

## 4 HPLCを用いた肥料中のDMPP(硝酸化成抑制材)の分析法の開発

船木紀夫<sup>1</sup>

**キーワード** DMPP, 硝酸化成抑制材, HPLC, 肥料

### 1. はじめに

近年, 硝酸化成抑制効果が報告されている<sup>1)2)</sup>3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(以下「DMPP」という。)を含む肥料の登録例が見られる。硝酸化成抑制材を配合された肥料には, 農林水産省告示<sup>3)</sup>でその種類及び量の表示が義務づけられているが, DMPP については肥料等試験法(2020)<sup>4)</sup>に分析方法が記載されていない。

欧州規格では高速液体クロマトグラフ(以下「HPLC」という。)を用いた肥料中の DMPP 分析方法が記載されていることから<sup>5)</sup>, この方法について肥料等試験法における他の硝酸化成抑制材の分析法とリンクするよう試料溶液調製における抽出方法を検討し, 測定条件についてはマトリックスの影響及び溶液 pH の影響等を調査し, 単一試験室における分析法の妥当性(SLV: Single Laboratory Validation)を確認したので, 概要を報告する。

### 2. 材料及び方法

#### 1) 分析用試料

市場に流通している固形肥料について, DMPP を配合されたもの 4 種類合計 7 点(尿素, 混合窒素肥料, 化成肥料及び配合肥料)を用いた。また, 添加回収試験用及び定量下限等推定用として, DMPP 非配合の尿素, 化成肥料及び配合肥料を用いた。

各試料については, 目開き 500  $\mu\text{m}$  のふるいを通過するまで超遠心粉碎機にて粉碎したものを分析した。

#### 2) 試薬等の調製

(1) DMPP 標準液(2 mg/L): 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩[ $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$ ] (東京化成工業, 試薬純度 98.0% (質量分率)) を 0.20 g はかりとり, 超音波処理しながら水に溶かして 100 mL とした。

(2) 検量線用標準液(0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): DMPP 標準液の一定量を混合し, 水で適宜希釈して 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の検量線用標準液をそれぞれ調製した。

(3) 10 mmol/L りん酸二水素ナトリウム溶液: りん酸二水素ナトリウム二水和物[ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ] (富士フィルム和光純薬製, 特級) を 1.56 g はかりとり, 水に溶かして 1000 mL とした。

(4) 水: 超純水製造装置(MILLIPORE 製 Milli-Q Element A10)を用いて精製した超純水(比抵抗値 18  $\text{M}\Omega\text{cm}$  以上)を使用した。

(5) アセトニトリル: 富士フィルム和光純薬 HPLC 用

(6) りん酸二水素ナトリウム二水和物: 富士フィルム和光純薬 特級

#### 3) 装置及び器具

<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)名古屋センター

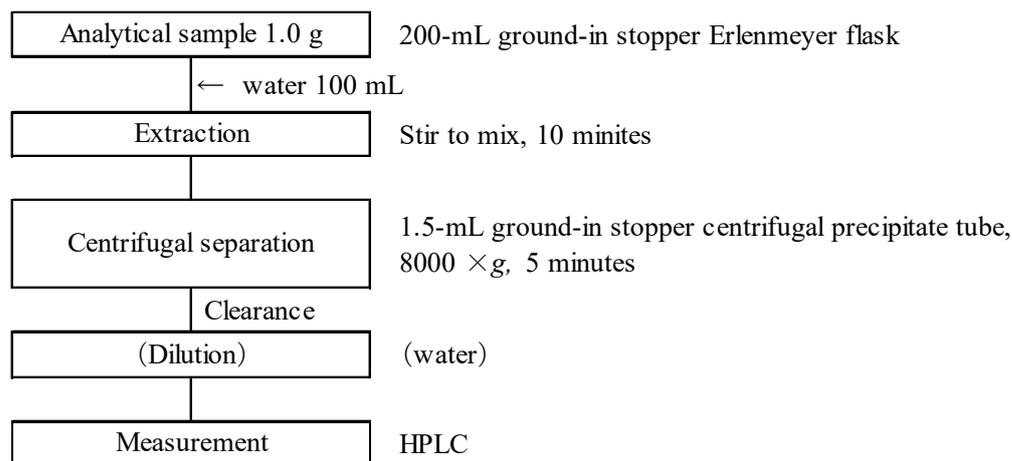
- (1) 高速液体クロマトグラフ: Waters 2695 Separation module, 2996 photo diode Array Detector
- (2) カラム: Supelco Discovery C18: 長さ 150 mm L×内径 4.6 mm I.D., 粒径 5 μm
- (3) マグネチックスターラー: 東京硝子器械 F-626N
- (4) 超遠心分離機: HITACHI himac CT15E
- (5) 超遠心粉碎機: ZM-200 Retsch
- (6) 超音波発生装置: SND US-4
- (7) 超純水製造装置: MILLIPORE Milli-Q Element A10
- (8) 全量フラスコ: クラス A
- (9) 全量ピペット: クラス A

