

## 7. 硝酸化成抑制材

### 7.1 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)

#### 7.1.a 高速液体クロマトグラフ法

##### (1) 概要

この試験法は 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)を含む肥料に適用する。この試験法の分類は Type C であり、その記号は 7.1.a-2017 又は AM.a-1 とする。

分析試料にメタノール-水(1+1)を加えて 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンを抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 295 nm で測定し、分析試料中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)を求める。なお、この試験法の性能は備考 6 に示す。

##### (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) **メタノール**: 高速液体クロマトグラフの溶離液に使用するメタノールは高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- d) **2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(1 mg/mL)**<sup>(1)</sup>: 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン [ $C_5H_6ClN_3$ ]<sup>(2)</sup>0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。メタノール-水(1+1)を加えて溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで同溶媒を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- e) **2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時に 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(1 mg/mL) 10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。
- f) **検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(10 µg/mL~50 µg/mL)**: 使用時に 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL~25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。
- g) **検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(1 µg/mL~10 µg/mL)**: 使用時に検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL~25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンとして 98 % (質量分率) 以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンは富士フィルム和光純薬及び関東化学より市販されている。

##### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ**: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。
  - 1) **カラム**: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 295 nm 付近で測定できるもの。
- b) **マグネチックスターラー**

- c) 遠心分離機:  $1700 \times g$  で遠心分離可能なもの。
- d) 高速遠心分離機:  $8000 \times g \sim 10\,000 \times g$  で遠心分離可能なもの。
- e) 酸性アルミナカートリッジカラム: 酸性アルミナ  $500 \text{ mg} \sim 1 \text{ g}$  を充てんしたもの<sup>(3)</sup>に注射筒  $10 \text{ mL}$  を連結し、メタノール  $3 \text{ mL}$  を入れ、流下させる。

注(3) 容量  $3 \text{ mL} \sim 6 \text{ mL}$  のカラムにシリカゲル  $500 \text{ mg} \sim 1 \text{ g}$  を充てんしたカートリッジを用いてもよい。

備考 2. カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、Puresil C<sub>18</sub>、COSMOSIL 5C18-MS-II 等の名称で市販されている。

備考 3. 酸性アルミナカートリッジは Bond Elut AL-A、Sep-Pak Alumina-A、Supelclean LC-Alumina-A 等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料  $1 \text{ g}$  を  $1 \text{ mg}$  の桁まではかりとり、 $200 \text{ mL}$  共栓三角フラスコに入れる。
- b) メタノール-水(1+1)  $100 \text{ mL}$  を加え、マグネチックスターラーを用いて約  $30$  分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液を  $50 \text{ mL}$  共栓遠心沈殿管にとる。
- d) 遠心力約  $1700 \times g$  で約  $5$  分間遠心分離し<sup>(4)</sup>、上澄み液を抽出液<sup>(5)</sup>とする。

注(4) 回転半径  $16.5 \text{ cm}$  及び回転数  $3000 \text{ rpm}$  で遠心力  $1700 \times g$  程度となる。

(5) 試料溶液中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、抽出液の一定量をメタノール-水(1+1)で希釈する。

(4.2) クリーンアップ クリーンアップは、次のとおり行う。

- a) 抽出液を酸性アルミナカートリッジカラムに入れる。
- b) 初めの流出液約  $3 \text{ mL}$  を捨て、その後の流出液約  $2 \text{ mL}$  を試験管にとる。
- c) 流出液を  $1.5 \text{ mL}$  共栓遠心沈殿管<sup>(6)</sup>にとる。
- d) 遠心力  $8000 \times g \sim 10\,000 \times g$  で約  $5$  分間遠心分離し<sup>(7)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

注(6) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(7) 回転半径  $7.2 \text{ cm} \sim 8.9 \text{ cm}$  及び回転数  $10\,000 \text{ rpm}$  で遠心力  $8100 \times g \sim 10\,000 \times g$  程度となる。

備考 4. (4.2)c)～d)の操作に代えて、PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径  $0.5 \mu\text{m}$  以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

備考 5. 有機物を含有しない肥料の場合には、次の方法で試験することができる。

(4.1)c)～d)及び(4.2)a)～b)の操作を省略し、(4.2)c)の「流出液」を「静置後、上澄み液」に変えて操作する。

(4.3) 測定 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

- a) **高速液体クロマトグラフの測定条件:** 高速液体クロマトグラフの測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。
- 1) **カラム:** オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm、粒径 5  $\mu$ m)
  - 2) **カラム槽温度:** 30  $^{\circ}$ C~40  $^{\circ}$ C
  - 3) **溶離液:** メタノール-水 (4+6)
  - 4) **流量:** 1 mL/min
  - 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 295 nm
- b) **検量線の作成**
- 1) 各検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液 10  $\mu$ L を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 295 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
  - 2) 各検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液の濃度と波長 295 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。
- c) **試料の測定**
- 1) 試料溶液 10  $\mu$ L を **b) 1)**と同様に操作する。
  - 2) 検量線から 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン量を求め、分析試料中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)を算出する。

**備考 6.** 化成肥料(1点)及び配合肥料(2点)を用いて回収試験を実施した結果、2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンとして 1.0%(質量分率)、0.4%(質量分率)及び 0.1%(質量分率)の濃度レベルでの平均回収率は 99.1%~100.5%、99.3%~101.6%及び 100.2%~100.7%であった。  
なお、この試験法の定量下限は 0.005%(質量分率)程度と推定された。

#### 参考文献

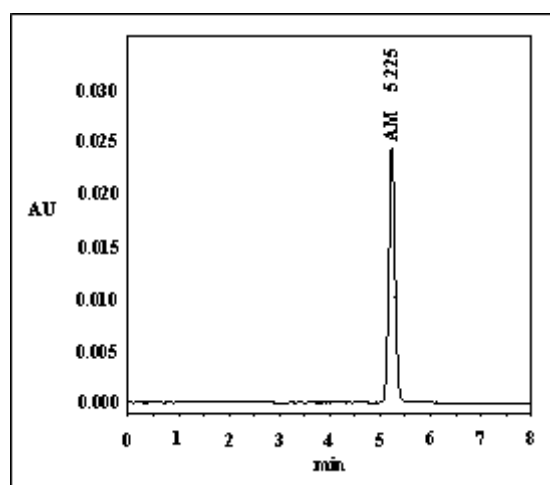
- 1) 白井裕治: 高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジンの定量法について, 肥検回報, **44 (3)**, 26~41(1991)

(5) **2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)試験法フローシート** 肥料中の 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン試験法のフローシートを次に示す。

分析試料 1 g	1 mgの桁まで 200 mL共栓三角フラスコにはかりとる
	← メタノール-水(1+1) 100 mL
かき混ぜ	マグネチックスターラー、10分間
遠心分離	共栓遠心沈殿管、1700×g、5分間
クリーンアップ	酸性アルミナカートリッジカラム
遠心分離	共栓遠心沈殿管、8000×g～10 000×g、5分間
試料溶液	
測定	高速液体クロマトグラフ

