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（1000 μg/mL）(1)： 2-スルファニルアミドチアゾール ［$C_9H_9N_3O_2S_2$］(2)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（100 μg/mL）： 使用時に 2-スルファニルアミドチアゾール標準液（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－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（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－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(3)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_{18}、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 50 mL 程度とる。

d） 遠心力 1700×*g* で約 5 分間遠心分離し(4)、上澄み液を抽出液(5)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(6)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(7)、上澄み液を試料溶液とする。

注（**6**） 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。

（**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。

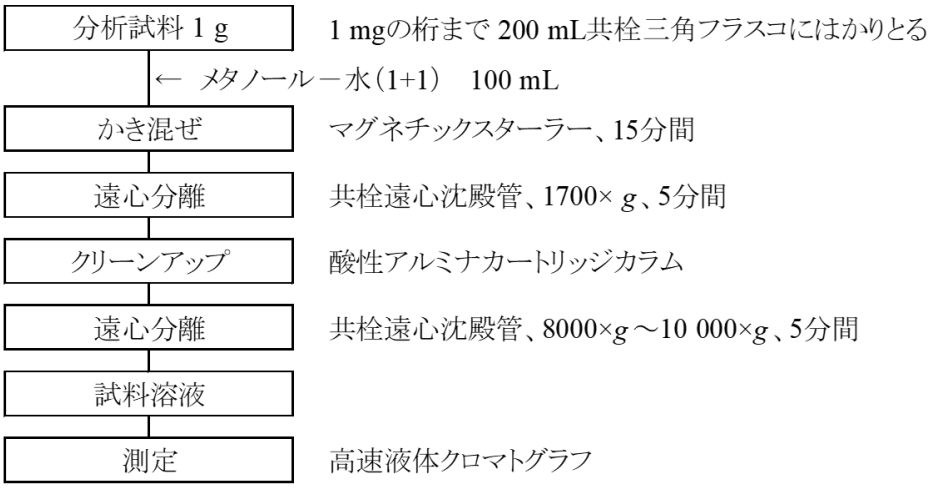
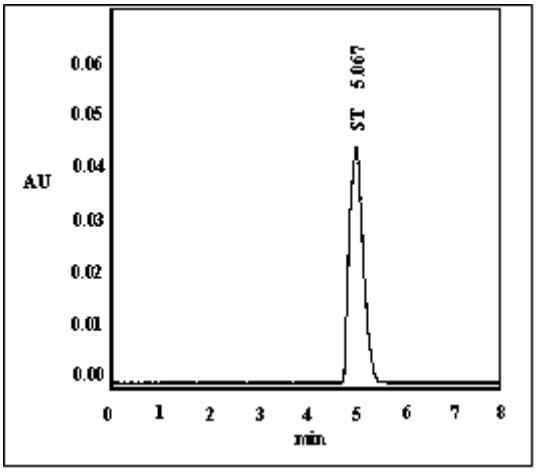


図　肥料中の2-スルファニルアミドチアゾール(ST)試験法フローシート

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