
クリーンアップ	酸性アルミナカートリッジカラム
遠心分離	共栓遠心沈殿管、8000×g～10000×g、5分間
測定	高速液体クロマトグラフ

図 肥料中の2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)試験法フローシート

参考 検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)標準液の HPLC クロマトグラムを次に示す。



参考図 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)標準液の HPLC クロマトグラム

HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(100 ng 相当量)

その他の条件は(4.3) a) HPLC の測定条件の例示のとおり

7.2 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)

7.2.a 高速液体クロマトグラフ法

(1) 概要

この試験法(記号: 7.2.a-2017、ASU.a-1)は1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)を含む肥料に適用する。

水を分析試料に加えて1-アミノ-2-チオ尿素を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 262 nm で測定し、分析試料中の1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)を求める。なお、この試験法の性能は備考4に示す。

(2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) メタノール: HPLC の溶離液に使用するメタノールは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- c) 1-ヘキサスルホン酸ナトリウム: イオンペアークロマトグラフィー用又は同等の品質の試薬。
- d) 酢酸: HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- e) 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(1 mg/mL)⁽¹⁾: 1-アミノ-2-チオ尿素 [C₂H₆N₄S]⁽²⁾ 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。水を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで水を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- f) 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(0.1 mg/mL): 使用時に 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- g) 検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(10 µg/mL～50 µg/mL): 使用時に 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線まで水を加える。
- h) 検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(1 µg/mL～10 µg/mL): 使用時に検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線まで水を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 1-アミノ-2-チオ尿素として 98%(質量分率)以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. 1-アミノ-2-チオ尿素はグアニルチオ尿素として東京化成工業より、アミノチオ尿素として関東化学より市販されている。

(3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
 - 1) カラム: 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
 - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。
 - 3) 検出部: 吸光光度検出器で波長 262 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機: 8000×g～10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、Puresil C₁₈、COSMOSIL 5C18-MS-II 等の名称で市販されている。

(4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーで約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液⁽³⁾を共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁵⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注(3) 試料溶液中の 1-アミノ-2-チオ尿素濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(4) ポリプロピレン製等の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(5) 回転半径 7.2 cm \sim 8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 $8100 \times g \sim 10000 \times g$ 程度となる。

備考 3. (4.1) c \sim d) の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μ m 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) 測定 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件:** 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm \sim 6 mm、長さ 150 mm \sim 250 mm、粒径 5 μ m)
- 2) **カラム槽温度:** 30 $^{\circ}$ C \sim 45 $^{\circ}$ C
- 3) **溶離液:** メタノール-水 (2+8) 1000 mL に 1-ヘキサスルホン酸ナトリウム 0.94 g を溶かし、酢酸で pH 3.15 に調整し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μ m 以下)でろ過する⁽¹⁾。
- 4) **流量:** 1 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 262 nm

b) **検量線の作成**

- 1) 各検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液 10 μ L を HPLC に注入し、波長 262 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液の濃度と波長 262 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c) **試料の測定**

- 1) 試料液 10 μ L を b) 1) と同様に操作する。
- 2) 検量線から 1-アミノ-2-チオ尿素量を求め、分析試料中の 1-アミノ-2-チオ尿素 (ASU) を算出する。

備考 4. 化成肥料(2点)を用いて3点併行で回収試験を実施した結果、1-アミノ-2-チオ尿素として 1.0 % (質量分率)、0.5 % (質量分率) 及び 0.25 % (質量分率) の濃度レベルでの平均回収率は 99.0 % \sim 104.3 %、97.7 % \sim 100.7 % 及び 99.7 % \sim 101.3 % であった。

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1に示す。

なお、この試験法の定量下限は0.005%(質量分率)程度である。

表1 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)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⁾ (%)
化成肥料1	10	0.093	0.009	9.1	0.010	11.2
化成肥料2	10	0.246	0.021	8.6	0.021	8.6
化成肥料3	10	0.511	0.018	3.6	0.025	4.9
化成肥料4	10	0.759	0.039	5.1	0.040	5.3
化成肥料5	10	1.020	0.039	3.8	0.044	4.3

1) 解析に用いた試験室数

2) 平均値(n =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

- 千葉一則：高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の硝酸化成抑制材 1-アミノ-2-チオウレア(ASU)の分析法について，肥検回報，**43** (4)，15~22 (1990)
 - 甲斐茂浩，渡部絵里菜：化成肥料中の硝酸化成抑制材 1-アミノ-2-チオ尿素の測定 —共同試験成績—，肥料研究報告，**6**，36~32 (2013)
- (5) **1-アミノ-2-チオ尿素試験法フローシート** 肥料中の 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)試験法のフローシートを次に示す。

