

3 高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の硝酸化成抑制材

ジシアンジアミド測定

— 共同試験成績 —

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, 共同試験

1. はじめに

現在, 肥料分析法 (1992 年)¹⁾ は硝酸化成抑制材ジシアンジアミドの分析法として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を採用している. しかし, 前者は有機物を含有する場合には適用できない場合があり, 後者はメタノールのみで抽出するため, 肥料の原料によっては測定値が低くなることもある. 筆者は, 含水メタノールで抽出効率を改善し, シリカゲルカートリッジカラムによって測定を妨害する夾雑成分の除去できることを確認した^{2, 3)}. 更に, この試験法の添加回収試験, 定量下限の確認等を実施し, 満足する成績を得た.

今回, IUPAC の共同試験プロトコル⁴⁾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

市販のジシアンジアミド入り化成肥料 (5 点) について試験品として各 2~3 kg を採取し, ビニール袋に入れて密封し, 粉砕時まで保管した. 各試験品について超遠心粉砕機 (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.

共同試験用試料を約 2 g ずつ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, 乱数を付して各種類の肥料 2 袋 (計 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 を共栓付き三角フラスコ 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 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上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL にとり, 遠心力 2,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離, またはろ紙 3 種でろ過した. その上澄み液またはろ液 10 mL を全量フラスコ 50 mL にとり, 標線までメタノールを加えた. これをメタノールでコンディショニ

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

ングしたシリカゲルカートリッジカラムに入れ、初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液約 2 mL を試験管にとった。流出液を共栓遠心沈殿管 1.5 mL に移し、遠心力 $8,000\times g$ で 5 分間遠心分離、または PTFE メンブランフィルター(孔径 $0.5\ \mu\text{m}$ 以下)でろ過し、上澄み液またはろ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。

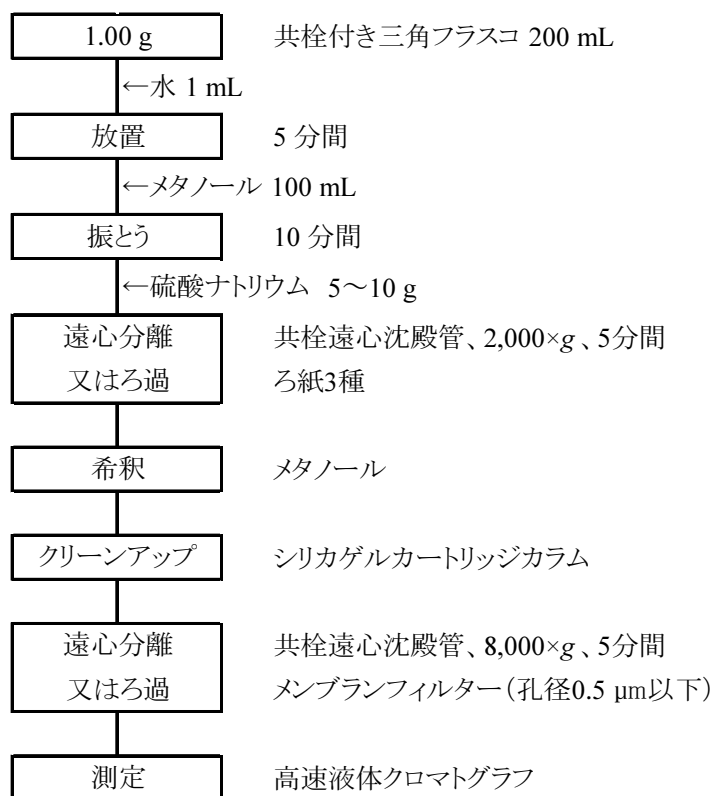


図1 ジシアンジアミド試験法フローシート

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⁵⁾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。

5) 共同試験

試験に参加した 13 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。

- ・ アジレント・テクノロジー株式会社

(Agilent 1200 Series, ZORBAX Carbohydrate Analysis(内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 $5\ \mu\text{m}$))

- ・ 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 $5\ \mu\text{m}$))