#### 4) 分析方法

##### (1) 抽出

分析試料 1.0 g を 1 mg の桁まではかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れ、水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて 10 分間かき混ぜを行った。さらに 8000×g で 5 分間遠心分離したものを、HPLC 測定用試料溶液とした。

分析フローシートは Scheme 1 のとおりである。



Scheme 1 Method flow sheet of measuring DMPP in fertilizers

##### (2) HPLC による測定

検量線用 DMPP 標準液 10 μL を HPLC に注入し、既報<sup>2,5)</sup>を参考に設定した Table 1 の測定条件で UV-Vis 吸収による吸光度を測定して得られたピーク面積から検量線を作成した。試料溶液 10 μL を HPLC に注入し、ピーク面積から検量線により試料溶液中の DMPP の量を求め、分析試料中の濃度を算出した。測定時間については、DMPP 配合の流通肥料では妨害ピークが 2~7 分頃に出る試料があったこと、DMPP のピークが概ね 8~10 分頃に現れることから、12 分とした。

なお、流量については、既報<sup>5)</sup>では 1.5 mL/min とされているが、この流量では今回の検討にて使用した機器において、流路内圧力が許容値より高くなることから、約半分の 0.7 mL/min とした。同様にカラム槽温度については、既報<sup>5)</sup>では常温とされているが、常温レベルの温度では機器によっては安定し難いと考え、HPLC 法において一般的な設定温度である 40 °C に変更した。

クロマトグラム及び吸光度曲線の一例を Fig. 1 に示す.

Table 1 HPLC condition

HPLC	Waters 2695 separation module
Detector system	2996 photo diode array detector
Wavelength	224 nm
Column	Discovery C18 (150 mm L×4.6 mm I.D., 5 μm particle size)
Column temperature	40 °C
Mobile phase	10 mmol/L Sodium dihydrogen phosphate - Acetonitrile (40+7)
Flow rate	0.7 mL/min
Injection volume	10 μL
Measurement time	12 minutes

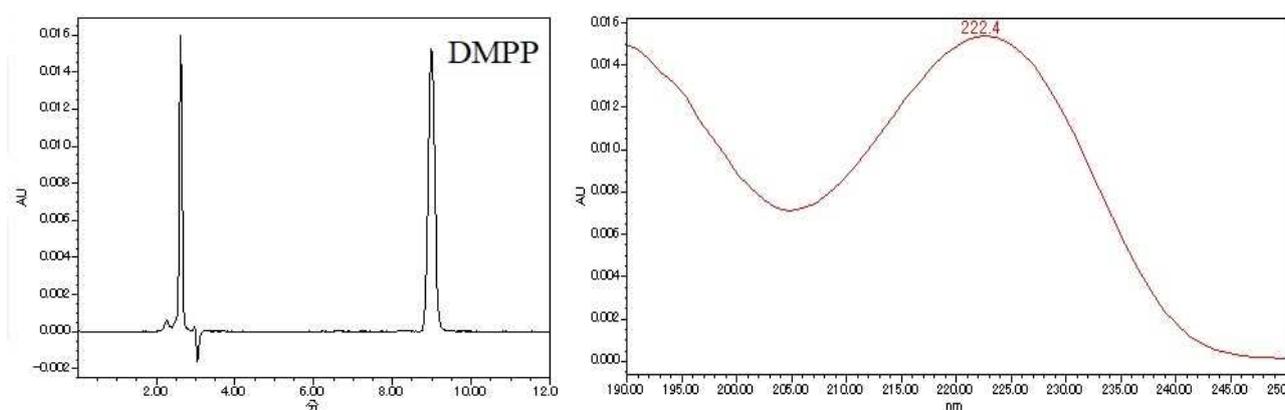


Fig. 1 HPLC chromatogram of standard solution and absorbance curves of DMPP (10 μg/mL) using Discovery C18 (Wavelength: 224 nm)

### 3. 結果

#### 1) 検量線の直線性の確認

0.5 μg/mL～100 μg/mL の範囲でピーク面積を元に検量線を作成した. DMPP の検量線の決定係数( $r^2$ )は 0.999 以上を示し, この範囲における検量線の直線性が確認できた (Fig. 2).

