

5-1 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—

齊木雅一¹, 浅尾美由起²

キーワード ジシアンジアミド, 石灰窒素, 高速液体クロマトグラフ法

1. はじめに

石灰窒素は土壌中の水分と接触すると加水分解され、数回の分解過程を経て最終的に無機態窒素にまで分解される(図 1)。ジシアンジアミド(Dd)は、この分解過程での生成物で、硝酸化成抑制効果を持つため窒素の流亡損失が少なく肥効を持続させるなどの働きがあるが、多量に存在する場合は植物に障害をもたらすことが知られている。このため、公定規格¹⁾において石灰窒素中でのジシアンジアミド性窒素としての含有量が窒素全量の 20 %以下と制限されている²⁾。

現在、肥料分析法³⁾において石灰窒素中のジシアンジアミド性窒素の分析はニッケルグアニル尿素法を採用しているが、この方法は使用する試薬の入手が困難であることや定量に長時間を要することから、硝酸化成抑制材のジシアンジアミドの分析法である高速液体クロマトグラフ法により、迅速に精度よく定量することを目的に検討を行った。また、石灰窒素入り化成肥料等中に含有するジシアンジアミド性窒素についても妥当性の確認を行った。

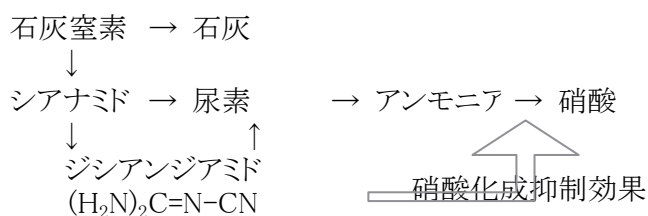


図 1 石灰窒素の分解過程

2. 材料及び方法

1) 分析用試料の調製

流通している石灰窒素 3 点及び石灰窒素入り化成肥料 4 点(計 7 点)各 2~3 kg を試験品として採取し、超遠心粉砕機で粉砕し、目開き 500 μm のふるいを全通するように分析用試料を調製しよく混合した。

¹ (独)農林水産消費安全技術センター札幌センター

² (独)農林水産消費安全技術センター札幌センター (現)肥飼料安全検査部

2) 試薬等の調製

- (1) メタノール: HPLC 用及び特級試薬.
- (2) アセトニトリル: HPLC 用.
- (3) アセトン: 特級試薬.
- (4) ジシアンジアミド [$C_2H_4N_4$]: 化学用(和光純薬株式会社製).
- (5) ジシアンジアミド標準液 (1 mg/mL): ジシアンジアミド 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.
- (6) ジシアンジアミド標準液 (100 μ g/mL): ジシアンジアミド標準液 (1 mg/mL) の一定量をメタノールで希釈し, ジシアンジアミド標準液 (100 μ g/mL) を調製する.
- (7) 検量線用ジシアンジアミド標準液 (10~50 μ g/mL): 使用時にジシアンジアミド標準液 (100 μ g/mL) の 5~25 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.
- (8) 検量線用ジシアンジアミド標準液 (1~5 μ g/mL): 使用時に検量線用ジシアンジアミド標準液 (10 μ g/mL) の 5~25 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.

3) 装置及び器具

- (1) 高速液体クロマトグラフ: 島津製作所製 LC-VP シリーズ
- (2) カラム: Hibar LiChrosorb NH_2 (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μ m), ShodexSilica C18M 4E (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μ m)
- (3) 超遠心粉砕機: Retsch ZM100
- (4) 振とう機: イワキ製 KM Shaker, タイテック製 RECIPRO SHAKER SR-2w

4) ジシアンジアミドの測定

(1) 試料溶液の調製

分析試料 1.00 g を量りとり, 共栓三角フラスコ 200 mL に入れた. メタノール 100 mL を加えて 10 分間振り混ぜた. 静置後, 上澄み液をメンブランフィルター (孔径 0.45 μ m) でろ過し, 高速液体クロマトグラフに供する試料溶液とした (図 2).

