

8 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

船木紀夫¹

キーワード 尿酸, 高速液体クロマトグラフィー, リン酸緩衝液, 家きん由来原料

1. はじめに

尿酸は、家きん由来の肥料中に含まれる窒素の主要形態であり、ウリカーゼ等の作用により土壤中でアラントイン、アラントイン酸及び尿素を経由して速やかに分解する(Fig. 1)ことから、有効態の窒素として評価されている。このことから、肥料中の尿酸を定量することは、肥料の特性や肥効発現の様相を知る上で重要であるだけでなく、肥料中の家きん由来原料の含有量を判断する指標になると考えられる。

従来、肥料及び堆肥中の尿酸の分析法としては、吸光光度法により測定する方法が、詳解肥料分析法¹⁾に記載がある他、多く報告されている^{2~10)}が、どの分析法も、前処理工程が長く分析操作に習熟を要する、妥当性が確認されていない、等の問題がある。そこで、肥料中の尿酸の含有量を簡便に確認することを目的に、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による肥料中の尿酸分析時における選択性、真度、精度、定量下限、添加回収率、中間精度及び併行精度等の検討を行ったので、それらの概要を報告する。

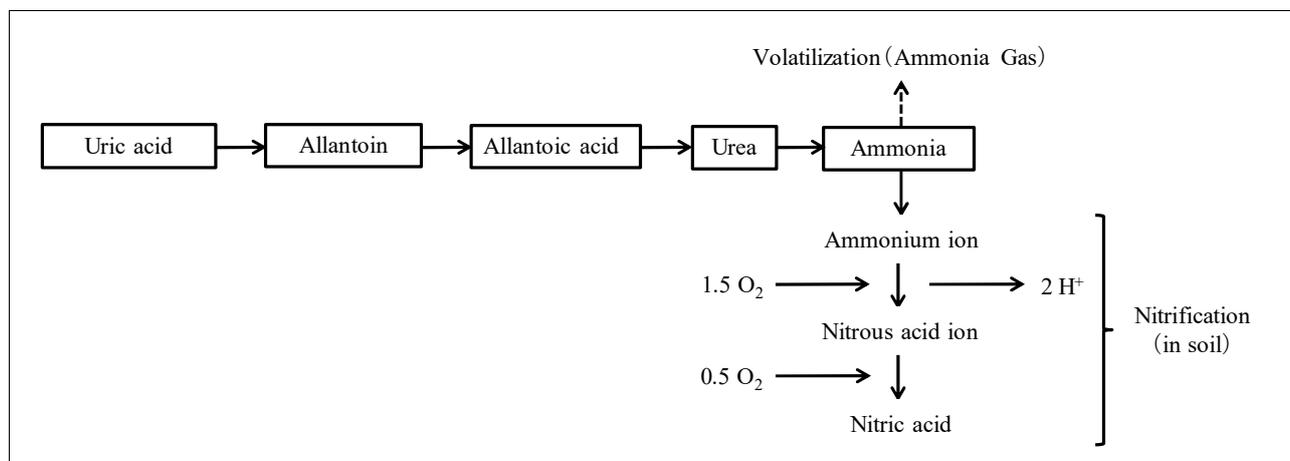


Fig. 1 The pathway of uric acid metabolism

2. 材料及び方法

1) 供試試料

供試試料として市販の流通肥料 24 点(化成肥料, 汚泥発酵肥料, 混合堆肥複合肥料, 堆肥及び動物の排せつ物(うずらふん))を供試した。汚泥発酵肥料, 堆肥及び動物の排せつ物は 65 °C の恒温乾燥器にて 10 時間乾燥した後に、他の種類の肥料は乾燥せずに、それぞれ超遠心粉碎機を用いて 500 μm 以下に粉碎した。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

