

## 6-1 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 —

惠智正宏<sup>1</sup>, 木村康晴<sup>2</sup>, 白井裕治<sup>3</sup>

**キーワード** 尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素,  
グアニル尿素性窒素

#### 1. はじめに

近年, 施肥作業省力化や環境保全等の観点から肥効調節型肥料が注目されており<sup>1)</sup>, 多くの緩効性窒素肥料が使用されている. 緩効性窒素肥料の主原料の一つである尿素は, 製造時に高温下での粒状化工程等でビウレットを生成し, 葉面散布時に植害が生じる恐れがあることから<sup>2), 3)</sup>, 公定規格において, 含有を許される有害成分の最大量が設定されている. また, 尿素性窒素, ジシアンジアミド性窒素及びグアニジン性窒素は, 緩効性能に影響を及ぼすことから, 同じく公定規格<sup>4)</sup>において, 含有量が制限項目として設定されている.

検査機関, 肥料メーカー品質管理部門等では, 迅速な分析が求められる一方, 詳解肥料分析法等<sup>5), 6)</sup>に記載されている従来法は, 分析操作に習熟を要し, その簡便性, 迅速性等が課題になると考えられる. 近年, 肥料分析において, 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法の導入が進んでおり<sup>7)</sup>, 弱酸性陽イオン交換カラムを用いることで, 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), さらにグアニル尿素性窒素(GU-N)の一斉分析が可能と推測された. そこで, HPLC法による5成分一斉分析法として, 対象成分の選択性, 検量線の直線性, 測定の真度, 定量下限及び夾雑物の影響排除等の検討を行ったので概要を報告する.

#### 2. 材料及び方法

##### 1) 供試試料

ホルムアルデヒド加工尿素肥料4点, 尿素3点, メチロール尿素重合肥料2点, 硫酸グアニル尿素2点, イソブチルアルデヒド縮合尿素2点, アセトアルデヒド縮合尿素1点及び原料に尿素又はホルムアルデヒド加工尿素肥料を含む肥料(化成肥料11点, 液状窒素肥料8点, 家庭園芸用複合肥料7点, 被覆窒素肥料3点及び配合肥料1点)の合計44点を供試肥料とした. 供試試料のうち固形のものには, 500 µmのスクリーンを装着した遠心粉碎機を用いて粉碎した.

##### 2) 試薬等の調製

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター (現) 肥飼料安全検査部

<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

<sup>3</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

(1) 精製水: HPLCの移動相及び標準液の調製にはDirectQ 3UV (MILLIPORE)で製造した超純水, 試料の抽出等の前処理操作にはRFD240NA (ADVANTEC)で製造した蒸留水を用いた.

(2) リン酸塩緩衝液(移動相): 特級りん酸二水素カリウム( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Wako) 19.60 g 及び特級りん酸( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Wako) 0.584 g を超純水に溶かして 500 mL とし, 使用時に超純水で 10 倍に希釈して使用した.

(3) 尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素標準液: 尿素( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , Wako) 0.2145 g, ビウレット( $(\text{CO}\cdot\text{NH}_2)_2\text{NH}$ , 東京化成) 0.2454 g, 特級ジシアンジアミド( $(\text{CN}\cdot\text{NH}_2)_2$ ) 0.1502 g, グアニジン硫酸塩( $\text{C}_2\text{H}_{10}\text{N}_6\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0.2574 g 及びグアニル尿素硫酸塩( $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_8\text{O}_2\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0.2699 g をそれぞれ超純水に溶かし 100 mL とした(各成分の窒素(N)として, いずれも 1.0 g/L に相当).

(4) 検量線用混合標準液(各成分のNとして 1 mg/L~200 mg/L): 尿素性窒素標準液, ビウレット性窒素標準液, ジシアンジアミド性窒素標準液, グアニジン性窒素標準液及びグアニル尿素性窒素標準液の一定量を混合し, 水で順次希釈し, 各成分のNとして 1 mg/L~200 mg/L の濃度の検量線用混合標準液を調製した.

### 3) 器具及び装置

Table 1 に示した装置及び測定条件により HPLC 測定を行った. なお, ホルムアルデヒド加工尿素肥料を含む肥料については, その成分由来のピークを分離するため HAMILTON PRP-X200 弱酸性陽イオン交換カラム (HAMILTON PRP-X200)を用い, それ以外は Asahipak ES-502C 7C 弱酸性陽イオン交換カラム (Asahipak ES-502C 7C)を用いた. 前処理に親水性 PTFE (Polytetrafluoroethylene) メンブレンフィルター (孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , ADVANTEC), マグネチックスターラー (OCUTOPUS CS-1), 高速遠心分離機 6800 (KUBOTA) 及び遠心粉碎器 ZM-200 (Retsch) を用いた.

