6.1 ジシアンジアミド性窒素

6.1.b 高速液体クロマトグラフ法(2)

(1) 概要

この試験法は肥料に適用する。ただし、石灰窒素は適用範囲から除く。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 6.1.b-2017 又は Dd-N.b-1 とする。

分析試料に水を加えてジシアンジアミドを抽出し、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、分析試料中のジシアンジアミド性窒素(Dd-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、ビウレット性窒素(B-N)、尿素性窒素(U-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 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) りん酸二水素カリウム: JIS K 9007 に規定する特級又は同等の品質のもの。

c) りん酸: JIS K 9005 に規定する特級又は同等の品質のもの。

d) ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 2000 μg/mL)(1): ジシアンジアミド[$C_2H_4N_4$](2) 0.3 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、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで水を加える。

e) 検量線用ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 200 μg/mL)(1): ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 2000 μg/mL)10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線まで水を加える。

f) 検量線用ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 50 μg/mL～100 μg/mL)(1): ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 200 μg/mL)25 mL～50 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線まで水を加える。

g) 検量線用ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 1 μg/mL～50 μg/mL)(1): 使用時にジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-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) 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) 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: 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 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*～10 000×*g* で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Asahipak ES-502C 7C 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 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) 静置後、上澄み液[3]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 分間遠心分離し[5]、上澄み液を試料溶液とする。

注(3) 試料溶液中のジシアンジアミド性窒素(Dd-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。

(4.1.2) 液状分析用試料(簡易抽出)

a) 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、100 mL 全量フラスコに入れる。

b) 水約 50 mL を加えて、振り混ぜる。

c) 標線まで水を加え[6]、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 分間遠心分離し[5]、上澄み液を試料溶液とする。

注(6) 試料溶液中のジシアンジアミド性窒素(Dd-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 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 4.0 mm～7.5 mm、長さ 100 mm～150 mm、粒径 5 μm～10 μm)

2) カラム槽温度: 40 °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 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 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 を高速液体クロマトグラフに注入し、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ジシアンジアミド性窒素（Dd-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ジシアンジアミド性窒素（Dd-N）量を求め、分析試料中のジシアンジアミド性窒素（Dd-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、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、3 %（質量分率）、1.5 %（質量分率）及び 0.3 %（質量分率）の添加レベルでの平均回収率はそれぞれ 96.3 %～96.3 %、94.5 %～99.7 %及び 88.9 %～100.6 %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。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 0.01 %（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] (%)
配合肥料	5	3.03	0.02	0.5	0.02	0.5
化成肥料	5	1.45	0.01	0.9	0.02	1.6
家庭園芸用複合肥料	5	0.145	0.001	0.9	0.003	2.3

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

表2　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)] (%)
化成肥料1	10(2)	0.0464	0.0023	5.0	0.0148	31.9
化成肥料2	12(0)	0.206	0.011	5.1	0.031	15.2
化成肥料3	12(0)	1.69	0.05	2.8	0.12	7.0
化成肥料4	10(2)	2.76	0.07	2.6	0.12	4.4

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）惠智正宏, 木村康晴, 白井裕治: 高速液体クロマトグラフ（HPLC）法による肥料中の尿素性窒素, 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**, 72~85 (2017)

2）船木紀夫, 木村康晴: 高速液体クロマトグラフ（HPLC）法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定　－共同試験成績－, 肥料研究報告, **10**, 86~100 (2017)

（5）ジシアンジアミド性窒素試験法フローシート　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。

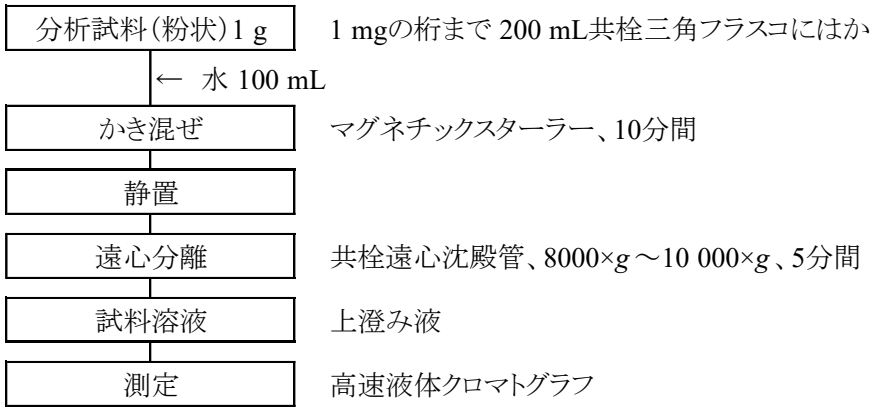


図1　肥料中のジシアンジアミド性窒素試験法のフローシート（抽出操作（4.1.1）及び測定）

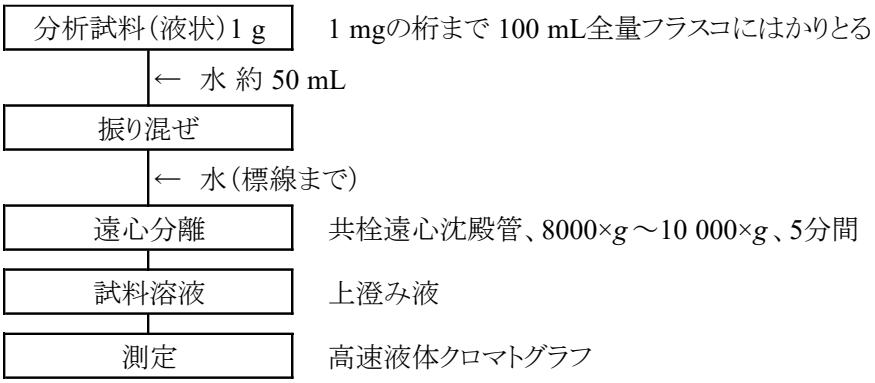
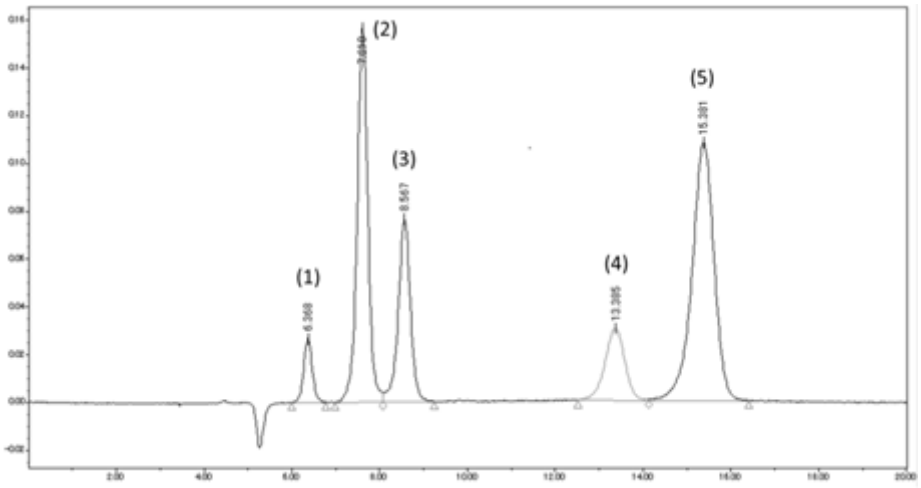


図2　肥料中のジシアンジアミド性窒素試験法のフローシート (抽出操作(4.1.2)及び測定)

参考　ジシアンジアミド性窒素の検量線用標準液のクロマトグラム例を次に示す。



参考図　検量線用混合標準液(各 10 µg/mL)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