

5 肥料中の硝酸化成抑制材ジシアンジアミド測定

—高速液体クロマトグラフ法の改良—

齊木雅一¹

キーワード 肥料, 硝酸化成抑制材, ジシアンジアミド, 高速液体クロマトグラフ

1. はじめに

ほ場に施肥された窒素は、微生物の働きにより最終的に硝酸態窒素となり流亡や脱窒する。肥料中に使用されている硝酸化成抑制材は、アンモニア性窒素が硝酸態窒素へと変化するのを抑制することにより、窒素の損失を防ぎ、肥料効果を持続させ、施肥量を削減することができる。ジシアンジアミド(Dd)は、最も良く利用されている硝酸化成抑制材の一つであり、肥料中で 0.5～3 % 程度使用されている。なお、硝酸化成抑制材を含有する肥料には、農林水産省告示¹⁾で保証票中に材料の種類、名称及び使用量の記載が義務づけられている。

現在、肥料分析法²⁾におけるジシアンジアミドの分析はニトロプルシドナトリウム法及び高速液体クロマトグラフ法(以下 HPLC 法)の 2 種類の方法が採用されている。しかしながら、ニトロプルシドナトリウム法は有機物を含有する肥料には適用できない場合がある²⁾。一方 HPLC 法においては、メタノールのみで抽出するため肥料の原料に使用されている有機物及びその製造工程の影響により測定値が低くなる例があった。小山らは、抽出されにくいペレット化された飼料中の飼料添加物について、予め水を加えることによって抽出効率を改善したと報告している³⁾。このため、筆者は、HPLC 法の抽出操作においても同様に初めに水を少量添加することを試みたところ、抽出効率が改善され、良好な成績を得たのでその概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 分析用試料の調製

ジシアンジアミド入り化成肥料(化成肥料 1～6)6 点、成形複合肥料 1 点及びジシアンジアミドを含まない化成肥料(化成肥料 A～E)5 点(計 12 点)各 2～3 kg を試験品として採取し、超遠心粉碎機で粉碎し、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た。

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) ジシアンジアミド[$\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4$]: 化学用(和光純薬工業製)
- (4) 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、全量プラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加える。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

(5) ジシアンジアミド標準液(100 $\mu\text{g/mL}$): 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 $\mu\text{g/mL}$)を調製する。

(6) 検量線用ジシアンジアミド標準液(10~50 $\mu\text{g/mL}$): 使用時にジシアンジアミド標準液(100 $\mu\text{g/mL}$)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。

(7) 検量線用ジシアンジアミド標準液(1~10 $\mu\text{g/mL}$): 使用時に検量線用ジシアンジアミド標準液(20 $\mu\text{g/mL}$)の2.5~25 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(以下 HPLC): 島津製作所製 LC-VP シリーズ
- (2) カラム: GL Sciences 製 Inertsil NH_2 (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm)
- (3) 超遠心粉碎機: Retsch 製 ZM100
- (4) 振とう機: イワキ製 KM Shaker
- (5) シリカゲルカートリッジカラム: Waters 製 Sep-Pak Plus Silica (シリカゲル 690 mg を含有)
- (6) メンブレンフィルター: ADVANTEC 製 DISMIC-13HP045AN(孔径 0.45 μm)

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 を共栓三角フラスコ 200 mL にはかりとり、水 1 mL を加えた。5 分間放置後、メタノール 100 mL を加えて 10 分間振り混ぜた。硫酸ナトリウム 5~10 g を加え、しばらく放置した後ろ紙でろ過した。ろ液の一定量をメタノールで希釈し、メタノールでコンディショニングしたシリカゲルカートリッジカラム(シリカゲル 690 mg)に負荷した。初流 3 mL 捨て、その後の流出液をメンブレンフィルター(孔径 0.45 μm)でろ過し、HPLC に供する試料溶液とした(図 1)。

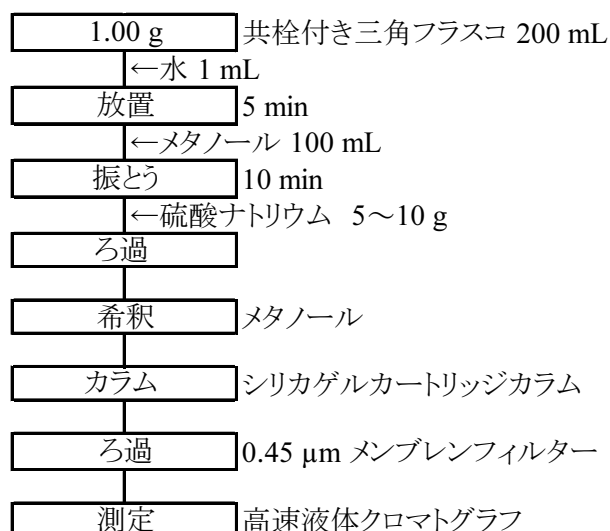


図1 ジシアンジアミド分析法の操作手順

(2) 測定

各検量線用ジシアンジアミド標準液 10 μL を HPLC 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 HPLC に注入し、ピーク面積又は高さから検量線により試料溶液中のジシアンジアミド量を求め、分析試料中の濃度を算出した。