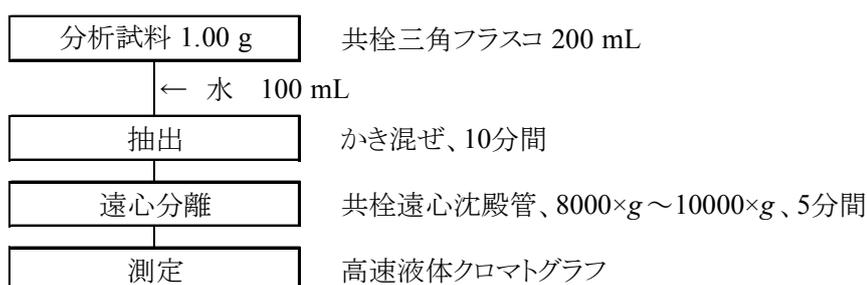
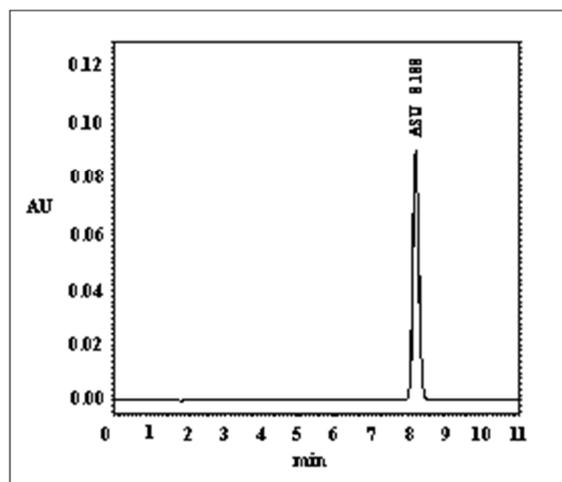


図 肥料中の1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)試験法フローシート

参考 検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素 (ASU) 標準液の HPLC クロマトグラムを次に示す。



参考図 1-アミノ-2-チオ尿素 (ASU) 標準液の HPLC クロマトグラム

HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μ m)

1-アミノ-2-チオ尿素標準液 (200 ng 相当量)

その他の条件は (4.2) a) HPLC の測定条件の例示のとおり

7.3 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)

7.3.a 高速液体クロマトグラフ法

(1) 概要

この試験法(記号: 7.3.a-2017、ATC.a-1)は 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)を含み有機物を含まない肥料に適用する。

メタノールを分析試料に加えて4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、アミノプロピルシリカゲルカラムで分離し、波長 220 nm で測定し、分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)を求める。なお、この試験法の性能は備考 4 に示す。

(2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- b) **メタノール**: HPLC の溶離液に使用するメタノールは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- c) **アセトニトリル**: HPLC の溶離液に使用するアセトニトリルは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- d) **4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(1 mg/mL)**⁽¹⁾⁽²⁾: 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール $[\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4]$ ⁽³⁾ 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。メタノールを加えて溶かし、褐色全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線までメタノールを加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- e) **4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時に 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までメタノールを加える。
- f) **検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(10 µg/mL～50 µg/mL)**: 使用時に 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- g) **検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(1 µg/mL～10 µg/mL)**: 使用時に検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。

注(1) 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩として 1.434 mg/mL を含有している。

(2) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(3) 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールとして 98 % (質量分率) 以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールは 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールとして和光純薬工業及び東京化成工業より、4-アミノ-4*H*-1,2,4-トリアゾールとして関東化学より市販されている。

(3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)**: JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
 - 1) **カラム**: 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にアミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
 - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。
 - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 220 nm 付近で測定できるもの。
- b) **マグネチックスターラー**
- c) **高速遠心分離機**: 8000×g～10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Hibar LiChrosorb NH₂、Inertsil NH₂、Unison UK-Amino、Mightysil NH₂、Shim-pack CLC-NH₂、Shodex NH-5A、Unisil Q NH₂ 等の名称で市販されている。

(4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) メタノール 100 mL を加え、マグネチックスターラーで約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾ 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 8000×g～10000×g で約 5 分間遠心分離し⁽⁵⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注(4) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(5) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 8100×g～10000×g 程度となる。

備考 3. (4.1)c)～d)の操作に代えて、PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料液としてもよい。

(4.2) **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件:** 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** アミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm、粒径 5 μm)
- 2) **カラム槽温度:** 30 °C～40 °C
- 3) **溶離液:** アセトニトリル-メタノール(9+1)
- 4) **流量:** 1 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 220 nm

b) **検量線の作成**

- 1) 各検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液 10 μL を HPLC に注入し、波長 220 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液の濃度と波長 220 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c) **試料の測定**

- 1) 試料液 10 μL を b) 1) と同様に操作する。
- 2) 検量線から 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール量を求め、分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールを算出する。
- 3) 次の式によって 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)を算出する。

$$\begin{aligned} & \text{分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(\% (質量分率))} \\ & = A \times 1.434 \end{aligned}$$

$$A: \text{分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール(\% (質量分率))}$$

備考 4. 化成肥料(2点)を用いて回収試験を実施した結果、4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩として、0.5% (質量分率)、0.3% (質量分率)及び0.2% (質量分率)の濃度レベルでの平均回収率は100.2%～104.9%、100.8%～103.0%及び100.7%～104.2%であった。