2) 試薬等の調製

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水.
- (2) pH 7, pH 8 及び pH 9 の 1/15 mol/L りん酸緩衝液: JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 9.073 g を水に溶かして 1000 mL としたもの, 及び JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4) 9.464 g を水に溶かして 1000 mL としたものを, pH がそれぞれ 7.0 ± 0.1 , 8.0 ± 0.1 及び 9.0 ± 0.1 になるよう混合して使用した.
- (3) 0.1 mol/L ピロリン酸ナトリウム溶液: ピロリン酸ナトリウム ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 26.6 g を水に溶かして 1000 mL とした.
- (4) 0.4 % 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) 4 g を水に溶かして 1000 mL とした.
- (5) 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液: JIS K 8576 に規定する水酸化ナトリウム (NaOH) 4 g を水に溶かして 1000 mL としたもの.
- (6) 0.01 mol/L 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) 0.74 g を水に溶かして 1000 mL とした.
- (7) 尿酸標準液 (1000 $\mu\text{g/L}$): 尿酸 [$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$] (和光純薬工業, 特級) を 0.100 g はかりとり, 0.01 mol/L 炭酸リチウム溶液に溶かして 100 mL とした.
- (8) アラントイン標準液 (1000 $\mu\text{g/L}$): アラントイン [$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3$] (関東化学, 特級) を 0.100 g はかりとり, 水に溶かして 100 mL とした.
- (9) アラントイン酸標準液 (1000 $\mu\text{g/L}$): アラントイン酸 [$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_5$] (和光純薬工業) を 0.100 g はかりとり, 0.01 mol/L 炭酸リチウム溶液に溶かして 100 mL とした.
- (10) 検量線用混合標準液 (0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~ 100 $\mu\text{g/mL}$): 尿酸標準液, アラントイン標準液及びアラントイン酸標準液の一定量を混合し, 抽出液で順次希釈して 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ 及び 100 $\mu\text{g/mL}$ の検量線用混合標準液をそれぞれ調製した.
- (11) 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液: JIS K 8359 に規定する酢酸アンモニウム ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) を 1.54 g はかりとり, 水に溶かして 1000 mL とした.
- (12) メタノール: HPLC 用

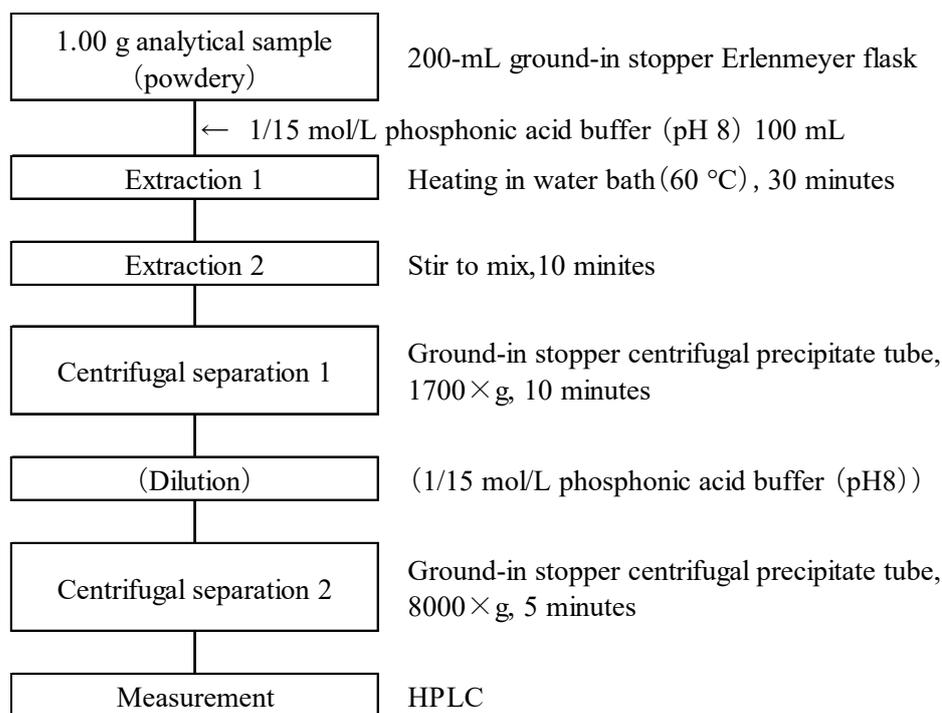
3) 器具及び装置

- (1) 高速液体クロマトグラフ: Waters 2695 Separation module, 2996 photo diode Array Detector
- (2) カラム: Scherzo SS-C18: 長さ 250 mm L × 内径 4.6 mm I.D., 粒径 3 μm
- (3) マグネチックスターラー: 東京硝子器械 F-626N
- (4) 遠心分離機: 日立工機 himac SCT 5BA
- (5) 超遠心分離機: KUBOTA 6800
- (6) 超遠心粉碎機: ZM-200 Retsch

4) 試験操作

(1) 抽出

粉状にした分析用試料 1.00 g を共栓三角フラスコ 200 mL にはかり取り, 1/15 mol/L リン酸緩衝液 (pH 8.0 ± 0.1, 以下 pH 8) を 100 mL 加え, 軽くシリコン栓をし, 60 ± 2 °C になるよう設定したウォーターバスで約 30 分間加熱 (10 分ごとに軽く振とう) 後, 直ちにマグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜた. 抽出液を 15 mL または 50 mL の遠心沈殿管にとり, 1700 × g で 10 分間遠心分離した後, さらに 8000 × g で 5 分間遠心分離したものを, HPLC 測定用試料溶液とした (Scheme 1).