図 肥料中の2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)試験法フローシート

**参考** 検量線用 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)標準液の HPLC クロマトグラム例を次に示す。



参考図 2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン(AM)標準液の HPLC クロマトグラム

#### HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

2-アミノ-4-クロロ-6-メチルピリミジン標準液(100 ng 相当量)

その他の条件は(4.3) a) HPLC の測定条件の例示のとおり

## 7.2 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)

### 7.2.a 高速液体クロマトグラフ法

#### (1) 概要

この試験法は 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)を含む肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 7.2.a-2017 又は ASU.a-1 とする。

水を分析試料に加えて 1-アミノ-2-チオ尿素を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 262 nm で測定し、分析試料中の 1-アミノ-2-チオ尿素(ASU)を求める。なお、この試験法の性能は備考 4 に示す。

#### (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) **メタノール**: 高速液体クロマトグラフの溶離液に使用するメタノールは高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- c) **1-ヘキサスルホン酸ナトリウム**: イオンペアークロマトグラフィー用又は同等の品質の試薬。
- d) **酢酸**: 高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- e) **1-アミノ-2-チオ尿素標準液(1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: 1-アミノ-2-チオ尿素  $[\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_4\text{S}]$ <sup>(2)</sup> 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。水を加えて溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで水を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- f) **1-アミノ-2-チオ尿素標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時に 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(1 mg/mL) 10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線まで水を加える。
- g) **検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(10 µg/mL～50 µg/mL)**: 使用時に 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。
- h) **検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(1 µg/mL～10 µg/mL)**: 使用時に検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。

**注(1)** 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 1-アミノ-2-チオ尿素として 98 % (質量分率) 以上の純度の試薬が市販されている。

**備考 1.** 1-アミノ-2-チオ尿素はグアニルチオ尿素として東京化成工業より、アミノチオ尿素として関東化学より市販されている。

#### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ**: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。
  - 1) **カラム**: 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。
  - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 262 nm 付近で測定できるもの。
- b) **マグネチックスターラー**
- c) **高速遠心分離機**: 8000×g～10 000×g で遠心分離可能なもの。

**備考 2.** カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、Puresil C<sub>18</sub>、COSMOSIL 5C18-MS-II 等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーで約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液<sup>(3)</sup>を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管<sup>(4)</sup>にとる。
- d) 遠心力 8000×g～10 000×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(5)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注(3)** 試料溶液中の 1-アミノ-2-チオ尿素濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(4) ポリプロピレン製等の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(5) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 8100×g～10 000×g 程度となる。

**備考 3.** (4.1) c～d) の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフの測定条件:** 高速液体クロマトグラフの測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm、粒径 5 μm)
- 2) **カラム槽温度:** 30 °C～45 °C
- 3) **溶離液:** メタノール-水 (2+8) 1000 mL に 1-ヘキサスルホン酸ナトリウム 0.94 g を溶かし、酢酸で pH 3.15 に調整し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過する<sup>(1)</sup>。
- 4) **流量:** 1 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 262 nm

b) **検量線の作成**

- 1) 各検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 262 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液の濃度と波長 262 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c) **試料の測定**

- 1) 試料液 10 μL を b) 1) と同様に操作する。
- 2) 検量線から 1-アミノ-2-チオ尿素量を求め、分析試料中の 1-アミノ-2-チオ尿素 (ASU) を算出する。

**備考 4.** 化成肥料(2点)を用いて3点併行で回収試験を実施した結果、1-アミノ-2-チオ尿素として 1.0 %

(質量分率)、0.5%(質量分率)及び0.25%(質量分率)の濃度レベルでの平均回収率は99.0%~104.3%、97.7%~100.7%及び99.7%~101.3%であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表1に示す。

なお、この試験法の定量下限は0.005%(質量分率)程度と推定された。

表1 1-アミジノ-2-チオ尿素(ASU)試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

試料名	試験室数 <sup>1)</sup>	平均値 <sup>2)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$s_r$ <sup>4)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_r$ <sup>5)</sup> (%)	$s_R$ <sup>6)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_R$ <sup>7)</sup> (%)
化成肥料1	10(0)	0.093	0.009	9.1	0.010	11.2
化成肥料2	10(0)	0.246	0.021	8.6	0.021	8.6
化成肥料3	10(0)	0.511	0.018	3.6	0.025	4.9
化成肥料4	10(0)	0.759	0.039	5.1	0.040	5.3
化成肥料5	10(0)	1.020	0.039	3.8	0.044	4.3

1) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)

2) 平均値( $n$ =有効試験室数×試料数(2))

3) 質量分率

4) 併行標準偏差

5) 併行相対標準偏差

6) 室間再現標準偏差

7) 室間再現相対標準偏差

### 参考文献

- 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)
- 甲斐茂浩, 渡部絵里菜: 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-, 肥料研究報告, **6**, 36~32 (2013)

- (5) **1-アミジノ-2-チオ尿素試験法フローシート** 肥料中の 1-アミジノ-2-チオ尿素(ASU)試験法のフローシートを次に示す。

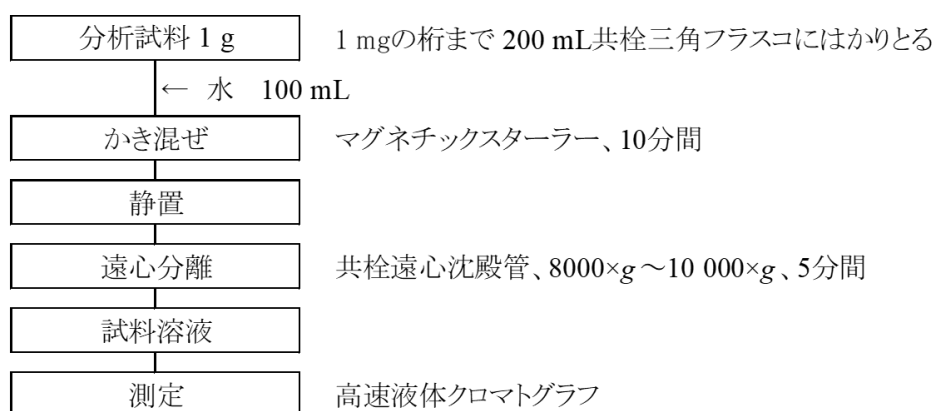
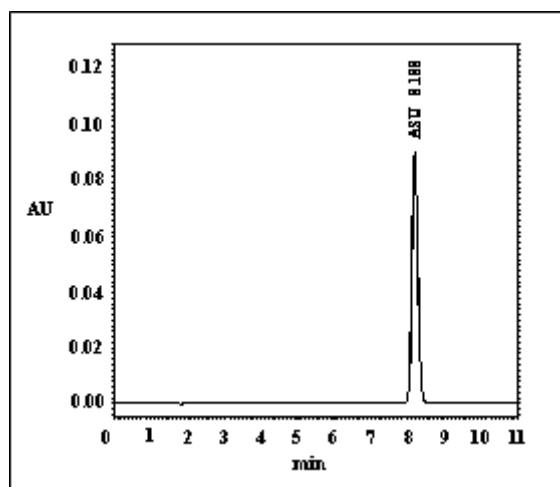


