8.6 尿酸

8.6.a 高速液体クロマトグラフ法

(1) 概要

この試験法は肥料に適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.6.a-2018 又は U-acid.a-1 とする。

分析試料にりん酸塩溶液(pH 8)を加えて尿酸を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、マルチモード ODS(逆相+強アニオン交換+強カチオン交換+順相)カラムで分離し、波長 290 nm で測定し、分析試料中の尿酸(U-acid)を求める。この方法の性能は**備考 5** に示す。

(2) 試薬 試薬及び水は、次による。

a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。ただし、高速液体クロマトグラフに導入する溶離液については同 A4 の水を使用する。

b) りん酸二水素カリウム: JIS K 9007 に規定する試薬又は同等の品質のもの。

c) りん酸水素二ナトリウム: JIS K 9020 に規定する試薬又は同等の品質のもの。

d) りん酸塩溶液: りん酸二水素カリウム 9.073 g を水に溶かして 1000 mL としたもの、及びりん酸水素二ナトリウム 9.464 g を水に溶かして 1000 mL としたものを、pH 8.0±0.1 になるよう混合したもの。

e) 炭酸リチウム溶液: 純度 99 %(質量分率)以上の炭酸リチウム(Li_2CO_3)0.739 g を水に溶かして 1000 mL としたもの。

f) 尿酸標準液(U-acid 1000 µg/mL)(1): 尿酸 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。少量の炭酸リチウム溶液に溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで炭酸リチウム溶液を加える。

g) 検量線用尿酸標準液(U-acid 100 µg/mL): 尿酸標準液(U-acid 1000 µg/mL)10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線までりん酸塩溶液を加える。

h) 検量線用尿酸標準液(U-acid 10 µg/mL～50 µg/mL): 尿素性窒素標準液(U-acid 100 µg/mL)10 mL～50 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線までりん酸塩溶液を加える。

i) 検量線用尿酸標準液(U-acid 0.1 µg/mL～5 µg/mL): 使用時に尿酸標準液(U-acid 10 µg/mL)1 mL～50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までりん酸塩溶液を加える。

j) 酢酸アンモニウム: JIS K 8359 に規定する試薬又は同等の品質のもの。

k) メタノール: 高速液体クロマトグラフ用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。

(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 250 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 3 µm のオクタデシル基、強酸性用イオン交換基及び強塩基性陰イオン交換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 290 nm 付近で測定できるもの。

b) 水浴: 60 °C±2 °C に調節できるもの。

c) マグネチックスターラー

d） **遠心分離機**： 1700×*g* で遠心分離可能なもの。

e） **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 Scherzo SS-C18 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） りん酸塩溶液 100 mL を加え(2)、60 °C±2 °C の水浴中で 10 分ごとに振り混ぜながら(3)30 分間加熱する。

c） 直ちにマグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。

d） 静置後、上澄み液を 50 mL 共栓遠心沈殿管(4)に 50 mL 程度とり、遠心力 1700×*g* で約 10 分間遠心分離する(5)。

e） 上澄み液(6)を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管(4)に 1.5 mL 程度とり、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（**2**） 溶液を加熱するため、ガラス栓に替えてシリコン栓を用いる。

（**3**） 蒸気でシリコン栓が飛び易いので指で軽くシリコン栓を上から押さえながら、フラスコ内壁の水滴をできるだけ落とすように振る。なお、加熱操作前後にもこの操作を行う。

（**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 3000 rpm で遠心力 1700×*g* 程度となる。

（**6**） 試料溶液中の尿酸（U-acid）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りん酸塩溶液で希釈する。

（**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 2. （**4.1**）**e**）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**： オクタデシル基、強酸性用イオン交換基及び強塩基性陰イオン交換基を化学結合したシリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 3 μm）

2） **カラム槽温度**： 40 °C

3） **溶離液**(1)： 酢酸アンモニウム 1.54 g を水に溶かして 1000 mL としたものを 900 mL とり、メタノール 100 mL と混合する。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**： 0.4 mL/min

5） **注入量**： 10 μL

6） **検出器**： 吸光光度検出器、測定波長 290 nm

備考 3. 溶離液は、酢酸アンモニウム 15.4 g を水に溶かして 1000 mL として冷蔵保存し、使用時にその一定

量を 10 倍に希釈し、体積比で 1/9 のメタノールと混合後、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。

b） 検量線の作成

1） 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、波長 290 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積または高さを求める。

2） 各検量線用標準液の尿酸（U-acid）濃度と波長 290 nm のピーク面積または高さ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） ピーク面積または高さから検量線より尿酸（U-A）量を求め、分析試料中の尿酸（U-A）を算出する。

備考 4. この測定方法（Scherzo SS-C18 カラムを用いた場合）では、尿酸に加えアラントイン及びアラントイン酸を同時に測定することができる。なお、アラントイン及びアラントイン酸の検出波長は 210 nm である。

