

5-2 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—

齊木雅一¹, 義本将之¹

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, 共同試験

1. はじめに

現在、肥料分析法(1992年)¹⁾は石灰窒素中のジシアンジアミド性窒素の試験法としてニッケルグアニル尿素法を採用している。しかし、この方法は使用する試薬が入手困難であり、また定量に長時間を必要とする。筆者らは、硝酸化成抑制材のジシアンジアミドの試験法である高速液体クロマトグラフ法を用いることにより、迅速に精度よく定量することを報告した²⁾。さらに ISO/IEC 17025 の要求事項である試験所間の比較試験について、IUPAC の共同試験プロトコル³⁾を参考に高速液体クロマトグラフによるジシアンジアミド性窒素の試験法の共同試験を実施し、機種間も含む試験室間の再現精度を調査したので、その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料の調製

石灰窒素 3 点及び石灰窒素入り配合肥料 2 点(計 5 点)各 2~3 kg を試験品として採取し、ビニール袋に入れて密封した。超遠心粉砕機(Retsch ZM100)で目開き 500 μm のふるいを全通するまで粉砕し、よく混合して共同試験用試料を調製した。

各共同試験用試料約 2 g をビニール袋に入れ密封した。一対のブラインド試料を提供するため、それぞれの肥料の共同試験用試料の袋に 2 系列の番号のラベルを付けた。共同試験用試料(10 点)を参加試験室に送付した。

2) 装置

各試験室に設置している振とう機及び高速液体クロマトグラフ装置を使用した。

3) ジシアンジアミドの測定

分析試料 1.00 g を 200 mL 共栓付き三角フラスコに量りとり、メタノール 100 mL を加え 10 分間振り混ぜ、その上澄み液を PTFE メンブランフィルターでろ過したろ液、又は遠心力 $8 \times 10^3 \text{ g}$ (10,000 rpm) で 5 分間遠心分離した上澄み液を試料溶液とした。その試料溶液を高速液体クロマトグラフに供し、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、分析試料中のジシアンジアミド濃度を算出した(図 1)。

測定にあたっては、各試験室の高速液体クロマトグラフの操作方法に従った。

¹ (独)農林水産消費安全技術センター札幌センター

4) 共同試験用試料の均質性確認

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル⁴⁾の均質性試験に従い、各系列の共同試験用試料からそれぞれ 10 試料を抜き取り、各試料につき 2 点併行で 3) に従って分析した。

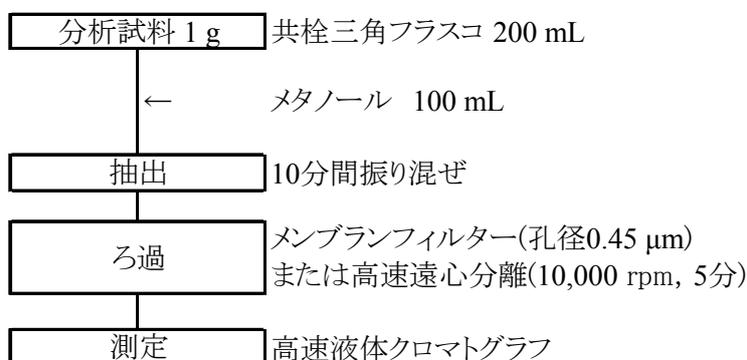


図 1 ジシアンジアミドの試験法フローシート

5) 共同試験

試験に参加した 11 試験室と使用した高速液体クロマトグラフ及びカラムは以下のとおりであり、それぞれの試験室において送付した 10 試料について 3) に従って試験を実施した。

- ・ ジーエルサイエンス株式会社 カスタマーサポートセンター
(GL-7400 Series, Inertsil NH₂(内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm))
- ・ 株式会社島津総合分析試験センター 京都事業所
(島津製作所 LC-10A Series, Unison UK-Amino (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm))
- ・ 電気化学工業株式会社 青海工場
(TOSOH-8020 Series, Unisil Q NH₂ (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm))
- ・ 財団法人日本食品分析センター 多摩研究所
(島津製作所 LC-20AD Series, Mightysil NH₂ (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm))
- ・ 財団法人日本肥糧検定協会
(島津製作所 LC-6A Series, Shim-pack CLC-NH₂ (内径 6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 μm))
- ・ 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大阪事務所
(Agilent 1100 Series, Mightysil NH₂ (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm))
- ・ 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
(Agilent 1100 Series, Hibar LiChrosorb NH₂ (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm))
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター
(HEWLETT PACKARD SERIES 1100, Unisil Q NH₂ (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm))
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター
(Agilent 1100 Series, Mightysil NH₂ (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm))
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター
(Agilent 1100 Series, Unisil Q NH₂ (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm))
- ・ 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
(島津製作所 LC-10A Series, Shodex NH-5A (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm))

(50 音順)