図 肥料中の1-アミジノ-2-チオ尿素(ASU)試験法フローシート

**参考** 検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素 (ASU) 標準液の HPLC クロマトグラム例を次に示す。



参考図 1-アミノ-2-チオ尿素 (ASU) 標準液の HPLC クロマトグラム

#### HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5  $\mu$ m)

1-アミノ-2-チオ尿素標準液 (200 ng 相当量)

その他の条件は (4.2) a) HPLC の測定条件の例示のとおり



### 7.3 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)

#### 7.3.a 高速液体クロマトグラフ法

##### (1) 概要

この試験法は4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)を含み有機物を含まない肥料に適用する。この試験法の分類は Type C であり、その記号は 7.3.a-2017 又は ATC.a-1 とする。

メタノールを分析試料に加えて4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、アミノプロピルシリカゲルカラムで分離し、波長 220 nm で測定し、分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)を求める。なお、この試験法の性能は備考 4 に示す。

##### (2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- b) **メタノール**: 高速液体クロマトグラフの溶離液に使用するメタノールは高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- c) **アセトニトリル**: 高速液体クロマトグラフの溶離液に使用するアセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- d) **4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(1 mg/mL)**<sup>(1)(2)</sup>: 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール  $[\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4]$ <sup>(3)</sup> 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。メタノールを加えて溶かし、褐色全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線までメタノールを加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- e) **4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時に 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(1 mg/mL) 10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線までメタノールを加える。
- f) **検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(10 µg/mL～50 µg/mL)**: 使用時に 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- g) **検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(1 µg/mL～10 µg/mL)**: 使用時に検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。

**注(1)** 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩として 1.434 mg/mL を含有している。

(2) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(3) 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールとして 98 % (質量分率) 以上の純度の試薬が市販されている。

**備考 1.** 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールは 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールとして富士フィルム和光純薬及び東京化成工業より、4-アミノ-4H-1,2,4-トリアゾールとして関東化学より市販されている。

##### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ**: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。
  - 1) **カラム**: 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にアミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。
  - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 220 nm 付近で測定できるもの。

- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機:  $8000\times g\sim 10\,000\times g$  で遠心分離可能なもの。

**備考 2.** カラムは Hibar LiChrosorb NH<sub>2</sub>、Inertsil NH<sub>2</sub>、Unison UK-Amino、Mightysil NH<sub>2</sub>、Shim-pack CLC-NH<sub>2</sub>、Shodex NH-5A、Unisil Q NH<sub>2</sub> 等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。
- メタノール 100 mL を加え、マグネチックスターラーで約 10 分間かき混ぜる。
- 静置後、上澄み液を<sup>1)</sup>1.5 mL 共栓遠心沈殿管<sup>4)</sup>にとる。
- 遠心力  $8000\times g\sim 10\,000\times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>5)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注 (4)** ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(5) 回転半径 7.2 cm $\sim$ 8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力  $8100\times g\sim 10\,000\times g$  程度となる。

**備考 3.** (4.1)c)~d)の操作に代えて、PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過し、ろ液を試料液としてもよい。

(4.2) 測定 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフの測定条件:** 高速液体クロマトグラフの測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- カラム:** アミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm $\sim$ 6 mm、長さ 150 mm $\sim$ 250 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$ )
- カラム槽温度:** 30  $^{\circ}\text{C}\sim 40\ ^{\circ}\text{C}$
- 溶離液:** アセトニトリル-メタノール(9+1)
- 流量:** 1 mL/min
- 検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 220 nm

#### b) 検量線の作成

- 各検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液 10  $\mu\text{L}$  を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 220 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 各検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液の濃度と波長 220 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

#### c) 試料の測定

- 試料液 10  $\mu\text{L}$  を b) 1) と同様に操作する。
- 検量線から 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール量を求め、分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾールを算出する。
- 次の式によって 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)を算出する。

分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(%(質量分率))

$$=A \times 1.434$$

A: 分析試料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール(%(質量分率))

**備考 4.** 化成肥料(2点)を用いて回収試験を実施した結果、4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩として、0.5%(質量分率)、0.3%(質量分率)及び0.2%(質量分率)の濃度レベルでの平均回収率は100.2%~104.9%、100.8%~103.0%及び100.7%~104.2%であった。

なお、この試験法の定量下限は0.005%(質量分率)程度と推定された。

#### 参考文献

- 1) 坂上光一: 高速液体クロマトグラフィーによる 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩の分析法について, 肥検回報, **40** (4), 9~16 (1987)

- (5) **4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)試験法フローシート** 肥料中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩試験法のフローシート例を次に示す。

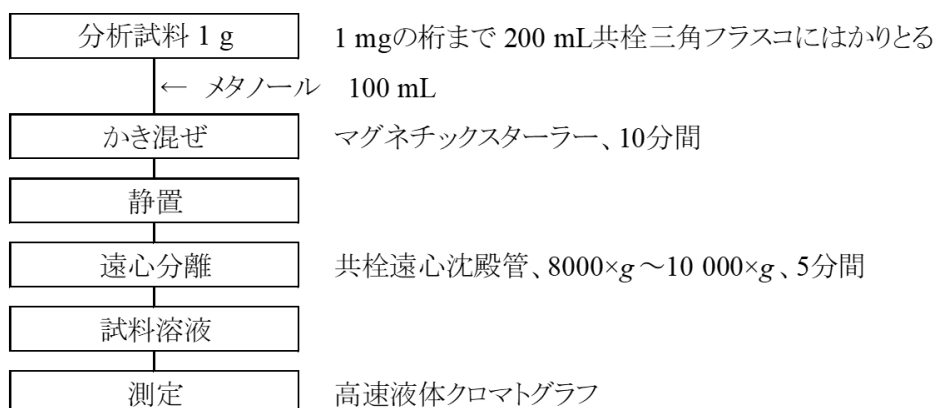


図 肥料中の4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩(ATC)試験法フローシート

## 7.4 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)

### 7.4.a 高速液体クロマトグラフ法

#### (1) 概要

この試験法は N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)を含み有機物を含まない肥料に適用する。この試験法の分類は Type C であり、その記号は 7.4.a-2017 又は DCS.a-1 とする。

メタノール・りん酸 (996+4)と水を分析試料に加えて N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 246 nm で測定し、分析試料中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)を求める。なお、この試験法の性能は備考 3 に示す。

#### (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) **メタノール**: 高速液体クロマトグラフの溶離液に使用するメタノールは高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- d) **りん酸**: JIS K 9005 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- e) **N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(1 mg/mL)**<sup>(1)</sup>: N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸 [C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>] 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。メタノールを加えて溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線までメタノールを加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- f) **N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時に N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(1 mg/mL) 10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線までメタノールを加える。
- g) **検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(10 µg/mL~50 µg/mL)**: 使用時に N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(0.1 mg/mL)の 5 mL~25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- h) **検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(1 µg/mL~10 µg/mL)**: 使用時に検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液(20 µg/mL)の 2.5 mL~25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

#### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ**: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。
  - 1) **カラム**: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
  - 3) **検出部**: 吸光度検出器で波長 246 nm 付近で測定できるもの。
- b) **マグネチックスターラー**
- c) **高速遠心分離機**: 8000×g~10 000×g で遠心分離可能なもの。