- ・ 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-20A Series, Unison UK-Amino(内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm))
- ・ 全国農業協同組合連合会(JA 全農) 肥料研究室
(島津製作所 LC-10AD Series, TSKgel Amide-80(内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm))
- ・ 日本ウォーターズ株式会社 東京 SC
(Waters Alliance, 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 彩都研究所
(島津製作所 LC-10A 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
(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
(島津製作所 LC-10A Series, Inertsil 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, Shodex Asahipak NH2P-50 4E(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
(日本分光 LC-2000Plus Series, Finpak SIL NH2-5(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, Inertsil 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本部
(島津製作所 LC-10A Series, Mightysil NH₂(内径 4.6 mm, 長さ 150 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

均質性試験の成績及び繰返し2回×10試料の一元配置による分散分析から得られた統計量を表1に示した。いずれの試料においても、F値がF(9, 10;0.05)を下回ったことから、有意水準5%において試料間に有意な差は認められず⁴⁾、すべての分析試料が共同試験に用いることができる均質性を有していることを確認した。

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^{4, 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、13 試験室の試験成績のうち化成肥料 1 及び 2 で 2 試験室、化成肥料 4 及び 5 で 1 試験室の試験成績が外れ値と判別された。

表1 ジシアンジアミドの均質性確認試験の結果

| 試料名 | 平均定量値 ¹⁾ (%) | 相対標準偏差 ²⁾ (%) | F値 ³⁾ | F値限界 ⁴⁾ |
|-------|----------------------------|-----------------------------|------------------|--------------------|
| 化成肥料1 | 0.279 | 1.0 | 0.84 | 3.02 |
| 化成肥料2 | 2.15 | 1.1 | 0.49 | 3.02 |
| 化成肥料3 | 0.583 | 0.9 | 0.61 | 3.02 |
| 化成肥料4 | 0.447 | 1.7 | 0.24 | 3.02 |
| 化成肥料5 | 1.09 | 1.0 | 0.68 | 3.02 |

1) 10試料2点併行分析の総平均定量値

2) 試料間の相対標準偏差

3) 一元分散分析値により算出された分散比

4) F(9,10:0.05)

表2 ジシアンジアミドの共同試験成績 (%)

| 試験室 ¹⁾ | 化成肥料1 | | 化成肥料2 | | 化成肥料3 | |
|-------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------|-------|
| A | 0.263 | 0.266 | 2.01 | 2.06 | 0.557 | 0.553 |
| B | 0.247 | 0.241 | 1.92 | 1.94 | 0.526 | 0.522 |
| C | 0.240 | 0.245 | 2.04 | 2.06 | 0.527 | 0.548 |
| D | 0.251 ²⁾ | 0.174 ²⁾ | 2.05 | 2.06 | 0.539 | 0.543 |
| E | 0.260 | 0.261 | 2.03 ²⁾ | 2.96 ²⁾ | 0.545 | 0.542 |
| F | 0.261 | 0.285 | 2.09 | 2.15 | 0.602 | 0.590 |
| G | 0.253 | 0.248 | 2.08 | 2.08 | 0.585 | 0.564 |
| H | 0.275 | 0.305 | 2.11 | 1.98 | 0.544 | 0.515 |
| I | 0.184 ³⁾ | 0.182 ³⁾ | 1.96 | 1.94 | 0.495 | 0.481 |
| J | 0.278 | 0.279 | 2.42 ²⁾ | 2.10 ²⁾ | 0.590 | 0.599 |
| K | 0.248 | 0.246 | 2.10 | 2.06 | 0.539 | 0.529 |
| L | 0.245 | 0.249 | 1.98 | 2.01 | 0.523 | 0.527 |
| M | 0.298 | 0.285 | 2.12 | 2.09 | 0.600 | 0.573 |
| 試験室 | 化成肥料4 | | 化成肥料5 | | | |
| A | 0.423 | 0.438 | 1.03 | 1.00 | | |
| B | 0.410 | 0.406 | 0.965 | 0.968 | | |
| C | 0.398 | 0.429 | 0.998 | 1.01 | | |
| D | 0.420 | 0.412 | 0.978 | 0.987 | | |
| E | 0.405 | 0.425 | 0.995 | 0.995 | | |
| F | 0.444 | 0.478 | 1.03 | 1.05 | | |
| G | 0.437 | 0.407 | 1.05 | 1.07 | | |
| H | 0.397 | 0.401 | 1.14 ²⁾ | 1.05 ²⁾ | | |
| I | 0.291 ²⁾ | 0.366 ²⁾ | 0.950 | 0.926 | | |
| J | 0.452 | 0.441 | 1.10 | 1.08 | | |
| K | 0.425 | 0.407 | 1.04 | 1.00 | | |
| L | 0.399 | 0.396 | 1.01 | 0.997 | | |
| M | 0.451 | 0.439 | 1.06 | 1.05 | | |

