

12 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 —

白澤優子¹

キーワード 硝酸化成抑制材, 1-アミジノ-2-チオ尿素 (ASU), N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸 (DCS), 2-スルファニルアミドチアゾール (ST), 高速液体クロマトグラフ法

1. はじめに

肥料中の硝酸化成抑制材は土壌中の亜硝酸菌や硝酸菌を抑えることにより、施肥された肥料が土壌に吸着しやすいアンモニア態のまま長く存在することを目的として開発された材料である。これによって施肥量の削減ができ、同時に省力化も期待されている。現在国内で市販されている肥料に使用されているものは主にジシアンジアミド (Dd), 1-アミジノ-2-チオ尿素 (ASU), N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸 (DCS) 及び 2-スルファニルアミドチアゾール (ST) であり、そのなかで最も使用銘柄の多いジシアンジアミドの測定法については齊木¹⁾によって肥料分析法²⁾における高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法についての改良がされているところである。それ以外の硝酸化成抑制材については千葉³⁾、久保⁴⁾及び白井⁵⁾による分析法の検討が1990～1991年に報告されている。近年、分離能及び耐久性に優れた高速液体クロマトグラフ用のカラムが開発されていることから、肥料等試験法 (2010)⁶⁾の策定にあたり、現在市販されているカラムを用いて1-アミジノ-2-チオ尿素 (ASU), N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸 (DCS) 及び2-スルファニルアミドチアゾール (ST) の標準液のHPLCクロマトグラムを作成し、検量線の直線性が得られる濃度範囲を確認した。また装置の検出下限についても得られたのでその概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 装置及び器具

- (1) 高速液体クロマトグラフ: 島津製作所製 LC-VP シリーズ
- (2) カラム: 関東化学製 (Mightysil RP-18, 内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 µm)

2) 試薬

肥料等試験法 (2010)⁶⁾に従って調製した。

3) 1-アミジノ-2-チオ尿素 (ASU) 測定のための検量線の作成

- (1) 1-アミジノ-2-チオ尿素標準液 (100 µg/mL) 5～25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線まで水を加えた。

¹ (独) 農林水産消費安全技術センター札幌センター

(2) 1-アミノ-2-チオ尿素標準液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2.5~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線まで水を加えた。

(3) 各検量線用標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入して条件1(表1)に示したとおりに測定し、得られたピーク面積又は高さから検量線を作成した。

4) N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸(DCS)測定のための検量線の作成

(1) N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 5~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加えた。

(2) N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2.5~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノールを加えた。

(3) 各検量線用標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入して条件2(表2)に示したとおりに測定し、得られたピーク面積又は高さから検量線を作成した。

5) 2-スルファニルアミドチアゾール(ST)測定のための検量線の作成

(1) 2-スルファニルアミドチアゾール標準液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 5~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノール-水 (1+1) を加えた。

(2) 2-スルファニルアミドチアゾール標準液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2.5~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までメタノール-水 (1+1) を加えた。

(3) 各検量線用標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入して条件3(表3)に示したとおりに測定し、得られたピーク面積又は高さから検量線を作成した。

表1 条件1

カラム温度	30 $^{\circ}\text{C}$
溶離液	メタノール-水 (2+8) 1,000 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)でろ過した。
流量	1 mL/min
検出波長	262 nm

表2 条件2

カラム温度	30 $^{\circ}\text{C}$
溶離液	メタノール-水 ¹⁾ (55+45)
流量	0.8 mL/min
検出波長	246 nm

1) 使用する水は、予めりん酸でpH 3 に調整した。

表3 条件3

カラム温度	30 $^{\circ}\text{C}$
溶離液	メタノール-水 (2+8)
流量	1 mL/min
検出波長	285 nm

6) 装置の検出下限の確認

(1) 1-アミノ-2-チオ尿素標準液、N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液及び 2-スルファニルアミドチアゾール標準液のそれぞれについて薄い濃度 (0.01~0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のものを7回ずつ測定し、その相対標

準偏差を求めた。相対標準偏差が 1 % 程度となる濃度から、装置の検出下限を推定した。

3. 結果および考察

1) 1-アミノ-2-チオ尿素測定のための検量線及び装置の検出下限

肥料等試験法(2010)⁶⁾における高速液体クロマトグラフ法の 1-アミノ-2-チオ尿素の測定のための検量線を図 1-1 に示した。その結果、1~50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で回帰式 $y = 51080x - 984$ で、決定係数 $r^2 = 1.0000$ と十分に利用できる検量線が得られた。現在、登録を受けている肥料中の 1-アミノ-2-チオ尿素の含有量が主に 0.5 % 程度であり、さらに抽出操作時に 100 倍に希釈されることから測定に適用できることを確認した。また装置の検出下限は 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 程度であると推定された。なお、参考のため、検量線用 1-アミノ-2-チオ尿素標準液の HPLC クロマトグラムを図 1-2 に示した。