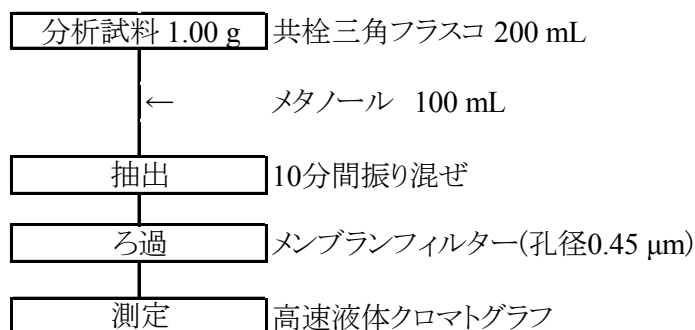


図 2 ジシアンジアミドの試験法フローシート

(2) 測定

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、表 1 の条件で測定し、得られたピーク面積又は高さから検量線を作成した。試料溶液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積又は高さから試料溶液中のジシアンジアミド量を求め、分析試料中の測定対象物質濃度を算出した。

3. 結果及び考察

1) 測定条件の検討

肥料分析法における硝酸化成抑制材の分析では、メタノールで抽出し NH_2 カラムを用い、溶離液にアセトニトリル+メタノールを使用することになっている³⁾(条件 1, 表 1)。一方、詳解肥料分析法⁴⁾ではアセトンで抽出し、シリカ-ODS カラムを用いる方法(条件 2, 表 2)も記載されているため、これらの 2 法について検討を行った。ジシアンジアミド粉末をメタノール及びアセトンに溶解して標準液を調製し、条件 1 及び条件 2 で分析したクロマトグラムを図 3 及び図 4 に示した。条件 1 ではジシアンジアミドのピークと他のピークは離れており、1~50 $\mu\text{g/mL}$ の範囲では、重なることはなかった。条件 2 ではジシアンジアミドのピークの直後に他のピークが現れ、濃度が高くなると、重なってしまった。また、条件 1 では 1~50 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で検量線は直線性を示し(図 5)、今後の検討は条件 1 で行うこととした。

表1 条件1

抽出溶媒	メタノール
HPLC装置	島津製作所製 LC-VPシリーズ
カラム	Hibar LiChrosorb NH_2 (内径4.6 mm, 長さ250 mm, 粒径5 μm)
カラム温度	30 $^\circ\text{C}$
溶離液	アセトニトリル-メタノール(6+1)
流量	0.5 mL/min
検出波長	215 nm

表2 条件2

抽出溶媒	アセトン
HPLC装置	島津製作所製 LC-VPシリーズ
カラム	ShodexSilica C18M 4E (内径4.6 mm, 長さ250 mm, 粒径5 μm)
カラム温度	30 $^\circ\text{C}$
溶離液	アセトニトリル-水(4+1)
流量	0.5 mL/min
検出波長	215 nm

2) 抽出時間の確認

肥料分析法では抽出時間は 10 分間となっている。石灰窒素及び化成肥料を用いて、抽出時間の確認を行った。抽出時間を 5~30 分間として分析した結果は図 6 に示したとおりで、抽出時間による抽出効率の差は見られなかった。このことから、今後は抽出時間を 10 分で行うこととした。

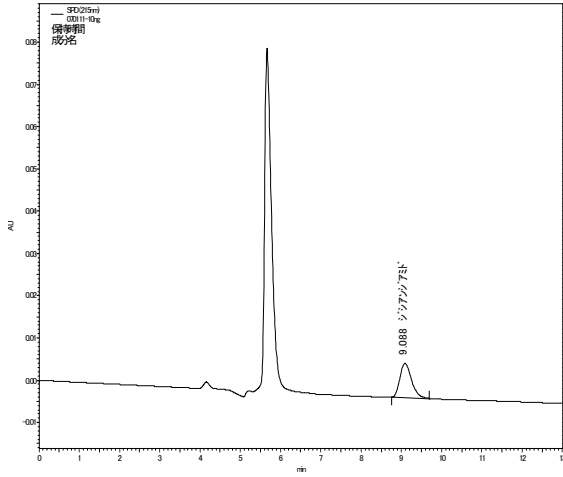


図3 Dd 1 µg/mL (条件1)

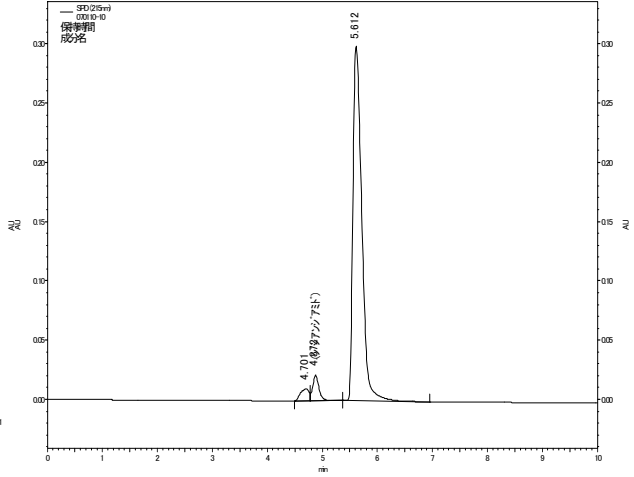


図4 Dd 1 µg/mL (条件2)