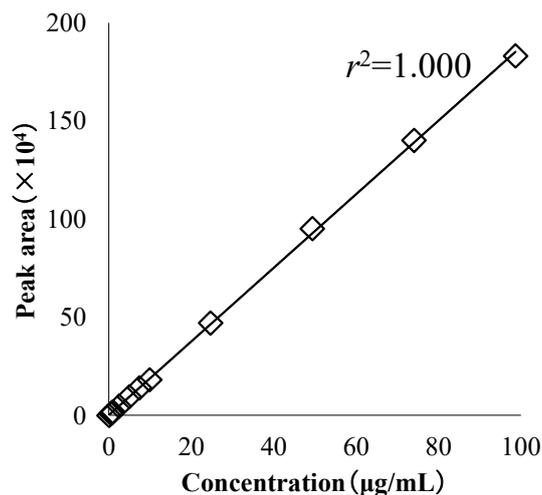


Fig. 2 Calibration curves of DMPP using Discovery C18 (0.5 µg/mL~100 µg/mL)

## 2) 抽出条件の検討: 希釈倍率及び抽出方法

肥料中における DMPP 測定方法の既報<sup>5)</sup>では, ①試料 30 g を 1000 mL 全量フラスコにはかりとり, 水 900 mL を加えて約 15 分間超音波処理をする, とされている(以下「A 法」とする.)。これに対し, ②試料 1 g を全量フラスコ 100 mL にはかりとり, 水 90 mL を加えて A 法と同様に超音波処理を行う方法(以下「B 法」とする.) , または③肥料等試験法<sup>4)</sup>に記載されている各硝酸化成抑制材の分析法と同様に, 試料 1 g を 200 mL 共栓三角フラスコにはかりとり, 水 100 mL を加えスターラーで 10 分間かき混ぜる方法(以下「C 法」とする.) について, それぞれ A 法と比較することにした。A 法と B 法, 及び A 法と C 法を比較するため, DMPP を配合された 3 種類の肥料について 4 点併行分析を行い, *F* 検定及び *t* 検定により DMPP 定量値の同等性を判断した。A~C 法間での抽出操作の相違点を Table 2 に, 比較の結果を Table 3-1~2 にそれぞれ示した。

A 法-B 法の比較, A 法-C 法の比較共に, 2 つの検定で有意差が認められなかったことから, この後の検討では他の硝酸化成抑制材の分析法における抽出方法と同様に, 試料 1 g を 200 mL 共栓三角フラスコにはかりとり 10 分間かき混ぜる抽出方法(C 法)を採用することとした。

Table 2 Differences in extraction operations between methods A, B and C

	Method A	Method B	Method C
Sampling volume	30 g	1 g	1 g
Constant capacity (water)	1000 mL	100 mL	-
Adding volume (water)	-	-	100 mL
Extraction	Ultrasonic shaking 15 minutes	Ultrasonic shaking 15 minutes	Stir to mix 10 minutes
Filtration	Hydrophilic PTFE membrane filter (0.45 µm)	Hydrophilic PTFE membrane filter (0.45 µm)	Centrifugal separation 8000 ×g, 5 minutes

Table 3-1 The comparison of methods A and B

Sample	Method	Quantitative value of DMPP <sup>a)</sup> (%) <sup>b)</sup>	<i>F</i> -test		<i>t</i> -test	
			Variance ratio	Critical value <sup>c)</sup>	<i>t</i> -value	Critical value <sup>d)</sup>
Urea	Method B	0.269	4.02	9.28	0.95	2.45
	Method A (Conventional method)	0.274				
Compound fertilizer A	Method B	0.0559	3.68	9.28	0.46	2.45
	Method A (Conventional method)	0.0560				
Mixed fertilizer	Method B	0.0248	1.33	9.28	0.83	2.45
	Method A (Conventional method)	0.0251				

a) Average ( $n=4$ )

b) Mass fraction

c)  $F$  (3,3;0.05)d)  $t$  (6;0.05)

Table 3-2 The comparison of methods A and C

Sample	Method	Quantitative value of DMPP <sup>a)</sup> (%) <sup>b)</sup>	<i>F</i> -test		<i>t</i> -test	
			Variance ratio	Critical value <sup>c)</sup>	<i>t</i> -value	Critical value <sup>d)</sup>
Urea	Method C	0.266	2.65	9.28	0.20	2.45
	Method A (Conventional method)	0.266				
Compound fertilizer A	Method C	0.0507	2.23	9.28	1.16	2.45
	Method A (Conventional method)	0.0498				
Mixed fertilizer	Method C	0.0231	1.14	9.28	0.55	2.45
	Method A (Conventional method)	0.0234				

a) Average ( $n=4$ )

b) Mass fraction

c)  $F$  (3,3;0.05)d)  $t$  (6;0.05)

### 3) 抽出条件の検討:ろ過方法

C法のろ過方法において、遠心分離をメンブレンフィルターろ過に変更した場合の同等性を確認した。Table

4 のとおり,  $F$  検定及び  $t$  検定で有意差が認められなかったことから, いずれのろ過方法も適用できることを確認した.

