

5 HPLC を用いた肥料中の DMPP(硝酸化成抑制材)の分析法の性能評価

— 室間共同試験による妥当性確認 —

平田絵理香¹, 橋本良美², 大島舞弓²

キーワード DMPP(3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩), 高速液体クロマトグラフ, 共同試験

1. はじめに

窒素成分として施肥されたアンモニウム塩または土壌中でアンモニウムとなる尿素や有機質肥料は、微生物による硝化作用を受けることで亜硝酸を経て硝酸に酸化される。この硝酸イオンは土壌に吸着されないため、畑地土壌では降雨によって溶脱し、窒素成分が損失することが知られている¹⁾。そこで、微生物による硝化作用を抑えるために、肥料の製造時には硝酸化成抑制材が材料として添加されることがある。なお、硝酸化成抑制材を材料として添加した肥料は、肥料法告示²⁾によって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。

硝酸化成抑制材の 1 つに 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(以下、「DMPP」という。)があり、令和 2 年度に船木³⁾が高速液体クロマトグラフを用いた分析法(以下、「本法」とする。)を開発し、単一試験室での妥当性確認(Single Laboratory Validation:SLV)を行った。その結果、本法の性能が評価され、肥料等試験法⁴⁾に DMPP の分析法として収載されている。今回、国際的に標準と認められる室間共同試験を実施し、妥当性確認(Harmonized Collaborative Validation:HCV)を行い、本法の性能を評価したので、その結果を報告する。

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料の選定及び調製

(1) 共同試験用試料の選定

DMPP を含む肥料の特徴として、一部の肥料において調製後即時又は経時的に DMPP 含有量が著しく減少することが、船木³⁾により報告されている。共同試験期間中に試料中の DMPP 量が減少すると各試験室における分析結果に影響を及ぼすため、DMPP の経時的な変化量が小さい肥料を共同試験用試料として選定する必要があり、まず候補試料中の DMPP 濃度とその経時変化を確認した。候補試料には、肥料生産工場等で製造され流通している DMPP が配合された肥料(以下、「流通肥料」とする。)及び DMPP 非配合肥料に DMPP 試薬を一定量添加して調製した肥料(以下、「調製試料」とする。)を用いた。

流通肥料の特徴は、着色材を含む DMPP を配合した尿素、DMPP の他に固結防止材及び着色材を添加した混合窒素肥料、DMPP を含む尿素を被覆した被覆窒素肥料並びに DMPP、粒状化促進材及び着色材を加えた無機の化成肥料 2 種類である。これらを目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉碎・混合した。流通肥料の DMPP 濃度とその経時変化を確認するため、1 回目の分析を行い、約 2 ヶ月以上経過してから 2 回目の分析を行った。結果は Table 1 のとおりであり、1 回目と 2 回目での分析値の比が 100 %に近かった尿素、混合窒素肥料、化成肥料 1 の 3 種類を共同試験用試料として選定した。

¹ 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 (現)札幌センター

² 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

Table 1 Changes in DMPP concentration over time

Sample	Analytical value of DMPP		Ratio of analytical values ^{b)}	Days elapsed
	1st (%) ^{a)}	2nd (%) ^{a)}		
Urea	0.285	0.275	96	59
Mixed nitrogen fertilizer	0.171	0.172	101	71
Coated nitrogen fertilizer	0.151	0.131	87	56
Compound fertilizer 1	0.0770	0.0764	99	99
Compound fertilizer 2	0.0360	0.0327	91	99

a) Mass fraction

b) Ratio of analytical values = 2nd value/1st value × 100

候補となる調製試料は、有機質を含まない DMPP 非配合の配合肥料及び化成肥料を目開き 500 μm の網ふるいを通すまで粉碎・混合した後に、DMPP 試薬(東京化成工業、試薬純度 98.0 % (質量分率))を添加して作製した。使用した DMPP 非配合の配合肥料及び化成肥料の詳細は、銅の効果発現促進材を含む無機配合肥料、固結防止材及び粒状化促進材を混合し副産系の原料も使用した無機化成肥料 A、尿素や硫酸アンモニア等を原料とした化成肥料 B、アンモニア、りん酸及び硫酸を用いて製造したりん酸アンモニアと同等の化成肥料 C である。調製試料の添加濃度を決定するために、市場に流通している肥料の DMPP 含有量を調査した結果、最も少ないもので 0.034 % (質量分率)、最も多いもので 1.04 % (質量分率) だったことから、DMPP 試薬の添加濃度は 0.02 % (質量分率)、1.0 % (質量分率)、1.5 % (質量分率) とした。DMPP 試薬添加後の安定性を確認するために、作製後 1~2 ヶ月における経時変化の結果を Fig. 1-1, Fig. 1-2 及び Fig. 1-3 で示した。なお、図中の経過日数 0 日は作製時の添加濃度を示している。