検量線用ジシアンジアミド標準液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及び試料溶液(化成肥料 3)のクロマトグラムを図 2 に示した。

表1 HPLC条件

HPLC装置	島津製作所製 LC-VPシリーズ
カラム	GL Sciences 製 Inertsil NH ₂ (内径4.6 mm, 長さ250 mm, 粒径5 μm)
カラム槽温度	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

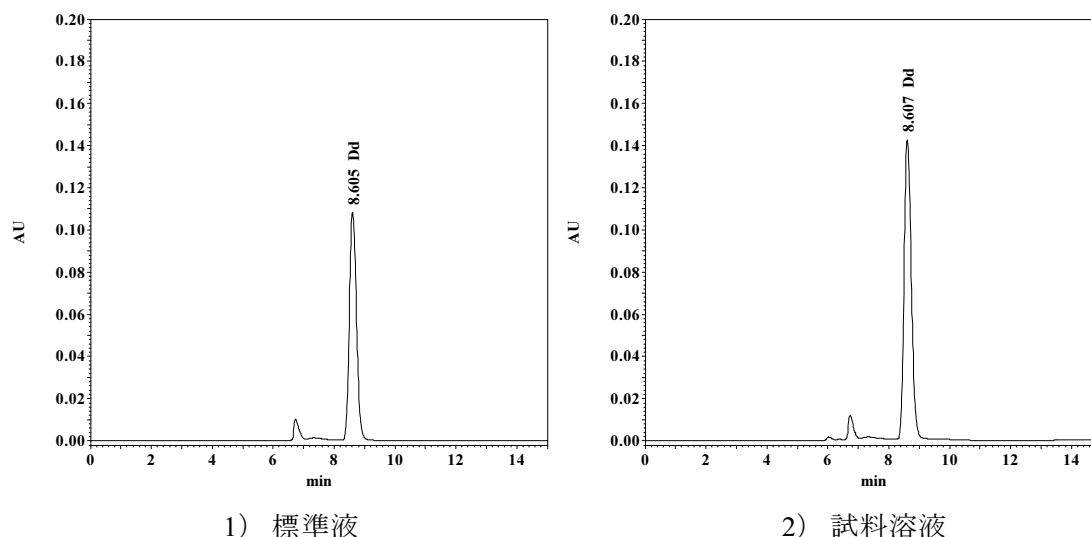


図2 ジシアンジアミドの HPLC クロマトグラム

3. 結果及び考察

1) カートリッジカラムの溶出確認

肥料分析法では有機物を含有する肥料は、HPLC に供する前にカラムクロマトグラフ用シリカゲルで妨害物質を除去している。操作の簡便化及び迅速化のため市販のシリカゲルカートリッジカラムを用いて、溶出画分の流出液のジシアンジアミド濃度の検討を行った。

ジシアンジアミド標準液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を注射器に連結したシリカゲルカートリッジカラム(メタノールでコンディショニングしたもの)に加え、流出液のジシアンジアミド濃度を測定した。結果は表 2 のとおりであり、0~2 mL ではジシアンジアミド濃度が小さくなり、2 mL 以降では 100 % 程度となった。余裕をみて最初の流出液 3 mL を捨て、その後の流出液を以後の操作に用いることとした。

表2 シリカゲルカートリッジカラムからの流出液中の
ジシアンジアミド濃度の推移

流出液量 (mL)	ジシアンジアミド 濃度(μg/mL)	添加濃度 ^{a)} に対する 割合
0~1	0.0	0.00
1~2	6.6	0.66
2~3	10.1	1.01
3~4	10.1	1.01
4~5	10.2	1.02
5~6	10.4	1.04
6~7	10.3	1.03
7~8	10.2	1.02
8~9	10.2	1.02
9~10	10.2	1.02

a) シリカゲルカートリッジカラムに負荷したジシアンジアミド
標準液の濃度(10 μg/mL)

2) 分析条件の検討

肥料分析法のメタノール 100 mL では測定値が低くなるものがある。配合飼料中のアンプロリウムの定量で、あらかじめ試料に水を加えた後メタノールを加えて抽出することにより、抽出効率が改善した例があるため³⁾、まず試料に水を少量加えた後、メタノールを加えることにより抽出効率が改善できるかどうか検討した。