Scheme 1 Method flow sheet of uric acid in fertilizers

(2) HPLC による測定

各検量線用混合標準液 10 μL を HPLC に注入し, Table 1 の測定条件で測定して得られたピーク高さから検量線を作成した. 試料溶液 10 μL を HPLC に注入し, ピーク高さから検量線により試料液中の尿酸の量を求め, 分析試料中の濃度を算出した. なお, 測定時間については, 妨害ピークが 25~28 分頃に出る試料があったため, 30 分とした.

Table 1 HPLC Conditions

HPLC	Waters 2695 separation module
Detector system	2996 photo diode array detector
Wavelength	290 nm (uric acid) 210 nm (allantoin and allantoic acid)
Column	Scherzo SS-C18 (250 mm L×4.6 mm I.D., 3 μm particle size)
Column temperature	40 °C
Mobile phase	20 mmol/L ammonium acetate - metanol (9+1)
Flow rate	0.4 mL/min
Injection volume	10 μL
Measurement time	30 min

3. 結果及び考察

1) 測定条件の検討

(1) HPLCの分離モード及び検出方法の選択

尿酸と、その代謝物質であるアラントイン及びアラントイン酸のHPLCまたはLC-MSによる測定法として、血清の報告法、ジューエルサイエンス社のカラムアプリケーション、及びインタクト社のカラムアプリケーション等の報告がある^{11~15)} (Table 2). これらのうち、インタクト社の方法¹⁵⁾は、測定波長を210 nmとすることで、尿酸、アラントイン及びアラントイン酸を同時に分析することができるが、他の方法ではアラントインとアラントイン酸を分離できず、また、HILICカラムでは尿酸とアラントインをも分離できないことを確認した。

肥料の種類によっては、家きん由来原料から生じる尿酸が、代謝物質であるアラントインまたはアラントイン酸の形で検出する可能性もあると考え、今後3成分の同時分析が必要となったときにも対応できるよう、本検討ではインタクト社の条件を改良して採用することとした。なお、改良した点は、測定波長、カラム内径及びカラム温度である。改良法によるクロマトグラムの一例をFig. 2に示す。

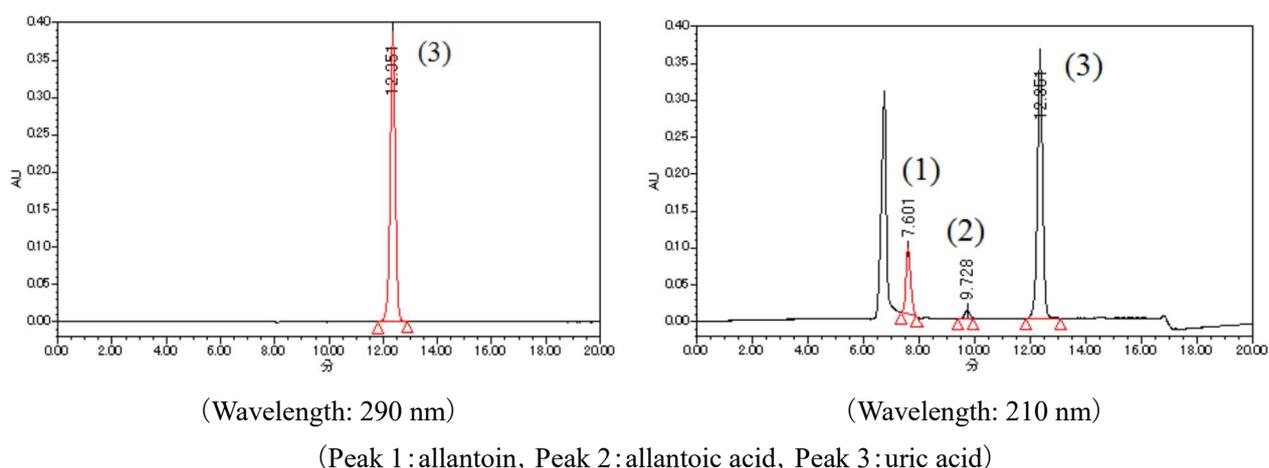


Fig. 2 HPLC chromatogram of mixed standard solution (50 μg/mL) using Scherzo SS-C18
(The solution is diluted with 1/15 mol/L phosphate buffer (pH 8).)