DMPP の経時的な変化量が少ない組合せを選び、3 種類の調製試料を共同試験用試料として選定した結果、調製試料の原料として DMPP 0.02 % (質量分率) の作製には配合肥料を、1.0 % (質量分率) の作製には化成肥料 C、1.5 % (質量分率) の作製には化成肥料 A を用いることとした。ただし、一部の組合せでは調製後即時に DMPP 量が減少し、Fig. 1-3 では、化成肥料 A の DMPP 含有量は試薬添加時の 1.5 % (質量分率) から、1 回目の分析では 1.3 % (質量分率) まで減少した。しかし、その後の経時的な減少は見られなかったことから、化成肥料 A を用いて共同試験用試料を作製する際には調製後即時の減少量を考慮して、DMPP の添加濃度を 2.0 % (質量分率) に引き上げることとした。

なお、Fig. 1-3 の化成肥料 C について、7 日目の分析値が 0.9 % (質量分率) まで減少したが、20 日目の分析値で 1.3 % (質量分率) と増加していた。経過日数 20 日以降は 1.3 % (質量分率) で推移していたことから、分析値の増減は作製時の混合が不十分だったことが原因で生じたものと推測した。

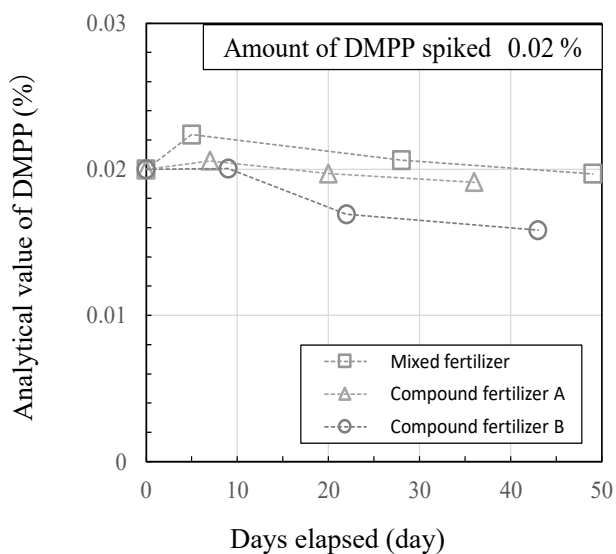


Fig. 1-1 Changes in DMPP concentration over time for prepared fertilizer spiked 0.1 % (mass fraction) (Day 0 is spiked concentration)

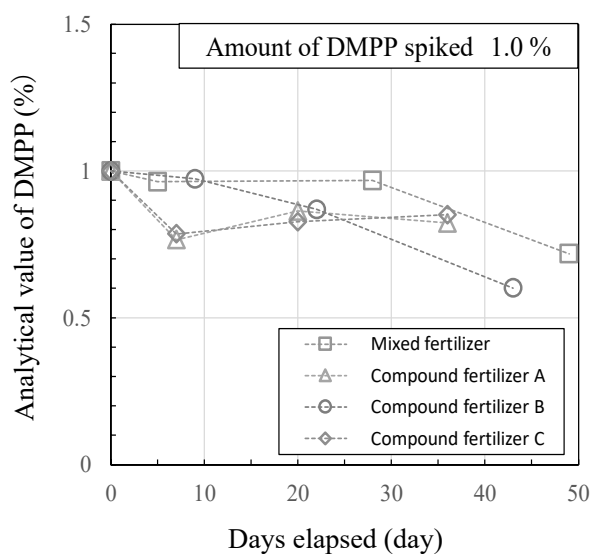


Fig. 1-2 Changes in DMPP concentration over time for prepared fertilizer spiked 1.0 % (mass fraction) (Day 0 is spiked concentration)

