

## 5 化成肥料中の硝酸化成抑制材 1-アミジノ-2-チオ尿素の測定

— 共同試験成績 —

甲斐茂浩<sup>1</sup>, 渡部絵里菜<sup>1</sup>

キーワード 肥料, 硝酸化成抑制材, 高速液体クロマトグラフ, 共同試験

### 1. はじめに

現在, 農林水産消費安全技術センター (FAMIC) では, 肥料分析法<sup>1)</sup>との整合性に配慮しながら新たに試験法の妥当性の確認を行い, 「肥料等試験法」<sup>2)</sup>を策定し, 肥料試験業務等への活用を進めている. 肥料分析法に記載されている硝酸化成抑制材 1-アミジノ-2-チオ尿素の高速液体クロマトグラフ法による試験法は, 千葉<sup>3)</sup>により真度及び併行精度, また, 白澤<sup>4)</sup>により定量下限が報告され ISO/IEC 17025<sup>5)</sup>で要求されている試験室内における試験方法の妥当性確認がなされたところである. しかしながら, 同基準の要求事項である試験所間の比較試験が実施されていなかった. よって, IUPAC の共同試験プロトコル<sup>6)</sup>を参考に 1-アミジノ-2-チオ尿素試験法の共同試験を実施し, 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

流通している化成肥料 約 2 kg を収集し, ビニール袋に入れて密封して常温で保存した. 超遠心粉碎機 (Retsch ZM100) で目開き 500  $\mu\text{m}$  のふるいを全通するまで粉碎したものに, 1-アミジノ-2-チオ尿素を添加し, よく混合して 5 種類の濃度の共同試験用試料を調製した.

共同試験用試料は約 1.5 g をラミジップ袋に入れ密封した. 一対のブラインド試料を提供するため, 乱数を付して各濃度試料 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高速液体クロマトグラフを使用した.

#### 3) 1-アミジノ-2-チオ尿素の測定

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 100 mL を加え 10 分間振り混ぜた. 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, 標線まで水を加えた. これを共栓遠心沈殿管 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 (Fig 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, ピーク面積又は高さから試料溶液中の 1-アミジノ-2-チオ尿素の量を求め, 分析試料中の 1-アミジノ-2-チオ尿素濃度を算出した.

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.

<sup>1</sup> 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

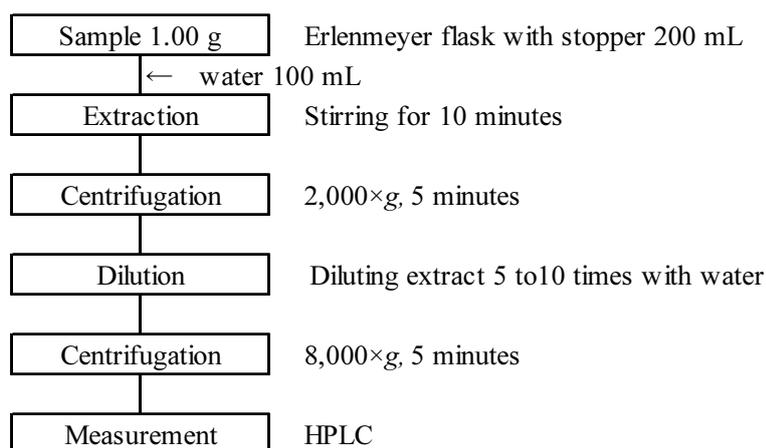


Fig. 1 Analytical procedure for 1-amidino-2-thiourea

Table 1 HPLC conditions

Column	ODS column <sup>1)</sup>
Column temperatures	30 ~ 40 °C
Mobile phase	Dissolve 0.94 g of sodium 1-hexasulfonic acid in 1,000 mL of methanol water (2+8), adjust to pH 3.15 with acetic acid and filter with a membrane filter (aperture diameter: no more than 0.5- $\mu$ m) made of hydrophilic PTFE.
Flow rate	1.0 mL/min
Detector system	UV detector at a wavelength of 262 nm