備考 5. 真度の評価のため、化成肥料、汚泥発酵肥料、混合堆肥複合肥料及び堆肥各 1 銘柄を用いて添加回収試験を実施した結果、0.1 %（質量分率）、0.01 %（質量分率）及び 0.005 %（質量分率）の添加レベルでの平均回収率はそれぞれ 92.4 %～101.8 %、85.3 %～105.0 %及び 92.5 %～114.1 %であった。

精度の評価のため、化成肥料、汚泥発酵肥料、混合堆肥複合肥料及び堆肥各 1 銘柄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算出した結果を表 1 に示す。

なお、この試験法の定量下限は 0.0008 %（質量分率）程度と推定された。

表1　尿酸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] (%)
化成肥料	5	0.0989	0.0006	0.6	0.0015	1.6
	5	0.0102	0.0001	0.7	0.00042	4.2
汚泥発酵肥料	5	0.0932	0.0004	0.5	0.0016	1.7
	5	0.00938	0.00009	0.9	0.00031	3.3
混合堆肥複合肥料	5	0.0924	0.0004	0.4	0.0015	1.7
	5	0.00921	0.00005	0.6	0.00032	3.5
堆肥	5	0.101	0.001	1.3	0.0029	2.8
	5	0.00966	0.00018	1.8	0.00049	5.0

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

参考文献

1） 船木紀夫： 高速液体クロマトグラフ（HPLC）法による肥料中の尿酸の測定, 肥料研究報告, **11**, 86~105 (2018)

（**5**） **尿酸試験法フローシート** 肥料中の尿酸試験法のフローシートを次に示す。

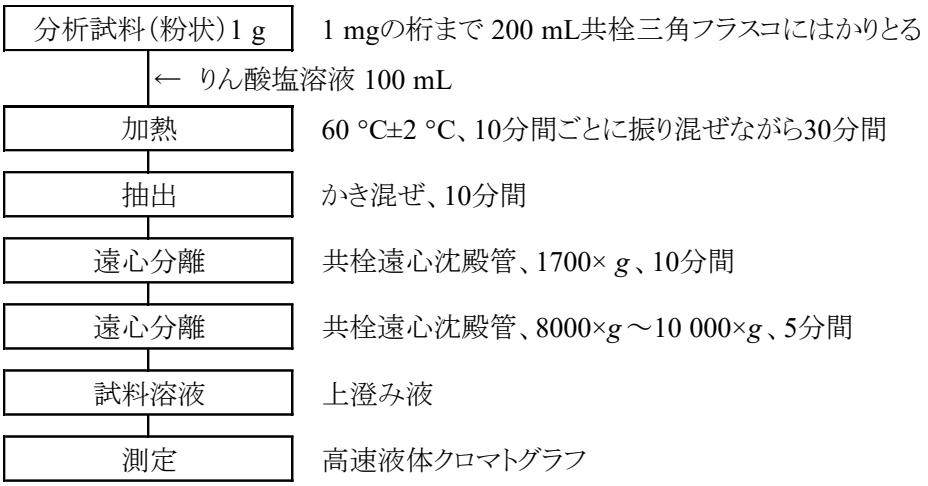
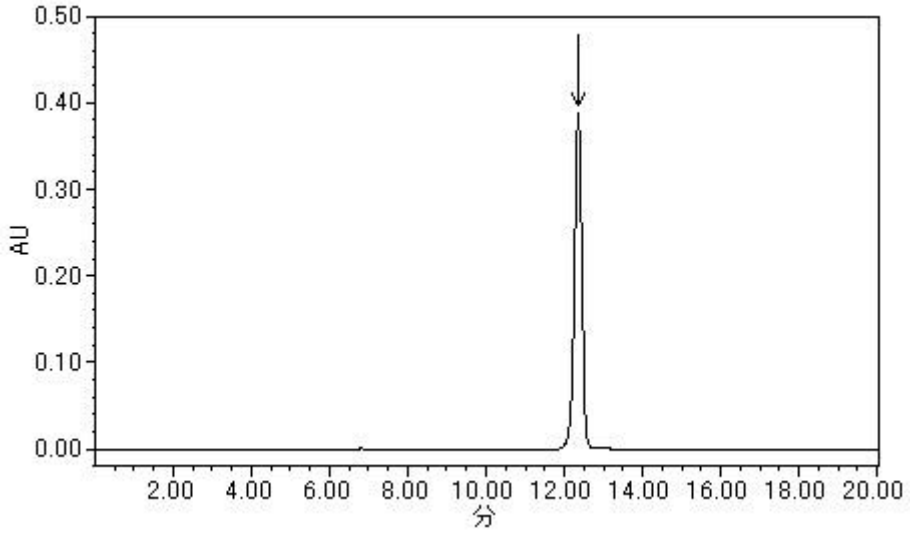


図　肥料中の尿酸試験法のフローシート

参考　尿酸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　検量線用尿酸標準液（50 µg/mL）の HPLC クロマトグラム

ピーク名　（↓） 尿酸

HPLC の測定条件

カラム： Scherzo SS-C18（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 3 µm）

その他の条件は（**4.2**）**a**）HPLC 測定条件の例示のとおり