市販のジシアンジアミド入り化成肥料 6 点及び成形複合肥料 1 点について、水を添加せずメタノール 100 mL で抽出したものと、水を 1 mL 添加し 5 分間放置した後メタノール 100 mL を加え抽出したものを比較した。結果は表 3 のとおりであり、比較に用いた 7 点のうち化成肥料 2 及び 3 について水を添加しなかったものは水を添加したのものに対してそれぞれ 93.0 % 及び 83.8 % と低くなった。

表3 水添加の有無によるジシアンジアミド測定値の比較

試料名	水添加量		(A) / (B)
	0 mL(A)	1 mL(B)	
化成肥料1	0.761 ^{a)}	0.772	0.99
化成肥料2	0.699	0.752	0.93
化成肥料3	0.635	0.758	0.84
化成肥料4	0.954	0.967	0.99
化成肥料5	0.381	0.398	0.96
化成肥料6	2.18	2.18	1.00
成形複合肥料	1.04	1.06	0.98

a) 測定値(%)

3) 抽出不足の原因について

化成肥料 2 及び 3 は原料としてなたね油かす及びその粉末(以下「なたね油かす」)を 15 及び 30 % 使用しさらに造粒工程がある。これが測定値が低くなる原因ではないかと考え、なたね油かす(超遠心粉砕機で粉砕し、目開き 500 μm のふるいを全通させたもの)4.95 g にジシアンジアミド 0.05 g 及び水 2 mL を加え、良くかき混ぜ 75℃で 3 時間乾燥させたものをめのう乳鉢ですりつぶし、水を添加しないもの及び添加したものを比較した。なお、この操作は肥料製造時の造粒工程に相当する。結果は表 4 のとおりであり、水を添加したものは良好な回収率であったが、水を添加しなかったものは 50.1 % の回収率であった。

この結果から、原料になたね油かすなどの有機質原料を使用することにより、肥料分析法の方法では回

収率が低くなるが、抽出時に水を添加することにより回収率を改善することができると考えられた。

表4 水添加の有無によるジシアンジアミド測定値の比較(なたね油かす)

試料名	ジシアンジアミド 添加量(%)	水添加量		(A) / (B)
		0 mL(A)	1 mL(B)	
なたね油かす	1	0.501 ^{a)}	0.985	0.51

a) 測定値(%)

4) 水添加量の検討

抽出時に添加する水の量について、水添加の有無によって測定値の差が一番大きかった化成肥料 3 について添加量を 0, 1, 2 及び 3 mL として検討を行った。結果は表 5 のとおりであり、水 0 mL では測定値が低くなり、水 1~3 mL では測定値に差はみられなかった。この結果から、水の添加量は 1 mL とすることとした。

表5 水添加量の測定値への影響

水添加量 (mL)	化成肥料3	
	測定値 ^{a)} (%)	測定値 の比較 ^{b)}
0	0.645	85.6
1	0.753	100.0
2	0.756	100.4
3	0.750	99.6

a) 3点併行分析の平均値

b) 水添加量1 mLの測定値を100とした割合

5) 抽出時間の確認

肥料分析法では抽出時間は 10 分間となっているため、本法についても 10 分間が適切かどうか、化成肥料 3 について抽出時間を 10, 20, 30, 60 分として検討を行った。結果は表 6 のとおりであり、10~60 分では測定値に差はみられなかった。この結果から抽出時間は 10 分間とすることとした。

表6 抽出時間の測定値への影響

抽出時間 (min)	化成肥料3	
	測定値 ^{a)} (%)	測定値 の比較 ^{b)}
10	0.746	100.0
20	0.746	100.1
30	0.747	100.3
60	0.751	100.8

a) 3点併行分析の平均値

b) 抽出時間10分間の測定値を100とした割合

6) 水添加から抽出までの時間の確認

試料に水を添加した後すぐにメタノールを加え抽出するか、少し放置した後メタノールを加え抽出するか

化成肥料 3 について検討を行った。すなわち、水を添加してすぐにメタノールを加え抽出したものと、水を添加してから 5、10 及び 20 分後にそれぞれメタノールを加えて抽出したものを比較した。結果は表 7 のとおりであり、すぐに抽出したものは測定値が低くなり、5～20 分では測定値に差はみられなかった。この結果から、水を添加してすぐにメタノールを加えて抽出すると測定値が低くなるため、5 分間以上放置が必要であることがわかった。

表7 放置時間の測定値への影響

放置時間 (min)	化成肥料3	
	測定値 ^{a)} (%)	測定値 の比較 ^{b)}
0	0.681	90.2
5	0.755	100.0
10	0.734	97.2
20	0.752	99.6

a) 3点併行分析の平均値

b) 放置時間5分間の測定値を100とした割合

7) 添加回収試験

ジシアンジアミドを含有しない無機化成肥料(2点)及び有機入り化成肥料(3点)(計5点)を用いて、ジシアンジアミド 2% 及び 0.2% を添加し、3点併行分析した結果を表 8 に示した。平均回収率及び相対標準偏差は、ジシアンジアミド 2% 添加した試料では 101.2～102.6% 及び 0.5～1.8% であり、0.2% 添加した試料では 98.4～100.6% 及び 0.2～1.3% であった。現在、農林水産大臣の登録を受けている肥料におけるジシアンジアミドの添加量は、ほとんどが 0.2～2% であり、この範囲において良好な正確さ(平均回収率)及び併行精度(相対標準偏差)が得られた。

