

6-2 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素,

ビウレット性窒素等の測定

—共同試験成績—

船木紀夫¹, 木村康晴¹

キーワード 高速液体クロマトグラフィー, 尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素, グアニル尿素性窒素

1. はじめに

ビウレットは尿素肥料を高温下における粒状化工程等で生成されるが¹⁾, 葉面散布時に植害が生じる恐れがあるため²⁾, 肥料取締法の公定規格³⁾において, ビウレット性窒素として含有を許される最大量が規定されている。また, 尿素性窒素, ジシアンジアミド性窒素, 及びグアニジン性窒素についても, 肥料取締法の公定規格³⁾において, 含有量を許される最大量が規定されている。

肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素, グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素(以下「ビウレット性窒素等」という。)の分析法として, 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法が恵智らによって検討され, 真度, 併行精度, 定量下限等の検討を行った結果, 単一試験室内における試験方法の妥当性が確認された⁴⁾。

今回, HPLC 法による肥料中のビウレット性窒素等の測定の性能評価のため, 共通試料を用いて, 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

ビウレット性窒素等を含まないことを確認した化成肥料を目開き 500 μm のふるいを通すまで粉砕したものに, 尿素、ビウレット、ジシアンジアミド、グアニジン及びグアニル尿素的の各試薬を 4 通りの比率で混合, 55 $^{\circ}\text{C}$ 通風乾燥及び粉砕することで, ビウレット性窒素等を含む 4 種類の化成肥料試料を調製した。別途, 尿素及びビウレット, グアニジン及びグアニル尿素的をそれぞれ乳鉢で混合することで, 尿素肥料試料及びグアニル尿素肥料試料を調製した。これらの共同試験用試料を約 1.3 g ずつアルミラミネート袋に密封して, それぞれ 75 個を調製した。ブラインド試料を提供するため, 共同試験用試料に乱数を付し, 参加試験室に配付した。

2) 装置及び器具

各試験室に設置している高速液体クロマトグラフ, 遠心分離機及び高速遠心分離機を使用した。

3) ビウレット性窒素等の測定

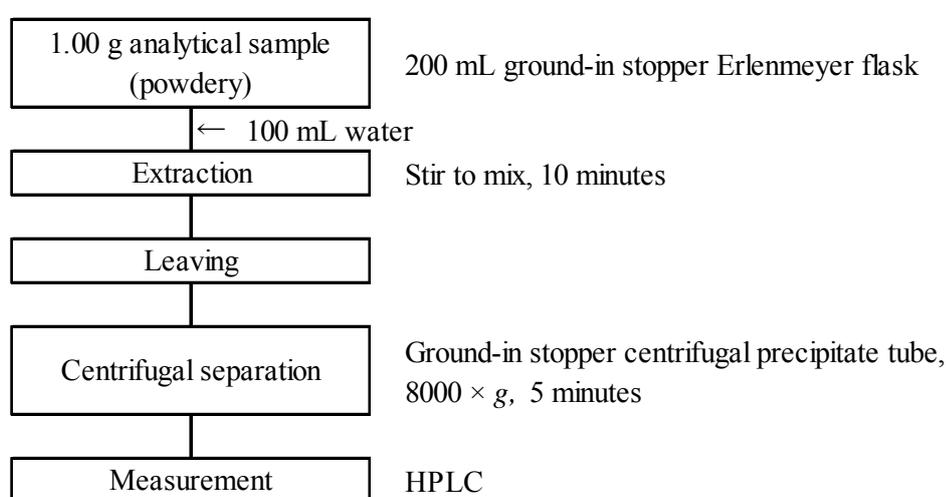
¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

(1) 抽出

分析試料 1.00 g をはかりとり, 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約 10 分間かき混ぜ, 抽出液とした。

(2) 測定

各抽出液を 1.5 mL の共栓遠心沈殿管にとり, 8000×g で約 5 分間遠心分離した上澄み液または, 親水性 PTFE メンブレンフィルターを用いてろ過した溶液を HPLC 測定用試料溶液とした (Scheme 1)。その試料溶液を高速液体クロマトグラフに供し, Table 1 の測定条件で測定し, ピーク高さから試料溶液中のビウレット性窒素等の量を求め, 分析試料中の濃度を算出した。測定に当たっては, 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。



