

## 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**: 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 用又は同等の品質の試薬。
- d) **ジシアンジアミド標準液(1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: ジシアンジアミド[C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>]<sup>(2)</sup>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、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) **ジシアンジアミド標準液(0.1 mg/mL)**: ジシアンジアミド標準液(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(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。

(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富士フィ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(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 215 nm 付近で測定できるもの。
- b) **垂直往復振とう機**: フラスコ用アダプターを用いて全量フラスコ 250 mL を 300 往復/分(振幅 40 mm)で垂直往復振とうさせられるもの。
- 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 NH<sub>2</sub>、Inertsil NH<sub>2</sub>、Unison UK-Amino、Mightysil NH<sub>2</sub>、Shim-pack

CLC-NH<sub>2</sub>、Shodex NH-5A、Unisil Q NH<sub>2</sub>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～300 mL に入れる。
- b) 直ちにメタノール 100 mL を加え<sup>(3)</sup>、300 往復/分(振幅 40 mm)で約 10 分間振り混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 8000×g～10000×g で約 5 分間遠心分離する<sup>(5)</sup>。
- 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)～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(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(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 HPLC 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(56.027)

$MW_2$ : ジシアンジアミドの分子量(84.080)

**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)程度である。

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 <sup>1)</sup> | 平均値 <sup>2)</sup><br>(%) <sup>3)</sup> | $s_r$ <sup>4)</sup><br>(%) <sup>3)</sup> | $RSD_r$ <sup>5)</sup><br>(%) | $s_R$ <sup>6)</sup><br>(%) <sup>3)</sup> | $RSD_R$ <sup>7)</sup><br>(%) |
|-------|--------------------|--|--|------------------------------|--|------------------------------|
| 石灰窒素1 | 9                  | 0.0321                                 | 0.0010                                   | 3.2                          | 0.0012                                   | 3.8                          |
| 石灰窒素2 | 10                 | 0.159                                  | 0.002                                    | 1.3                          | 0.006                                    | 3.8                          |
| 石灰窒素3 | 11                 | 0.245                                  | 0.002                                    | 0.7                          | 0.008                                    | 3.3                          |
| 配合肥料1 | 11                 | 0.124                                  | 0.001                                    | 0.7                          | 0.002                                    | 2.0                          |
| 配合肥料2 | 11                 | 0.410                                  | 0.007                                    | 1.6                          | 0.008                                    | 1.9                          |

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

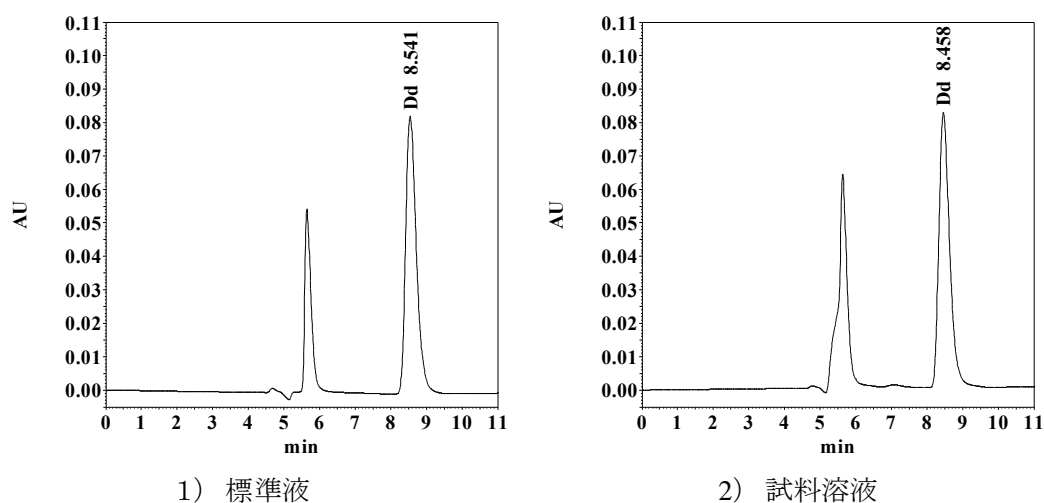
- 1) 齊木雅一, 浅尾美由起: 石灰窒素等中のジシアンジアミド性窒素測定 —高速液体クロマトグラフ法—, 肥料研究報告, **2**, 25~31 (2009)
- 2) 齊木雅一, 義本将之: 石灰窒素等中のジシアンジアミド性窒素測定 —共同試験成績—, 肥料研究報告, **2**, 32~37 (2009)