Table 4 The comparison of centrifugation and filtration

Sample	Method	Quantitative value of DMPP <sup>a)</sup> (%) <sup>b)</sup>	$F$ -test		$t$ -test	
			Variance ratio	Critical value <sup>c)</sup>	$t$ -value	Critical value <sup>d)</sup>
Compound fertilizer A	Method C (Membrane filter)	0.0541	1.05	9.28	1.23	2.45
	Method C (Centrifugation: Conventional method)	0.0544				

a) Average ( $n=4$ )

b) Mass fraction

c)  $F$  (3,3;0.05)

d)  $t$  (6;0.05)

#### 4) マトリックスの影響の確認

現在, 国内で肥料登録されている DMPP 配合肥料は全て有機質を含まない肥料であるが, 今後有機質を含む肥料についても登録される可能性があると考え, DMPP 非配合の有機質入り化成肥料 4 点及び混合堆肥複合肥料 1 点について C 法による抽出を行い, DMPP のピークと重なるピークの有無を確認した. また, DMPP 非配合であり有機質も含まない化成肥料 1 点及び配合肥料 2 点, 並びに DMPP を配合したものの登録実績がない肥料として, アセトアルデヒド縮合尿素 1 点, イソブチルアルデヒド縮合尿素 1 点, ホルムアルデヒド加工尿素肥料 1 点及び被覆窒素肥料 1 点についても同様に, ピークの有無を確認した.

その結果, 有機質入り化成肥料 4 点, 混合堆肥複合肥料 1 点及びホルムアルデヒド加工尿素肥料について, 8~10 分頃に DMPP のピークと重なるピークがあり, かつ検出下限相当を上回るピークが見られたことから, 有機質を含む肥料及びホルムアルデヒド加工尿素肥料については本法の適用外とすることとした.

なお, これらのピーク確認を実施した有機質を含む肥料に含まれる有機質原料を Table 5 に, 各肥料のクロマトグラムを Fig. 3 に, それぞれ示す.

Table 5 Organic raw materials in fertilizers containing organic matter for blank test

Type of fertilizer	Organic materials
Organic compound fertilizer-1	Rapeseed oil residue, Castor oil residue, Rice bran, Processed poultry manure fertilizer, Fish meal powder, Mixed organic fertilizer
Organic compound fertilizer-2	Rapeseed oil residue, Rice bran oil residue, Soybean oil residue, Mixed organic fertilizer, Steamed feather meal,
Organic compound fertilizer-3	Rapeseed oil residue, Castor oil residue, Rice bran, Processed poultry manure fertilizer, Fish meal powder, Mixed organic fertilizer, Dry cell fertilizer
Organic compound fertilizer-4	Steamed leather powder, Dry blood, Steamed feather meal, Processed organic fertilizer, Meat-and-bone meal
Compost mixed fertilizer	Chicken manure compost, Livestock manure compost