Scheme 1 Flow sheet for urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen and guanyl urea nitrogen in fertilizers

Table 1 HPLC Conditions

HPLC	Waters 2695 Separation module
Detector system	2996 photo diode array detector
Wavelength	190 nm
Column	(1) Asahipak ES-502C 7C (100 mm L×7.5 mm I.D. 9 μm particle size) (2) HAMILTON PRP-X200 (150 mm L×4.1 mm I.D. 10 μm particle size)
Column temperature	40 °C
Mobile phase	Phosphate buffer (KH ₂ PO ₄ 28.81 mmol/L, H ₃ PO ₄ 1.19 mmol/L)
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	10 μL
Measurement time	20 min

4) 共同試験用試料の均質性試験

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 20 試料を抜き取り, 2 試料ずつを混合したもの (10 試料) を, それぞれ 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 12 試験室と使用した高速液体クロマトグラフ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 12 試料について、3)に従って分析した。

- ・ エムシー・ファーティコム株式会社いわき工場(日本分光 UV-2075, PU-2080, CO-2060)
 - ・ エムシー・ファーティコム株式会社つくば開発センター(島津製作所 LC-10AD VP, SPD-10A, CTO-10A VP)
 - ・ 株式会社島津製作所(島津製作所 Prominence)
 - ・ 昭和電工株式会社(島津製作所 Prominence-i)
 - ・ 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所(島津製作所 LD-20AD, SPD-20AD)
 - ・ 公益財団法人日本肥糧検定協会(島津製作所 LC-20AD, SPD-20A, CTO-20A)
 - ・ 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(Waters 2695 Series)
 - ・ 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-10AD VP, SPD-10AV VP, CTO-10A VP)
 - ・ 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(日本分光 ChromNAV Series)
 - ・ 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(Waters 1515 Isocratic HPLC Pump, 2487 Duel λ)
 - ・ 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 technologies 1100 Series)
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部(Waters e2695 Series)
- (50 音順)

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性試験の試験成績について、Cochran 検定による外れ値を除外し、一元配置分散分析から得られた統計量を Table 2 に示した。いずれの試料においても、併行相対標準偏差(RSD_r)及び併行精度を含む試料間相対標準偏差(RSD_{b+r})は肥料等試験法⁶⁾の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度(併行相対標準偏差及び中間相対標準偏差)の目安の 1.5 倍以内であり、 F 値が F 限界値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なかった⁵⁾。これらのことから、各試料は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。

Table 2-1 Homogeneity test results of urea nitrogen

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%)	s_{b+r} ^{g)} (%) ³⁾	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j,k)}
Compound fertilizer 1	10(0)	0.320	0.003	0.9	0	0.003	0.9	4	0.89
Compound fertilizer 2	9(1)	0.614	0.017	2.8	0.010	0.020	3.2	4	1.63
Compound fertilizer 3	10(0)	3.37	0.02	0.7	0	0.02	0.7	4	0.62
Compound fertilizer 4	10(0)	6.48	0.06	1.0	0.06	0.09	1.4	4	2.65
Urea fertilizer	10(0)	48.6	0.8	1.7	0	0.8	1.7	4	0.50

a) The Number of samples used for analysis; (): The number of outliers

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

e) Mass fraction

d) Standard deviation of repeatability

e) Relative standard deviation of repeatability

f) Standard deviation of sample-to-sample

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

h) Relative standard deviation of sample-to-sample include repeatability

i) The aim of Relative standard deviation of repeatability for Testing Methods For Fertilizers F value calculated based on analysis of variance (ANOVA)

j) F value calculated based on analysis of variance (ANOVA)

k) F critical value: $F(9,10;0.05)=3.02$

F critical value: $F(8,9;0.05)=3.23$

Table 2-2 Homogeneity test results of biuret nitrogen

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%)	s_{b+r} ^{g)} (%) ³⁾	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j,k)}
Compound fertilizer 1	10(0)	0.00959	0.00023	2.4	0	0.00023	2.4	6	0.52
Compound fertilizer 2	9(1)	0.0198	0.0006	2.9	0.0003	0.0007	3.4	4	1.73
Compound fertilizer 3	9(1)	0.102	0.005	4.9	0.003	0.006	6.0	4	1.95
Compound fertilizer 4	10(0)	0.207	0.010	5.1	0	0.010	5.1	4	0.80
Urea fertilizer	9(1)	0.853	0.028	3.3	0.023	0.036	4.2	4	2.33

