## 6.3 尿素性窒素

### 6.3.a ウレアーゼ法

#### (1) 概要

この試験法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。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 6.3.a-2017 又は U-N.a-1 とする。

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尿素性窒素(U-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 日間～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、250 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで水を加える(1)。この液一定量を 200 mL～300 mL 三角フラスコにとり、指示薬としてブ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 mol/L～0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター($f_1$)
$= (W_1 \times A \times 0.01/97.104) \times (V_1/V_2) \times (1000/V_3) \times (1/C_1)$

$W_1$: 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): 硫酸約 14 mL を予め水 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(2)200 mL～300 mL を三角フラスコにとり、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(3)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 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(B)
$= V_4/V_5$ ····· (1)

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

**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) 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。

**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) メチルレッドー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) メチルレッドー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)** 5 mL～10 mL
**(3)** 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.** ウレアーゼは、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**: 次の上下転倒式回転振り混ぜ機又はマグネチックスターラー

**aa) 上下転倒式回転振り混ぜ機**: 250 mL～500 mL 全量フラスコを毎分 30 回転～40 回転で上下転倒して回転できるもの。

**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) 上下転倒式回転振り混ぜ機を用いる場合**

**a)** 分析試料 5 g を 1 mg の桁まではかりとり、500 mL 全量フラスコに入れる。

**b)** 水約 400 mL を加え、毎分 30 回転～40 回転で約 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 2.5 g を 1 mg の桁まではかりとり、250 mL 全量フラスコに入れてもよい。その場合は b)の操作で水約 200 mL を加える。

**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 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。

**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.c** の(**4.1**)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 300 mL 蒸留フラスコに入れる。

**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[4]。

**d)** 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[5][6]、密栓して 40 °C～45 °C の水浴中で加温する。

**e)** 放冷して試料溶液とする。

**f**） 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(7)、未分解試験溶液を調製する。

**g**） ウレアーゼ空試験として、別の蒸留フラスコを用いて **b**）、**d**）及び **e**）の操作を実施し(6)(8)、空試験溶液を調製する。

**注**（**4**） pH 5.6～pH 5.8

（**5**） ウレアーゼの添加量の一例を**備考 10** に示す。

（**6**） ウレアーゼが蒸留フラスコの壁面についた場合、少量の水で洗い落とす。

（**7**） 試料溶液の調製と同量の抽出液を分取する。

（**8**） 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(9)を受器(10)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(9)を受器(10)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(11)、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**（**9**） 5 mL～20 mL

（**10**） 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 200 mL～300 mL 三角フラスコ又はビーカーを用いる。

（**11**） 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、蒸留フラスコ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(3)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。

**d**） 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））

$$=((B\times V_6-V_7)-(B\times V_6-V_8)-(B\times V_6-V_9))\times C_1\times f_1\times(V_{10}/V_{11})\times(14.01/W_2)\times(100/1000)$$

$=(-(B\times V_6)-(V_7-V_8-V_9))\times C_1\times f_1\times(V_{10}/V_{11})\times(1.401/W_2)$

$B$: 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

$V_6$: (**4.3**)**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(12)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。

**d**) 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))

$=(V_{12}-V_{13}-V_{14})\times C_2\times 2\times f_2\times(V_{10}/V_{11})\times(14.01/W_2)\times(100/1000)$

$=(V_{12}-V_{13}-V_{14})\times C_2\times f_2\times(V_{10}/V_{11})\times(2.802/W_2)$

$V_{12}$: (**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**(12) 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 分間～2 分間煮沸し、冷却した後滴定するとよい。

**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。

尿素の含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の量は次の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の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)
$=(D_2/100)\times(60.062/(14.01\times2))\times W_2\times(V_{11}/V_{10})$
$=(D_2/100)\times2.144\times W_2\times(V_{11}/V_{10})$

$D_2$: 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((**4.4.1**)**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((**4.4.1**)**b**)又は(**4.4.2**)**b**))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 点を用いた日を変えての分析結果について、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、0.4 %（質量分率）程度と推定された。

表1　尿素性窒素の日を変えた試験成績の解析結果

| 試料名 | 日数[1] $T$ | 平均値[2] (%)[3] | 併行精度 $s_r$[4] (%)[3] | 併行精度 $RSD_r$[5] (%) | 中間精度 $s_{I(T)}$[6] (%)[3] | 中間精度 $RSD_{I(T)}$[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） 2点併行分析を実施した日数
2） 平均値（$n$= 日数（$T$）×併行数（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

**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)

**2**） 藤田敏文, 加藤公栄, 新見豊和, 木村康晴, 伊藤浩平, 白井裕治: 尿素性窒素試験法（ウレアーゼ法）の性能調査, 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**, 195~207 (2017)