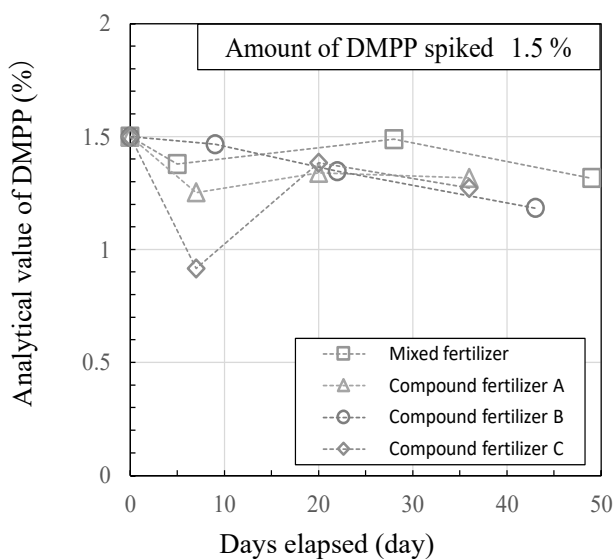


Fig. 1-3 Changes in DMPP concentration over time for prepared fertilizer spiked 1.5 % (mass fraction) (Day 0 is spiked concentration)

(2) 共同試験用試料の調製

(1)で選定した流通肥料3種類(尿素, 混合窒素肥料, 化成肥料1)及び調製試料3種類を用いて, 共同試験用試料とした. 流通肥料は目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉砕し, 均質となるようによく混合した. 調製試料は DMPP 非配合の配合肥料及び化成肥料を約 200 g ずつ用いて DMPP 試薬を試料中 0.02 % (質

量分率), 1.0 % (質量分率), 2.0 % (質量分率)となるように添加し, 目開き 500 μm の網ふるいを通過するまで粉砕した. これら 6 種類の肥料を 1.9 g ずつアルミ袋に充填, 密封し, 各種類 44 個の試料を作製した.

作製した試料 264 個 (44 個 \times 6 種類) に乱数表を用いてランダムに番号を貼付し, 試料を識別した. これらの識別した 6 種類の試料から乱数表を用いてランダムに 10 個ずつ抜き取り, 60 個 (10 個 \times 6 種類) を均質性確認用試料とした. 次に, 6 種類の試料からランダムに 2 個ずつ抽出し, 一試験室に送付する共同試験用試料とし, 参加試験室数に必要な試料を準備した.

均質性確認用試料の均質性が確認された後に, 共同試験用試料を以下の共同試験参加試験室に配付した.

(共同試験参加試験室)

- ・ 一般財団法人日本食品分析センター 多摩研究所
- ・ 一般社団法人日本海事検定協会 理化学分析センター
- ・ コープエンジニアリング株式会社 新潟分析センター
- ・ 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
- ・ 昭和電工株式会社 Shodex サービスセンター
- ・ 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部カスタマーサポートセンター
- ・ 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 肥料検査課
- ・ 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 肥飼料検査課
- ・ 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 肥飼料検査課
- ・ 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 肥料検査課
- ・ 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 肥料検査課
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター 本部 肥飼料安全検査部 肥料鑑定課