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性試験の成績から IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル⁴⁾の新たな統計手法に記述されている判定基準(次式)に用いる統計量⁵⁾を表 1 に示した. 算出した各共同試験用試料の統計量がこの判断基準を満たし, 更に, 試料間の相対標準偏差は 0.9~7.7 %であることから, 全ての共同試験用試料が共同試験に用いるための均質性を有することを確認した.

$$s_{\text{sam}}^2 \leq F_1 \sigma_{\text{all}}^2 + F_2 s_{\text{an}}^2$$

s_{sam}^2 : 試料間の純分散(負の値の場合は, 0 とする)

s_{an}^2 : 繰返しの分散

σ_{all}^2 : 許容可能な試料間の分散 ($\sigma_{\text{all}}^2 = (0.3 \times \sigma_p)^2$; σ_p は Horwitz の式⁹⁾により算出)

F_1, F_2 : 10 試料を 2 点併行で測定した場合のファクター

($F_1=1.88, F_2=1.01$; critical values for homogeneity testing(Appendix 1))

表1 ジシアンジアミドの均質性確認試験の結果

試料の種類	平均定量値 ¹⁾ (%)	標準偏差 ²⁾ (%)	相対標準偏差 ²⁾ (%)	s_{sam}^2	$F_1 \sigma_{\text{all}}^2 + F_2 s_{\text{an}}^2$
石灰窒素1	0.0246	0.0006	2.4	2.54E-07	6.06E-07
石灰窒素2	0.164	0.002	1.3	3.01E-06	1.39E-05
石灰窒素3	0.266	0.003	1.1	2.08E-06	3.53E-05
配合肥料1	0.133	0.010	7.7	0 ⁴⁾	1.23E-04
配合肥料2	0.418	0.004	0.9	0 ⁴⁾	7.64E-05

1) 10試料2点併行分析の総平均定量値

2) 試料間の標準偏差

3) 試料間の相対標準偏差

4) s_{sam}^2 の算出値が負の値であったので0とした

2) 共同試験成績及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験成績を表 2 に示した. 各系列の分析試料の試験結果を IUPAC の共同試験プロトコル^{3, 6)}に従って統計処理した. 試験成績の外れ値を検出するために Cochran の検定及び Grubbs の検定を実施したところ, 11 試験室の試験成績のうち石灰窒素 1 で 2 試験室, 石灰窒素 2 で 1 試験室の試験成績が外れ値と判別された.

3) 併行精度及び室間再現精度

外れ値を除外した試験成績より算出した平均値, 併行標準偏差 (SD_f), 相対標準偏差 (RSD_f) 及び HorRat 値 (Ho_f) 並びに室間再現標準偏差 (SD_R), 相対標準偏差 (RSD_R) 及び HorRat 値 (Ho_R) を表 3 に示した. HorRat 値は分析方法の精度の評価をするために用いられており, Ho_f は $RSD_f/RSD_f(P)$ 及び Ho_R は $RSD_R/RSD_R(P)$ により求められる⁷⁾. なお, $RSD_R(P)$ は平均定量値から Horwitz 式⁵⁾により求め, $RSD_f(P)$ は Horwitz 式に係数 (1/2) を乗じて求めた^{8, 9)}. 外れ値を除外した試験成績の平均値は 0.0321~0.410 % であ

り、その SD_r 及び SD_R は 0.001~0.007 % 及び 0.001~0.008 % であり、 RSD_r 及び RSD_R は 0.7~3.2 % 及び 1.9~3.8 % であった。また、 RSD_r 及び RSD_R の評価に用いる Ho_r 及び Ho_R は 0.24~0.94 及び 0.37~0.72 であり、いずれも 2 以下であった¹⁰⁾。

表2 ジシアンジアミドの共同試験成績 (%)

試験室 ¹⁾	石灰窒素1		石灰窒素2		石灰窒素3	
A	0.0310	0.0314	0.165	0.165	0.264	0.265
B	0.0323	0.0307	0.149	0.151	0.251	0.254
C	0.0319	0.0335	0.159	0.164	0.243	0.243
D	0.0329	0.0354	0.155	0.152	0.245	0.246
E	0.0319	0.0310	0.153	0.150	0.249	0.250
F	0.0375 ³⁾	0.0390 ³⁾	0.164	0.166	0.236	0.235
G	0.0331	0.0314	0.164	0.164	0.243	0.246
H	0.0320	0.0331	0.155	0.156	0.241	0.241
I	0.0317	0.0331	0.165	0.163	0.242	0.242
J	0.0307	0.0312	0.172 ²⁾	0.159 ²⁾	0.248	0.243
K	0.0354 ³⁾	0.0374 ³⁾	0.156	0.162	0.239	0.234
試験室	配合肥料1		配合肥料2			
A	0.126	0.128	0.418	0.417		
B	0.121	0.122	0.418	0.421		
C	0.125	0.123	0.406	0.400		
D	0.128	0.129	0.406	0.402		
E	0.123	0.124	0.402	0.403		
F	0.120	0.121	0.409	0.420		
G	0.123	0.124	0.415	0.408		
H	0.122	0.122	0.406	0.400		
I	0.121	0.122	0.414	0.402		
J	0.124	0.124	0.418	0.407		
K	0.122	0.123	0.422	0.401		