a) ~ k) Refer to the footnote of Table 2-1

Table 2-3 Homogeneity test results of dicyandiamide nitrogen

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%)	s_{b+r} ^{g)} (%) ³⁾	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j,k)}
Compound fertilizer 1	10(0)	0.00959	0.00023	2.4	0	0.00023	2.4	6	0.52
Compound fertilizer 2	9(1)	0.0198	0.0006	2.9	0.0003	0.0007	3.4	4	1.73
Compound fertilizer 3	9(1)	0.102	0.005	4.9	0.003	0.006	6.0	4	1.95
Compound fertilizer 4	10(0)	0.207	0.010	5.1	0	0.010	5.1	4	0.80
Urea fertilizer	9(1)	0.853	0.028	3.3	0.023	0.036	4.2	4	2.33

a) ~ k) Refer to the footnote of Table 2-1

Table 2-4 Homogeneity test results of guanidine nitrogen

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%)	s_{b+r} ^{g)} (%) ³⁾	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j)k)}
Compound fertilizer 1	10(0)	4.98	0.04	0.9	0.02	0.05	1.0	4	1.61
Compound fertilizer 2	10(0)	3.76	0.22	5.8	0.06	0.23	6.0	4	1.13
Compound fertilizer 3	10(0)	3.08	0.06	2.0	0.02	0.06	2.1	4	1.20
Compound fertilizer 4	10(0)	2.06	0.01	0.7	0	0.01	0.7	4	2.03
Guanyl urea fertilizer	10(0)	5.12	0.13	2.6	0.13	0.19	3.7	4	2.90

a) ~ k) Refer to the footnote of Table 2-1

Table 2-5 Homogeneity test results of guanyl urea nitrogen

Sample	No. of sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%)	s_{b+r} ^{g)} (%) ³⁾	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j)k)}
Compound fertilizer 1	10(0)	2.13	0.02	0.9	0.01	0.02	1.0	4	1.59
Compound fertilizer 2	9(1)	3.97	0.16	4.0	0.09	0.18	4.6	4	1.65
Compound fertilizer 3	10(0)	5.82	0.06	1.1	0.04	0.07	1.2	4	1.66
Compound fertilizer 4	10(0)	7.56	0.06	0.8	0	0.06	0.8	4	0.83
Guanyl urea fertilizer	10(0)	32.0	0.7	2.2	0.2	0.7	2.3	4	1.15

a) ~ k) Refer to the footnote of Table 2-1

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 Table 3 に示した。各系列の分析試料の結果を IUPAC の共同試験プロトコル^{7, 8)}に従って統計処理した。最初に、不検出と報告された試験成績を除外してから、残りの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。その結果、12 試験室の試験成績のうち、尿素性窒素については 5 種類の試料のうち、1 種類の試料で 4 試験室及び 4 種類の試料で各 2 試験室の報告値が、ビウレット性窒素については 5 種類の試料のうち、1 種類の試料で 3 試験室、1 種類の試料で 2 試験室及び 1 種類の試料で 1 試験室の報告値が、ジシアンジアミド性窒素については 4 種類の試料のうち、2 種類の試料で 2 試験室の報告値が、グアニジン性窒素については 5 種類の試料のうち、3 種類の試料で 1 試験室の報告値が、グアニル尿素性窒素については 5 種類の試料のうち、2 種類の試料で 2 試験室の報告値が、それぞれ不検出による除外値または外れ値となった。

