

高速液体クロマトグラフ法による肥料中の尿素性窒素試験法(参考法)

(1) 概要

この試験法は肥料に適用する。

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、弱酸性陽イオン交換樹脂カラムで共存成分を分離し、波長 190 nm で測定して尿素性窒素(U-N)を定量する。

備考 1. この試験法で使用される用語等の規定は肥料等試験法(2014)の **1.1 共通事項**を参照すること。

(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) **りん酸二水素カリウム:** JIS K 9007 に規定する試薬又は同等の品質のもの。
- c) **りん酸:** JIS K 9005 に規定する試薬又は同等の品質のもの。
- d) **尿素:** JIS K 8731 に規定する試薬又は同等の品質のもの。
- e) **尿素性窒素標準液(U-N 1 mg/mL):** 尿素 0.2144 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。
- f) **尿素性窒素標準液(U-N 0.1 mg/mL)⁽¹⁾:** 尿素性窒素標準液(U-N 1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで水を加える。
- g) **検量線用尿素性窒素標準液(U-N 1~50 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 2 mm~4.6 mm、長さ 100 mm~250 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) **吸光光度検出器:** 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) **遠心分離機:** 8000×g で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは#3011-C(日立ハイテクノロジーズ)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。

(4.1.1) 粉状分析用試料

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり⁽²⁾、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 $8000 \times g$ で約 5 分間遠心分離⁽⁵⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注(2) 試験品を目開き $500 \mu\text{m}$ ふるいを全通するまで粉碎した分析用試料から採取する。その他の分析用試料の調製及び試料の保管は、肥料等試験法(2014)の**2. 粉試料の取扱い**を参照すること。

(3) 試料溶液中の尿素性窒素が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、(4.1.1)c)の上澄み液又は(4.1.2)c)の定容した溶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) ローター半径 7 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 $8000 \times g$ 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⁽³⁾、共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾ 1.5 mL にとる。

d) 遠心力 $8000 \times g$ で約 5 分間遠心分離⁽⁵⁾、上澄み液を試料溶液とする。

備考 3. (4.1.1)c)～b)又は(4.1.2)c)～b)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 $0.5 \mu\text{m}$ 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:** 弱酸性イオン交換樹脂カラム(内径 2 mm ～ 4.6 mm 、長さ 100 mm ～ 250 mm 、粒径 $5\sim 10 \mu\text{m}$)

2) **カラム恒温槽:** $40 \text{ }^\circ\text{C}$

3) **溶離液:** りん酸二水素カリウム 0.20 g 及びりん酸 0.29 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 $0.5 \mu\text{m}$ 以下)でろ過する。

4) **流量:** 0.4 mL/min (6 min)→ 0.8 mL/min (9 min)⁽⁶⁾

5) **吸光光度検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 190 nm

注(6) グアニル尿素又はグアニジンが共存している場合は、保持時間 13 分 付近にピークが現れる。

備考 4. 溶離液は、りん酸二水素カリウム 5.0 g 、りん酸 7.3 g を水 500 mL に溶かした溶液を冷蔵保存し、使用時にこの溶液を水で 50 倍に希釈し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 $0.5 \mu\text{m}$ 以下)でろ過してもよい。

b) 検量線の作成

1) 各検量線用尿素性窒素標準液 $10 \mu\text{L}$ を HPLC に注入し、波長 190 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積を求める。

2) 各検量線用尿素性窒素標準液の尿素性窒素濃度とピーク面積から検量線を作成する。

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) 検量線から尿素性窒素 (U-N) 量を求め、分析試料中の尿素性窒素 (U-N) 濃度を算出する。