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

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_r), 相対標準偏差 (RSD_r) 及び HorRat 値 ($HorRat_r$) 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 ($HorRat_R$) を

表3に示した. HorRat_r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, 現在のところ肥料に使用している事例がないが参考に記載した. HorRat_rは $RSD_r/RSD_r(P)$ 及びHorRat_Rは $RSD_R/RSD_R(P)$ により求められる. なお, $RSD_R(P)$ は平均定量値からHorwitz式⁷⁾により求め, $RSD_r(P)$ 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0.263~2.04%であり, そのSD_r及びSD_Rは0.009~0.04%及び0.019~0.07%であり, RSD_r 及び RSD_R は1.4~3.2%及び3.2~7.4%であった. また, HorRat_r及びHorRat_Rは0.69~1.40及び0.89~1.51であり, いずれも2以下であった¹⁰⁾.

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⁾ (%) | HorRat _r ⁵⁾ | SD _R ⁶⁾ (%) | RSD _R ⁷⁾ (%) | HorRat _R ⁸⁾ |
|-------|--------------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 化成肥料1 | 11 | 0.263 | 0.009 | 3.2 | 1.39 | 0.019 | 7.4 | 1.51 |
| 化成肥料2 | 11 | 2.04 | 0.04 | 1.7 | 0.97 | 0.07 | 3.2 | 0.89 |
| 化成肥料3 | 13 | 0.548 | 0.011 | 2.0 | 0.90 | 0.033 | 6.0 | 1.36 |
| 化成肥料4 | 12 | 0.423 | 0.013 | 3.2 | 1.40 | 0.022 | 5.2 | 1.13 |
| 化成肥料5 | 12 | 1.02 | 0.01 | 1.4 | 0.69 | 0.04 | 4.3 | 1.07 |

1) 解析に用いた試験室数

2) 総平均値(n =試験室数×繰返し数(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

13試験室において5銘柄(10点)の硝酸化成抑制材ジシアンジアミド入り化成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の試験法の評価を行った. その結果, 室間再現精度(相対標準偏差)は3.2~7.4%であった. このことから, 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.

既報により単一試験室による妥当性の確認が実施されており, 本試験法は肥料中のジシアンジアミドの測定に用いることができる十分な性能を有する事が確認された. これらのことから, 2010年度肥料等技術検討会の審議を受け, 肥料等試験法に収載された²⁾.

謝 辞

共同試験にご協力頂いたアジレント・テクノロジー株式会社, 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, 全国農業協同組合連合会(JA 全農), 日本ウォーターズ株式会社, 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) 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(2011)

<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>

- 3) 齊木雅一: 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—, 肥料研究報告, 3, 43~50 (2010)
- 4) Horwitz, W.: Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67 (2), 331~343 (1995)
- 5) 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)
- 6) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guideline for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg (2000)
- 7) 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)
- 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)

Determination of Dicyandiamide as a Nitrification Inhibitor in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography: A Collaborative Study

Masakazu SAIKI¹

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 as a nitrification inhibitor in fertilizer. 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 with 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 samples of 5 kinds of compound fertilizers were sent to 13 collaborators. The samples were analyzed as blind duplicates. After removing the outlying data using Cochran and Grubbs outlier test, mean values reported from 0.263 to 2.04 % for each kind of samples. The relative standard deviation (RSD_r) for repeatability ranged from 1.4 to 3.2%. The relative standard deviation (RSD_R) for reproducibility ranged from 3.2 to 7.4 %. These results indicated that this method has an acceptable precision for determination of dicyandiamide as a nitrification inhibitor in fertilizer.

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

(Research Report of Fertilizer, 4, 16~22, 2011)