(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。

|                |                                |
|----------------|--------------------------------|
| 分析試料 1.00 g    | 共栓三角フラスコ 200 mL~300 mL         |
| ← メタノール 100 mL |                                |
| 振り混ぜ           | 垂直往復振とう機(300往復/分、振幅40 mm)、10分間 |
| 静置             |                                |
| 遠心分離           | 共栓遠心沈殿管、8000×g~10000×g、5分間     |
| 試料溶液           | 上澄み液                           |
| 測定             | 高速液体クロマトグラフ                    |

図 石灰窒素及び石灰窒素を含有する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 クロマトグラムを次に示す。



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<sub>2</sub>(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

## 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) 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) ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 2 mg/mL)<sup>(1)</sup>: ジシアンジアミド[C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>]<sup>(2)</sup> 0.300 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) 検量線用ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 200 µg/mL)<sup>(1)</sup>: ビウレット性窒素標準液(B-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) 検量線用ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 50 µg/mL~100 µg/mL)<sup>(1)</sup>: ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-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) 検量線用ジシアンジアミド性窒素標準液(Dd-N 1 µg/mL~50 µg/mL)<sup>(1)</sup>: 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、富士フィルム和光純薬及び関東化学よりジシアン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(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<sup>(3)</sup>を共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 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<sup>(5)</sup>、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、振り混ぜる。
- c) 標線まで水を加え<sup>(6)</sup>、共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup> 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<sup>(5)</sup>、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  $\mu\text{m}$  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<sup>(1)</sup>:** 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  $\mu\text{m}$  以下)でろ過する。
- 4) **流量:** 0.6 mL/min
- 5) **注入量:** 10  $\mu\text{L}$
- 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 0.01 % (質量分率) 程度である。

表1 ジシアンジアミド性窒素の日を変えての反復試験成績の解析結果

| 試料名       | 反復試験<br>日数 ( $T$ ) <sup>1)</sup> | 平均値 <sup>2)</sup><br>(%) <sup>3)</sup> | $s_r$ <sup>4)</sup><br>(%) <sup>3)</sup> | $RSD_r$ <sup>5)</sup><br>(%) | $s_{I(T)}$ <sup>6)</sup><br>(%) <sup>3)</sup> | $RSD_{I(T)}$ <sup>7)</sup><br>(%) |
|-----------|----------------------------------|--|--|------------------------------|---|-----------------------------------|
| 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 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<br>室数 <sup>1)</sup> | 平均値 <sup>2)</sup><br>(%) <sup>3)</sup> | $s_r$ <sup>4)</sup><br>(%) <sup>3)</sup> | $RSD_r$ <sup>5)</sup><br>(%) | $s_R$ <sup>6)</sup><br>(%) <sup>3)</sup> | $RSD_R$ <sup>7)</sup><br>(%) |
|-------|------------------------|--|--|------------------------------|--|------------------------------|
| 化成肥料1 | 10                     | 0.0464                                 | 0.0023                                   | 5.0                          | 0.0148                                   | 31.9                         |
| 化成肥料2 | 12                     | 0.206                                  | 0.011                                    | 5.1                          | 0.031                                    | 15.2                         |
| 化成肥料3 | 12                     | 1.69                                   | 0.05                                     | 2.8                          | 0.12                                     | 7.0                          |
| 化成肥料4 | 10                     | 2.76                                   | 0.07                                     | 2.6                          | 0.12                                     | 4.4                          |