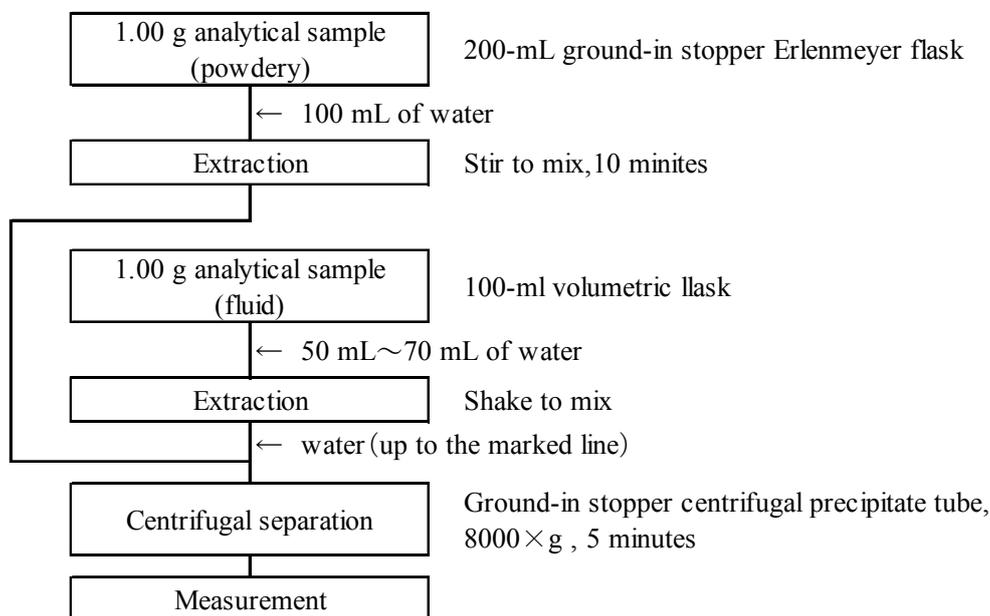
Table 1 HPLC Conditions

HPLC	Waters 2695 Separation module
Detector system	2996 photo diode array detector
Wavelength	190 nm
Column	(1) Asahipak ES-502C 7C (100 mm L×7.5 mm I.D. 9 $\mu\text{m}$ particle size) (2) HAMILTON PRP-X200 (150 mm L×4.1 mm I.D. 10 $\mu\text{m}$ particle size)
Column temperature	40 °C
Mobile phase	Phosphate buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 28.81 mmol/L, $\text{H}_3\text{PO}_4$ 1.19 mmol/L)
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	10 $\mu\text{L}$
Measurement time	20 min

### 4) 試験操作

試料の調製について Scheme 1 に示した. 固形試料は, 1.00 g を 200 mL の共栓付き三角フラスコにはかりとり, 100 mL の蒸留水を加え, マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜた. これを遠沈管に移して 8000  $\times g$  で約 5 分間遠心分離した上澄み液を測定液とした. その試料溶液を Table 1 の測定条件で測定し, 得られたピーク面積から検量線法により試料液中の尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素の質量を求め, 分析試料中の濃度を算出した.

液状の分析試料は、分析試料 1.00 g を 100 mL の全量フラスコにはかり取り、約 50 mL の蒸留水を加えて蓋をして振り混ぜた後、100 mL とした。これを遠沈管に移して  $8000 \times g$  で約 5 分間遠心分離した上澄み液を測定液とした。以降は固形肥料と同じ操作を行った。



Scheme 1 Method flow sheet for Urea nitrogen (U-N), Biuret nitrogen (B-N), Dicyandiamide nitrogen (Dd-N), Guanidine nitrogen (Gd-N) and Guanylurea nitrate (GU-N) in fertilizers

### 3. 結果及び考察

#### 1) 測定条件の検討

移動相は、りん酸二水素カリウム( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )及びりん酸( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )の緩衝液とし、20通りの濃度比率で移動相を作成して最適な移動相組成を検討した。Asahipak ES-502C 7Cを用いて混合標準液(10 mg/L)を測定したところ、りん酸緩衝液の濃度変化に対してグアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素の保持時間が、大きく変動する傾向が認められた(Fig. 1)。尿素性窒素、ビウレット性窒素、ジシアンジアミド性窒素、グアニジン性窒素、グアニル尿素性窒素の順に5成分が分離され(Fig. 2-1)、移動相濃度は  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  28.81 mmol/L,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1.19 mmol/L が最適と判断した。

なお、ホルムアルデヒド加工尿素肥料について、本法により調製した試料溶液をAsahipak ES-502-C 7を用いてクロマトグラムを作成したところ、尿素性窒素と夾雑成分のピークが重なった(Fig. 2-2)。そのため、HAMILTON PRP-X200 カラムを用いて、同様に調製した試料溶液について同じ測定条件でクロマトグラムを作成したところ、夾雑成分と分離した尿素性窒素のピークが得られた(Fig. 2-3)。このことから、ホルムアルデヒド加工尿素肥料及びそれを含む肥料中の尿素性窒素の測定には HAMILTON PRP-X200 カラムを用いることとした。