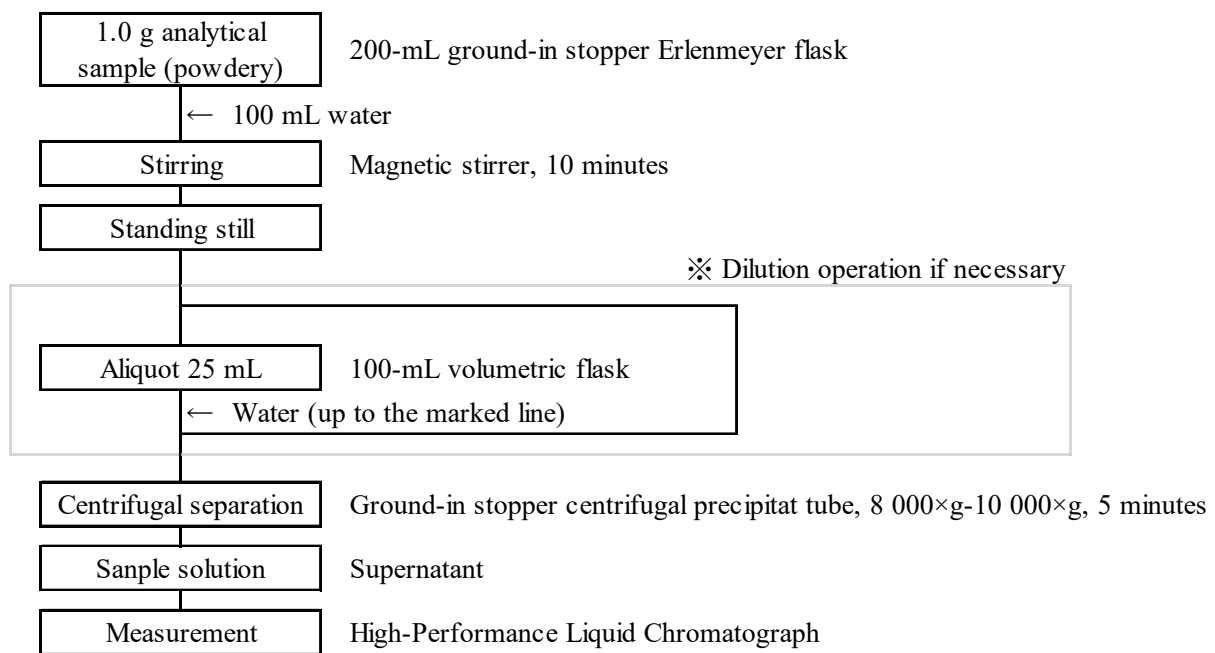
(敬称略, 50 音順)

2) 装置及び器具

各試験室に設置しているスターラー, 高速液体クロマトグラフを使用した. 分析に用いたカラムは各試験室が保有しているものを使用し, 所有していない試験室にはカラムを貸与した.

3) 試験方法

肥料等試験法⁴⁾ 7.7 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩 (DMPP) の 7.7.a 高速液体クロマトグラフ法を用いた. 参考のために, 共同試験で使用した操作のフローシートを Scheme 1 で示す.



Scheme 1 The flow sheet for determination of DMPP used in the test

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^{6), 7)}に従い, 1) で調製した均質性確認用試料 60 個について, 各試料につき 2 点併行で 3) に従って分析した. ただし, 各試料の含有量 1.9 g から 2 回分取するため, 共栓三角フラスコにはかり入れる量は 0.90 g とした.

5) 共同試験

参加した 12 試験室で使用した高速液体クロマトグラフの型式及びメーカー, 分析カラムの詳細は Table 2 のとおりである. 共同試験用試料及び標準液調製用の DMPP 試薬(純度 98 %以上, 東京化成工業株式会社)を各試験室に 2021 年 11 月 12 日から発送し, 実施期間は試料到着日から 2021 年 12 月 24 日まで(一部の試験室は 2022 年 1 月 14 日まで)とした. それぞれの試験室において 1) により配付した合計 12 試料を, 3) の Scheme 1 で示した分析方法に従って分析した.