Table 3-1 Individual result of urea nitrogen

Lab ID ^{a)}	(% (mass fraction))					
	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	N.D. ^{d)}	0.251 ^{d)}	0.606	0.583	3.18	3.22
B	0.290	0.299	0.591	0.589	3.05	3.07
C	0.296	0.295	0.589	0.592	2.99	3.00
D	0.303	0.301	0.557	0.620	3.10	3.06
E	0.129 ^{b)}	0.0369 ^{b)}	0.251 ^{c)}	0.353 ^{c)}	3.11	3.09
F	0.308	0.311	0.610	0.611	3.05	3.09
G	0.295	0.296	0.590	0.588	3.03	3.00
H	0.315 ^{b)}	0.0683 ^{b)}	0.611	0.619	3.11	3.07
I	0.307	0.276	0.541	0.534	2.81 ^{c)}	2.80 ^{c)}
J	0.291	0.263	0.638 ^{b)}	0.495 ^{b)}	2.51 ^{c)}	2.57 ^{c)}
K	N.D. ^{d)}	0.298 ^{d)}	0.575	0.575	3.08	2.98
L	0.298	0.300	0.596	0.598	3.07	3.15
Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 4		Urea fertilizer			
A	6.43	6.37	47.5	46.0		
B	5.61	5.90	46.0	46.1		
C	6.07	6.00	45.0	45.0		
D	5.84	6.12	46.7	45.5		
E	5.52 ^{b)}	4.68 ^{b)}	46.8	46.8		
F	6.02	6.21	44.2	46.1		
G	6.03	6.02	45.4	45.6		
H	6.21	6.29	48.5	48.5		
I	5.83	5.83	48.1	49.0		
J	4.84 ^{c)}	4.37 ^{c)}	47.5 ^{b)}	34.1 ^{b)}		
K	5.93	6.02	40.7 ^{b)}	49.6 ^{b)}		
L	5.91	5.91	46.2	46.4		

a) Laboratory identification

b) Outlier of Cochran test

c) Outlier of Grubbs test

d) Outlier of No detection

Table 3-2 Individual result of biuret nitrogen

Lab ID ^{a)}	(% (mass fraction))					
	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	0.217 ^{b)}	0.00689 ^{b)}	0.0189	0.0190	0.115	0.0944
B	0.00931	0.00979	0.0202	0.0201	0.104	0.109
C	0.00961	0.00973	0.0201	0.0205	0.0916	0.0979
D	0.00915	0.00952	0.0202	0.0203	0.114	0.125
E	0.00976	0.00980	0.0200	0.0203	0.109	0.108
F	0.00923	0.00933	0.0190	0.0190	0.118	0.157
G	0.00960	0.0100	0.0202	0.0202	0.120	0.122
H	0.00978	0.00991	0.0203	0.0216	0.107	0.109
I	0.0178 ^{b)}	0.0187 ^{b)}	0.0592 ^{b)}	0.0336 ^{b)}	0.137	0.144
J	0.0102	0.00918	0.0192 ^{b)}	0.0163 ^{b)}	0.0767	0.110
K	0.0216 ^{d)}	N.D. ^{d)}	0.0206	0.0206	0.117	0.114
L	0.00981	0.00970	0.0204	0.0204	0.101	0.132
Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 4		Urea fertilizer			
A	0.233	0.192	0.765	0.802		
B	0.167	0.201	0.832	0.846		
C	0.180	0.192	0.879	0.896		
D	0.347 ^{b)}	0.215 ^{b)}	0.910	0.949		
E	0.219	0.218	0.805	0.794		
F	0.245	0.199	0.863	0.918		
G	0.216	0.222	0.897	0.962		
H	0.208	0.204	0.899	0.842		
I	0.143	0.222	0.392	0.402		
J	0.146	0.170	0.748	0.536		
K	0.208	0.199	0.956	0.841		
L	0.222	0.223	0.516	0.614		

a)~d) Refer to the footnote of Table 3-1

Table 3-3 Individual result of dicyandiamide nitrogen

Lab ID ^{a)}	(% (mass fraction))					
	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	0.0315	0.0296	0.224	0.217	1.83	1.82
B	0.0342	0.0386	0.177	0.184	1.56	1.59
C	0.0379	0.0393	0.186	0.180	1.63	1.61
D	0.0489	0.0498	0.221	0.220	1.72	1.74
E	0.0266	0.0262	0.142	0.165	1.53	1.50
F	0.0580	0.0560	0.227	0.231	1.77	1.77
G	0.0332	0.0372	0.182	0.180	1.69	1.63
H	0.0641	0.0649	0.241	0.255	1.80	1.79
I	0.0302 ^{b)}	0.0148 ^{b)}	0.190	0.167	1.57	1.71
J	0.0662	0.0587	0.221	0.186	1.55	1.55
K	0.0203 ^{b)}	0.0590 ^{b)}	0.227	0.232	1.75	1.72
L	0.0650	0.0629	0.246	0.246	1.94	1.78
Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 4					
A	2.93	2.99				
B	2.25 ^{b)}	2.76 ^{b)}				
C	2.68	2.72				
D	2.68	2.77				
E	2.59	2.64				
F	2.73	2.72				
G	2.56	2.68				
H	2.81	2.76				
I	2.68	2.84				
J	2.32 ^{c)}	2.07 ^{c)}				
K	2.93	2.77				
L	2.95	2.82				