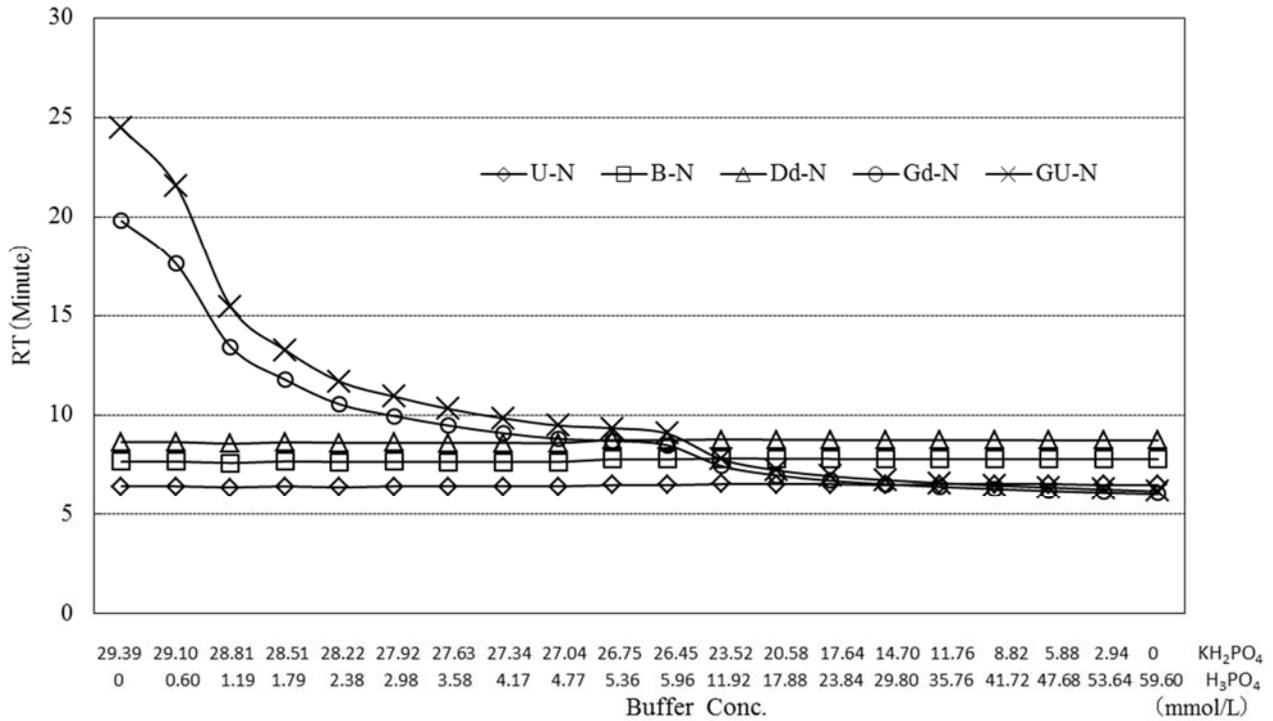


Fig. 1 Retention time of any peak at different concentration of the buffer

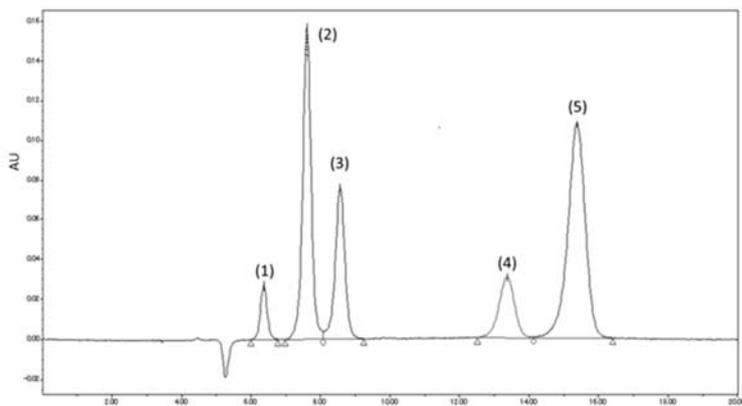


Fig. 2-1 HPLC chromatogram of mixed standard solution using Asahipak ES-502-C 7  
(Peak 1:U-N, Peak 2:B-N, Peak 3:Dd-N, Peak 4:Gd-N, Peak 5:GU-N)

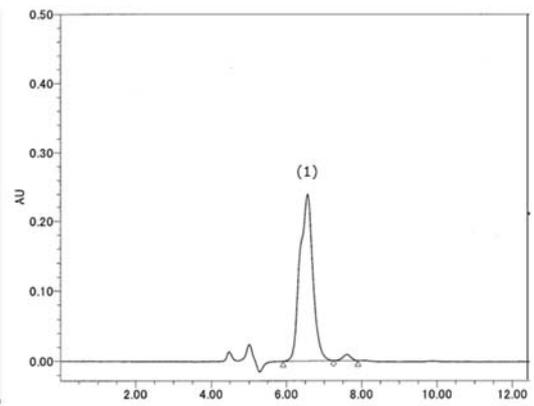


Fig. 2-2 HPLC chromatogram sample solution of urea form using Asahipak ES-502-C 7  
(Peak 1:U-N)

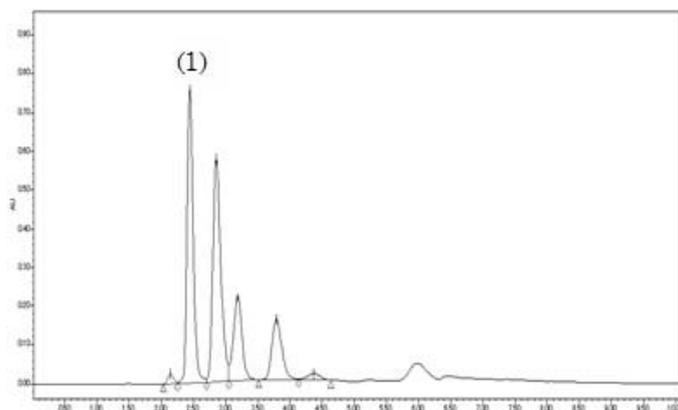


Fig. 2-3 HPLC chromatogram of HAMILTON PRP-X200  
(Peak 1: U-N)

## 2) 検量線の検討

検量線用混合標準液 9 点 (各成分の N として 1.0 mg/L, 2.5 mg/L, 5.0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 160 mg/L 及び 200 mg/L) 及び超純水 1 点を 2 点併行で測定し, ピーク面積から検量線を作成した.

Asahipak ES-502C 7C を用いた場合, ビウレット性窒素が 1 mg/L~50 mg/L の範囲で直線性を示し, 尿素性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素が 1 mg/L~200 mg/L の範囲で, グアニル尿素性窒素が 1 mg/L~100 mg/L の範囲で直線性を示し, 決定係数 ( $r^2$ ) はいずれも 0.9997 以上であった. また, HAMILTON PRP-X200 を用いた場合, 尿素性窒素が 1 mg/L~160 mg/L の範囲で直線性を示し, 決定係数 ( $r^2$ ) は 0.9998 であった (Fig. 3-1, Fig. 3-2).