備考 1. カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、

Puresil C<sub>18</sub>、COSMOSIL 5C18-MS-II 等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。
- b) メタノールーりん酸 (996+4) 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 30 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液<sup>(2)</sup>を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管<sup>(3)</sup>にとる。
- d) 遠心力 8000×g～10 000×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(4)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注(2)** 試料溶液中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、流出液の一定量をメタノールで希釈する。

(3) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(4) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 8100×g～10 000×g 程度となる。

**備考 2.** (4.1)c～d)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) 測定 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフの測定条件:** 高速液体クロマトグラフの測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm、粒径 5 μm)
- 2) **カラム槽温度:** 30 °C～40 °C
- 3) **溶離液:** メタノールー水<sup>(5)</sup> (55+45)
- 4) **流量:** 0.8 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 246 nm

**注(5)** 使用する水は、予めりん酸で pH 3 に調整する。

#### b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 246 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液の濃度と波長 246 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

#### c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10 μL を b) 1) と同様に操作する。
- 2) 検量線から N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸量を求め、分析試料中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)を算出する。

**備考 3.** 化成肥料(2点)及び配合肥料(1点)を用いて回収試験を実施した結果、N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸として0.4%(質量分率)、0.2%(質量分率)及び0.1%(質量分率)の濃度レベルでの平均回収率は100.9%~101.4%、100.8%~101.4%及び101.2%~103.4%であった。

なお、この試験法の定量下限は0.005%(質量分率)程度と推定された。

### 参考文献

- 久保 明: 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 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸の分析法の検討について, 肥検回報, **44** (4), 25~36 (1991)
- (5) N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)試験法フローシート** 肥料中のN-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)試験法のフローシートを次に示す。

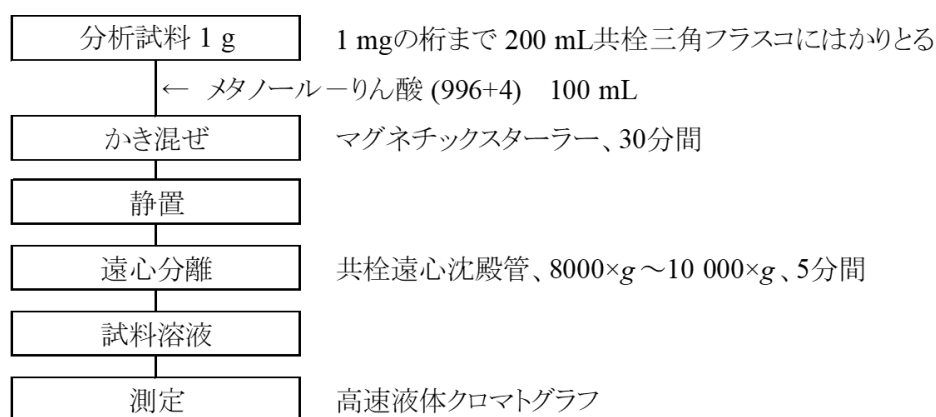
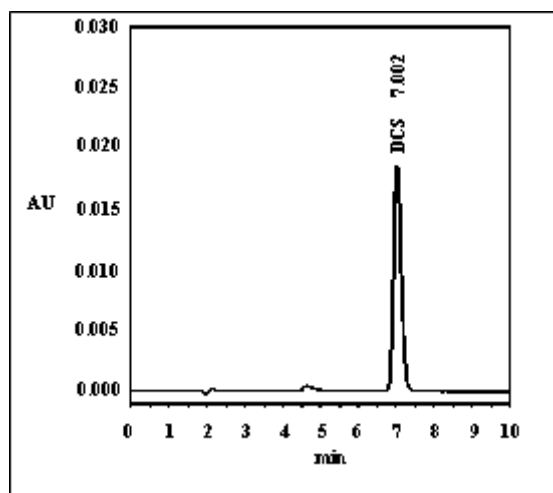


図 肥料中のN-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)試験法フローシート

**参考** 検量線用 N-2,5-ジクロロフェニルスキシナミド酸 (DCS) 標準液の HPLC クロマトグラム例を次に示す。



参考図 N-2,5-ジクロロフェニルスキシナミド酸の HPLC クロマトグラム

#### HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5  $\mu$ m)

N-2,5-ジクロロフェニルスキシナミド酸標準液 (100 ng 相当量)

その他の条件は (4.2) a) HPLC の測定条件の例示のとおり

## 7.5 ジシアンジアミド(Dd)

### 7.5.a 高速液体クロマトグラフ法

#### (1) 概要

この試験法はジシアンジアミド(Dd)を含む肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 7.5.a-2017 又は Dd.a-1 とする。

分析試料に水を加えて少時放置した後、メタノールを加えてジシアンジアミドを抽出し、シリカゲルカートリッジカラムで妨害物質を除去した後、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、アミノプロピルシリカゲルカラムで分離し、波長 215 nm で測定し、分析試料中のジシアンジアミド(Dd)を求める。なお、この試験法の性能は備考 5 に示す。

#### (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) **メタノール**: 高速液体クロマトグラフの溶離液に使用するメタノールは高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- d) **アセトニトリル**: 高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- e) **ジシアンジアミド標準液(1 mg/mL)<sup>(1)</sup>**: ジシアンジアミド[C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>]<sup>(2)</sup> 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量のメタノールを加えて溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで同溶媒を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- f) **ジシアンジアミド標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時にジシアンジアミド標準液(1 mg/mL) 10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線までメタノールを加える。
- g) **検量線用ジシアンジアミド標準液(10 µg/mL～50 µg/mL)**: 使用時にジシアンジアミド標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- h) **検量線用ジシアンジアミド標準液(1 µg/mL～10 µg/mL)**: 使用時に検量線用ジシアンジアミド標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。
- i) **硫酸ナトリウム**: JIS K 8987 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) ジシアンジアミドとして 98 %以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. ジシアンジアミドは富士フィルム和光純薬及び関東化学よりジシアノジアミドとして市販されている。

#### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ**: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。
  - 1) **カラム**: 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にアミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C～40 °C で調節できるもの。
  - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 215 nm 付近で測定できるもの。
- b) **垂直往復振とう機**: フラスコ用アダプターを用いて全量フラスコ 250 mL を 300 往復/分(振幅 40 mm)で垂直往復振り混ぜさせられるもの。



- c) **遠心分離機**: 1700×g で遠心分離可能なもの。
- d) **高速遠心分離機**: 8000×g~10 000×g で遠心分離可能なもの。
- e) **シリカゲルカートリッジカラム**: シリカゲル 500 mg~1 g を充てんしたものの<sup>(3)</sup>に注射筒 10 mL を連結し、メタノール 3 mL を入れ、流下させる。

**注(3)** 容量 3 mL~6 mL のカラムにシリカゲル 500 mg~1 g を充てんしたカートリッジを用いてもよい。

**備考 2.** カラムは Hibar LiChrosorb NH<sub>2</sub>、Inertsil NH<sub>2</sub>、Unison UK-Amino、Mightysil NH<sub>2</sub>、Shim-pack CLC-NH<sub>2</sub>、Shodex NH-5A、Unisil Q NH<sub>2</sub> 等の名称で市販されている。