1) Usual laboratory apparatus

## 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<sup>7)</sup>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 10 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 1260 Infinity Series, Agilent HC-C18(2) (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5  $\mu$ m))
- ・ ジーエルサイエンス株式会社  
(GL-7400 Series, InertSustain C18 (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5  $\mu$ m))
- ・ 株式会社島津総合分析試験センター 京都事業所  
(島津高速液体クロマトグラフ Prominense システム, Shim-pack VP-ODS (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3  $\mu$ m))
- ・ 財団法人日本食品分析センター 彩都研究所 分析化学課  
(島津製作所 LC-10A Series, Mightysil RP-18 (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5  $\mu$ m))
- ・ 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, Mightysil RP-18GP (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5  $\mu$ m))
- ・ 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, Mightysil RP-18 (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5  $\mu$ m))
  - ・ 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 LC-2000Plus Series, Mightysil RP-18 (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5  $\mu$ m))
  - ・ 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 1500 Series, Mightysil RP-18GP (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5  $\mu$ m))
  - ・ 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, Mightysil RP-18 (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5  $\mu$ m))
  - ・ 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 RP-18 (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5  $\mu$ m))
- (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  $\times$  10 試料の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, 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<sup>7)</sup>, 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。

Table 2 Homogeneity test results

Sample	Mean <sup>1)</sup> (%) <sup>2)</sup>	$s_{an}$ <sup>3)</sup> (%) <sup>2)</sup>	$s_{sam}$ <sup>4)</sup> (%) <sup>2)</sup>	$s_R$ <sup>5)</sup> (%) <sup>2)</sup>	F value <sup>6)</sup>	F critical value <sup>7)</sup>
Compound fertilizer 1	0.090	0.004	0.003	0.005	2.30	3.02
Compound fertilizer 2	0.242	0.022	0	0.022	0.94	3.02
Compound fertilizer 3	0.486	0.020	0.017	0.026	2.35	3.02
Compound fertilizer 4	0.729	0.040	0.012	0.042	1.18	3.02
Compound fertilizer 5	1.03	0.08	0	0.08	0.92	3.02

1) Grand mean of the result obtained by analyzing ten sample containers in duplicate

2) Mass fraction

3) Analytical standard deviation

4) Sampling standard deviation

5) Reproducibility standard deviation of sample-to-sample

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

7) F (9, 10; 0.05)

#### 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試験結果を IUPAC の共同試験プロトコル<sup>6)</sup>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, 10 試験室の試験成績, 全てにおいて外れ値は認められなかった。

Table 3 Individual result of 1-amidino-2-thiourea in fertilizer (mass %)

Lab ID	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	0.078	0.089	0.225	0.241	0.506	0.523
B	0.102	0.106	0.263	0.242	0.533	0.524
C	0.085	0.088	0.226	0.253	0.529	0.548
D	0.093	0.108	0.239	0.248	0.490	0.492
E	0.087	0.094	0.242	0.234	0.516	0.460
F	0.090	0.109	0.236	0.223	0.495	0.534
G	0.089	0.101	0.283	0.271	0.529	0.537
H	0.101	0.104	0.224	0.266	0.477	0.503
I	0.091	0.092	0.243	0.238	0.469	0.494
J	0.068	0.090	0.228	0.301	0.531	0.524

\* It was not a result of the identified outliers with Cochran's test and Grubbs' tests.

Table 3 (continued)

Lab ID	Compound fertilizer 4		Compound fertilizer 5	
A	0.737	0.819	1.12	1.06
B	0.827	0.727	1.08	0.994
C	0.774	0.758	1.05	0.996
D	0.775	0.773	1.03	1.07
E	0.730	0.709	0.994	0.974
F	0.739	0.807	1.03	0.948
G	0.812	0.807	1.05	1.02
H	0.699	0.742	1.02	0.955
I	0.748	0.707	1.04	0.996
J	0.714	0.780	1.00	0.974

### 3) 併行精度及び室間再現精度

試験成績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 ( $RSD_r$ ) 値, 並びに室間再現標準偏差 ( $s_R$ ), 室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) 及び室間再現 HorRat 値を Table 4 に示した. 室間再現 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, 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 値は  $RSD_R/PRSD_R$  により求められる. なお,  $PRSD_R$  は平均定量値から Horwitz 修正式<sup>8)</sup>により求めた. 試験成績の平均値は質量分率 0.093 %~1.02 %であり, その  $s_r$  及び  $s_R$  は質量分率 0.009 %~0.039 % 及び 0.010 %~0.044 %であり,  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  は 3.8 %~9.1 %及び 4.3 %~11.2 %であった. また, HorRat 値は 1.09~1.95 であった<sup>9)</sup>.