Table 2 Condition of participating laboratories

Lab No ^{a)}	Model of High-Performance Liquid Chromatograph (HPLC)	HPLC Column		Condition	
		(Inner diameter × length, particle diameter)	Column temperature	Flow rate	Injection volume
A	GL7400 HPLC System, GL Sciences Inc.	InertSustain C18 4.6×150 mm, 5µm, GL Sciences Inc. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
B	Prominence i, Shimadzu Corporation.	Shodex Silica C18M 4D, SHOWA DENKO K.K. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
C	LC-20AD series, Shimadzu Corporation.	Mightysil RP-18 150-4.6 (5 µm), KANTO KAGAKU. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
D	ChromNAV series, JASCO Corporation.	STR ODS-II, Shinwa Chemical Industries Ltd. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
E	DGU-20A3R, LC-20AD, SIL-20AC, CBM-20A, SPD-20A, CTO-20A, Shimadzu Corporation.	TSKgel ODS-80Ts QA, TOSOH Corporation (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
F	e2696*2489 UV/Vis, Waters	Discovery C18, Supelco ^{b)} (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
G	1260 Infinity, Agilent Technologies	Mightysil RP-18 150-4.6 (5 µm), KANTO KAGAKU. ^{b)} (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
H	Prominence, Shimadzu Corporation.	Inertsil Ph, GL Sciences Inc. ^{b)} (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
I	LC-30AD, SIL-30AC, SPD-20A, CTO-20AC, DGU-20A3R, Shimadzu Corporation.	TSKgel ODS-100Z, TOSOH Corporation (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
J	LC-2030, Shimadzu Corporation.	Mightysil RP-18 150-4.6 (5 µm), KANTO KAGAKU. ^{b)} (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
K	LC-20AD series, Shimadzu Corporation.	Mightysil RP-18GP 150-4.6 (5 µm), KANTO KAGAKU. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL
L	e2625, Waters	Mightysil RP-18 150-4.6 (5 µm), KANTO KAGAKU. (4.6 mm×150 mm×5 µm)	40°C	0.7 mL/min	10 µL

a) Laboratory identification (random order)

b) Loaned by FAMIC, the organizer of the test

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性確認用試料 60 個を 2 点併行で分析した総平均値 (\bar{x}), 一元配置分散分析の統計量から算出した併行標準偏差 (s_r), 試料間標準偏差 (s_{bb}), 併行精度を含む試料間標準偏差 (s_{b+r}) を Table 3 に示した. さらに, 肥料等試験法に示されている室間再現精度の目安 ($CRSD_R$) 及び (式 1) から算出した推定室間再現標準偏差 ($\hat{\sigma}_R$) を併せて Table 3 に示した.

均質性の判定は, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル^{6),7)} の手順を参考に実施した. まず, 分析結果の等分散性を確認するために Cochran の検定を実施した. その結果, 6 種類全ての試料において等分散性が確認できたので, 一元配置分散分析を実施した. (式 2) を用いて併行精度を確認したところ, 化成肥料 1 が (式 2) を満たさなかったため, 全ての試料に対して, IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル (1993) で示されている十分に均質の判定式 (式 3) を用いて均質性の判定を行った. その結果, 調製試料 2 を除く 5 種類の試料で判定式 (式 3) を満たしていた. 調製試料 2 の併行精度を確認すると, Table 4 のとおり, (式 2) で示す併行精度の評価を満たしており, 併行精度が十分に小さかった. そのため, 調製試料 2 は IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル (2006) で示されている十分に均質の条件を緩和した判定式 (式 4) を用いて均質性を判定した. その結果, 調製試料 2 は緩和の判定式 (式 4) を満たす結果となった.

十分に均質の判定式 (式 3) は併行標準偏差が小さい場合に, 判定条件が厳しすぎることもある⁸⁾. 調製試料 2 が (式 3) を満たさなかった理由として, 併行標準偏差が小さかったこと, 調製時の混合が不十分だったことが原因であると推測した.

以上より, 6 種類全ての試料が共同試験用試料として妥当な均質性を有することを確認した. なお, 参考として, (式 5) によって併行精度を含む試料間標準偏差 (s_{b+r}) を算出したところ, Table 3 のとおり, 全ての試料が $\hat{\sigma}_R$ と比較して十分に小さい値であった.

$$\hat{\sigma}_R = CRSD_R \times \bar{x} / 100 \quad \dots (式 1)$$

$$s_r < 0.5\sigma_p = 0.5\hat{\sigma}_R \quad \dots (式 2)$$

$$s_{bb} < 0.3\sigma_p = 0.3\hat{\sigma}_R \quad \dots (式 3)$$

$$s_{bb}^2 \leq F1(0.3\sigma_p)^2 + F2s_r^2 \quad \dots (式 4)$$

$$s_{b+r} = \sqrt{s_r^2 + s_{bb}^2} \quad \dots (式 5)$$

$\hat{\sigma}_R$: 推定室間再現標準偏差

$CRSD_R$: 肥料等試験法に示されている室間再現精度 (室間再現相対標準偏差 (%)) の目安

\bar{x} : 総平均値

s_{bb} : 試料間標準偏差

σ_p : 妥当性確認を行う目的に適合した標準偏差

s_r : 併行標準偏差

s_{b+r} : 併行精度を含む試料間標準偏差

$F1, F2$: 均質性判定のためのパラメータ (試料数 10, 2 点併行の場合, $F1=1.88, F2=1.01$)