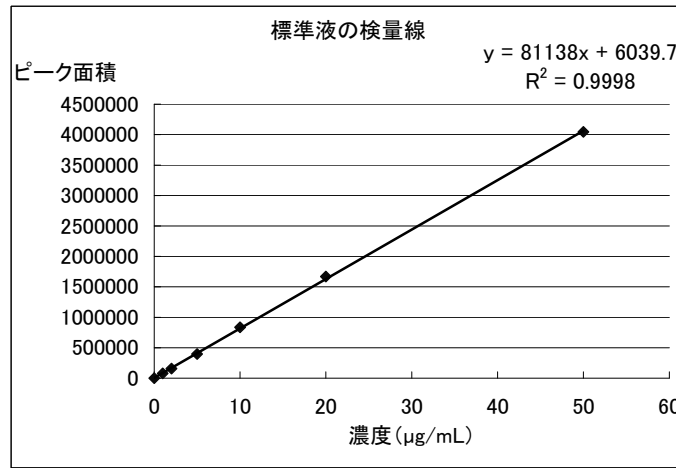


図5 検量線

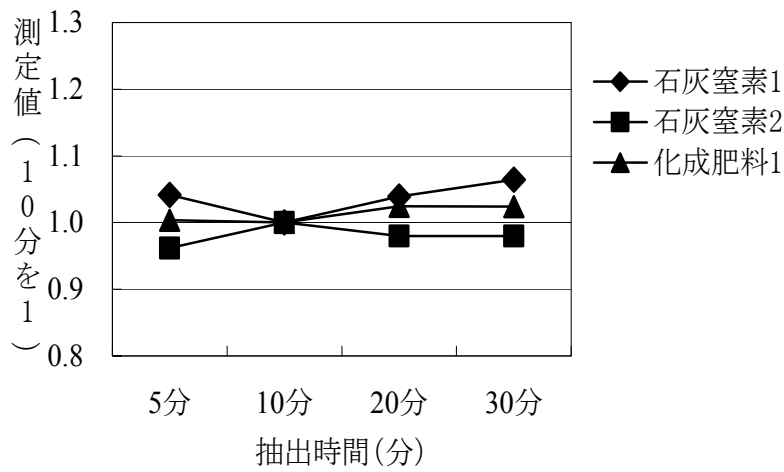


図6 抽出時間による比較

3) 分析試料採取から抽出までの時間について

石灰窒素中のシアナミドは、高温多湿の状態の一部が重合しジシアンジアミドとなる⁵⁾。空気中でも同様にジシアンジアミドが生成する可能性があるため、分析試料採取から抽出までの時間について検討を行った。石灰窒素を用いて、サンプリングから抽出までの時間について、0～240分として検討した結果を図7に示した。サンプリングから抽出までの時間を長くするにつれて測定値が高くなり、240分では0分と比べ約2倍の測定値となった。このことから分析試料採取後できるだけ早く抽出する必要があることがわかった。また、分析用試料の保管にも注意する必要がある。

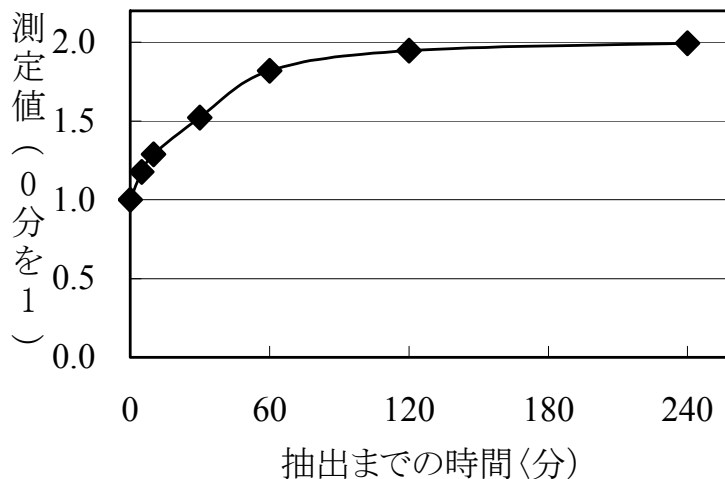


図7 サンプリングから抽出までの時間

4) 添加回収試験

石灰窒素及び化成肥料に添加した回収試験結果を表3に示した。ジシアンジアミド(Dd)として6%及び0.6%相当量を添加した分析用試料を用いて5点併行試験を実施したところ、平均回収率は94.9～101.3%及び95.6～103.5%で、それら繰り返し精度は相対標準偏差0.7～2.0%及び0.4～1.7%であった。