a)~d) Refer to the footnote of Table 3-1

Table 3-4 Individual result of guanidine nitrogen

Lab ID ^{a)}	(% (mass fraction))					
	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	5.24	5.25	4.09	4.00	3.31	3.29
B	4.72	4.86	3.96	3.94	3.05	2.99
C	4.87	4.86	3.90	3.95	2.95	2.97
D	5.65	5.16	4.17	4.35	3.14	3.27
E	4.91	4.76	3.88	3.82	2.94	2.97
F	4.98	5.02	4.01	3.99	2.97	3.05
G	4.84	4.85	3.90	3.92	3.04	3.03
H	4.95	4.99	3.94	3.94	3.04	2.96
I	5.28	4.83	3.92	3.92	3.11	3.07
J	4.15	4.68	3.63	3.14	2.45 ^{c)}	2.47 ^{c)}
K	4.67	4.66	3.66	3.76	3.12	2.95
L	4.85	4.92	4.05	4.64	3.09	2.95
Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 4		Guanyl urea fertilizer			
A	2.18	2.16	5.45	5.03		
B	1.81	2.00	5.16	4.86		
C	2.02	2.02	5.11	5.21		
D	2.20	2.15	5.22	5.15		
E	1.99	1.98	4.83	5.05		
F	2.06	2.08	5.47	5.11		
G	2.01	2.02	5.40	4.82		
H	2.02	2.04	5.05	4.96		
I	2.05	1.98	5.27	5.21		
J	1.62 ^{c)}	1.41 ^{c)}	4.32 ^{c)}	4.52 ^{c)}		
K	2.08	1.99	5.19	4.89		
L	2.03	2.12	5.06	5.28		

a)~d) Refer to the footnote of Table 3-1

Table 3-5 Individual result of guanyl urea nitrogen

Lab ID ^{a)}	(% (mass fraction))					
	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	2.56	2.35	4.46	4.39	6.36	6.19
B	1.97	2.21	4.37	4.21	5.96	5.92
C	2.17	2.18	4.30	4.34	5.68	5.77
D	2.48	2.45	4.68	4.88	6.75	6.59
E	2.23	2.20	4.41	4.45	6.14	6.02
F	2.20	2.26	4.53	4.48	5.13 ^{b)}	5.93 ^{b)}
G	2.19	2.20	4.31	4.32	5.94	5.90
H	2.14	2.15	4.30	4.26	5.71	5.78
I	2.41	2.21	4.42	4.41	6.14	6.08
J	1.82	2.06	3.95 ^{b)}	3.43 ^{b)}	4.64	4.74
K	2.01	2.02	3.97	4.08	5.73	5.55
L	2.17	2.20	4.34	4.41	5.28	5.44
Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 4		Guanyl urea fertilizer			
A	8.13	8.15	32.4	32.3		
B	6.11	7.61	30.8	31.3		
C	7.57	7.43	30.0	29.8		
D	8.61	8.49	29.3	28.7		
E	7.75	7.75	30.3	30.1		
F	6.37	7.59	29.8	29.4		
G	7.67	7.61	30.3	30.6		
H	7.64	7.61	30.2	29.4		
I	7.84	7.77	31.3	30.1		
J	6.04	5.29	29.4	28.4		
K	7.45	7.37	30.4	29.6		
L	7.24	7.31	31.8	31.7		

a)~d) Refer to the footnote of Table 3-1

3) 併行精度及び室間再現精度

不検出のデータ, 並びに Cochran の検定及び Grubbs の検定による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 (s_f) 及び併行相対標準偏差 (RSD_f), 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 4 に示した.

4 種類の化成肥料試料における尿素性窒素の平均値は 0.296 % (質量分率) ~ 6.03 % (質量分率) であり, その s_f は 0.011 % (質量分率) ~ 0.11 % (質量分率), RSD_f は 1.1 % ~ 3.6 %, s_R は 0.012 % (質量分率) ~ 0.20 % (質量分率), RSD_R は 2.0 % ~ 4.1 % であった. 尿素肥料試料における尿素性窒素の平均値は 46.5 % (質量分率) であり, その s_f は 0.6 % (質量分率), RSD_f は 1.4 %, s_R は 1.3 % (質量分率), RSD_R は 2.8 % であった.