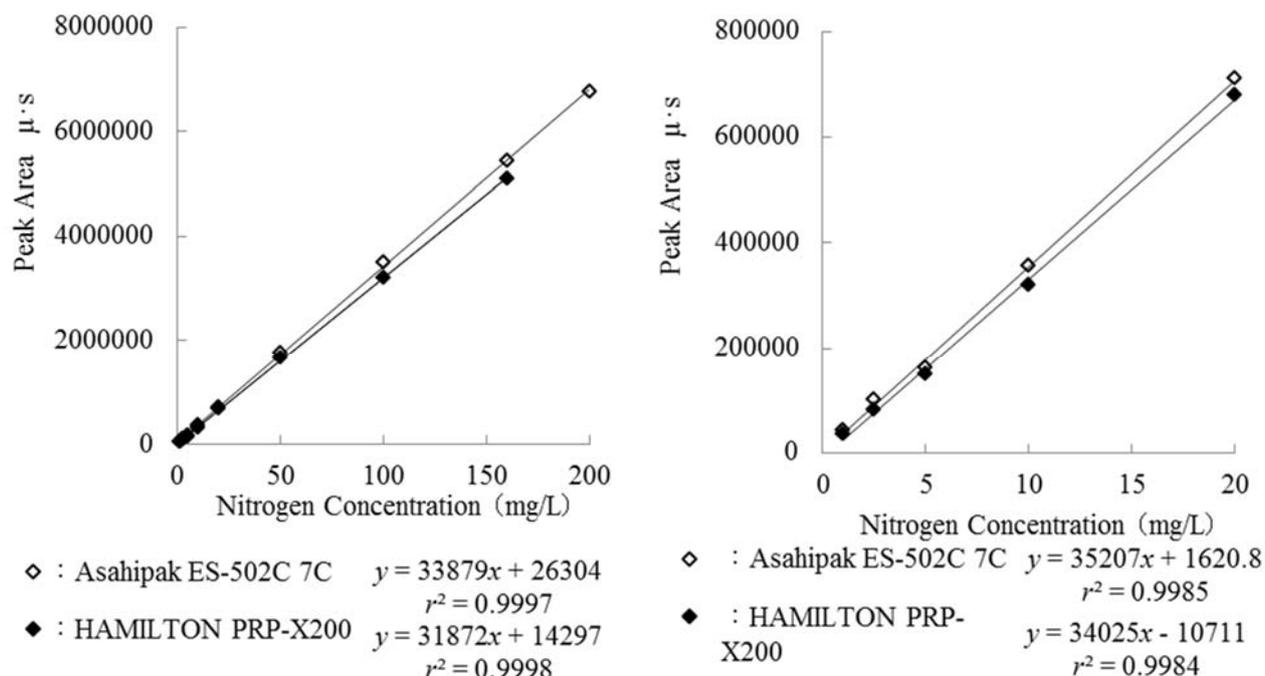


Fig. 3-1 Calibration curves of U-N using Asahipak ES-502C 7C and HAMILTON PRP-X200

The figure on the right: All concentration range (1 ~ 200 mg/L)

The figure on the left: Low concentration range (1 ~ 20 mg/L)

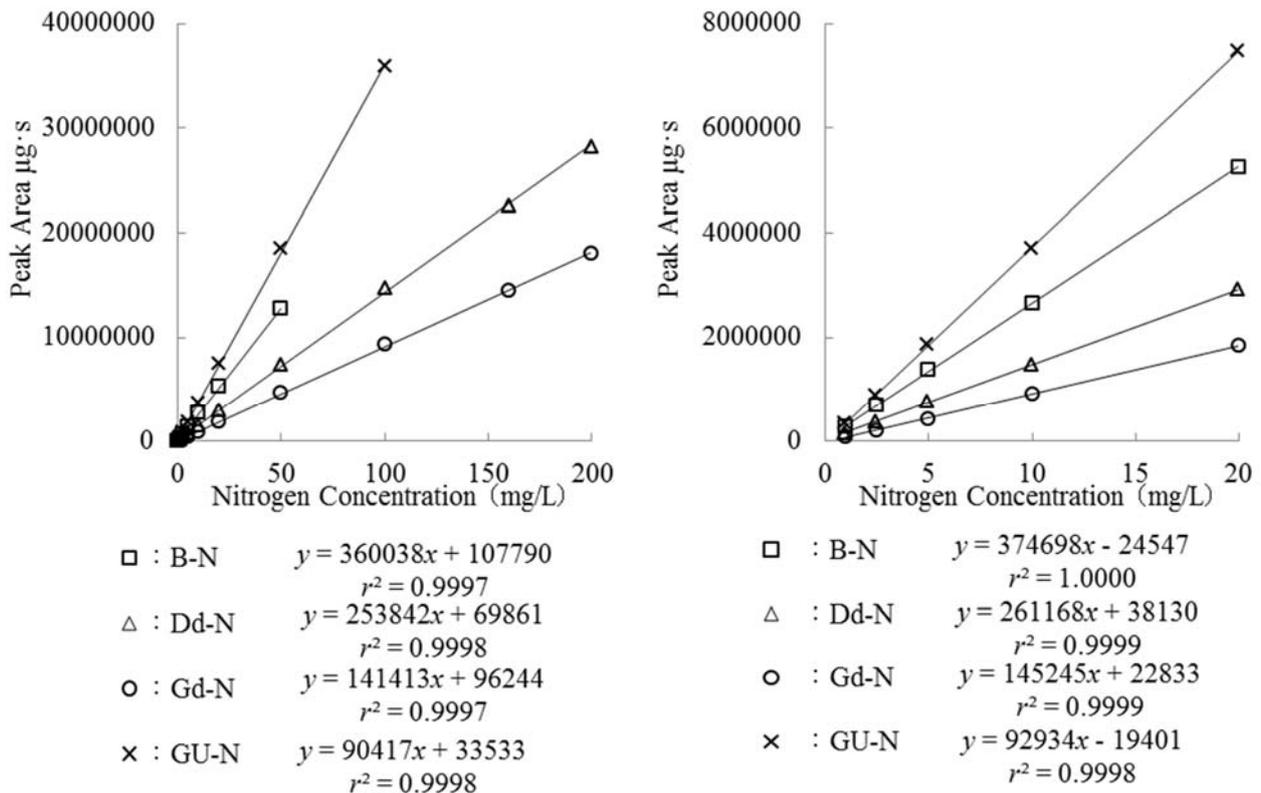


Fig. 3-2 Calibration curves of B-N, Dd-N, Gd-N and GU-N using Asahipak ES-502C 7C

The figure on the right: All concentration range (1 ~ 200 mg/L)

The figure on the left: Low concentration range (1 ~ 20 mg/L)