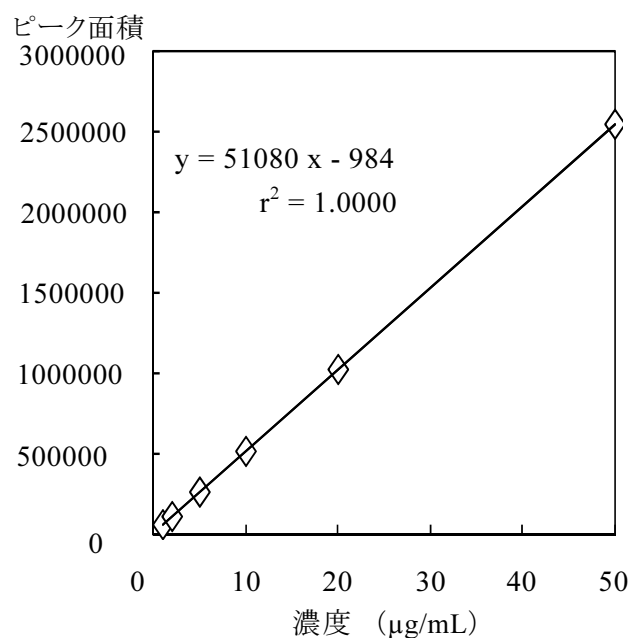


図 1-1 1-アミノ-2-チオ尿素の検量線

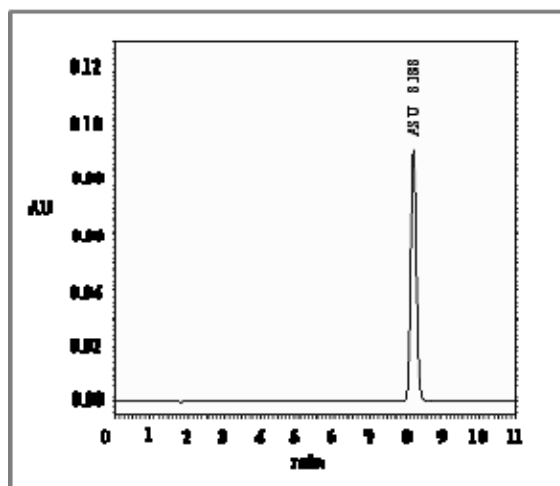


図 1-2 1-アミノ-2-チオ尿素標準液の HPLC クロマトグラム

HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 15 cm、粒径 5 μm)

1-アミノ-2-チオ尿素標準液 (200 ng 相当量)

その他の条件は表 1 を参照

2) N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸測定のための検量線

肥料等試験法 (2010)⁶⁾における N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸の測定のための検量線を図 2-1 に示した。その結果, 1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で回帰式 $y=25854x + 112$ で, 決定係数 $r^2=1.0000$ と十分に利用できる検量線が得られた。現在, 登録を受けている肥料中の N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸の含有量が主に 0.06~0.36 % 程度であり, さらに抽出操作時に 100 倍に希釈されることから測定に適用できることを確認した。また装置の検出下限は 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度であると推定された。なお, 参考のため, 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 HPLC クロマトグラムを図 2-2 に示した。

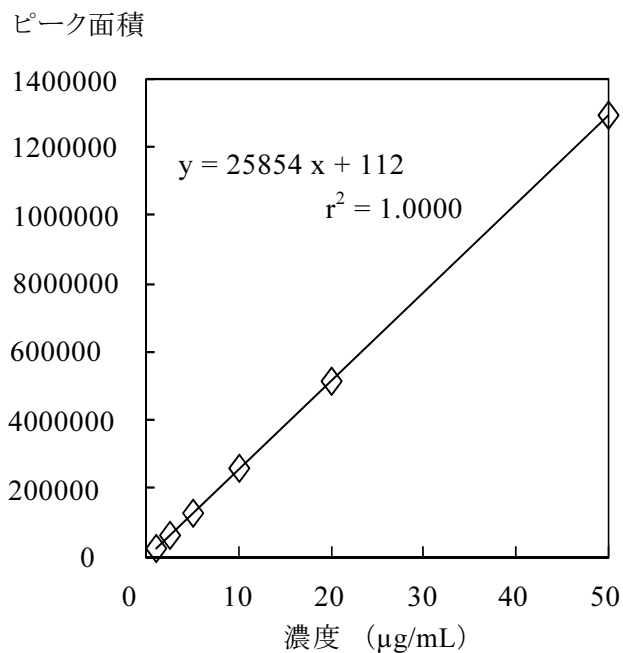


図 2-1 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸の検量線

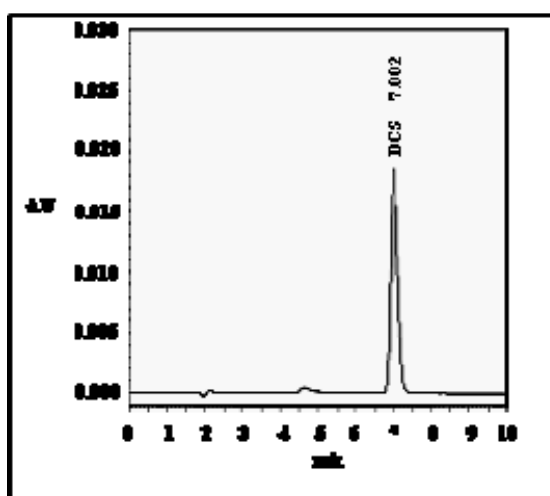


図 2-2 N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸の HPLC クロマトグラム

HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 15 cm、粒径 5 µm)