Table 3 Homogeneity test results

Sample	No. of Sample	\bar{x} ^{a)} (%) ^{b)}	$CRSD_R$ ^{c)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{d)} (%) ^{b)}	s_{bb} ^{e)} (%) ^{b)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{f)} (%) ^{b)}	s_r ^{g)} (%) ^{b)}	$0.5\hat{\sigma}_R$ ^{h)} (%) ^{b)}	s_{b+r} ⁱ⁾ (%) ^{b)}
Prepared sample 1	10	1.66	8	0.133	0.031	0.040	0.065	0.066	0.072
Prepared sample 2	10	0.333	8	0.027	0.011	0.008	0.011	0.013	0.016
Urea	10	0.285	8	0.023	0 ^{j)}	0.007	0.002	0.011	0.002
Mixed nitrogen fertilizer	10	0.131	8	0.011	0.0027	0.0032	0.001	0.005	0.003
Compound fertilizer 1	10	0.0796	8	0.006	0 ^{j)}	0.0019	0.0038	0.0032	0.0038
Prepared sample 3	10	0.0187	8	0.0015	0.00042	0.00045	0.00070	0.00075	0.0008

a) Grand mean value ($n = 10 \times$ number of repetition(2))

b) Mass fraction

c) Criteria of precision for Reproducibility relative standard in Testing Methods for Fertilizers 2021

d) The estimated standard deviation of reproducibility calculated based on $CRSD_R$

e) Standard deviation of sample-to-sample

f) The value for the test : $s_{bb} < 0.3\sigma_p = 0.3\hat{\sigma}_R$

g) Repeatability standard deviation

h) Parameters for the determination of repeatability standard deviation (s_r)

i) Standard deviation of sample-to-sample including repeatability : $s_{b+r} = \sqrt{s_r^2 + s_{bb}^2}$

j) When the variance between groups < the variance within a group, s_{bb}^2 was considered as 0

Table 4 Homogeneity test result of Prepared sample 2

Sample	No. of sample	\bar{x} ^{a)} (%) ^{b)}	$CRSD_R$ ^{c)} (%)	$\hat{\sigma}_R$ ^{d)} (%) ^{b)}	s_r ^{e)} (%) ^{b)}	$0.5\hat{\sigma}_R$ ^{f)} (%) ^{b)}	s_{bb} ^{g)} (%) ^{b)}	$0.3\hat{\sigma}_R$ ^{h)} (%) ^{b)}	s_{bb}^2 ^{g)}	critical value ⁱ⁾
Prepared sample 2	10	0.33	8	0.03	0.011	0.013	0.011	0.008	0.0001	0.0002

a) ~d) Refer to the footnote Table 3

e) Repeatability standard deviation

f) Parameters for the determination of repeatability standard deviation (s_r)

g) Standard deviation of sample-to-sample

h) Parameters for the determination of homogeneity (determination of s_{bb})

i) The value for the test : $F1(0.3\hat{\sigma}_R)^2 + F2s_r^2$

$F1=1.88, F2=1.01$ (The number of samples (10), The number of repetition (2))

2) 共同試験結果及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験結果を Table 5 に示した。試験室 F の結果は、検量線用 DMPP 標準液を用事調製しなかったことにより検量線に不備があると考えられたため、以降の統計解析には用いないこととした。

試験室 F を外した 11 試験室の結果を IUPAC の共同試験プロトコル^{9, 10)}に従って統計解析した。まず、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。結果、11 試験室のうち、調製試料 2 で 2 試験室、尿素で 1 試験室、化成肥料 1 で 2 試験室、調製試料 3 で 1 試験室の報告値が外れ値として判定された。

Table 5 Individual results of DMPP (% Mass fraction)