**備考 3.** シリカゲルカートリッジカラムは Sep-Pak Plus Silica、InertSep Si 等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。
- b) 水 1 mL を加え<sup>(4)</sup>、約 5 分間放置する。
- c) メタノール 100 mL を加え、300 往復/分(振幅 40 mm) で約 10 分間振り混ぜる。
- d) 硫酸ナトリウム適量<sup>(5)</sup>を加える。
- e) 静置後、上澄み液を 50 mL 共栓遠心沈殿管にとる。
- f) 遠心力約 1700×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(6)</sup>、上澄み液を抽出液<sup>(7)</sup>とする。

**注(4)** 試料がすべて水と触れるようによく混ぜる。

(5) 5 g~10 g 程度。

(6) 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 1700×g 程度となる。

(7) 試料溶液中のジシアンジアミド濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、抽出液の一定量をメタノールで希釈する。

(4.2) **クリーンアップ** クリーンアップは、次のとおり行う。

- a) 抽出液をシリカゲルカートリッジカラムに入れる。
- b) 初めの流出液 3 mL を捨て、その後の流出液約 2 mL を試験管にとる。
- c) 流出液を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管<sup>(8)</sup>にとる。
- d) 遠心力 8000×g~10 000×g で約 5 分間遠心分離し<sup>(9)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注(8)** ポリプロピレン製等の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(9) 回転半径 7.2 cm~8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 8100×g~10 000×g 程度となる。

**備考 4.** (4.2)c)~d)の操作に代えて、PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.3) **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフの測定条件:** 高速液体クロマトグラフの測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** アミノ基又はアミノプロピル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm、粒径 5  $\mu$ m)
- 2) **カラム槽温度:** 30  $^{\circ}$ C~40  $^{\circ}$ C
- 3) **溶離液:** アセトニトリル-メタノール(6+1)
- 4) **流量:** 0.5 mL/min~1 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 215 nm

b) **検量線の作成**

- 1) 各検量線用ジシアンジアミド標準液 10  $\mu$ L を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 215 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用ジシアンジアミド標準液の濃度と波長 215 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c) **試料の測定**

- 1) 試料溶液 10  $\mu$ L を b) 1) と同様に操作する。
- 2) 検量線から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(Dd)を算出する。

**備考 5.** 無機化成肥料(2 点)及び有機入り化成肥料(3 点)を用いて回収試験を実施した結果、2%(質量分率)及び0.2%(質量分率)の濃度レベルでの回収率は 101.2%~102.6%及び 98.4%~100.6%であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表 1 に示す。

なお、この試験法の定量下限は 0.01%(質量分率)程度と推定された。

表1 ジシアンジアミド試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

試料名	試験 室数 <sup>1)</sup>	平均値 <sup>2)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$s_r$ <sup>4)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_r$ <sup>5)</sup> (%)	$s_R$ <sup>6)</sup> (%) <sup>3)</sup>	$RSD_R$ <sup>7)</sup> (%)
化成肥料1	11(2)	0.263	0.009	3.2	0.019	7.4
化成肥料2	11(2)	2.04	0.04	1.7	0.07	3.2
化成肥料3	13(0)	0.548	0.011	2.0	0.033	6.0
化成肥料4	12(1)	0.423	0.013	3.2	0.022	5.2
化成肥料5	12(1)	1.02	0.01	1.4	0.04	4.3

1) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)

2) 平均値( $n$ =有効試験室数 $\times$ 試料数(2))

3) 質量分率

4) 併行標準偏差

5) 併行相対標準偏差

6) 室間再現標準偏差

7) 室間再現相対標準偏差

**参考文献**

- 1) 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)
- 2) 齊木雅一: 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-, 肥料研究報告, 4, 16~22 (2011)

(5) ジシアンジアミド試験法フローシート 肥料中のジシアンジアミド試験法のフローシートを次に示す。

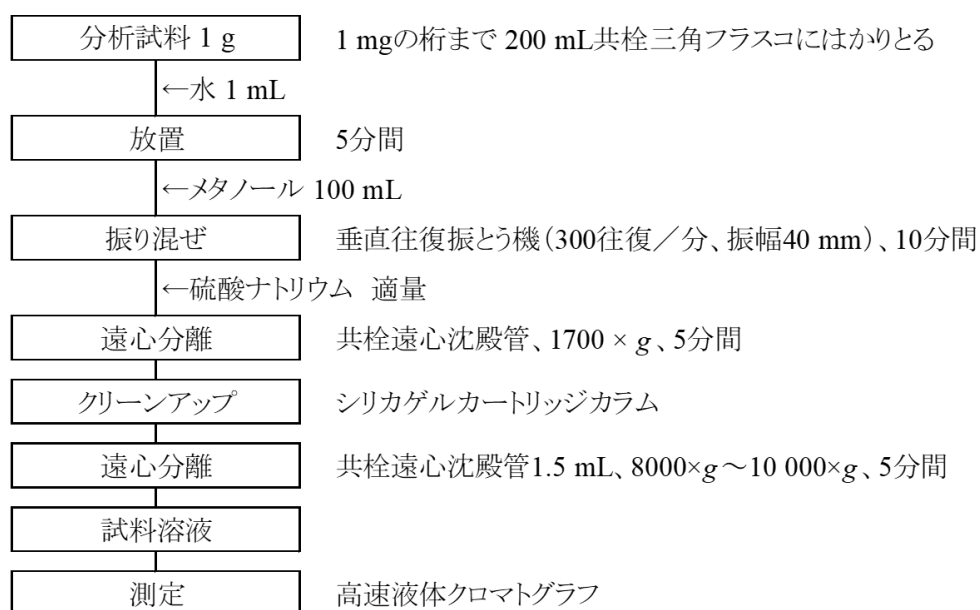
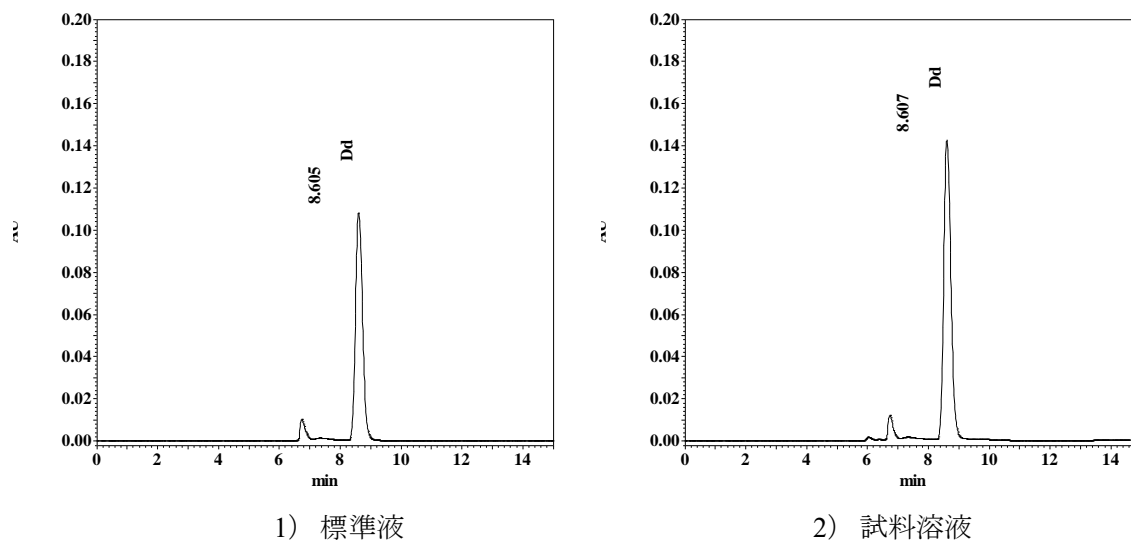