Table 2 The measuring method for uric acid and its metabolite, using HPLC or LC-MS

The name of analytical method or testing organization	Substance	The name of column	Column size ^{a)}	Mobile phase	Flow rate (mL/min)	Wavelength (nm)	m/z
Japanese recommendation method for serum	Uric acid	Inertsil ODS-4	4.6 mm φ 250 mm L 5 μm (P)	74 mmol/L phosphate buffer (pH 2.2) ^{b)}	1.0	284	-
				74 mmol/L phosphate buffer (pH 2.2) ^{b)} - Methanol (98+2)			
Niigata Univ., Japan	Allantoin Allantoic Acid	Symmetry C8	4.6 mm φ 150 mm L 5 μm (P)	Methanol- Water (9+1), added monoethanolamine (0.01 %)	0.8	210 ^{c)}	157 ^{c)} 175
GL Science Corp.	Uric acid Allantoin	Inertsil HILIC	2.1 mm φ 150 mm L 5 μm (P)	Acetonitrile - 2 mmol/L ammonium acetate (9+1)	0.3		169.9 157.9
Ehime Pref., Japan	Allantoin	HILIC Silica	4.6 mm φ 150 mm L Unknown (P)	Acetonitrile - water (95+5)	1.0	195	-
Intakt Corp.	Uric acid Allantoin Allantoic acid	Scherzo SS-C18	3.0 mm φ 250 mm L 3 μm (P)	20 mmol/L ammonium acetate - methanol (9+1)	0.4	210	-

a) φ: Inner diameter, L: Length, (P): Particle size

b) 0.2 mol/L disodium hydrogen phosphate 12-water and 0.5 mol/L phosphoric acid are mixed

c) Measured by LC-MS (Ionization mode: APCI) because of no dividing peaks with allantoin and allantoic acid

(2) 測定波長

溶液中の尿酸等の吸光度曲線を Fig. 3 に示す. インタクト社の方法¹⁵⁾では, 測定波長を 210 nm としているが, 尿酸は 290 nm 及び 235 nm 付近に特異的な吸収をもち, 特に 290 nm では 210 nm よりも高いピーク高さを得られること, また 290 nm においては尿酸の保持時間付近に肥料中の妨害ピークが少なかったことから, 尿酸については測定波長を 290 nm とした.

(3) カラム内径

インタクト社の方法¹⁵⁾では 3.0 mm とされていたが, 流速 0.4 mL/min の条件では HPLC システムで使用する検出器について, 流路内圧力がメーカー推奨範囲を大幅に超えたため, それを超えないようカラム内径をより大きな 4.6 mm のものに変更した.

(4) カラム温度

インタクト社の方法¹⁵⁾では 50 °C とされていたが, 溶離液中メタノールのカラム内での膨張に由来すると考えられる, 流路内圧力の急激な増加がみられたことから, カラム温度は 40 °C とした.