4 種類の化成肥料試料におけるビウレット性窒素の平均値は 0.00963 % (質量分率) ~ 0.212 % (質量分率) であり, その s_f は 0.00030 % (質量分率) ~ 0.017 % (質量分率), RSD_f は 1.6 % ~ 11.7 %, s_R は 0.00029 % (質量分率) ~ 0.026 % (質量分率), RSD_R は 3.1 % ~ 15.3 % であった. 尿素肥料試料におけるビウレット性窒素の平均値

は 0.832 % (質量分率) であり, その s_r は 0.050% (質量分率), RSD_r は 6.0 %, s_R は 0.086 % (質量分率), RSD_R は 10.3 % であった.

4 種類の化成肥料試料におけるジシアンジアミド性窒素の平均値は 0.0464 % (質量分率) ~ 2.76 % (質量分率) であり, その s_r は 0.0023 % (質量分率) ~ 0.07 % (質量分率), RSD_r は 2.6 % ~ 5.1 %, s_R は 0.0148 % (質量分率) ~ 0.12 % (質量分率), RSD_R は 4.4 % ~ 31.9 % であった.

4 種類の化成肥料試料におけるグアニジン性窒素の平均値は 2.05 % (質量分率) ~ 4.91 % (質量分率) であり, その s_r は 0.05 % (質量分率) ~ 0.18 % (質量分率), RSD_r は 2.0 % ~ 4.2 %, s_R は 0.09 % ~ 0.29 % (質量分率), RSD_R は 4.0 % ~ 6.8 % であった. グアニル尿素肥料試料における平均値は 5.13 % (質量分率) であり, その s_r は 0.21 % (質量分率), RSD_r は 4.0 %, s_R は 0.19 % (質量分率), RSD_R は 3.6 % であった.

4 種類の化成肥料試料におけるグアニル尿素性窒素の平均値は 2.20 % (質量分率) ~ 7.43 % (質量分率) であり, その s_r は 0.07 % (質量分率) ~ 0.43 % (質量分率), RSD_r は 1.4 % ~ 5.7 %, s_R は 0.17 % (質量分率) ~ 0.78 % (質量分率), RSD_R は 4.3 % ~ 10.5 % であった. グアニル尿素肥料試料における平均値は 30.3 % (質量分率) であり, その s_r は 0.4 % (質量分率), RSD_r は 1.5 %, s_R は 1.1 % (質量分率), RSD_R は 3.6 % であった.

尿素性窒素, グアニジン性窒素及びグアニル尿素性窒素については, 今回配布した全ての試料において, 併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差が肥料等試験法⁶⁾の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度の目安の 1.5 倍を下回った.

ビウレット性窒素については, 2 種類の化成肥料試料 (平均値 0.114 % (質量分率) ~ 0.212 % (質量分率)) において, 併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差が, 肥料等試験法⁶⁾の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度の目安の 1.5 倍を上回った. なお, 他の 2 種類の化成肥料試料 (平均値 0.00963 % (質量分率) ~ 0.0201 % (質量分率)) 及び尿素肥料 (平均値 0.832 % (質量分率)) においては, 目安の 1.5 倍を下回った.

ジシアンジアミド性窒素については, 2 種類の化成肥料試料 (平均値 0.0464 % (質量分率) ~ 0.206 % (質量分率)) において, 併行相対標準偏差が, 肥料等試験法⁶⁾の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度の目安の 1.5 倍を下回ったが, 室間再現相対標準偏差については, 目安の 1.5 倍を上回った. なお, 他の 2 種類の化成肥料試料 (平均値 1.69 % (質量分率) ~ 2.76 % (質量分率)) については, 併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差ともに, 目安の 1.5 倍を下回った.

以上のことから, 本法の精度は尿素性窒素及びグアニジン性窒素について, 同試験法の性能評価規準の要求事項に適合していることを確認した. また, ビウレット性窒素, ジシアンジアミド性窒素及びグアニル尿素性窒素については, 一部の濃度範囲で同試験法の性能評価規準の要求事項に適合していることを確認した.