図 肥料中のジシアンジアミド(Dd)試験法のフローシート

**参考** 検量線用ジシアンジアミド(Dd)標準液及び試料溶液(化成肥料)のHPLCクロマトグラム例を次に示す。



参考図 ジシアンジアミド(Dd)のHPLCクロマトグラム

- 1) ジシアンジアミド標準液(ジシアンジアミド 100 ng 相当量(10  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{L}$ ))
- 2) 試料溶液(化成肥料)

#### HPLC の測定条件

カラム: Inertsil NH<sub>2</sub>(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$ )

カラム槽温度: 30  $^{\circ}\text{C}$

流量: 0.5 mL/min

その他の条件は(4.3 a) HPLC の測定条件の例示のとおり

## 7.6 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)

### 7.6.a 高速液体クロマトグラフ法

#### (1) 概要

この試験法は 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)を含む肥料に適用する。この試験法の分類は Type C であり、その記号は 7.6.a-2017 又は ST.a-1 とする。

メタノール-水 (1+1)を分析試料に加えて 2-スルファニルアミドチアゾールを抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 285 nm で測定し、分析試料中の 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)を求める。なお、この試験法の性能は備考 6 に示す。

#### (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) **メタノール**: 高速液体クロマトグラフの溶離液に使用するメタノールは高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- d) **2-スルファニルアミドチアゾール標準液(1 mg/mL)**<sup>(1)</sup>: 2-スルファニルアミドチアゾール  $[\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2]$ <sup>(2)</sup> 0.1 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。水を加えて溶かし、1000 mL 全量フラスコに移し入れ、標線までメタノール-水(1+1)を加える。冷蔵庫で保存し、調製後 6 ヶ月間以上経過したものは使用しない。
- e) **2-スルファニルアミドチアゾール標準液(0.1 mg/mL)**: 使用時に 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(100 µg/mL) 10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。
- f) **検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(10 µg/mL～50 µg/mL)**: 使用時に 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(0.1 mg/mL) の 5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノール-水 (1+1)を加える。
- g) **検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(1 µg/mL～10 µg/mL)**: 使用時に検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール標準液(20 µg/mL) の 2.5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノール-水(1+1)を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 2-スルファニルアミドチアゾールとして 98 % (質量分率)以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. 2-スルファニルアミドチアゾールは東京化成工業、富士フイルム和光純薬及び関東化学よりスルファチアゾールとして市販されている。

#### (3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **高速液体クロマトグラフ**: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。
  - 1) **カラム**: 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
  - 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。
  - 3) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 285 nm 付近で測定できるもの。
- b) **マグネチックスターラー**

- c) 遠心分離機: 1700×g で遠心分離可能なもの。
- d) 高速遠心分離機: 8000×g～10 000×g で遠心分離可能なもの。
- e) 酸性アルミナカートリッジカラム: 酸性アルミナ 500 mg～1 g を充てんしたもの<sup>(3)</sup>に注射筒 10 mL を連結し、メタノール 3 mL を入れ、流下させる。

注(3) 容量 3 mL～6 mL のカラムにシリカゲル 500 mg～1 g を充てんしたカートリッジを用いてもよい。

備考 2. カラムは Inertsil ODS、Mightysil RP-18、L-column ODS、Shim-pack VP-ODS、シリカ C18M 4D、Puresil C<sub>18</sub>、COSMOSIL 5C18-MS-II 等の名称で市販されている。

備考 3. 酸性アルミナカートリッジは Bond Elut AL-A、Sep-Pak Alumina-A、Supelclean LC-Alumina-A 等の名称で市販されている。

#### (4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。
- b) メタノール-水(1+1) 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 15 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液を 50 mL 共栓遠心沈殿管にとる。
- d) 遠心力 1700×g で約 5 分間遠心分離<sup>(4)</sup>、上澄み液を抽出液<sup>(5)</sup>とする。

注(4) 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 1700×g 程度となる。

(5) 試料溶液中の 2-スルファニルアミドチアゾール濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、抽出液の一定量をメタノールで希釈する。

(4.2) クリーンアップ クリーンアップは、次のとおり行う。

- a) 抽出液を酸性アルミナカートリッジカラムに入れる。
- b) 初めの流出液約 3 mL を捨て、その後の流出液約 2 mL を試験管にとる。
- c) 流出液を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管<sup>(6)</sup>にとる。
- d) 遠心力 8000×g～10 000×g で約 5 分間遠心分離<sup>(7)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

注(6) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(7) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 8100×g～10 000×g 程度となる。

備考 4. (4.2)c)～d)の操作に代えて、PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

備考 5. 有機物を含有しない肥料の場合には、次の方法で試験することができる。

(4.1)c)～d)及び(4.2)a)～b)の操作を省略し、(4.2)c)の「流出液」を「静置後、上澄み液」に変えて操作する。

(4.3) 測定 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフの測定条件:** 高速液体クロマトグラフの測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム:** オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm、粒径 5 μm)
- 2) **カラム槽温度:** 30 °C~40 °C
- 3) **溶離液:** メタノール-水 (2+8)
- 4) **流量:** 1 mL/min
- 5) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 285 nm

b) **検量線の作成**

- 1) 各検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 285 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール標準液の濃度と波長 285 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c) **試料の測定**

- 1) 試料溶液 10 μL を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線から 2-スルファニルアミドチアゾール量を求め、分析試料中の 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)を算出する。

**備考 6.** 化成肥料(1点)及び配合肥料(2点)を用いて回収試験を実施した結果、2-スルファニルアミドチアゾールとして 1.0%(質量分率)、0.4%(質量分率)及び 0.1%(質量分率)の濃度レベルでの平均回収率は 101.2%~102.1%、99.6%~101.7%及び 99.4%~101.0%であった。

なお、この試験法の定量下限は 0.005%(質量分率)程度でと推定された。

#### 参考文献

- 1) 白井裕治: 高速液体クロマトグラフィーによる肥料中の 2-スルファニルアミドチアゾールの定量法について, 肥検回報, **44 (1)**, 10~20 (1991)

- (5) 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)試験法フローシート 肥料中の 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)試験法のフローシートを次に示す。