Lab ID ^{a)}	Prepared sample 1		Prepared sample 2		Urea	
	A	1.67	1.72	0.300	0.279	0.293
B	1.62	1.57	0.0867 ^{c)}	0.243 ^{c)}	0.273	0.256
C	1.60	1.61	0.250	0.233	0.278	0.278
D	1.60	1.63	0.270	0.283	0.276	0.276
E	1.64	1.68	0.283	0.284	0.291	0.282
F ^{b)}	2.71	2.17	0.392	0.417	0.411	0.403
G	1.60	1.53	0.205 ^{d)}	0.178 ^{d)}	0.357 ^{c)}	0.254 ^{c)}
H	1.65	1.68	0.281	0.301	0.279	0.291
I	1.64	1.63	0.281	0.274	0.287	0.285
J	1.57	1.63	0.280	0.257	0.286	0.284
K	1.65	1.70	0.288	0.279	0.288	0.288
L	1.65	1.65	0.284	0.281	0.283	0.288

Lab ID ^{a)}	Mixed nitrogen fertilizer		Compound fertilizer 1		Prepared sample 3	
	A	0.137	0.135	0.0825	0.0767	0.0199
B	0.138	0.130	0.0948	0.0968	0.0176	0.0183
C	0.126	0.122	0.300 ^{e)}	0.297 ^{e)}	0.0180	0.0182
D	0.127	0.127	0.0961	0.0882	0.0172	0.0178
E	0.131	0.129	0.0784	0.0786	0.0161	0.0173
F ^{b)}	0.236	0.265	0.206	0.205	0.0454	0.0393
G	0.123	0.133	0.0796	0.0716	0.0167	0.0198
H	0.129	0.128	0.304 ^{e)}	0.307 ^{e)}	0.0274 ^{c)}	0.0181 ^{c)}
I	0.131	0.130	0.0780	0.0822	0.0189	0.0181
J	0.131	0.133	0.0834	0.0836	0.0181	0.0191
K	0.128	0.133	0.0798	0.0823	0.0184	0.0184
L	0.127	0.138	0.0753	0.0777	0.0184	0.0204

a) Laboratory identification (random order)

b) Not Adopted the result for flaw of analytical procedure

c) Outlier of Cochran test

d) Outlier of Single Grubbs test

e) Outlier of Paired Grubbs test

3) 併行精度及び室間再現精度

外れ値を除外した試験結果より算出した平均値, 併行標準偏差(s_r)及び併行相対標準偏差(RSD_r), 並びに室間再現標準偏差(s_R)及び室間再現相対標準偏差(RSD_R)を Table 6 に示した.

6 種類の試料について統計解析をした結果, 本法による DMPP の平均値は 0.0184 % (質量分率) ~ 1.63 % (質量分率) であり, その併行標準偏差(s_r)は 0.001 % (質量分率) ~ 0.030 % (質量分率), 併行相対標準偏差(RSD_r)は 1.8 % ~ 5.1 % であった. また, 室間再現標準偏差(s_R)は 0.001 % (質量分率) ~ 0.045 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差(RSD_R)は 2.8 % ~ 8.9 % であった. いずれの併行相対標準偏差(RSD_r)及び室間再現相対標準偏差(RSD_R)も, 肥料等試験法 附属書 A の妥当性確認の手順で示されている各濃度レベルにおける精度の目安とする値を満たしていたことから, 本法の精度は肥料等試験法の性能規準に適合していることを確認した.

Table 6 Statistical analysis of Collaborative study results

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$2*CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$2*CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Prepared sample 1	11 (0)	1.63	0.030	1.8	8	0.045	2.8	16
Prepared sample 2	9 (2)	0.277	0.010	3.8	8	0.017	6.0	16
Urea	10 (1)	0.283	0.005	1.9	8	0.009	3.1	16
Mixed nitrogen fertilizer	11 (0)	0.130	0.004	3.0	8	0.004	3.3	16
Compound fertilizer 1	9 (2)	0.0825	0.003	4.0	8	0.007	8.9	16
Prepared sample 3	10 (1)	0.0184	0.001	5.1	8	0.001	6.3	16

a) Number of laboratories, where p =number of laboratories retained after outlier removed and (q) =number of outliers

b) Grand mean value of the results of duplicate sample which were reported from laboratory retained after outlier
 $(n=$ The number of laboratories(p) \times The number of repetition(2))

c) Mass fraction

d) Standard deviation of repeatability

e) Repeatability relative standard deviation

f) Tolerance limits of repeatability relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2021

g) Standard deviation of reproducibility

h) Reproducibility relative standard deviation

i) Tolerance limits of reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizer 2021

4. まとめ

肥料等試験法に収載された 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩の分析法(以下,「本法」とする.)について, 国際的に標準とされる室間共同試験による妥当性確認(Harmonized Collaborative Validation:HCV)の方法で性能を評価するために, 12 試験室で 6 種類(12 点)の試料を用いた共同試験を実施した.