N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸標準液 (100 ng 相当量)

その他の条件は表 2 を参照

3) 2-スルファニルアミドチアゾール測定のための検量線

肥料等試験法 (2010)⁶⁾ における 2-スルファニルアミドチアゾールの測定のための検量線を図 3-1 に示した。

その結果, 1~50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で回帰式 $y=44979x - 10302$ で, 決定係数 $r^2=0.9999$ と十分に利用できる検量線が得られた. 現在, 登録を受けている肥料中の 2-スルファニルアミドチアゾールの含有量が主に 0.07~0.45 % 程度であり, さらに抽出操作時に 100 倍に希釈されることから測定に適用できることを確認した. また装置の検出下限は 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 程度であると推定された. なお, 参考のため, 検量線用 2-スルファニルアミドチアゾール標準液の HPLC クロマトグラムを図 3-2 に示した.

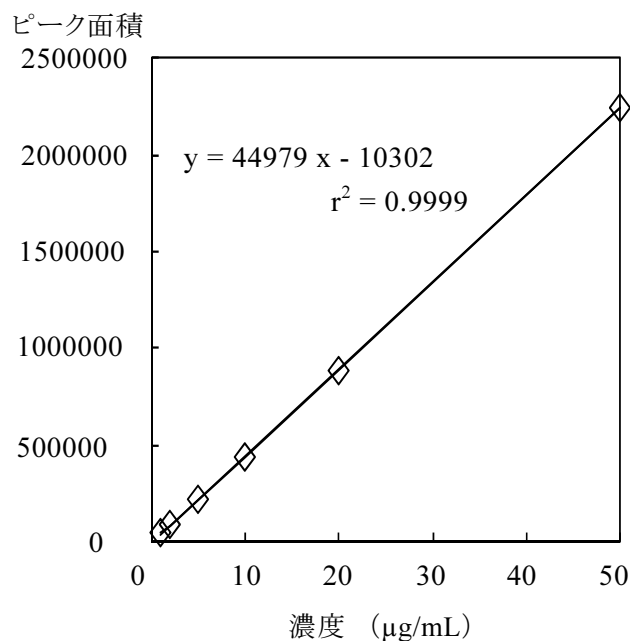


図 3-1 2-スルファニルアミドチアゾールの検量線

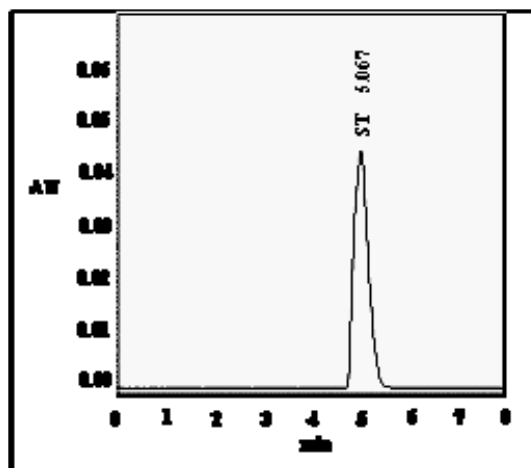


図 3-2 2-スルファニルアミドチアゾールの HPLC クロマトグラム

HPLC の測定条件

カラム: Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm、長さ 15 cm、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)

その他の条件は表 2 を参照

4. まとめ

1-アミノ-2-チオ尿素, N-2,5-ジクロロフェニルスクシナミド酸及び 2-スルファニルアミドチアゾールの測定のための検量線を作成したところ, いずれも 1~50 µg/mL の濃度範囲で直線性を示した. 検量線のプロットの最低濃度及び最高濃度から算出した分析試料中のそれぞれの成分の含有量は, 現在肥料中で使用されている量を測定できる量であった. 以上, いずれの検量線もそれぞれの成分測定に用いることができる十分な性能を有することが確認された. また装置の検出下限について確認したところ, いずれも 0.1 µg/mL 程度と推定された. このことから, これら硝酸化成抑制材の測定のための検量線法が肥料等試験法(2010)⁶⁾に採用された.

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の測定 — 高速液体クロマトグラフ法の改良 —, 肥料研究報告, **3**, 42~49 (2010)
- 2) 農林水産省農業環境技術研究所: 肥料分析法 (1992年版), p.21~22, p.34~37, p.70~71, 日本肥糧検定協会, 東京 (1992)
- 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) 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) 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)
- 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 (2010)
< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html> >