(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。

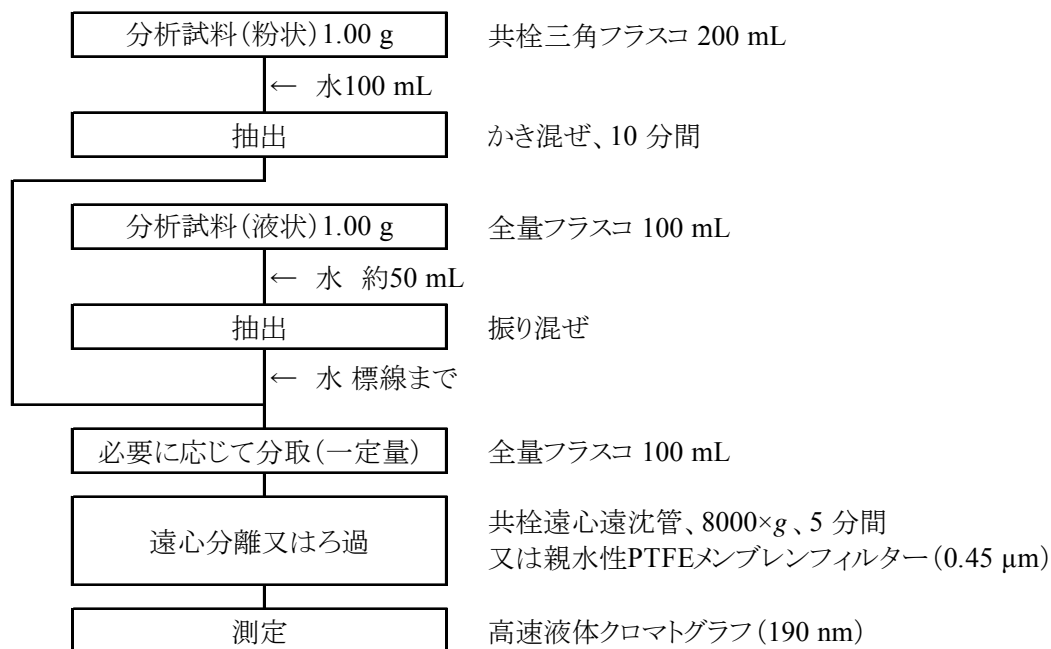
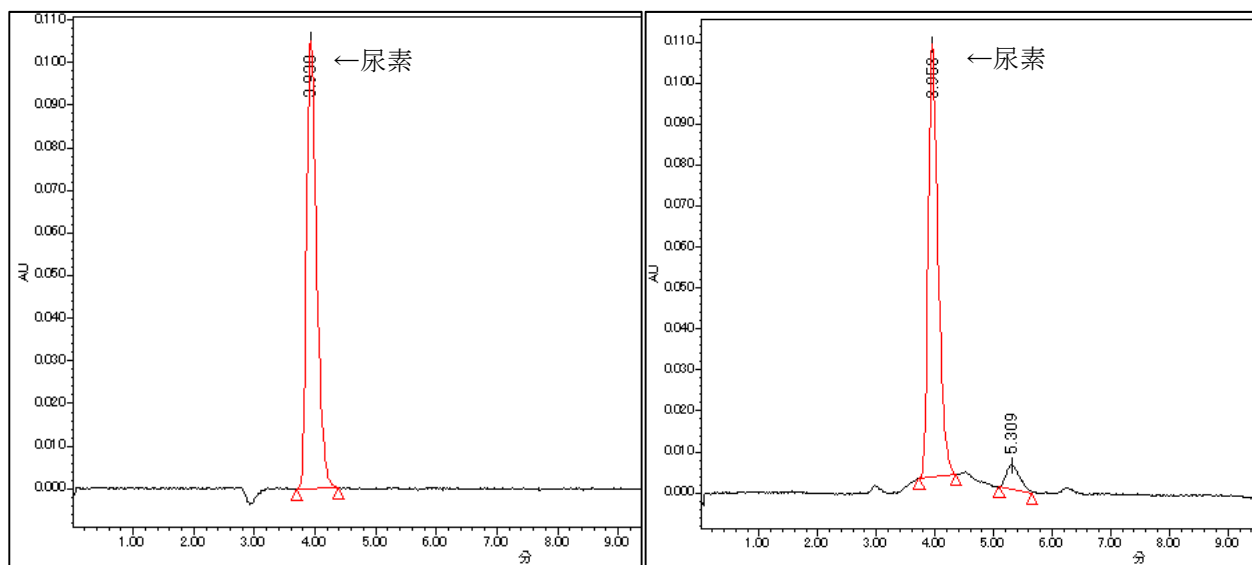


図 肥料中の尿素性窒素試験法のフローシート

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。



(A) 標準液
(U-N 25 µg/mL)

(B) 試料溶液
(有機化成肥料:尿素を 5.2%(U-N 2.4%)含有)

参考図 尿素性窒素のクロマトグラム

HPLC の測定条件

カラム: #3011-C (内径 4.6 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