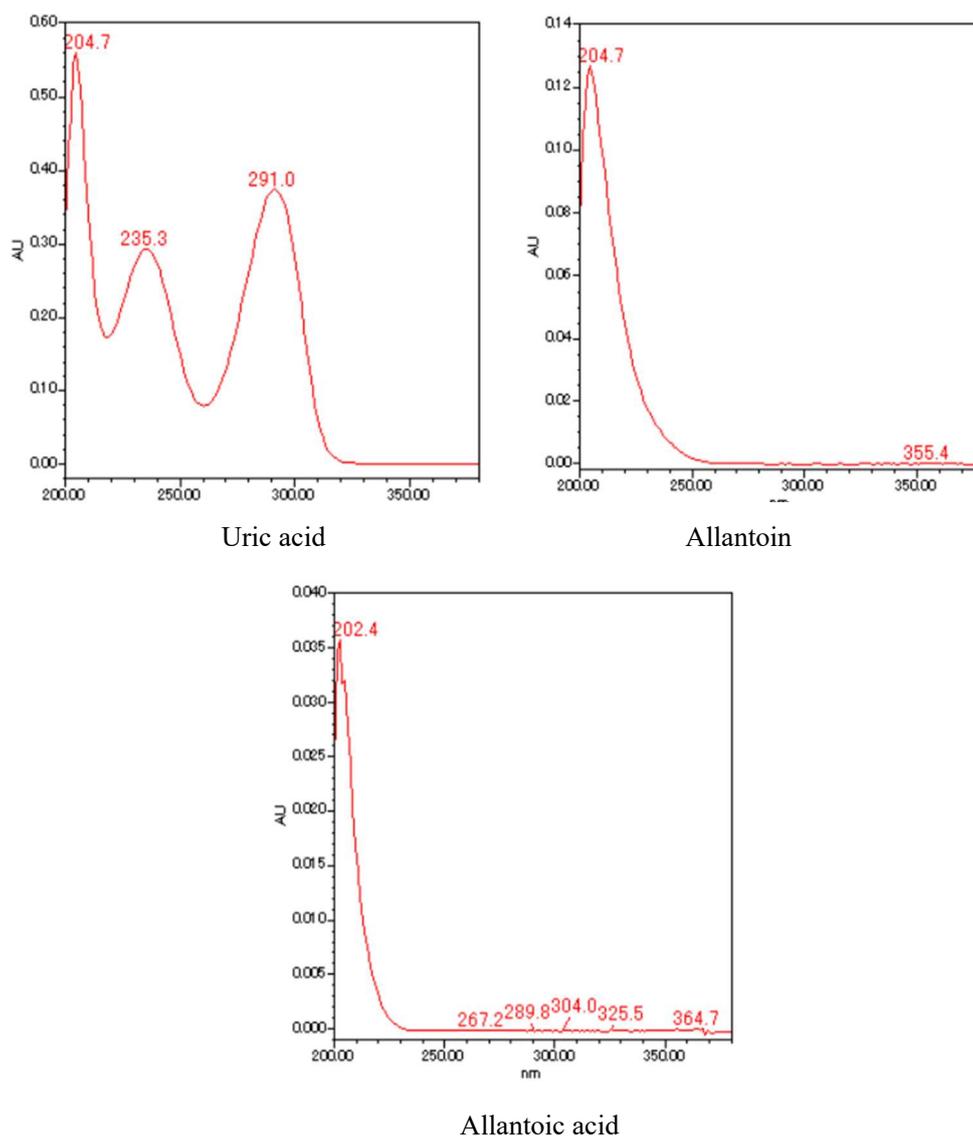


Fig. 3 Absorbance curves of uric acid, allantoin and allantoic acid (50 $\mu\text{g/mL}$)

2) 検量線の直線性の検討

各検量線用混合標準液(0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$)を本法に従ってHPLCに注入し、得られたクロマトグラムのピーク高さから検量線を作成した(Fig. 4). 尿酸は0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 相当量の範囲で高い直線性が得られた. なお, アラントインは2.5 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 相当量の範囲, アラントイン酸は5 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 相当量の範囲で高い直線性が得られた.