Table 4-1 Statistical analysis of Collaborative study results for urea nitrogen

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	8(2)	0.296	0.011	3.6	4	0.012	4.1	8
Compound fertilizer 2	10(2)	0.589	0.015	2.6	4	0.024	4.1	8
Compound fertilizer 3	10(2)	3.08	0.04	1.1	4	0.06	2.0	8
Compound fertilizer 4	10(2)	6.03	0.11	1.7	4	0.20	3.4	8
Urea fertilizer	10(2)	46.5	0.6	1.4	4	1.3	2.8	8

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 laboratories retained after outlier removed (n = The number of laboratories (p) \times The number of repetition (2))

c) Mass fraction

d) Standard deviation of repeatability

e) Relative standard deviation of repeatability

f) Rough standard of relative standard deviation of repeatability in Testing Methods for Fertilizers 2016

g) Standard deviation of reproducibility

h) Relative standard deviation of reproducibility

i) Rough standard of relative deviation of reproducibility in Testing Methods for Fertilizers 2016

Table 4-2 Statistical analysis of Collaborative study results for biuret nitrogen

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	9(2)	0.00963	0.00030	3.1	6	0.00029	3.1	11
Compound fertilizer 2	10(2)	0.0201	0.0003	1.6	4	0.0007	3.4	8
Compound fertilizer 3	12(0)	0.114	0.013	11.7	4	0.017	15.3	8
Compound fertilizer 4	11(1)	0.212	0.017	7.8	4	0.026	12.4	8
Urea fertilizer	12(0)	0.832	0.050	6.0	4	0.086	10.3	8

a) ~ i) Refer to the footnote of Table 4-1

Table 4-3 Statistical analysis of Collaborative study results for dicyandiamido nitrogen

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	10(2)	0.0464	0.0023	5.0	4	0.0148	31.9	8
Compound fertilizer 2	12(0)	0.206	0.011	5.1	4	0.031	15.2	8
Compound fertilizer 3	12(0)	1.69	0.05	2.8	4	0.12	7.0	8
Compound fertilizer 4	10(2)	2.76	0.07	2.6	4	0.12	4.4	8

a) ~ i) Refer to the footnote of Table 4-1

Table 4-4 Statistical analysis of Collaborative study results for guanidine nitrogen

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	12(0)	4.91	0.18	3.7	4	0.29	5.8	8
Compound fertilizer 2	12(0)	3.94	0.16	4.2	4	0.27	6.8	8
Compound fertilizer 3	11(1)	3.03	0.06	2.0	4	0.12	4.0	8
Compound fertilizer 4	11(1)	2.05	0.05	2.6	4	0.09	4.2	8
Guanyl urea fertilizer	11(1)	5.13	0.21	4.0	4	0.19	3.6	8

a) ~ i) Refer to the footnote of Table 4-1

Table 4-5 Statistical analysis of Collaborative study results for guanyl urea nitrogen

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	12(0)	2.20	0.09	4.2	4	0.17	7.7	8
Compound fertilizer 2	11(1)	4.38	0.07	1.5	4	0.19	4.3	8
Compound fertilizer 3	11(1)	5.83	0.08	1.4	4	0.52	8.9	8
Compound fertilizer 4	12(0)	7.43	0.43	5.7	4	0.78	10.5	8
Guanyl urea fertilizer	12(0)	30.3	0.4	1.5	4	1.1	3.6	8

a) ~ i) Refer to the footnote of Table 4-1

4. まとめ

12試験室において6種類(12点)の化成肥料試料, 尿素肥料試料及びグアニル尿素肥料を用いて共同試験を実施し, 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中のビウレット性窒素等測定の評価を行ったところ, 次の結果を得た.

(1) 尿素性窒素は平均値 0.296 % (質量分率) ~ 46.5 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 2.0 % ~ 4.1 % であった.

(2) ビウレット性窒素は平均値 0.00963 % (質量分率) ~ 0.0201 % (質量分率) の範囲及び 0.832 % (質量分率) において, その室間再現精度 (RSD_R) は 3.1 % ~ 10.3 % であった.

(3) ジシアンジアミド性窒素は平均値 1.69 % (質量分率) ~ 2.76 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 4.4 % ~ 7.0 % であった.

(4) グアニジン性窒素は平均値 2.05 % (質量分率) ~ 5.13 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 3.6 % ~ 6.8 % であった.