表3 添加回収試験

試料名 Dd含有量(%) ¹⁾	添加濃度 (%)	平均定量値 ²⁾ (%)	平均回収率 ³⁾ (%)	標準偏差 (%)	相対標準偏差 (%)
石灰窒素1	6	5.94	98.3	0.10	1.7
0.038	0.6	0.659	103.5	0.009	1.3
石灰窒素2	6	6.12	101.3	0.12	2.0
0.044	0.6	0.653	101.6	0.002	0.4
化成肥料1	6	5.99	96.9	0.04	0.7
0.176	0.6	0.769	98.8	0.013	1.7
化成肥料2	6	5.70	94.9	0.04	0.7
0.000	0.6	0.574	95.6	0.005	0.8
化成肥料3	6	6.57	105.1	0.08	1.2
0.263	0.6	0.600	100.0	0.006	0.7

1) 試料中に含有するジシアンジアミド(Dd)の含有量

2) 5点併行試験の平均値

3) 平均定量値からDd含有量を差し引き、値を添加濃度で除した値

5) 定量下限の確認

石灰窒素及び化成肥料を用い、ジシアンジアミドの定量下限確認の試験結果を表4に示した。10点併行試験を実施したところ、平均定量値はそれぞれ0.062 %及び0.020 %、繰り返し精度はともに標準偏差0.001 %であった。定量下限は標準偏差×10、また、検出下限は標準偏差×2×t(n-1,0.05)として示されるので、本法の定量下限及び検出下限は0.01 %程度及び0.006 %程度と推定された。

表4 定量下限の試験

	石灰窒素3	化成肥料4
平均定量値(%)	0.062	0.020
標準偏差(%)	0.001	0.001
定量下限(%)	0.01	0.01
検出下限(%)	0.006	0.003

4. まとめ

硝酸化成抑制材のジシアンジアミドの分析法である高速液体クロマトグラフ法を石灰窒素におけるジシアンジアミド性窒素の分析に応用した。メタノール 100 mL で 10 分間振り混ぜた後、高速液体クロマトグラフに供することにより、迅速かつ精度よく定量することができた。

この方法により、5種類のサンプルを使用し、ジシアンジアミドをそれぞれ6%及び0.6%添加し添加回収試験を実施した結果、平均回収率は94.9～105.1%及び95.6～103.5%で、それら繰り返し精度は相対標準偏差0.7～2.0%及び0.4～1.7%であった。また、定量下限は0.01%と推測された。

謝 辞

この試験の実施において電気化学工業株式会社及びコープケミカル株式会社にはサンプルをご提供頂きまして感謝いたします。

文 献

- 1) 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, 改正平成 20 年 4 月 1 日, 農林水産省告示第 320 号 (2008)
- 2) 国谷譲治、渡辺綱雄、高橋登:日本化学会誌(化学と工業化学), p.37~45 (1997)
- 3) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法, 財団法人日本肥糧検定協会, 東京 (1992)
- 4) 越野正義:第二改訂 詳解肥料分析法, p.80~81 株式会社養賢堂, 東京(1988)
- 5) 今井次郎、三幣正巳、山添文雄、吉田信雄、越野正義:詳解肥料分析法, p.187~190 株式会社養賢堂, 東京(1962)

Validation of High Performance Liquid Chromatography for Determination of Dicyandiamide in Nitrolime

Masakazu SAIKI¹ and Miyuki ASAO²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center
(Now) Fertilizer and Feed Inspection Department

We validated a method using high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of dicyandiamide in nitrolime and compound fertilizer with nitrolime. Dicyandiamide in these fertilizers was extracted with methanol. The extract filtered through membrane filter was analyzed using HPLC. HPLC was performed with an aminopropyl silica gel column (4.6 mm internal diameter, 250 mm length) at a flow-rate of 0.5 mL/min, using mobile phase of acetonitrile-methanol (6:1). Dicyandiamide was detected with a UV detector (215 nm). The means recovery rates from 5 samples with concentration of 6 and 0.6 % of dicyandiamide ranged from 94.9 to 101.3 % and from 95.6 to 103.5 %, respectively. The relative standard deviations (RSD) were from 0.7 to 2.0 % and from 0.4 to 1.7 %, respectively. On the basis of 10 replicate measurements of 2 naturally contaminated fertilizers, the LOQ values were 0.01 %. The results demonstrated the validity of HPLC for determination of dicyandiamide in nitrolime and compound fertilizer with nitrolime.

Key words dicyandiamide, nitrolime, high performance liquid chromatography

(Research Report of Fertilizer, 2, 25~31, 2009)