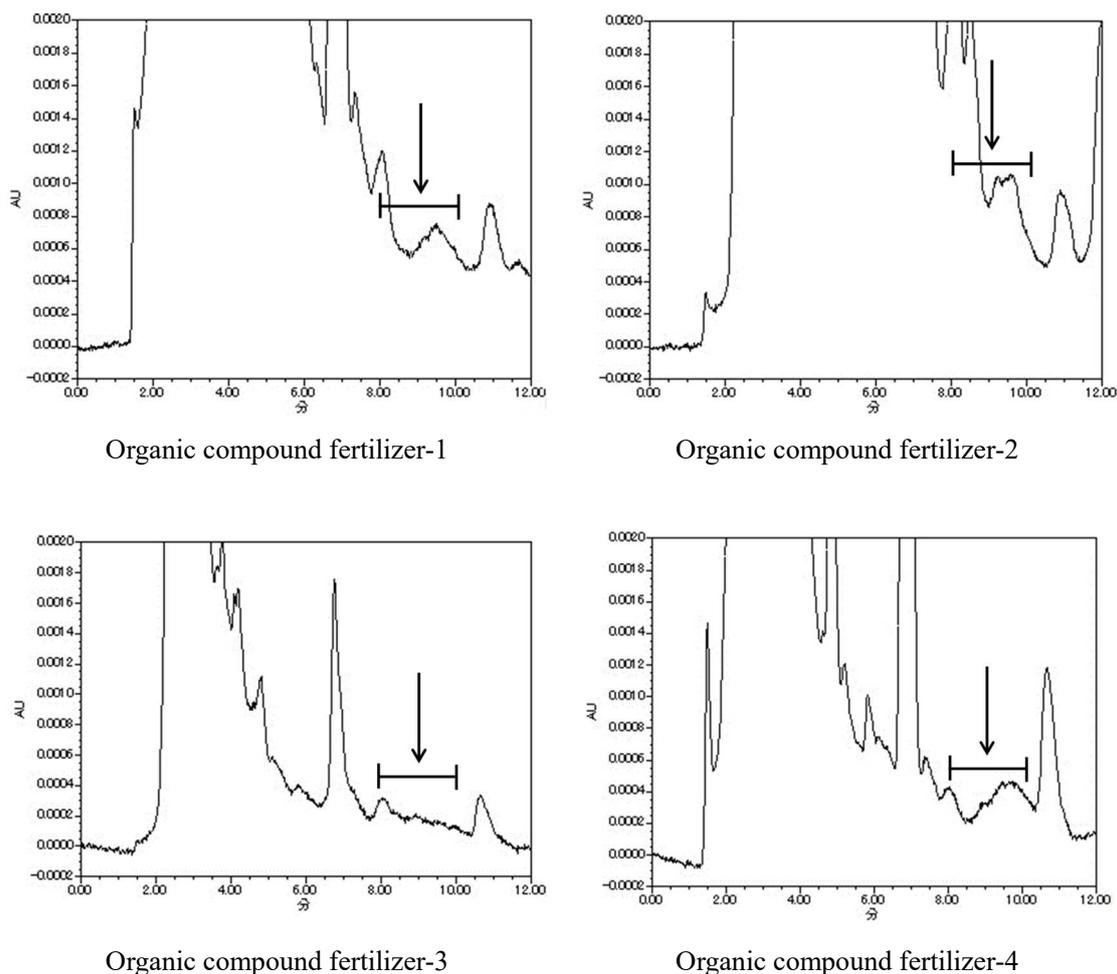


Fig. 3 Chromatogram of DMPP-free fertilizers at developed method

Arrow: Approximate retention time of DMPP

Horizontal line: Rough fluctuation range of retention time of DMPP

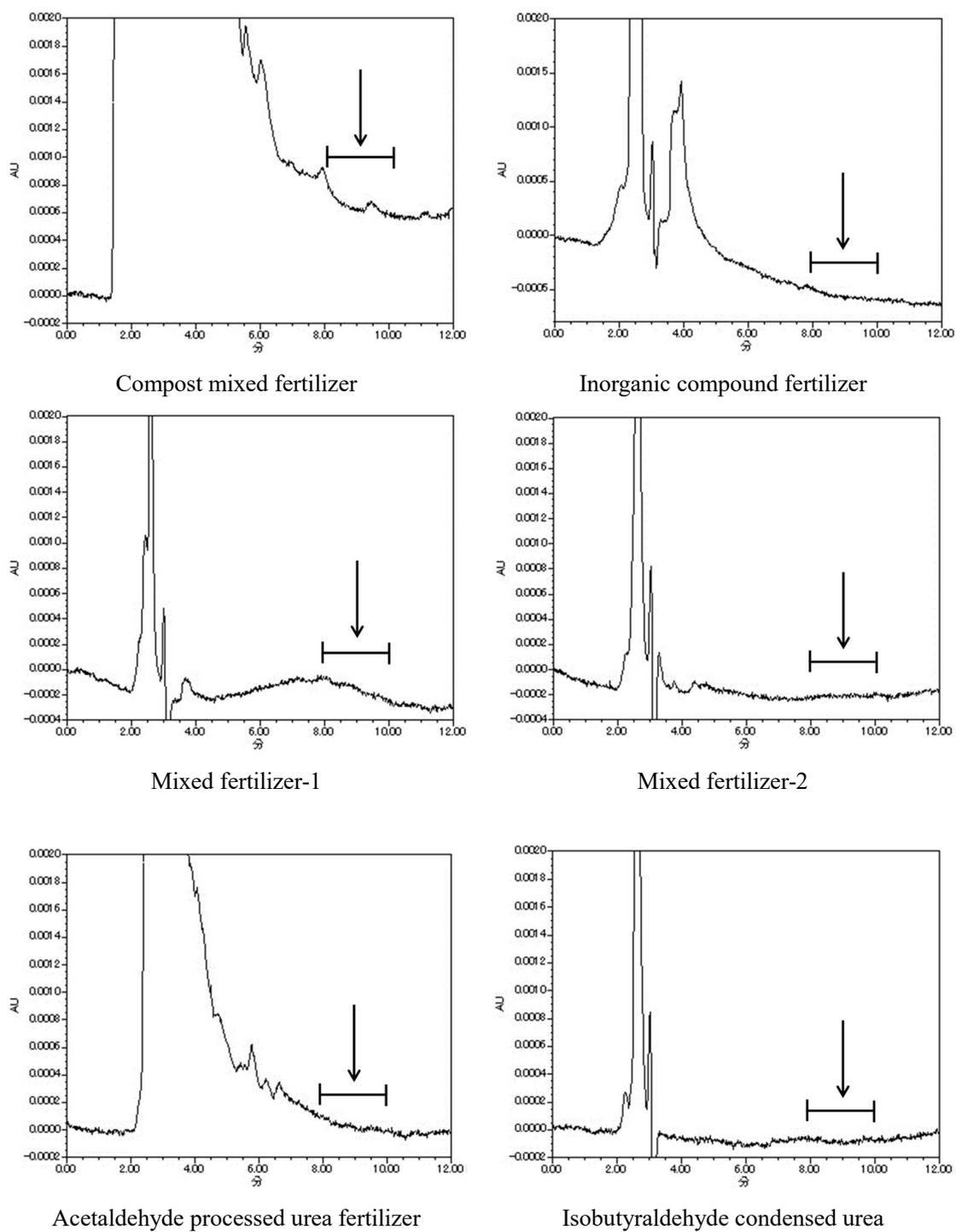


Fig. 3 (Continue)

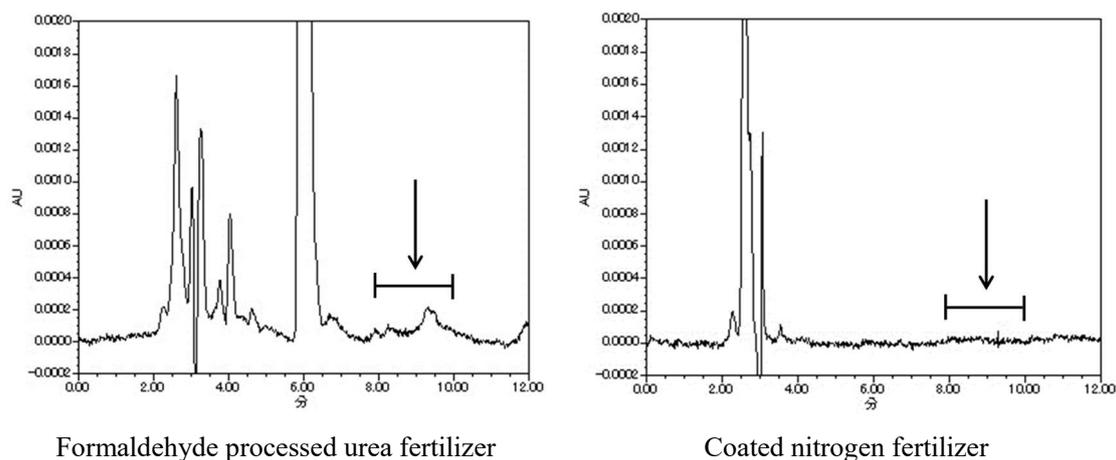


Fig. 3 (Continue)

### 5) 添加回収試験による真度の評価

真度を評価するため、DMPP 非配合の尿素、化成肥料(有機質肥料を含まない)及び配合肥料(同)各 1 点を使用し、3 点併行で添加回収試験を実施した結果を Table 6 に示す。これまでに国内で登録されている DMPP 配合肥料における、DMPP の使用範囲が約 0.03 %~0.3 %程度であり特に 0.1 %前後のものが多いこと、また、実際は設計値より過少または過剰に配合されるケースも想定して、添加濃度は 0.01 %、0.1 %及び 0.5 %とした。

いずれの回収率も肥料等試験法<sup>4)</sup>に示されている真度の目標範囲以内であったことから、本法は十分な真度を有していることが確認された。

Table 6 Results of recovery test

Sample	Spiked level (%) <sup>a)</sup>	Quantitative value of DMPP <sup>b)</sup> (%) <sup>a)</sup>	Recovery rate (%)	Criteria of the trueness <sup>c)</sup> (%)
Urea <sup>d)</sup>	0.5	0.501	100.2	85~110
	0.1	0.0976	97.6	85~110
	0.01	0.00989	98.9	80~115
Compound fertilizer <sup>d)</sup>	0.5	0.507	101.3	85~110
	0.1	0.0971	97.1	85~110
	0.01	0.00973	97.3	80~115
Mixed fertilizer <sup>d)</sup>	0.5	0.504	100.8	85~110
	0.1	0.0969	96.9	85~110
	0.01	0.00988	98.8	80~115

a) Mass fraction

b) Mean value ( $n=3$ )

c) Criteria of the trueness (recovery) shown in Testing Methods for Fertilizers

d) DMPP-free fertilizer

### 6) 併行精度及び中間精度の確認

DMPP 配合肥料である尿素 1 点, 混合窒素肥料 1 点, 化成肥料 4 点及び配合肥料 1 点について, それぞれ 2 点併行で 5 日間測定を行った結果を Table 7 に示す. また, その結果を基に, 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 8 に示す.