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

- 1) 恵智正宏, 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) **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。

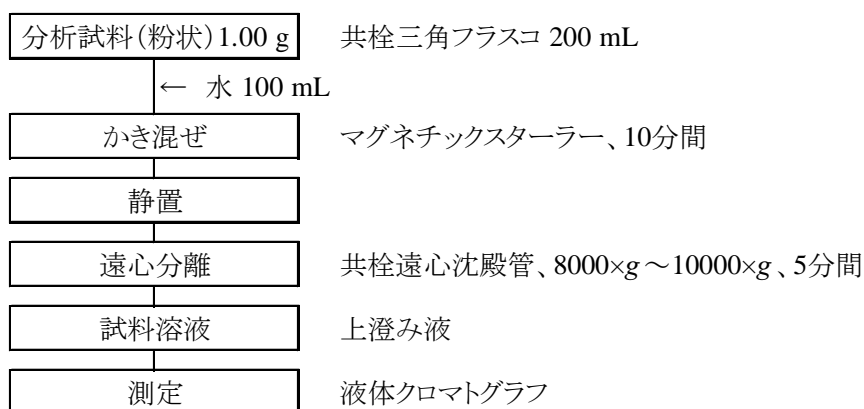


図1 肥料中のジシアンジアミド性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.1)及び測定)



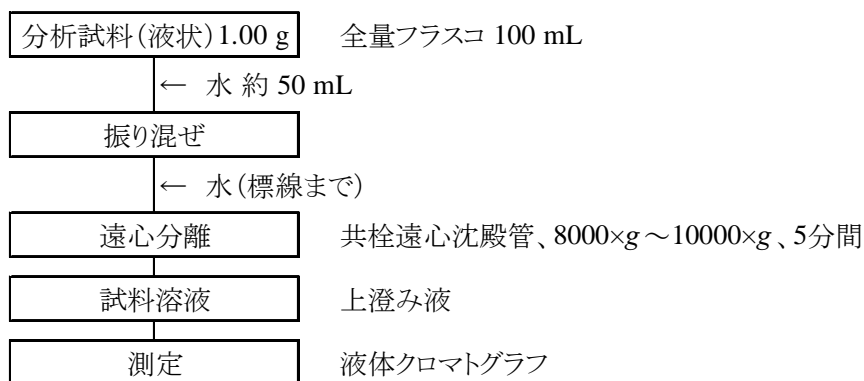
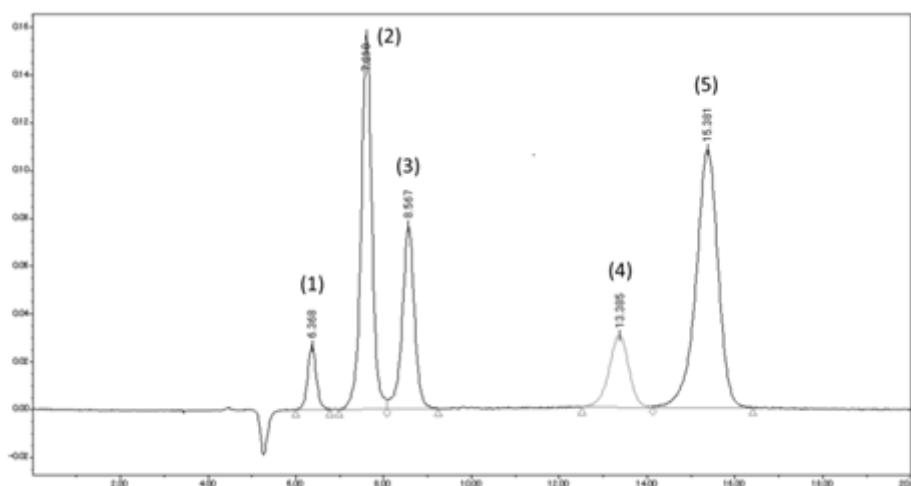


図2 肥料中のジシアンジアミド性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.2)及び測定)

**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