### 3) 抽出条件の検討

化成肥料及びグアニル尿素肥料を試料として用いて、抽出条件(時間)を検討した。試料に蒸留水を加えてかき混ぜずに直ちに遠心分離した抽出液、マグネチックスターラーで5分間~30分間それぞれかき混ぜた抽出液について5成分を測定した(Fig. 4-1, Fig. 4-2)。尿素性窒素は17.6 mg/L~18.1 mg/L, ビウレット性窒素は7.21 mg/L~7.53 mg/L, ジシアンジアミド性窒素は128 mg/L~132 mg/L, グアニジン性窒素は1.40 mg/L~1.51 mg/L, グアニル尿素性窒素は17.3 mg/L~18.5 mg/Lと一定範囲内で推移した。亜硝酸及び硫酸化物の測定法<sup>7)</sup>における抽出時間と同一の10分間が最適と判断した。

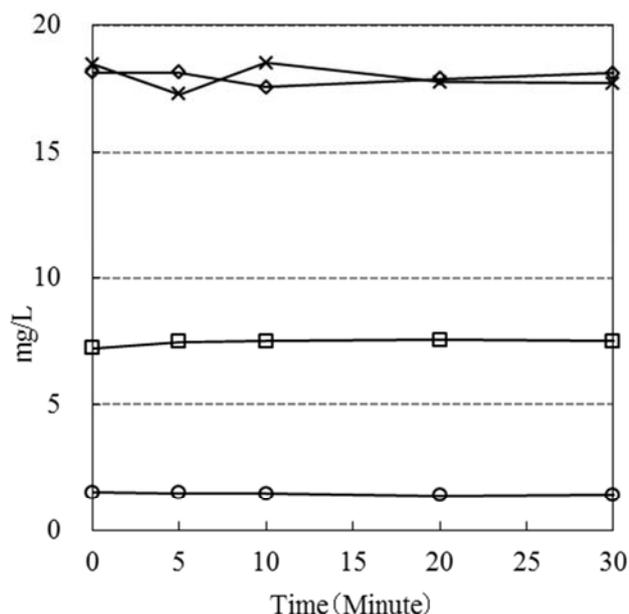


Fig.4-1 Effect of extraction time on extraction efficiency of each component

—◇— U-N —□— B-N —○— Gd-N —×— GU-N

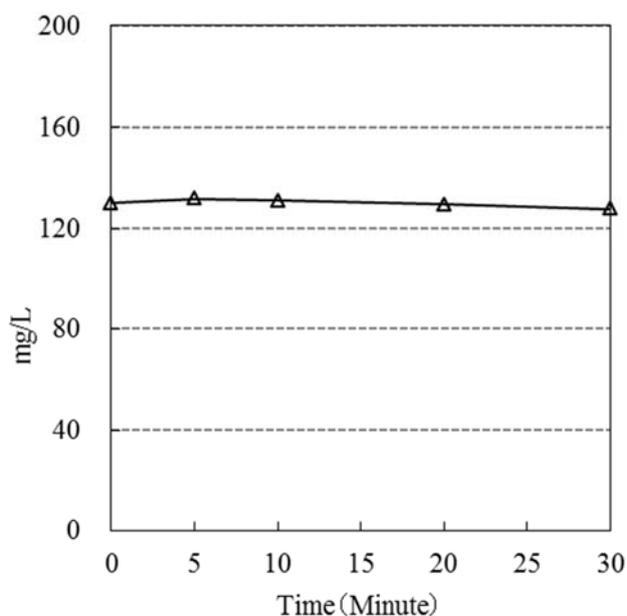


Fig.4-2 Effect of extraction time on extraction efficiency of Dd-N

—△— Dd-N

#### 4) 添加回収試験による真度の評価

アセトアルデヒド縮合尿素, 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の 5 種類の市販肥料と, 硫酸グアニル尿素試薬にグアニジン硫酸塩試薬を添加した模擬肥料(硫酸グアニル尿素模擬肥料)の計 6 試料を用いて真度の確認を実施した。

5 種類の市販肥料に, 尿素性窒素, ビウレット性窒素及びジシアンジアミド性窒素を, 含有許容量, 含有許容量の 0.2 倍及び含有許容量の 2 倍の 3 段階で添加し, 本法にしたがって Asahipak ES-502C 7C を用いて 3 点併行で分析した (Table 2-1). なお, ホルムアルデヒド加工尿素肥料を含む化成肥料については, 尿素性窒素を含有許容量, 含有許容量の 0.2 倍及び含有許容量の 2 倍の 3 段階で添加し, 本法にしたがって HAMILTON PRP-X200 を用いて 3 点併行で分析した (Table 2-2). 平均回収率は 87.0 %~105.6 %, 併行相対標準偏差 (RSD) は 0.1 %~3.7 %であり, いずれも肥料等試験法<sup>8)</sup>に示されている添加濃度における真度(回収率)の目標以内であり, 満足な結果が得られた。

Table 2-1 Results of recovery test ( Asahipak ES-502C 7C )

Sample Content	Acetaldehyde condensation Urea		Compound fertilizer		Mixed fertilizer		Fluid mixed fertilizer		Home garden-use mixed fertilizer		Criteria of the trueness <sup>d)</sup> (%)	
	Rec <sup>b)</sup>	RSD <sup>c)</sup>	Rec <sup>b)</sup>	RSD <sup>c)</sup>	Rec <sup>b)</sup>	RSD <sup>c)</sup>	Rec <sup>b)</sup>	RSD <sup>c)</sup>	Rec <sup>b)</sup>	RSD <sup>c)</sup>		
	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>		
U-N	6.0	98.5	0.8	98.3	1.9	100.4	2.0	102.0	0.5	102.9	0.7	85 ~ 110
	3.0	98.9	0.5	99.6	1.9	105.2	1.1	103.6	0.6	102.6	0.6	85 ~ 110
	0.6	92.3	1.9	99.1	0.7	98.8	0.1	99.9	1.0	96.9	2.0	85 ~ 110
B-N	0.2	87.0	0.9	94.0	0.9	91.5	0.7	95.1	0.8	91.7	1.3	85 ~ 110
	0.1	91.4	0.7	94.9	0.8	101.1	0.2	97.9	0.4	90.6	0.6	85 ~ 110
	0.02	105.5	1.6	105.0	1.4	91.2	0.3	105.3	1.3	91.5	3.7	85 ~ 110
Dd-N	3.0	97.2	0.5	96.3	1.8	97.4	1.0	96.4	0.8	96.8	0.5	85 ~ 110
	1.5	96.2	0.2	96.4	0.5	99.7	0.5	94.5	0.2	95.0	1.2	85 ~ 110
	0.3	99.2	1.3	96.1	0.9	100.6	0.3	90.2	0.5	88.9	0.6	85 ~ 110

