6. その他の制限事項に係る試験

6.1 ジシアンジアミド性窒素

6.1.a 高速液体クロマトグラフ法(1)

(1) 概要

この試験法は石灰窒素及びそれを含む肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 6.1.a-2017 又は Dd-N.a-1 とする。

メタノールを分析試料に加えてジシアンジアミド(Dd)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 215 nm で測定し、分析試料中のジシアンジアミド性窒素(Dd-N)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: 高速液体クロマトグラフの溶離液に使用するメタノールは高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。

c) アセトニトリル: 高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。

d) ジシアンジアミド標準液(1000 μg/mL)(1): ジシアンジアミド[$C_2H_4N_4$](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。少量のメタノールを加えて溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、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) ジシアンジアミド標準液(100 μg/mL): ジシアンジアミド標準液(1000 μg/mL)10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線までメタノールを加える。

f) 検量線用ジシアンジアミド標準液(10 μg/mL～50 μg/mL): 使用時にジシアンジアミド標準液(100 μg/mL)の 5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。

g) 検量線用ジシアンジアミド標準液(1 μg/mL～10 μg/mL): 使用時に検量線用ジシアンジアミド標準液(20 μg/mL)の 2.5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、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。

(2) ジシアンジアミドとして 98 %(質量分率)以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. ジシアンジアミドは東京化成工業より市販されている。また、富士フイルム和光純薬及び関東化学よりジシアノジアミドとして市販されている。

(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: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフ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 215 nm 付近で測定できるもの。

b) 垂直往復振り混ぜ機: フラスコ用アダプターを用いて 200 mL～300 mL 共栓三角フラスコを毎分 300 往復(振幅 40 mm)で垂直往復振り混ぜできるもの。

c) 高速遠心分離機: 8000×*g*～10 000×*g* で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Hibar LiChrosorb NH_2、Inertsil NH_2、Unison UK-Amino、Mightysil NH_2、Shim-pack CLC-NH_2、Shodex NH-5A、Unisil Q NH_2 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 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL～300 mL 共栓三角フラスコに入れる。

b) 直ちにメタノール 100 mL を加え(3)、毎分 300 往復(振幅 40 mm)で約 10 分間振り混ぜる。

c) 静置後、上澄み液を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管(4)に 1.5 mL 程度とる。

d) 遠心力 8000×*g*～10 000×*g* で約 5 分間遠心分離する(5)。

e) 上澄み液 1 mL を試料溶液とする。

注(3) 空気中に放置すると定量値が高くなるので、直ちにメタノールを加える。

(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～8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 8100×*g*～10 000×*g* 程度となる。

備考 3. (**4.1**)**c**)～**e**)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。

(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: 高速液体クロマトグラフ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(6+1)

4) 流量: 1 mL/min

5) 検出器: 吸光光度検出器、測定波長 215 nm

b) 検量線の作成

1) 各検量線用ジシアンジアミド標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 215 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) 各検量線用ジシアンジアミド標準液の濃度と波長 215 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) 試料溶液を 10 μL を **b**)**1**)と同様に操作する。

2) 検量線からジシアンジアミド(Dd)量を求め、分析試料中のジシアンジアミド(Dd)濃度を算出する。

3) 次の式によってジシアンジアミド性窒素(Dd-N)を算出する。

分析試料中のジシアンジアミド性窒素(Dd-N)(%(質量分率))

$= A \times (MW_1/MW_2)$

$=A\times 0.6664$

A: 分析試料中のジシアンジアミド(Dd)(%(質量分率))

MW_1: 窒素の 4 原子量(56.04)

MW_2: ジシアンジアミドの分子量(84.092)

備考 4. 石灰窒素(3 点)及び石灰窒素入り配合肥料(2 点)を用いて回収試験を実施した結果、ジシアンジアミドとして 6 %(質量分率)及び 0.6 %(質量分率)の濃度レベルでの回収率は 94.9 %～105.1 %及び 95.6 %～103.5 %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 0.01 %(質量分率)程度と推定された。

表1 ジシアンジアミド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)] (%)
石灰窒素1	9(2)	0.0321	0.0010	3.2	0.0012	3.8
石灰窒素2	10(1)	0.159	0.002	1.3	0.006	3.8
石灰窒素3	11(0)	0.245	0.002	0.7	0.008	3.3
配合肥料1	11(0)	0.124	0.001	0.7	0.002	2.0
配合肥料2	11(0)	0.410	0.007	1.6	0.008	1.9

1) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)
2) 平均値(n=有効試験室数×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

1) 齊木雅一, 浅尾美由起: 石灰窒素等中のジシアンジアミド性窒素測定 －高速液体クロマトグラフ法－, 肥料研究報告, **2**, 25~31 (2009)

2) 齊木雅一, 義本将之: 石灰窒素等中のジシアンジアミド性窒素測定 －共同試験成績－, 肥料研究報告, **2**, 32~37 (2009)

(5) ジシアンジアミド性窒素試験法フローシート 石灰窒素及び石灰窒素を含む肥料中のジシアンジアミド性窒素試験法のフローシートを次に示す。

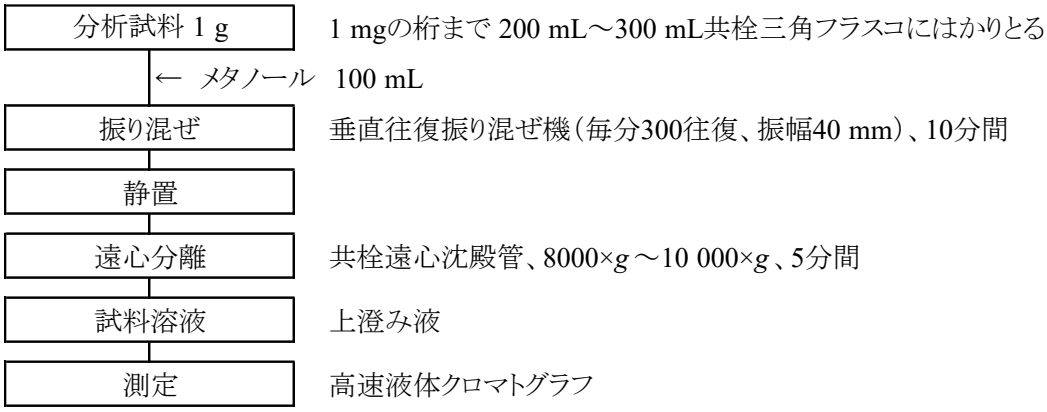
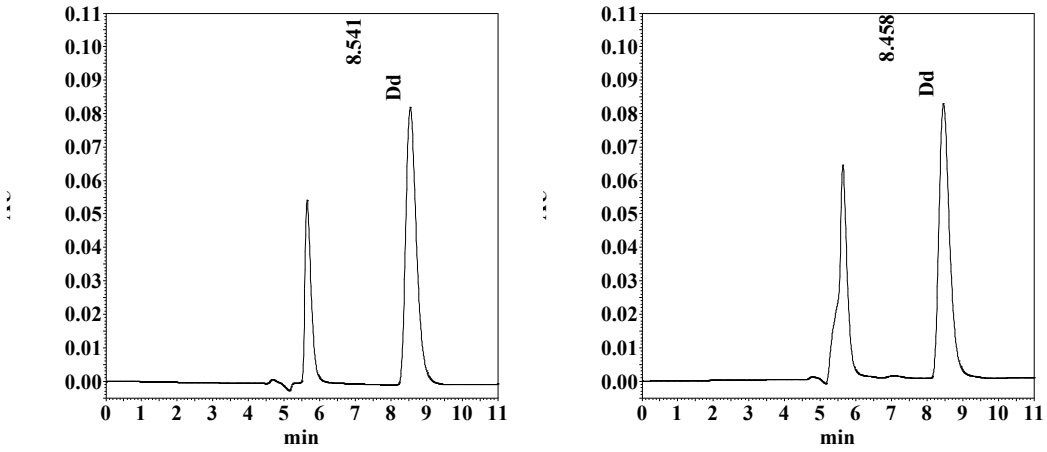


図　石灰窒素及び石灰窒素を含む肥料中のジシアンジアミド性窒素試験法フローシート

参考 検量線用ジシアンジアミド標準液及び試料溶液（石灰窒素）の HPLC クロマトグラム例を次に示す。



1） 標準液　　2） 試料溶液

参考図　ジシアンジアミドの HPLC クロマトグラム

1） ジシアンジアミド標準液（ジシアンジアミド 100 ng 相当量（10 µg/mL、10 µL））

2） 試料溶液（石灰窒素）

HPLC の測定条件

カラム： Hibar LiChrosorb NH_2（内径 4.6 mm、長さ 25 cm、粒径 5 µm）

その他の条件は（**4.2**）**a**）HPLC の測定条件の例示のとおり