なお、この試験法の定量下限は0.005% (質量分率)程度である。

参考文献

- 坂上光一：高速液体クロマトグラフィーによる4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩の分析法について，肥検回報，40(4)，9～16(1987)
- (5) 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)試験法フローシート 肥料中の4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩試験法のフローシートを次に示す。

分析試料 1.00 g	共栓三角フラスコ 200 mL
← メタノール 100 mL	
抽出	かき混ぜ、10分間
遠心分離	共栓遠心沈殿管、8000×g～10000×g、5分間
測定	高速液体クロマトグラフ

図 肥料中の4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)試験法フローシート

7.4 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)

7.4.a 高速液体クロマトグラフ法

(1) 概要

この試験法(記号: 7.4.a-2017、DCS.a-1)はN-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)を含み有機物を含まない肥料に適用する。

メタノール-りん酸(996+4)と水を分析試料に加えてN-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 246 nm で測定し、分析試料中のN-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)を求める。なお、この試験法の性能は備考3に示す。

(2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) **メタノール**: HPLC の溶離液に使用するメタノールは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- d) **りん酸**: JIS K 9005 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- e) **N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(1 mg/mL)⁽¹⁾**: N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸 $[C_{10}H_9Cl_2NO_3]$ 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。メタノールを加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線までメタノールを加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- f) **N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時に N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線までメタノールを加える。
- g) **検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(10 µg/mL~50 µg/mL)**: 使用時に N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- h) **検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(1 µg/mL~10 µg/mL)**: 使用時に検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)**: JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
 - 1) **カラム**: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
 - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
 - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 246 nm 付近で測定できるもの。
- b) **マグネチックスターラー**
- c) **高速遠心分離機**: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 1. カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、Puresil C₁₈、COSMOSIL 5C18-MS-II 等の名称で市販されている。

(4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) メタノール-りん酸 (996+4) 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 30 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液⁽²⁾を共栓遠心沈殿管⁽³⁾ 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁴⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注(2) 試料溶液中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、流出液の一定量をメタノールで希釈する。

(3) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(4) 回転半径 7.2 cm \sim 8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 $8100 \times g \sim 10000 \times g$ 程度となる。

備考 2. (4.1)c \sim d)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μ m 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) 測定 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件:** 高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm \sim 6 mm、長さ 150 mm \sim 250 mm、粒径 5 μ m)
- 2) **カラム槽温度:** 30 $^{\circ}$ C \sim 40 $^{\circ}$ C
- 3) **溶離液:** メタノール-水⁽⁵⁾ (55+45)
- 4) **流量:** 0.8 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 246 nm

注(5) 使用する水は、予めりん酸で pH 3 に調整する。

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液 10 μ L を HPLC に注入し、波長 246 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液の濃度と波長 246 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10 μ L を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線から N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸量を求め、分析試料中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)を算出する。

備考 3. 化成肥料(2 点)及び配合肥料(1 点)を用いて回収試験を実施した結果、N-2,5-ジクロロフェニルス

クシナミド酸として 0.4 % (質量分率)、0.2 % (質量分率) 及び 0.1 % (質量分率) の濃度レベルでの平均回収率は 100.9 % ~ 101.4 %、100.8 % ~ 101.4 % 及び 101.2 % ~ 103.4 % であった。

なお、この試験法の定量下限は 0.005 % (質量分率) 程度である。

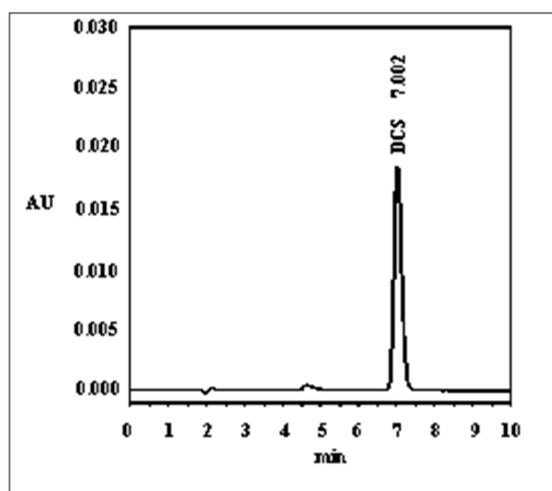
参考文献

- 久保 明：高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の硝酸化成抑制材 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸の分析法の検討について，肥検回報，**44 (4)**，25~36 (1991)
- (5) N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)試験法フローシート** 肥料中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS) 試験法のフローシートを次に示す。

分析試料 1.00 g	共栓三角フラスコ 200 mL
	← メタノールーりん酸 (996+4) 100 mL
抽出	かき混ぜ、30分間
遠心分離	共栓遠心沈殿管、8000×g ~ 10000×g、5分間
測定	高速液体クロマトグラフ

図 肥料中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS) 試験法フローシート

参考 検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS) 標準液の HPLC クロマトグラムを次に示す。



参考図 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸の HPLC クロマトグラム

HPLC の測定条件

カラム： Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液 (100 ng 相当量)

その他の条件は (4.2) a) HPLC の測定条件の例示のとおり