Table 4 Statistical analysis of collaborative study results for 1-amidino-2-thiourea

Sample	No. of labs $m(n)^{1)}$	Maen <sup>2)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$s_r$ <sup>4)</sup> (%) <sup>3)</sup>	RSD <sub>r</sub> <sup>5)</sup> (%)	$s_R$ <sup>6)</sup> (%) <sup>3)</sup>	RSD <sub>R</sub> <sup>7)</sup> (%)	HorRat <sup>8)</sup>
Compound fertilizer 1	10 (0)	0.093	0.009	9.1	0.010	11.2	1.95
Compound fertilizer 2	10 (0)	0.246	0.021	8.6	0.021	8.6	1.72
Compound fertilizer 3	10 (0)	0.511	0.018	3.6	0.025	4.9	1.11
Compound fertilizer 4	10 (0)	0.759	0.039	5.1	0.040	5.3	1.27
Compound fertilizer 5	10 (0)	1.02	0.039	3.8	0.044	4.3	1.09

- 1) Number of laboratories, where  $m$ =number of laboratories retained after outlier removed and  $(n)$ =number of outliers.
- 2) Grand mean value of the results of duplicate sample which were reported from laboratories retained after outlier removed
- 3) Mass fraction
- 4) Standard deviation of repeatability
- 5) Relative standard deviation of repeatability
- 6) Standard deviation of reproducibility
- 7) Relative standard deviation of reproducibility
- 8) Horwitz ratio of reproducibility

#### 4. まとめ

10 試験室において 5 種類 (10 点) の 1-アミジノ-2-チオ尿素入り化成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による 1-アミジノ-2-チオ尿素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 4.3 % ~ 11.2 % であった。このことから、試験室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り、本試験法は、肥料中の 1-アミジノ-2-チオ尿素測定に用いることが出来る十分な性能を有していることが確認できた。

#### 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、ジュ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及び財団法人日本食品分析センター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), 財団法人日本肥糧検定協会, 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  
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 3) 千葉一則: 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 1-アミジノ-2-チオウレア (ASU) の分析法について, 肥検回報, **43** (4), 15~22 (1990)
- 4) 白澤優子: 高速液体クロマトグラフ法による肥料中の硝酸化成抑制材試験法の妥当性確認 — 検量線の評価 —, 肥料研究報告, **4**, 123~129 (2010)
- 5) ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (1999)

- 6) Horwitz, W.: Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331~343 (1995)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) Codex Alimentarius: CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL Twentieth edition, p.66 (2011)

## **Determination of 1-Amidino-2-thiourea as a Nitrification Inhibitor in Compound Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography: A Collaborative Study**

Sigehiro KAI<sup>1</sup> and Erina WATANABE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

A collaborative study was conducted to evaluate high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of 1-amidino-2-thiourea in compound fertilizers. The test portion of sample was extracted with water. The extract was diluted and centrifuged. The 1-amidino-2-thiourea was separated by reversed-phase HPLC using buffer solution - methanol (4:1) containing sodium 1-hexanesulfonate, and detected with UV detector at 262 nm. Ten collaborators were sent 5 sample materials in a blind duplicate design. After identification of outliers with Cochran's test and Grubbs' test, mean values reported from 0.093 to 1.02 % for each kind of samples. The relative standard deviation ( $RSD_r$ ) for repeatability ranged from 3.6 to 9.1 %. The relative standard deviation ( $RSD_R$ ) for reproducibility ranged from 4.3 to 11.2 %. These results indicated that this method has an acceptable precision for determination of 1-amidino-2-thiourea in Chemical fertilizer.

*Key words* 1-amidino-2-thiourea, high performance liquid chromatography, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, 6, 36~42, 2013)