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（1000 μg/mL）[(1)(2)]： 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール ［$C_2H_4N_4$］[(3)] 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 褐色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。

e） 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液（100 μg/mL）： 使用時に 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液（1000 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（100 μg/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イ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 ℃～45 ℃ 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×*g*～10 000×*g* で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Hibar LiChrosorb NH_2、Inertsil NH_2、Unison UK-Amino、Mightysil NH_2、Shim-pack CLC-NH_2、Shodex NH-5A、Unisil Q NH_2 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 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、上澄み液を(4) 1.5 mL 共栓遠心沈殿管(5) に 1.5 mL 程度とる。

d） 遠心力 8000×*g*～10 000×*g* で約 5 分間遠心分離し(6)、上澄み液を試料溶液とする。

注（**4**） 試料溶液中の 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール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**） ポリプロピレン製等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 8100×*g*～10 000×*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 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**： 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 μm）

2） **カラム槽温度**： 30 °C～40 °C

3） **溶離液**： アセトニトリル－メタノール（9+1）

4） **流量**： 1 mL/min

5） **検出器**： 吸光光度検出器、測定波長 220 nm

b） **検量線の作成**

1） 各検量線用 4-アミノ-1,2,4-トリアゾール標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 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。

2） 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**

1） 試料溶液 10 μL を **b**）**1**）と同様に操作する。

2） 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。

3） 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×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。

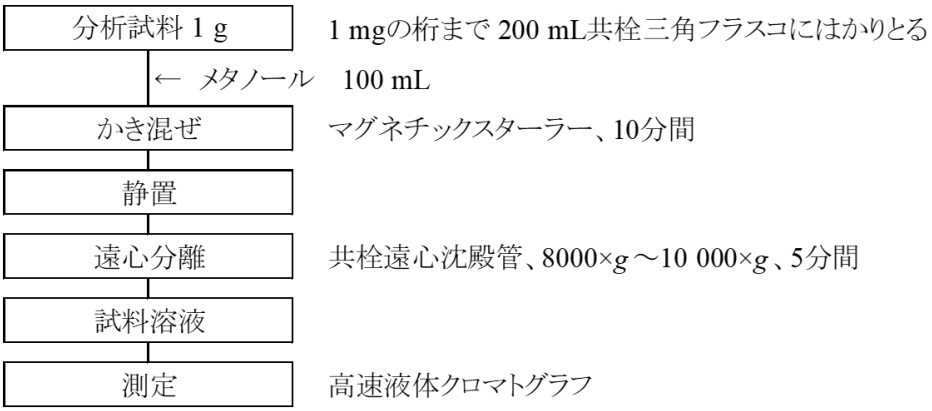


図 肥料中の4-アミノ-1,2,4-トリアゾール塩酸塩（ATC）試験法フローシート