a) Mass fraction

b) Mean recovery ( $n=3$ )

c) Repeatability relative standard deviation

d) Criteria of trueness (recovery) show in Testing Methods for Fertilizers (2016)

Table 2-1 Continue

Sample Content	Mock fertilizer of guanylurea		Criteria of the trueness <sup>d)</sup> (%)	
	Rec <sup>b)</sup>	RSD <sup>c)</sup>		
	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>		
G-N	3.7	91.2	1.3	85 ~ 110
	1.9	94.0	0.8	85 ~ 110
	0.4	100.0	0.8	85 ~ 110
GU-N	36.7	103.8	0.5	90 ~ 108
	35.2	104.6	0.8	90 ~ 108
	33.4	105.6	1.0	90 ~ 108

Table 2-2 Result of recovery test  
( HAMILTON PRP-X200 )

Sample Content	Acetaldehyde condensation Urea		Criteria of the trueness <sup>d)</sup> (%)	
	Rec <sup>b)</sup>	RSD <sup>c)</sup>		
	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>		
U-N	6.0	101.0	1.9	85 ~ 110
	3.0	103.1	0.6	85 ~ 110
	0.6	86.8	0.5	85 ~ 110

a)~d) refer to the footnotes of Table 2-1

### 5) 併行精度及び中間精度

併行精度及び中間精度を確認するため、尿素性窒素、ビウレット性窒素及びジシアンジアミド性窒素を含有許容量前後となるよう添加した化成肥料、配合肥料及び家庭園芸用複合肥料と、硫酸グアニル尿素試薬にグアニジン硫酸塩試薬を添加した硫酸グアニル尿素模擬肥料の計 4 試料を調製した。更に、ホルムアルデヒド加工尿素肥料を含有する化成肥料に尿素性窒素を含有許容量前後となるよう添加した試料を調製した。これらの試料を用いて 2 点併行で日を変えて 5 回試験した結果を Table 3-1 に示した。また、この結果から一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 3-2 に示した。なお、前者の試料の測定には Asahipak ES-502C 7C を、また、後者の試料の測定には HAMILTON PRP-X200 を用いて測定した。

その結果、各成分における窒素の平均値に対して、併行相対標準偏差は 0.5 %～1.1 %であり、中間相対標準偏差は 0.8 %～2.3 %であった。いずれの相対標準偏差も肥料等試験法<sup>8)</sup>に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安以内であったことから、十分な精度を有していることが確認された。

Table 3-1 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation

(% (Mass fraction))

Test day	U-N								Gd-N		GU-N	
	Mixed fertilizer		Compound fertilizer		Home garden-use mixed fertilizer		Compound fertilizer <sup>a)</sup>		Compound fertilizer		Specify mixed fertilize	
1	6.27	6.30	3.07	3.03	0.31	0.31	3.07	3.06	1.84	1.85	37.31	36.88
2	6.21	6.16	2.95	2.97	0.30	0.31	3.02	3.03	1.83	1.85	37.34	37.32
3	6.27	6.21	2.99	3.04	0.32	0.32	3.14	3.14	1.77	1.80	37.09	36.90
4	6.27	6.28	2.99	3.06	0.32	0.32	3.10	3.12	1.82	1.81	37.18	36.74
5	6.20	6.26	2.98	3.03	0.32	0.32	3.13	3.18	1.77	1.76	36.46	37.03

a) Measurement using HAMILTON PRP-X200 as HPLC column

Table 3-1 Continue

Test day	B-N						Dd-N					
	Mixed fertilizer		Compound fertilizer		Home garden-use mixed fertilizer		Mixed fertilizer		Compound fertilizer		Home garden-use mixed fertilizer	
1	0.20	0.20	0.098	0.098	0.010	0.010	3.03	3.04	1.47	1.46	0.144	0.143
2	0.21	0.21	0.095	0.095	0.010	0.010	3.04	3.01	1.41	1.41	0.139	0.143
3	0.20	0.20	0.098	0.099	0.010	0.010	3.03	3.00	1.45	1.47	0.143	0.143
4	0.20	0.20	0.096	0.097	0.010	0.010	3.04	3.03	1.44	1.47	0.149	0.149
5	0.20	0.20	0.096	0.097	0.010	0.011	3.02	3.04	1.44	1.46	0.146	0.147