（**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。

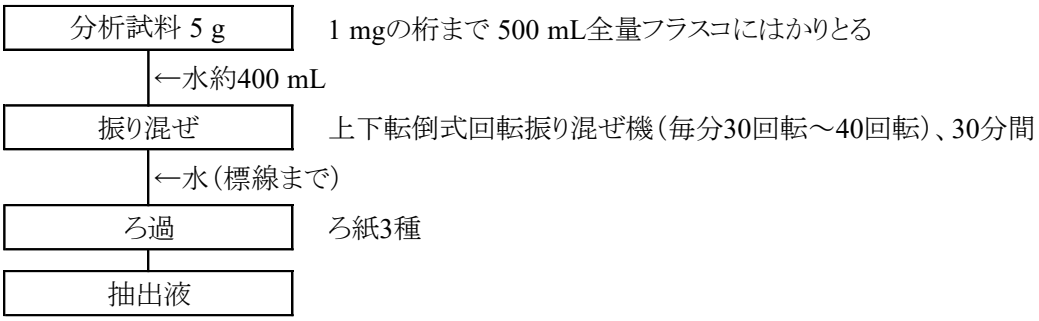



図1-1　尿素性窒素試験法フローシート（抽出操作（4.1.1））

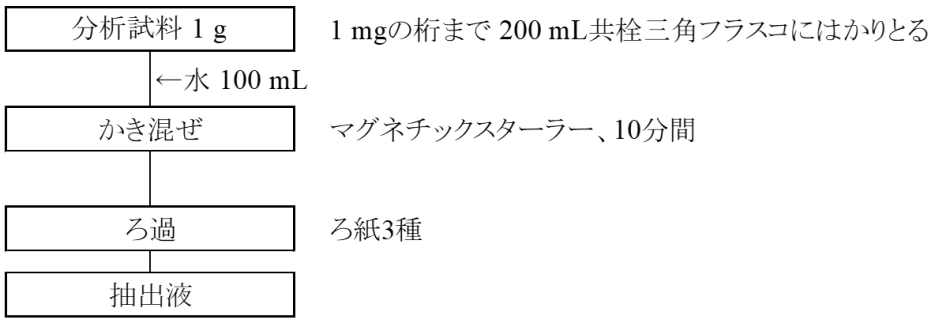



図1-2　尿素性窒素試験法フローシート（抽出操作（4.1.2））

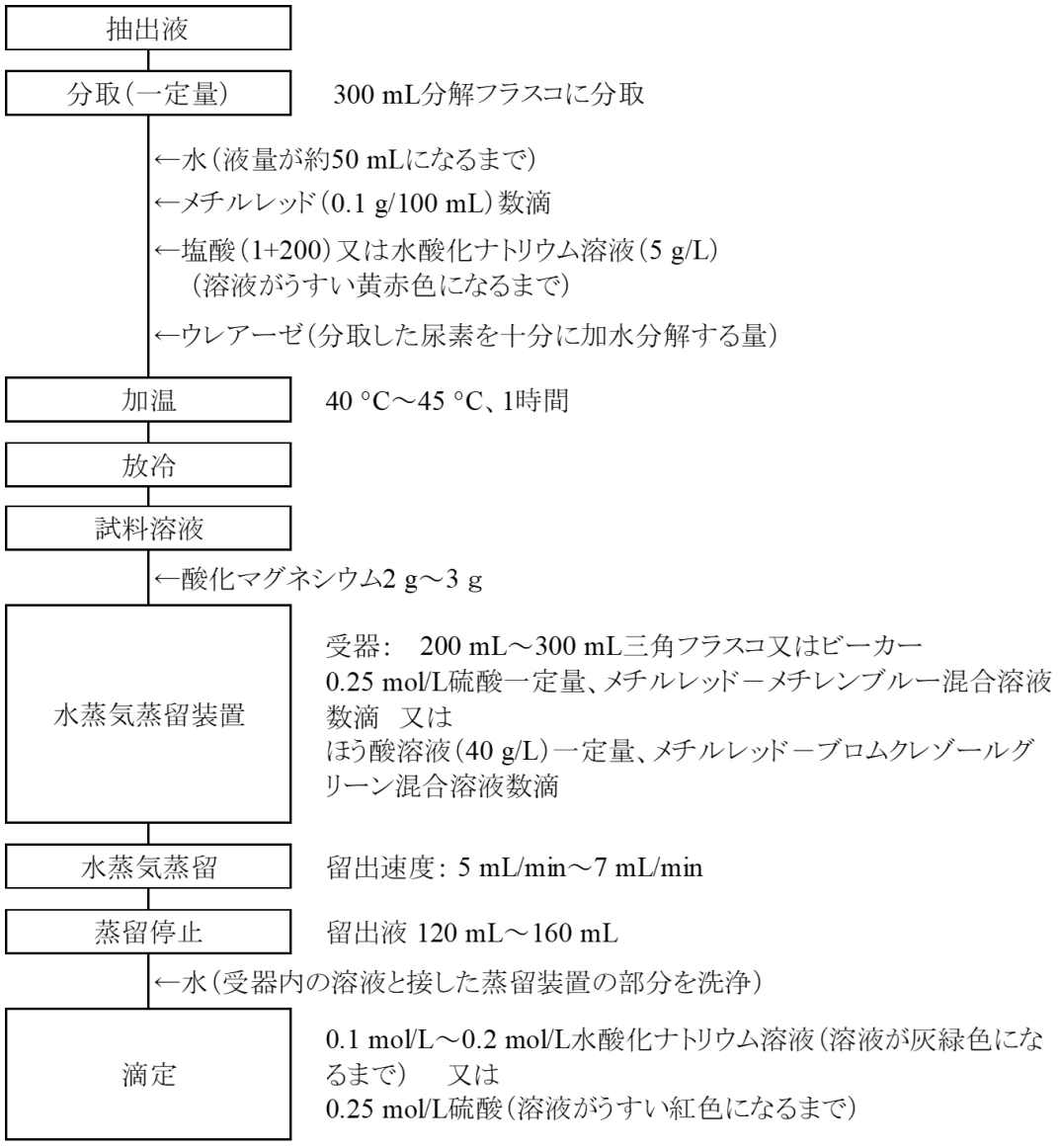



図2　尿素性窒素試験法フローシート（ウレアーゼによる加水分解、蒸留及び測定操作）