(5) グアニル尿素性窒素は平均値 2.20 % (質量分率) ~ 30.3 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 3.6 % ~ 10.5 % であった.

(6) ビウレット性窒素等5成分は, それぞれ(1) ~ (5)に示した濃度範囲において, いずれの室間再現精度も肥料等試験法に示されている併行精度及び室間再現精度の目安の1.5倍以内であり, 本法が肥料等試験法の要求する精度に適合していることを確認した.

(7) ビウレット性窒素は平均値 0.114 % (質量分率) ~ 0.212 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 12.4 % ~ 15.8 % であった.

- (8). ジシアンジアミド性窒素は平均値 0.0464 % (質量分率) ~ 0.206 % (質量分率) の範囲において, その室間再現精度 (RSD_R) は 15.2 ~ 31.9 % であった
- (9) ビウレット性窒素及びジシアンジアミド性窒素は, それぞれ (7) ~ (8) に示した濃度範囲において, いずれの室間再現精度も肥料等試験法に示されている併行精度及び室間再現精度の目安の 1.5 倍を上回り, 肥料等試験法の要求する精度に適合しなかった.

謝 辞

共同試験にご協力頂きました, エムシー・ファーティコム株式会社いわき工場, 同社つくば開発センター, 株式会社島津製作所, 昭和電工株式会社, 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 公益財団法人日本肥糧検定協会の各位に謝意を示します.

文 献

- 1) 植物栄養・肥料の辞典編集委員会: 植物栄養・肥料の辞典, 朝倉書店, 東京 (2002)
- 2) ポケット肥料要覧: 農林統計協会, 東京 (2015)
- 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, 最終改正平成 28 年 1 月 8 日, 農林水産省告示第 413 号 (2016)
- 4) 恵智正宏, 木村康晴, 白井裕治: 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定 ー単一試験室の妥当性確認ー, 肥料研究報告, **10**, 72~85 (2017)
- 5) 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)
- 6) 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 (2016)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2016.pdf >
- 7) Horwitz, W., : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331~343 (1995)
- 8) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

Determination of Urea Nitrogen, Biuret Nitrogen, Dicyandiamide Nitrogen, Guanidine Nitrogen and Guanyl urea Nitrogen in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography (HPLC): A Collaborative Study

Norio FUNAKI¹ and Yasuharu KIMURA¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

A collaborative study was conducted to evaluate high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen and guanyl urea nitrogen in fertilizers. The urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen and guanyl urea nitrogen were extracted with water. The extract was centrifuged. The urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen and guanyl urea nitrogen were analyzed by HPLC on cation exchanged column with UV detection at 190 nm. We sent twelve collaborators 6 materials in a blind duplicate design. After identification of outliers with Cochran test and Grubbs test, the mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) of determination of urea nitrogen were reported 0.296 % ~ 46.5 % as a mass fraction and 2.0 % ~ 4.1 %, respectively. Those of determination of biuret nitrogen were reported 0.00963 % ~ 0.201 % and 0.832 % as a mass fraction and 3.1 % ~ 10.3 %, respectively. Those of determination of dicyandiamide nitrogen were reported 1.69 % ~ 2.76 % as a mass fraction and 4.4 % ~ 7.0 %, respectively. Those of determination of guanidine nitrogen were reported 2.05 % ~ 5.13 % as a mass fraction and 3.6 % ~ 6.8 %, respectively. Those of determination of guanyl urea nitrogen were reported 2.20 % ~ 30.3 % as a mass fraction and 3.6 % ~ 10.5 %, respectively. These results indicated that this method has acceptable precision for determination of urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen and guanyl urea nitrogen in these concentration ranges. The mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) of determination of biuret nitrogen were reported 0.114 % ~ 0.212 % as a mass fraction and 12.4 % ~ 15.3 %, respectively. Those of determination of dicyandiamide nitrogen were reported 0.00464 % ~ 0.206 % as a mass fraction and 15.2 % ~ 31.9 %, respectively. These results indicated that this method has unacceptable precision for determination of biuret nitrogen and dicyandiamide nitrogen in these concentration ranges.

Key words urea nitrogen, biuret nitrogen, dicyandiamide nitrogen, guanidine nitrogen, guanyl urea nitrogen

(Research Report of Fertilizer, **10**, 86~100, 2017)