検量線に不備のあった 1 試験室を除外し, 11 試験室の報告値から室間再現性の評価を行った結果, 平均値 0.0184 % (質量分率) ~ 1.63 % (質量分率) の範囲において, 室間再現相対標準偏差(RSD_R)は 2.8 % ~ 8.9 % であり, 肥料等試験法の附属書 A に示されている各濃度レベルにおける精度の目安とする値を満たした.

今回検討した試験法は, すでに単一試験室による妥当性確認(Single Laboratory Validation:SLV)がなされていることから, 本法は肥料等試験法における試験法分類 Type B(HCV 及び SLV)の結果が肥料等試験法 附

属書 A の要求事項を満たした試験法)に適合していることを確認した。

謝 辞

共同試験にご協力いただきました、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般社団法人日本海事検定協会理化学分析センター、コープエンジニアリング株式会社新潟分析センター、ジュ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、昭和電工株式会社 Shodex サービスセンター、東ソー株式会社バイオサイエンス事業部カスタマーサポートセンターの各位に謝意を表します。

文 献

- 1) 但野利秋, 尾和尚人, 木村真人, 越野正義, 三枝正彦, 長谷川功, 吉羽雅昭: 肥料の事典, 株式会社朝倉書店 (2006)
- 2) 農林水産省告示: 肥料の品質の確保等に関する法律施行規則第十一条の二第一項, 第二項, 第三項及び第四項の規定に基づき普通肥料の原料の種類等の保証票への記載に関する事項を定める件, 昭和 59 年 3 月 16 日, 農林水産省告示第 700 号, 最終改正令和 3 年 6 月 14 日, 農林水産省告示第 1009 号 (2021)
- 3) 船木紀夫: HPLC を用いた肥料中の DMPP (硝酸化成抑制材) の分析法の開発, 肥料研究報告, **14**, 39~52 (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 (2021)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2021.pdf>
- 5) 船木紀夫: 肥料中の DMPP (硝酸化成抑制材) の安定性についての検証, 肥料研究報告, **14**, 210~220 (2021)
- 6) Thompson, Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **65** (9), 2123~2144 (1993)
- 7) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78** (1), 145~196 (2006)
- 8) 安井明美, 五十君静信, 後藤哲久, 丹野憲二, 湯川剛一郎: 最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック, 株式会社サイエンスフォーラム (2010)
- 9) Horwitz, W., : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331~343 (1995)
- 10) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

Performance Evaluation of Analysis method for 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in Fertilizers using HPLC : Harmonized Collaborative Validation

HIRATA Erika¹, HASHIMOTO Yoshimi² and OSHIMA Mayu²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) FAMIC, Sapporo Regional Center

² FAMIC, Fertilizer and Feed Inspection Department

The performance of the determination of 3,4-dimethyl-1H-pyrazole phosphoric acid (DMPP) in fertilizer using high-performance liquid chromatography (HPLC) as described in the Fertilizer Test Method has confirmed in a single laboratory. To evaluate the performance of the DMPP analytical method using HPLC, we conducted a collaborative study based on an internationally harmonized protocol. Six samples with confirmed homogeneity were sent to 12 collaborators. Those samples were analyzed in blind and duplicate. We estimated the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) from analytical values reported by the 11 collaborators, excluding one failed laboratory. After identification of outliers with Cochran test and Grubbs test, the mean value of DMPP was reported 0.0184 % -1.63 % for the mass fraction. Similarly, the RSD_R for the determination of DMPP was estimated 2.8 %-5.1 %. These results suggest that the accuracy of this method is suitable for the determination of DMPP in those concentration range. In conclusion, it demonstrated that the method for determination of DMPP was validated.

Key words DMPP, high-performance liquid chromatography (HPLC), harmonized collaborative validation

(Research Report of Fertilizer, **15**, 54-65, 2022)