Table 3 Statistical analysis of repetition test result for evaluating precision

Ingredient	Sample	Mean <sup>a)</sup> (%) <sup>b)</sup>	Repeatability			Intermediate precision		
			$s_r$ <sup>c)</sup> (%) <sup>b)</sup>	$RSD_r$ <sup>d)</sup> (%)	$CRSD_r$ <sup>e)</sup> (%)	$s_{I(T)}$ <sup>f)</sup> (%) <sup>b)</sup>	$RSD_{I(T)}$ <sup>g)</sup> (%)	$CRSD_{I(T)}$ <sup>h)</sup> (%)
U-N	Mixed fertilizer	6.24	0.03	0.5	4	0.05	0.8	6.5
	Compound fertilizer	3.01	0.0345	1.1	4	0.0407	1.4	6.5
	Home garden-use mixed fertilizer	0.315	0.003	1.0	4	0.005	1.7	6.5
	Compound fertilizer <sup>i)</sup>	3.10	0.0168	0.5	4	0.0558	1.8	6.5
B-N	Mixed fertilizer	0.204	0.001	0.3	4	0.002	0.9	6.5
	Compound fertilizer	0.097	0.001	0.7	4	0.002	1.6	6.5
	Home garden-use mixed fertilizer	0.0103	0.0001	0.9	4	0.0001	0.9	6.5
Dd-N	Mixed fertilizer	3.03	0.02	0.5	4	0.02	0.5	6.5
	Compound fertilizer	1.45	0.01	0.9	4	0.02	1.6	6.5
	Home garden-use mixed fertilizer	0.145	0.001	0.9	4	0.003	2.3	6.5
Gd-N	Mock fertilizer of guanlylurea	1.81	0.01	0.8	4	0.04	2.0	6.5
GU-N	Mock fertilizer of guanlylurea	37.0	0.3	0.7	4	0.3	0.8	6.5

a)  $n=10$  (5 test days  $\times$  duplicate measurement)

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability (repeatability relative standard deviation) shown in Testing Methods for Fertilizers

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

h) Criteria of intermediate precision (Intermediate relative standard deviation) shown in Testing Methods for Fertilizers

i) Measurement using HAMILTON PRP-X200 as HPLC column

## 6) 検出下限及び定量下限の確認

混合標準溶液(各成分のNとして各1 mg/L)を測定して得られたクロマトグラム上のSN比より, 対象5成分の定量下限及び検出下限を推定した. 対象5成分を含有しない液状の家庭園芸用複合肥料に, 推定定量下限濃度相当を添加した試料を調製し, 3回分析して得られた分析値の平均値より回収率を求めた. 本法の定量下限はビウレット性窒素0.005%(質量分率), 尿素性窒素0.03%(質量分率), ジシアンジアミド性窒素0.01%(質量分率), グアニジン性窒素0.02%(質量分率), 及びグアニル尿素性窒素0.006%(質量分率)程度と推測された. なお, これらの定量下限は含有許容量の確認に十分な定量範囲を有した.

Table 4 Quantification lower limit and detection lower limit of each target component

Sample	Estimated value from chromatogram		Confirmation by recovery test			Criteria of the trueness <sup>e)</sup>
	<i>LOQ</i> <sup>a)</sup>	<i>LOD</i> <sup>c)</sup>	Content of material	Mean value <sup>d)</sup>	Mean recovery	
	(%) <sup>b)</sup>	(%) <sup>b)</sup>	(%) <sup>b)</sup>	(%) <sup>b)</sup>	(%) <sup>b)</sup>	(%) <sup>b)</sup>
(Asahipak ES-502C 7C)						
Urea nitrogen	0.026	0.0078	0.026	0.0266	102	80 ~ 115
Biuret nitrogen	0.005	0.0014	0.005	0.0046	98	70 ~ 120
Dicyandiamide nitrogen	0.009	0.0028	0.009	0.0087	94	70 ~ 120
Guanidine nitrogen	0.023	0.0069	0.023	0.0257	112	80 ~ 115
Guanylurea nitrate	0.006	0.0017	0.006	0.0061	107	70 ~ 120
(HAMILTON PRP-X200)						
Urea nitrogen	0.019	0.0057	0.019	0.0188	99	80 ~ 115

a) Lower limited of quantitation

b) Mass fraction

c) Lower limited of detection

d)  $n=3$ 

e) Criteria of trueness (recovery) show in Testing Methods for Fertilizers

## 7) 流通肥料の測定

本法に従って前述の流通肥料 44 点(原材料として 94 種類を使用)を測定し、夾雑物による妨害、ベースラインの変動による影響等を調査した。Asahipak ES-502C 7C を使用した場合、ビウレット性窒素、ジシアンジアミド性窒素、グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素については、定量を妨害する夾雑ピーク等の影響は確認されなかった(Fig. 5-1)。尿素性窒素は、ホルムアルデヒド加工尿素肥料及びそれを原料とする化成肥料等について、夾雑ピークにより測定できなかったが、HAMILTON PRP-X200 を用いることで測定できることを確認した(Fig. 5-2)。

このことから、複合肥料等中の使用した尿素又は硫酸グアニル尿素的含有量の確認並びに公定規格に定める有害成分及び制限事項の確認など、実際の肥料製品に対する品質管理並びに規格適合性の評価に十分使用できる分析法であると考えられた。

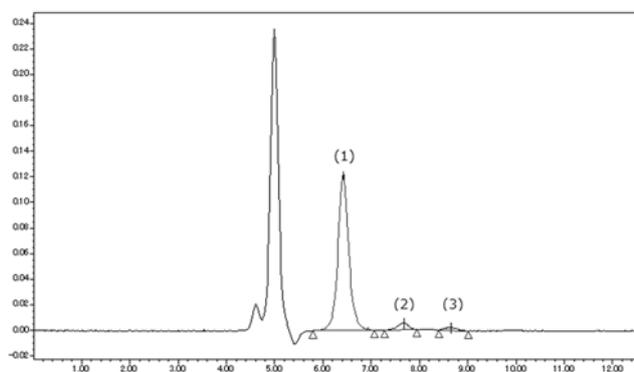


Fig.5-1 HPLC chromatogram of Compound fertilizer using Asahipak ES-502C 7C  
(Peak1:U-N, Peak2:B-N, Peak3:Dd-N)

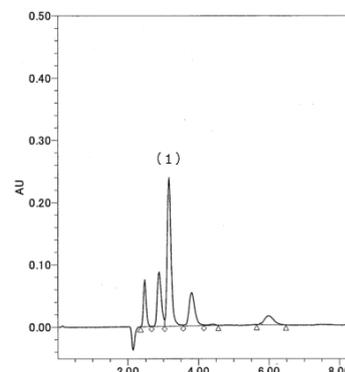


Fig.5-2 HPLC chromatogram of chemical fertilizer containing urea formaldehyde using HAMILTON PRP-X200  
(Peak1:U-N)

#### 4. まとめ

HPLC法による肥料中のビウレット性窒素, 尿素性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素の同時分析法について検討したところ, 次のとおりの結果が得られた.