いずれの相対標準偏差も肥料等試験法<sup>4)</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)の許容範囲内であったことから, 本法は十分な精度を有していることが確認された.

Table 7 Individual result of repetition test of changing the date for accuracy estimation (mass fraction (%))

Sample	Test day				
	1	2	3	4	5
Urea	0.262	0.258	0.253	0.259	0.260
	0.260	0.257	0.252	0.261	0.261
Mixed nitrogen fertilizer	0.149	0.147	0.147	0.138	0.143
	0.149	0.144	0.145	0.139	0.144
Compound fertilizer B	0.110	0.105	0.107	0.098	0.105
	0.111	0.105	0.108	0.099	0.105
Compound fertilizer C	0.0554	0.0541	0.0541	0.0504	0.0526
	0.0554	0.0545	0.0531	0.0507	0.0528
Compound fertilizer D	0.0380	0.0378	0.0377	0.0352	0.0372
	0.0388	0.0379	0.0376	0.0353	0.0366
Compound fertilizer A	0.0334	0.0320	0.0319	0.0324	0.0328
	0.0334	0.0331	0.0319	0.0325	0.0319
Mixed fertilizer	0.0183	0.0185	0.0181	0.0183	0.0179
	0.0190	0.0187	0.0173	0.0190	0.0185

Table 8 Statistical analysis of repetition test result for estimating precision

Sample	Quantitative value of DMPP <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> (%)
Urea	0.258	0.0011	0.4	4	0.0036	1.4	6.5
Mixed nitrogen fertilizer	0.145	0.0011	0.8	4	0.0039	2.7	6.5
Compound fertilizer B	0.105	0.0004	0.4	4	0.0044	4.1	6.5
Compound fertilizer C	0.0533	0.0004	0.7	4	0.0019	3.5	6.5
Compound fertilizer D	0.0372	0.0003	0.8	4	0.0012	3.3	6.5
Compound fertilizer A	0.0325	0.0004	1.4	4	0.0006	1.9	6.5
Mixed fertilizer	0.0184	0.0004	2.4	4	0.0005	2.8	6.5

a) Mean value ( $n$ =sample number of parallel test (2) × number of test days (5))

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

## 7) 定量下限等の推定

DMPP の検量線用の標準液の最小濃度は 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (分析試料中で 0.005 %相当量) であり, SN 比は 10 を超えていた. また, DMPP 配合肥料のうち, DMPP 配合量の設計値が最も低かったものは約 0.03 %程度であったことから, その約 1/5 である 0.006 %相当量になるよう, DMPP 非配合の配合肥料 1 g に 60  $\mu\text{g}$  を添加して 7 点併行で分析し, その平均値及び標準偏差等の結果を Table 9-1 に示した. この分析によって得られた DMPP の併行分析の結果, 用いた検量線 (0.5  $\text{ng}/\text{mL}$  ~ 10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) 及び試料溶液の SN 比についてそれぞれ, 肥料等試験法<sup>4)</sup>別添 試験法の妥当性確認の手順 に従って定量下限及び検出下限を Table 9-2 のとおり算出した.

その結果, DMPP の定量下限は 0.003 %, 検出下限は 0.001 %程度とそれぞれ推定された. また, 回収率は 95.7 %であり, 肥料等試験法に示されている真度評価の推奨範囲内であった.

Table 9-1 Result of parallel test for estimation of the lower limit of quantification of DMPP

Sample	Spiked level	Quantitative value of DMPP	$s_r$ <sup>b)</sup>	Recovery rate of DMPP <sup>c)</sup>
	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>	(%) <sup>a)</sup>
Mixed fertilizer <sup>d)</sup>	0.006	0.00574	0.00007	95.7

a) Mass fraction

b) Repeatability standard deviation

c) Mean value ( $n=7$ )

d) DMPP-free fertilizer

Table 9-2 Result of estimation of the lower limit of quantification and detection of DMPP