1) 共同試験に参加した試験室の記号(順不同)

2) Cochranテストによる外れ値

3) Grubbs テストによる外れ値

表3 共同試験成績の解析結果

試料の種類	試験 室数 ¹⁾	平均値 ²⁾ (%)	SD_r ³⁾ (%)	RSD_r ⁴⁾ (%)	Ho_r ⁵⁾	SD_R ⁶⁾ (%)	RSD_R ⁷⁾ (%)	Ho_R ⁸⁾
石灰窒素1	9	0.0321	0.0010	3.2	0.94	0.0012	3.8	0.57
石灰窒素2	10	0.159	0.002	1.3	0.51	0.006	3.8	0.72
石灰窒素3	11	0.245	0.002	0.7	0.30	0.008	3.3	0.67
配合肥料1	11	0.124	0.001	0.7	0.24	0.002	2.0	0.37
配合肥料2	11	0.410	0.007	1.6	0.71	0.008	1.9	0.41

1) 解析に用いた試験室数

2) 平均値 ($n = \text{試験室数} \times \text{試料数} (2)$)

3) 併行標準偏差

4) 併行相対標準偏差

5) 併行HorRat値

6) 室間再現標準偏差

7) 室間再現相対標準偏差

8) 室間再現HorRat値

4. まとめ

11 試験室において 5 銘柄 (10 点) の石灰窒素及び石灰窒素入り配合肥料を用いてジシアンジアミドの共同試験を実施し、高速液体クロマトグラフによるジシアンジアミド性窒素試験法の評価を行った。その結果、室間再現相対標準偏差は 1.9~3.8 %であった。また、その評価に用いる HorRat 値は 0.37~0.72 であり、2 を下回っていたことから、試験所間の比較による本試験法の室間再現精度は満足する成績であった。

既報により測定範囲、公定法との整合性等が検討されており、本試験法は石灰窒素及び石灰窒素入り配合肥料中のジシアンジアミド性窒素測定に用いることができる十分な性能を有することが確認された。このことから、2008 年度肥料等技術検討会の審議を受け、本試験法は肥料等試験法 (2009) に記載された¹¹⁾。

謝 辞

この試験の実施においてコープケミカル株式会社にはサンプルをご提供頂いたことを感謝いたします。また、共同試験にご協力頂いたジーエルサイエンス株式会社、株式会社島津総合分析試験センター、電気化学工業株式会社、財団法人日本食品分析センター及び財団法人日本肥糧検定協会の各位に謝意を表します。

文 献

- 1) 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)
- 2) 内山丈,白井裕治:汚泥肥料中の水分測定—共同試験成績—,肥料研究報告, **2**, 25~31 (2009)
- 3) Horwitz, W.: Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331~343 (1995)
- 4) Thompson, M., R.Ellison, S., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemical Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78** (1), 145~196 (2006)
- 5) Fearn, T., Thompson, M., A new test for 'sufficient homogeneity', *Analyst*, **126**, 1414~1417 (2001)
- 6) Thompson, M.: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385~386 (2000)
- 7) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guideline for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2000)
- 8) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix E: Laboratory Quality Assurance, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2000)
- 9) Horwitz, W., Kamps, L.R., Boyer, K.W.: Quality control. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. AOAC Int.*, **63** (6), 1344~1354 (1980)
- 10) Codex Alimentarius: "Recommendation for a checklist of information required to evaluate method of analysis and submitted to the Codex Committee on Method of Analysis and Sampling for endorsement", Vol.13, p.129 (1994)
- 11) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法(2009)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/bunnseki/sub9.html>>

Determination of Dicyandiamide in Nitrolime by High Performance Liquid Chromatography: A Collaborative Study

Masakazu SAIKI¹ and Masayuki YOSHIMOTO¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

A collaborative study was conducted to evaluate 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 was injected into a high performance liquid chromatograph connecting aminopropyl silica gel column. Dicyandiamide was detected with UV detector. The samples of 3 kinds of nitrolimes and 2 kinds of compound fertilizers with nitrolime were sent to 11 collaborators. The samples were analyzed as blind duplicates. After removing the outlying data using Cochran and Grubbs outlier test, mean values were from 0.0321 to 0.410 % for each kind of samples. The relative standard deviation (RSD_r) for repeatability ranged from 0.7 to 3.2 %. The relative standard deviation (RSD_R) for reproducibility ranged from 1.9 to 3.8 %. The HorRat values (RSD_R/predicted RSD_R) ranged from 0.37 to 0.72. These HorRat values indicated that this method has an acceptable precision for determination of dicyandiamide in nitrolime and compound fertilizer with nitrolime.

Key words dicyandiamide, nitrolime, high performance liquid chromatography, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **2**, 32~37, 2009)