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て 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩（DMPP）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 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（2000 μg/mL）(1)： 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩（DMPP）［$C_5H_{11}N_2O_4P$］(2) 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）(1)： 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩標準液（DMPP 2000 μg/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）(1)： 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩標準液（DMPP 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）(1)： 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）(1)： 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、富士フイ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（2.019）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 μm 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 °C～45 °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×*g*～10 000×*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。

a) 分析試料(3) 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(4)を 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(**3**) 一部の肥料においては未粉砕での保管中に 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)含有量が低下するため、試料は入手後速やかに粉砕すること。

(**4**) 試料溶液中の 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(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 8000×*g*～10 000×*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 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**: 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 μm)

2) **カラム槽温度**: 40 °C

3) **溶離液**(1): りん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 μm 以下)でろ過する。

4) **流量**: 0.7 mL/min

5) **注入量**: 10 μL

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分析結果について、一元配置分散分析を用いて解析し、併行精度及び中間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　DMPPの日を変えた試験成績の解析結果

試料名	日数[1] T	平均値[2] (%)[3]	併行精度 s_r[4] (%)[3]	併行精度 RSD_r[5] (%)	中間精度 $s_{I(T)}$[6] (%)[3]	中間精度 $RSD_{I(T)}$[7] (%)
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点併行分析を実施した日数
2） 平均値（n= 日数（T）×併行数(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[1]	平均値[2] (%)[3]	s_r[4] (%)[3]	RSD_r[5] (%)	s_R[6] (%)[3]	RSD_R[7] (%)
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)

2） 平田絵理香, 橋本良美, 大島舞弓: HPLC を用いた肥料中の DMPP（硝酸化成抑制材）の分析法の性能評価 －室間共同試験による妥当性確認－, 肥料研究報告, **15**, 54~65(2022)

(5) 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)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。

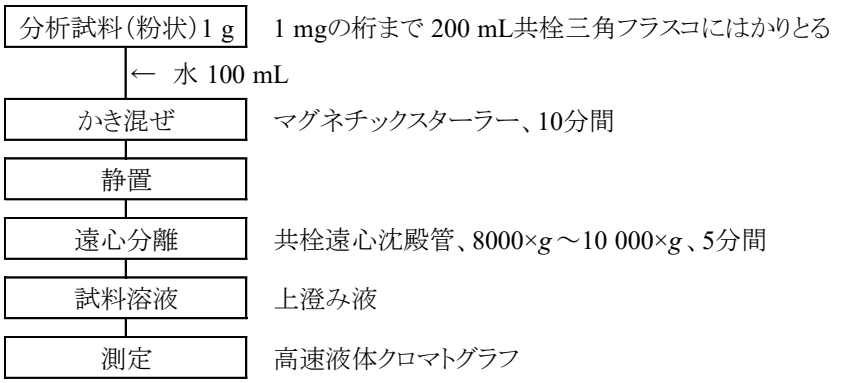
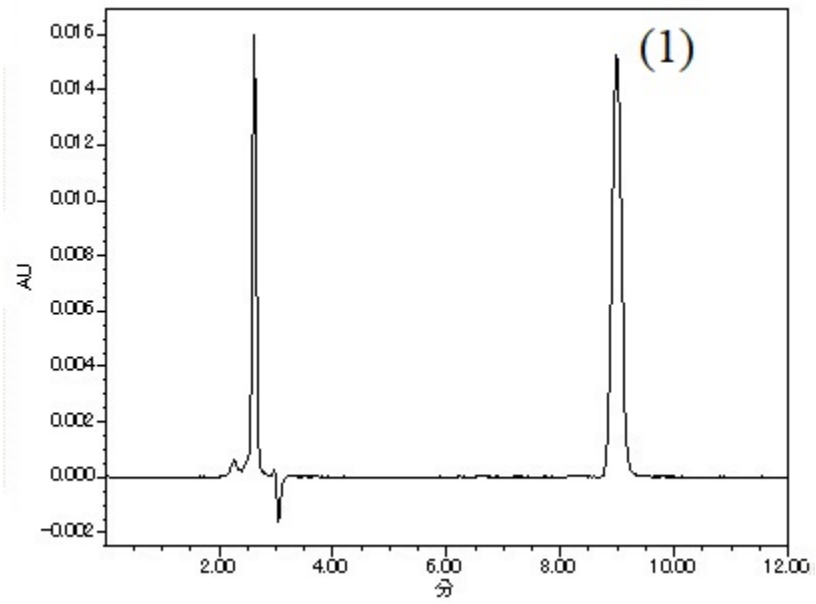


図 肥料中の3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩(DMPP)試験法のフローシート (抽出操作(4.1.1)及び測定)

参考 3,4-ジメチルピラゾールりん酸塩（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りん酸塩（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