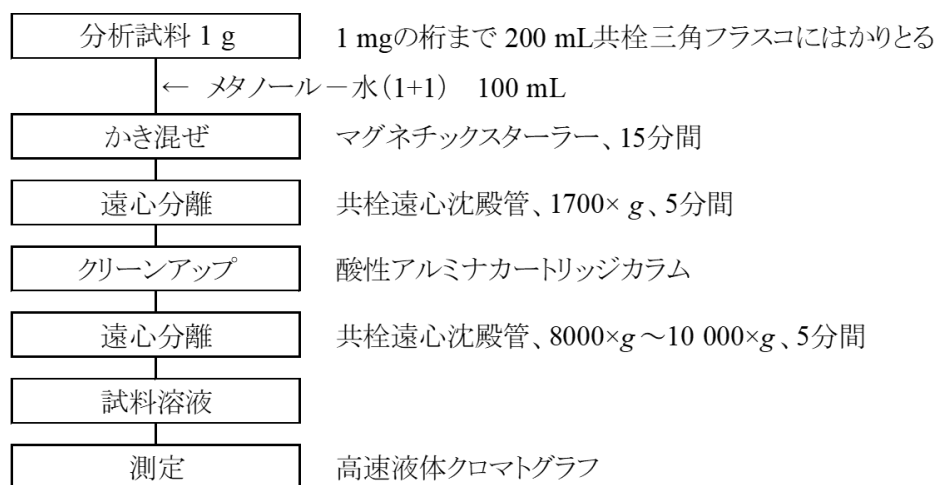
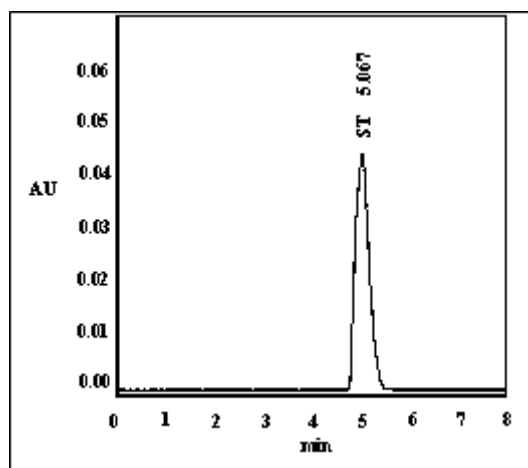


図 肥料中の2-スルファニルアミドチアゾール(ST)試験法フローシート

**参考** 検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)標準液の HPLC クロマトグラム例を次に示す。



参考図 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)の HPLC クロマトグラム

HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

2-スルファニルアミドチアゾール標準液(200 ng 相当量)

その他の条件は(4.3) a) HPLC の測定条件の例示のとおり



## 7.7 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)

### 7.7.a 高速液体クロマトグラフ法

#### (1) 概要

この試験法は 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)を含む固形肥料に適用する。ただし、有機質を含む肥料及びホルムアルデヒド加工尿素肥料は適用範囲から除く。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 7.7.a-2021 又は DMPP.a-1 とする。

分析試料に水を加え、攪拌により抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで分離し、波長 224 nm で測定し、分析試料中の 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)を求めらる。なお、この方法の性能は備考 5 に示す。

#### (2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) りん酸二水素ナトリウム二水和物: JIS K 9009 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) アセトニトリル: 高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- d) 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)標準液(2 mg/mL)<sup>(1)</sup>: 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP) [C<sub>3</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P]<sup>(2)</sup> 0.2 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の水を加えて 100 mL 全量フラスコに移し入れ、超音波発生器を用いて超音波処理して溶かし、標線まで水を加える。
- e) 検量線用 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)標準液(200 µg/mL)<sup>(1)</sup>: 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩標準液(DMPP 2 mg/mL) 20 mL を 200 mL 全量フラスコにとり、標線まで水を加える。
- f) 検量線用 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)標準液(50 µg/mL~100 µg/mL)<sup>(1)</sup>: 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)標準液(200 µg/mL) 25 mL~50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。
- g) 検量線用 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)標準液(5 µg/mL~25 µg/mL)<sup>(1)</sup>: 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩標準液(DMPP 100 µg/mL) 5 mL~25 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。
- h) 検量線用 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)標準液(0.5 µg/mL~2.5 µg/mL)<sup>(1)</sup>: 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩標準液(DMPP 10 µg/mL) 5 mL~25 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。なお、3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)標準液は不安定なので、e)~h)については用時調製すること。d)については冷蔵環境下で 1 ヶ月程度は使用可能である。

(2) 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)として 98 % (質量分率)以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩は東京化成工業より市販されている。また、富士フィルム和光純薬よりりん酸 3,4-ジメチルピラゾールとして市販されている。また、3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)に換えて、3,4-ジメチルピラゾール(DMP)を用いて検量線用 DMP 標準液を調製することもできる。この場合、検量線用標準液の濃度(DMP)又は(4.3)で得られた測定値(DMP)に換算係数(2.0208)を乗じて分析試料中の 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)を算出する。

(3) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) **高速液体クロマトグラフ**: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。

- 1) **カラム**: 内径 4.6 mm、長さ 150 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5  $\mu\text{m}$  のオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
- 2) **カラム槽**: カラム槽温度を 30  $^{\circ}\text{C}$ ~45  $^{\circ}\text{C}$  で調節できるもの。
- 3) **検出器**: 吸光光度検出器で波長 224 nm 付近で測定できるもの。

b) **マグネチックスターラー**

c) **高速遠心分離機**: 8000 $\times g$ ~10 000 $\times g$  で遠心分離可能なもの。

**備考 2.** カラムは Discovery C18、Inert Sustain C18、シリカ C18M 4D、Mightysil RP-18GP、STR ODS-II、TSKgel ODS-100Z 等の名称で市販されている。

(4) **試験操作**

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

(4.1.1) **固形分析用試料**

- a) 分析試料<sup>(3)</sup> 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。
- b) 水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液<sup>(4)</sup>を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管<sup>(5)</sup>にとる。
- d) 遠心力 8000 $\times g$ ~10 000 $\times g$  で約 5 分間遠心分離し<sup>(6)</sup>、上澄み液を試料溶液とする。

**注 (3)** 一部の肥料においては未粉碎での保管中に 3,4-ジメチルピラゾールリン酸塩(DMPP)含有量が低下するため、試料は入手後速やかに粉碎すること。

(4) 試料溶液中の 3,4-ジメチルピラゾールリン酸塩(DMPP)濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(5) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(6) 回転半径 7.2 cm~8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 8000 $\times g$ ~10 000 $\times g$  程度となる。

**備考 3.** (4.1.1)c)~d)の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフの測定条件**: 測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

- 1) **カラム**: オクタデシルシリル化シリカゲルカラム(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$ )
- 2) **カラム槽温度**: 40  $^{\circ}\text{C}$
- 3) **溶離液**<sup>(1)</sup>: リン酸二水素ナトリウム二水和物 1.56 g を水に溶かして 1000 mL とし、これにアセトニトリル 175 mL を混合する。親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5  $\mu\text{m}$  以下)でろ過する。
- 4) **流量**: 0.7 mL/min
- 5) **注入量**: 10  $\mu\text{L}$

**6) 検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 224 nm

**備考 4.** 溶離液は、りん酸二水素ナトリウム二水和物 15.6 g を水に溶かして 1000 mL としたものを冷蔵保存 (1 °C~8 °C) し、使用時にその一定量を 10 倍に希釈し、これに 0.175 倍量のアセトニトリルを混合した後、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過して調製してもよい。この冷蔵保存したりりん酸二水素ナトリウム二水和物溶液は 6 か月使用可能だが、使用にあたっては、浮遊物が無いこと、標準液の保持時間及びピーク面積に異常がないことを確認すること。