(1) HPLCカラムとして Asahipak ES-502C 7C を用い, 移動相はりん酸緩衝液 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  28.81 mol/L,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1.19 mol/L) でクロマトグラムを作成したところ, 尿素性窒素 (U-N), ビウレット性窒素 (B-N), ジシアンジアミド性窒素 (Dd-N), グアニジン性窒素 (Gd-N), グアニル尿素性窒素 (GU-N) の順で十分に分離されたピークを得た. なお, ホルムアルデヒド加工尿素肥料を含む肥料の尿素性窒素は, 先のカラムでは夾雑ピークと分離できなかったため, HPLCカラムとして HAMILTON PRP-X200 を用いて同移動相でクロマトグラムを作成したところ, 十分に分離されたピークを得た.

(2) Asahipak ES-502C 7C を用いた場合の検量線は, ビウレット性窒素が 1 mg/L ~ 50 mg/L までの濃度範囲, 尿素性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素が 1 mg/L ~ 200 mg/L の濃度範囲, グアニル尿素性窒素が 1 mg/L ~ 100 mg/L までの範囲で直線性を示した. また, HAMILTON PRP-X200 を用いた場合の検量線は, 尿素性窒素が 1 mg/L ~ 160 mg/L までの濃度範囲で直線性を示した.

(3) 添加回収試験を行ったところ, 尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素, グアニル尿素性窒素の回収率は, 86 % ~ 105 %, 87 % ~ 105 %, 88 % ~ 100 %, 91 % ~ 100 % 及び 103 % ~ 105 % であり, いずれも肥料等試験法に示されている添加濃度における真度 (回収率) の目標以内であった.

(4) 本法の併行精度及び中間精度を確認したところ, 肥料等試験法に示されている併行精度 (併行相対標準偏差) 及び中間精度 (中間相対標準偏差) の目安内であった.

(5) 定量下限等の確認を行った結果, 本法における尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素, グアニル尿素性窒素の定量下限は, 0.03 %, 0.005 %, 0.009 %, 0.02 % 及び 0.006 % 程度と推測された. また, 各測定項目の定量下限相当を添加した試料により添加回収試験を行ったところ, 尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素の回収率は, それぞれ 102 %, 98 %, 94 %, 112 % 及び 107 % であり, いずれも肥料等試験法に示される添加濃度における真度 (回収率) の目標範囲であった.

(6) 本法に従って流通肥料 44 点を測定したところ, 夾雑成分由来の妨害ピーク及びベースラインの変動は認められなかった.

以上のことから, 本法はビウレット性窒素, 尿素性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素の一斉分析法として, 十分な性能を有していることが確認された.

#### 参考文献

- 1) 安田環, 越野正義: 環境保全と新しい施肥技術, 養賢堂, 東京 (2001)
- 2) 植物栄養・肥料の辞典編集委員会: 植物栄養・肥料の辞典, 朝倉書店, 東京 (2002)
- 3) ポケット肥料要覧 2015/2016 年, 農林統計協会, p.137, 東京 (2017)
- 4) 農林水産省告示: 肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件, 昭和 61 年 2 月 22 日, 農林水産省告示第 284 号, 最終改正平成 27 年 1 月 9 日, 農林水産省告示第 52 号 (2015)
- 5) 農林水産省農業環境技術研究所: 肥料分析法 (1992 年版), 日本肥糧検定協会, 東京 (1992)
- 6) 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.87~93, 養賢堂, 東京 (1988)

- 7) 伊藤浩平, 木村康晴, 長谷川正憲, 白井裕治: 高速液体クロマトグラフ法を用いた肥料中の亜硝酸およびチオシアン酸塩の同時定量
- 8) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC): 肥料等試験法 (2015)  
<[http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho\\_2015.pdf](http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2015.pdf)>

## Determination of Urea Nitrogen, Biuret Nitrogen, Dicyandiamide Nitrogen, Guanidine Nitrogen and Guanyl urea Nitrogen in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography: A Single-Laboratory Validation

Masahiro ECHI<sup>1</sup>, Yasuharu KIMURA<sup>2</sup> and Yuji SHIRAI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center  
(Now) Fertilizer and Feed Inspection Department

<sup>2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

<sup>3</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

A HPLC method for simultaneous determination of urea nitrogen (U-N), biuret nitrogen (B-N), dicyandiamide nitrogen (Dd-N), guanidine nitrogen (G-N) and guanyl urea nitrogen (GU-N) in fertilizer was developed and validated as a single-laboratory validation. Samples were extracted by shaking and diluted with water. After centrifugation, sample solution was analyzed by HPLC, on cation exchanged column with UV detection at 190 nm. As a result of 3 replicate analysis of 6 fertilizer samples spiked with U-N, B-N, Dd-N, Gd-N and GU-N each, the mean recoveries were 86 % ~ 105 %, 87 % ~ 105 %, 88 % ~ 100 %, 91 % ~ 100 % and 103 % ~ 105 %, respectively. Repeatability standard deviation of U-N, B-N, Dd-N, Gd-N and GU-N were 0.5 % ~ 1.1 %, 0.3 % ~ 0.9 %, 0.5 % ~ 0.9 %, 0.8 % and 0.7 % respectively. Intermediate relative standard deviations of there were 0.8 % ~ 1.8 %, 0.9 % ~ 1.6 %, 0.5 % ~ 2.3 %, 2.0 % and 0.8 %, respectively. The limits of quantification of there were 0.026 %, 0.005 %, 0.009 %, 0.023 %, 0.006 %, respectively. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of U-N, Bd-N, Dd-N, G-N and GU-N in a fertilizer.

*Key words* urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen, guanyl urea nitrogen

(Research Report of Fertilizer, **10**, 72~85, 2017)