表8 添加回収試験結果

試料名	添加濃度 (%)	平均回収率 ^{a)} (%)	相対標準偏差 (%)
化成肥料A	2	101.5	1.3
	0.2	98.8	0.8
化成肥料B	2	102.4	0.6
	0.2	98.4	0.7
化成肥料C	2	102.1	0.5
	0.2	99.2	0.2
化成肥料D	2	102.6	0.5
	0.2	100.4	1.3
化成肥料E	2	101.2	1.8
	0.2	100.6	1.1

a) 3点併行分析成績の平均回収率

8) 定量下限の確認

ジシアンジアミドの濃度を 0.02% とした試料を調製し、本法の定量下限の確認を行った。10点併行分析を実施した結果は表 9 のとおりであり、定量下限は標準偏差×10、検出下限は標準偏差×2×t(n-1, 0.05)として示されるため、本法の定量下限及び検出下限は 0.002 及び 0.001% と推測された。

表9 定量下限試験結果

試料名	平均定量値 ^{a)} (%)	標準偏差 (%)	定量下限の推定 (%)	検出下限の推定 (%)
化成肥料A	0.0199	0.0002	0.002	0.001

a) 10点併行分析成績の平均回収率

9) 標準液の安定性

冷蔵庫(4℃)に保管されたジシアンジアミド標準液(1 mg/mL)についての安定性の確認を行った。1～6ヶ月後の定量値は表10のとおりであり、定量値は1.00～1.03 mg/mLであった。

このことから、ジシアンジアミド標準液(1 mg/mL)を冷蔵庫(4℃)で保存した場合、6ヶ月間安定であることが認められた。

表10 ジシアンジアミド標準液の安定性試験

保管期間	定量値 (mg/mL)
1ヶ月	1.03
2ヶ月	1.00
3ヶ月	1.02
4ヶ月	1.03
5ヶ月	1.01
6ヶ月	1.02

4. まとめ

肥料分析法に採用されている硝酸化成抑制材ジシアンジアミドのHPLC法は、原料になたね油かすなどの有機質原料を使用した肥料では測定値が低くなるものがあった。そこで抽出の際に水1 mLを添加し、5分間放置後、メタノールを加えて10分間振とうして抽出することにより、回収率を改善することができた。また、肥料分析法では有機物を含む肥料についてはカラムクロマトグラフ用シリカゲルを用いて妨害物質を除去しているが、市販のシリカゲルカートリッジカラムを用いて妨害物質を除去することにより、簡便化及び迅速化することができた。

文 献

- 1) 農林水産省告示:肥料取締法施行規則第十一条の二第一項及び第二項の規定に基づき原料及び材料の保証票への記載に関する事項を定める件:改正平成16年1月15日、農林水産省告示第74号(2004)
- 2) 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)
- 3) 小山敬之,白井裕治:高速液体クロマトグラフィーによる配合飼料中のアンプロリウムの定量,飼料研究報告,21,80~94(1996)

Development of High Performance Liquid Chromatography for Determination of Dicyandiamide as a Nitrification Inhibitor in Fertilizer

Masakazu SAIKI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

An analytical method using high performance liquid chromatograph (HPLC) for determination of dicyandiamide used as a nitrification inhibitor in fertilizer was developed. After the addition of water to sample, the sample was left still for 5 minutes. Dicyandiamide was extracted with methanol and the extract dried with anhydrous sodium sulfate treatment. The extract was cleaned up with silica gel cartridge column rinsed methanol. The eluate was filtered through membrane filter and analyzed using HPLC. HPLC was performed with an aminopropyl silica gel column (4.6 mm internal diameter, 250 mm length, 5 µm particle size) 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 2 and 0.2 % of dicyandiamide ranged from 101.2 to 102.6 % and from 98.4 to 100.6 %, respectively. The relative standard deviations (RSD) were from 0.5 to 1.8 % and from 0.2 to 1.3 %, respectively. The result of 10 replicate measurements of dicyandiamide in fertilizer, the lower limit of quantitation value was 0.002 %. These results show the method has sufficient sensitivity and accuracy for determination of dicyandiamide as a nitrification inhibitor in fertilizer.

Key words fertilizer, nitrification inhibitor, dicyandiamide, high performance liquid chromatography

(Research Report of Fertilizer, 3, 43~50, 2010)