**b) 検量線の作成**

- 1) 検量線用標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 224 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積を求める。
- 2) 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩 (DMPP) の濃度と波長 224 nm のピーク面積との比で検量線を作成する。

**c) 試料の測定**

- 1) 試料溶液 10 μL を **b) 1)** と同様に操作してピーク面積を求める。
- 2) 検量線から 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩 (DMPP) の濃度を求め、分析試料中の 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩 (DMPP) を算出する。

**備考 5.** 真度評価のため、3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩 (DMPP) 非含有の尿素、化成肥料及び配合肥料各 1 銘柄を用いて 3 点併行で添加回収試験を実施した結果、0.01 % (質量分率) ~ 0.5 % (質量分率) の添加レベルでの平均回収率は 96.9 % ~ 101.3 % であった。

尿素、混合窒素肥料、化成肥料 (4 点) 及び配合肥料を用いた、日を変えての繰り返し分析の結果について一元配置分散分析を用いて解析し、中間精度及び併行精度を推定した結果を表 1 に示す。

また、試験法の性能を評価するため、国際的に標準とされる妥当性確認方法で室間共同試験を実施し、併行精度及び室間再現精度を推定した解析結果を表 2 に示す。この試験法の定量下限は 0.003 % (質量分率) 程度と推定された。なお、室間共同試験には事前に 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩 (DMPP) 含有量の経時変化が小さい試料を用いた。

表1 併行精度及び中間精度の推定結果

試料名	反復試験	平均値 <sup>2)</sup>	$s_r$ <sup>4)</sup>	$RSD_r$ <sup>5)</sup>	$s_{I(T)}$ <sup>6)</sup>	$RSD_{I(T)}$ <sup>7)</sup>
	日数( $T$ ) <sup>1)</sup>	(%) <sup>3)</sup>	(%) <sup>3)</sup>	(%)	(%) <sup>3)</sup>	(%)
尿素	5	0.258	0.0011	0.4	0.0036	1.4
混合窒素肥料	5	0.145	0.0011	0.8	0.0039	2.7
化成肥料1	5	0.105	0.0004	0.4	0.0044	4.1
化成肥料2	5	0.0533	0.0004	0.7	0.0019	3.5
化成肥料3	5	0.0372	0.0003	0.8	0.0012	3.3
化成肥料4	5	0.0325	0.0004	1.4	0.0006	1.9
配合肥料	5	0.0184	0.0004	2.4	0.0005	2.8

1) 2点併行試験を実施した試験日数

2) 平均値(試験日数( $T$ )×併行試験数(2))

3) 質量分率

4) 併行標準偏差

5) 併行相対標準偏差

6) 中間標準偏差

7) 中間相対標準偏差

表2 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

試料名	試験室数 <sup>1)</sup>	平均値 <sup>2)</sup>	$s_r$ <sup>4)</sup>	$RSD_r$ <sup>5)</sup>	$s_R$ <sup>6)</sup>	$RSD_R$ <sup>7)</sup>
		(%) <sup>3)</sup>	(%) <sup>3)</sup>	(%)	(%) <sup>3)</sup>	(%)
調製試料1	11(0)	1.63	0.030	1.8	0.045	2.8
調製試料2	9(2)	0.277	0.010	3.8	0.017	6.0
尿素	10(1)	0.283	0.005	1.9	0.009	3.1
混合窒素肥料	11(0)	0.130	0.004	3.0	0.004	3.3
化成肥料	9(2)	0.0825	0.003	4.0	0.007	8.9
調製試料3	10(1)	0.0184	0.001	5.1	0.001	6.3

1) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)

2) 平均値( $n$ =有効試験室数×試料数(2))

3) 質量分率

4) 併行標準偏差

5) 併行相対標準偏差

6) 室間再現標準偏差

7) 室間再現相対標準偏差

## 参考文献

- 1) 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)

(5) **試験法フローシート** 肥料中の3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)試験法のフローシートを次に示す。

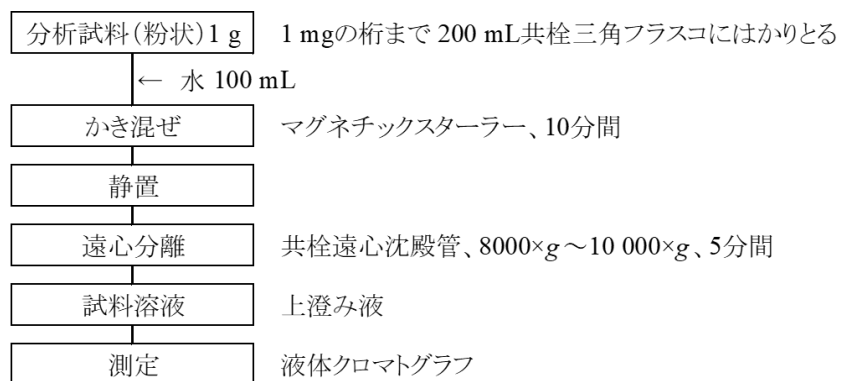
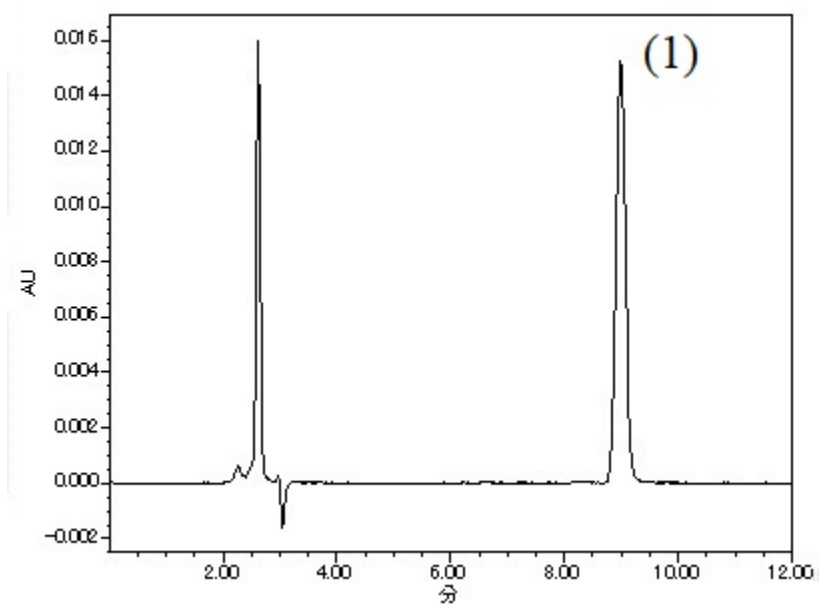


図 肥料中の3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)試験法のフローシート(抽出操作(4.1.1)及び測定)

**参考** 3,4-ジメチルピラゾールリン酸塩 (DMPP) の検量線用標準液のクロマトグラム例を次に示す。



参考図 検量線用標準液(10 µg/mL)の HPLC クロマトグラム

ピーク名

(1) 3,4-ジメチルピラゾールリン酸塩 (DMPP)

HPLC の測定条件

カラム: Discovery C18(内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm)

その他の条件は(4.2 a)HPLC 測定条件の例示のとおり