By parallel test <sup>a)</sup>		By calibration curves <sup>b)</sup>		By SN ratio <sup>c)</sup>	
$LOQ$ <sup>d)</sup>	$LOD$ <sup>e)</sup>	$LOQ$ <sup>d)</sup>	$LOD$ <sup>e)</sup>	$LOQ$ <sup>d)</sup>	$LOD$ <sup>e)</sup>
(%) <sup>f)</sup>	(%) <sup>f)</sup>	(%) <sup>f)</sup>	(%) <sup>f)</sup>	(%) <sup>f)</sup>	(%) <sup>f)</sup>
0.0007	0.0003	0.003	0.001	0.003	0.001

a) Procedure(3.6.1) and (3.7.1) for validating the testing method in attachment of Testing Methods of Fertilizers

b) Procedure(3.6.2) and (3.7.2) for validating the testing method in attachment of Testing Methods of Fertilizers

c) Procedure(3.6.3) and (3.7.3) for validating the testing method in attachment of Testing Methods of Fertilizers

d) Estimation of the lower limit of quantitation of DMPP

e) Estimation of the lower limit of detection of DMPP

f) Mass fraction

#### 4. まとめ

HPLC を用いて肥料中の DMPP の分析法について検討したところ、次の結果を得た。

(1) 試料溶液調製における抽出方法は、試料 1.0 g を 200 mL 容共栓三角フラスコにはかりとり、水 100 mL を加えてマグネチックスターラーで 10 分間かき混ぜ後、遠心分離またはメンブレンフィルターろ過する方法とした。

(2) HPLC の測定条件は、C18 カラムを用いて検出波長を 224 nm、溶離液を 10 mmol/L リン酸二水素ナトリウム+アセトニトリル(40+7)、流速を 0.7 mL/min、及びカラム温度を 40 °Cとした。また、検量線の直線性は 0.5 µg/mL~100 µg/mL の範囲で直線性(決定係数  $r^2=0.999$  以上)を示した。

(3) 有機質を含む肥料及びホルムアルデヒド加工尿素肥料ではマトリックスの影響があることから、本法の適用外とした。

(4) 添加回収試験は、3 種類の肥料に、3 段階の濃度の DMPP を添加した計 9 通りについて 3 点併行分析をし、平均回収率は 96.9 %~101.3 %であり、肥料等試験法<sup>4)</sup>における各濃度レベルの回収率の許容範囲内にすべて含まれていた。

(5) 4種類7点の試料について5日間の反復分析を行い, 併行精度及び中間精度を確認した結果, 肥料等試験法で示されている目安の範囲内であった.

(6) 本法におけるDMPPの定量下限は0.003%程度, 検出下限は0.001%程度であると推定された.

以上から, 単一試験室における分析法の妥当性を確認した結果, 本法は肥料中のDMPPを測定するために, 十分な性能を有していることを確認した.

## 文 献

- 1) 田淵浩平, 小林 新: 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) の硝酸化成抑制効果と水稻基肥への活用, 日本土壤肥科学雑誌, 90(2), 147-152(2019)
- 2) Gero Benckiser et al: The nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole-phosphate (DMPP) - quantification and effects on soil metabolism, Plant and Soil, 371, 257-266(2013)
- 3) 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, 最終改正令和3年6月14日, 農林水産省告示第1010号(2021)
- 4) 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(2020)  
<[http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho\\_2020.pdf](http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf)>
- 5) Fertilizers. Determination of 3,4-dimethyl-1H-pyrazole phosphate (DMPP). Method using high-performance liquid chromatography (HPLC), EN 16328(2012)

## Determination of 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in Fertilizers by High Performance Liquid Chromatography

FUNAKI Norio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Kobe Regional Center  
(Now) FAMIC, Nagoya Regional Center

DMPP is new nitrate inhibitor used in recent years. A High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for analytical method of DMPP in fertilizers was developed refer to EN 16328 (2012) and validated as a single-laboratory validation. I extracted the sample by adding water and stirred for ten minutes. After centrifugation, I analyzed sample solution by HPLC, on ODS column with UV detection at 224 nm. As a result of 3 replicate analysis of 3 fertilizer samples (urea, compound fertilizer and mixed fertilizer) spiked with DMPP (0.01 %, 0.1 % and 0.5 % (mass fraction)), the mean recoveries were 96.9 % - 101.3 %. Repeatability standard deviation of DMPP were estimated 0.4 % - 2.4 % by analyzing 7 fertilizer samples (urea, mixed nitrogen fertilizer, 4 compound fertilizers and mixed fertilizer). Similarly, intermediate relative standard deviations of there were estimated 1.4 % - 4.1 %. The limits of quantification of there were estimated 0.003 %, and the limits of detection of there were estimated 0.001 %. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of DMPP in fertilizers.

*Key words* DMPP, nitrate inhibitor, HPLC, fertilizer

(Research Report of Fertilizer, 14, 39-52, 2021)