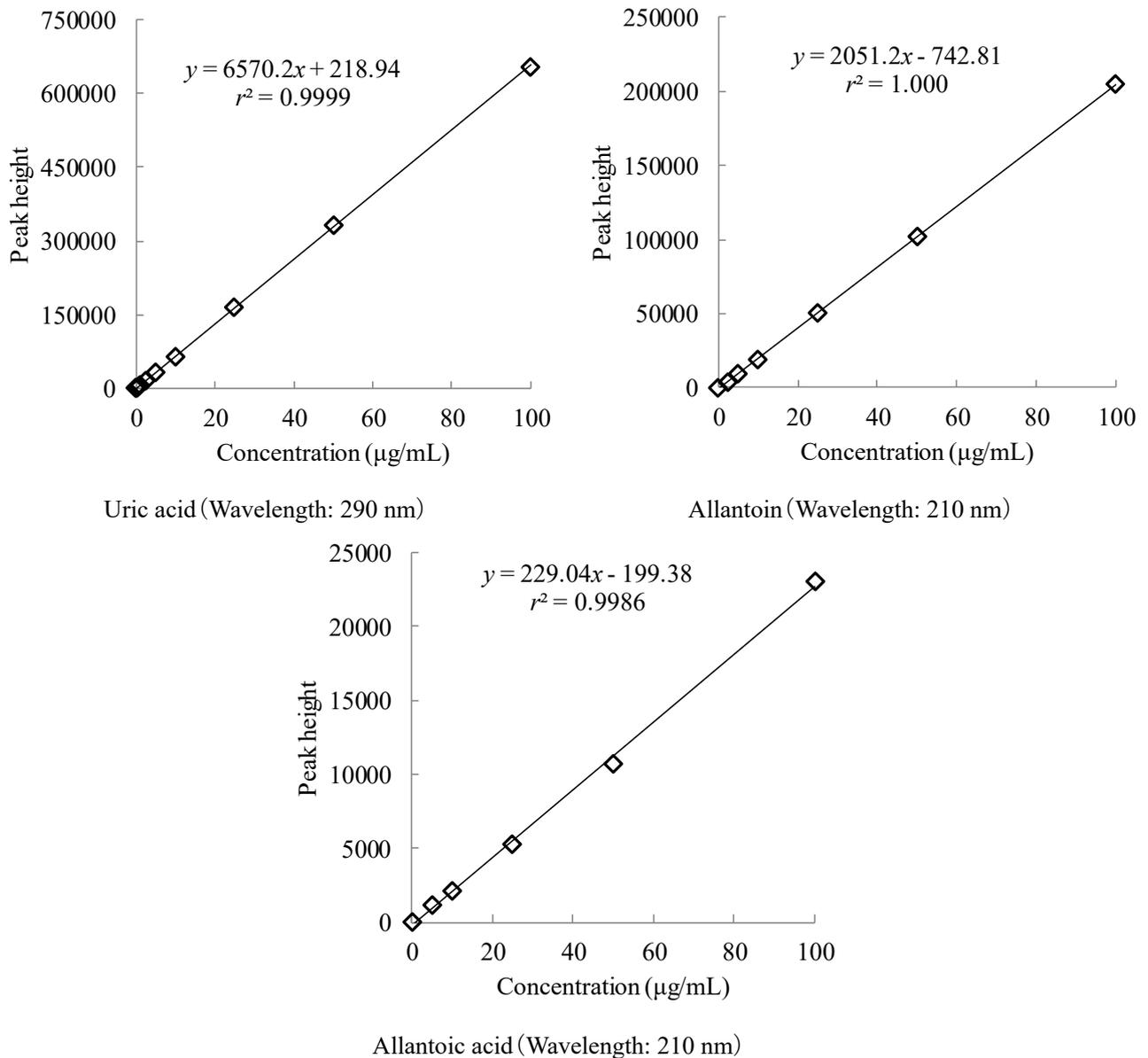


Fig. 4 Calibration curves of uric acid, allantoin, allantoic acid using Scherzo SS-C18

3) 抽出条件の最適化 1: pHに着目した、抽出液の種類を検討

これまでに報告されている、肥料及び堆肥中の尿酸分析法においては、抽出液としてりん酸二水素カリウム溶液及びりん酸水素二ナトリウム溶液を混合して調製した 1/15 mol/L りん酸緩衝液 (pH7.0 \pm 0.1, 以下 pH 7)^{9, 10)}, 0.1 mol/L ピロリン酸ナトリウム溶液^{6~8)}, 及び 0.4 % (または 0.6 %) 炭酸リチウム溶液^{2~5)} が用いられている。これらの溶液の pH はそれぞれ概ね 7, 10 及び 11 であることと、尿酸は冷水には難溶だがアルカリに可溶である⁹⁾ こと等を踏まえ、これらの溶液に加えて、1/15 mol/L りん酸緩衝液 (pH 8) 及び 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH は約 12.5) について、次の方法で尿酸の抽出力を比較検討することとした。なお、0.6 % 炭酸リチウム溶液については検討しなかった。

尿酸を検出することを確認した市販の化成肥料、汚泥発酵肥料、混合堆肥複合肥料及び堆肥各 1 点を供試

し、200 mL 三角フラスコに各試料 1.00 g を採取し、各抽出液 100 mL を加え、マグネチックスターラーで 10 分間攪拌し、遠心分離した試料溶液を HPLC にて分析した。

結果を Table 3 に、また一例として、汚泥発酵肥料試料における HPLC 測定のカロマトグラムを Fig. 5 に、それぞれ示す。混合堆肥複合肥料を除く 3 肥料について、0.1 mol/L ピロリン酸ナトリウム溶液、0.4 % 炭酸リチウム溶液及び 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液で抽出した各試料溶液は、尿酸濃度が pH 7 及び pH 8 のりん酸緩衝液に比べて低かった。この理由として、溶液中の pH が高くなりすぎると肥料中の尿酸の溶解度が小さくなった、または尿酸の分解に伴うアンモニアの生成・揮発が促進された、等が考えられる。

クロマトグラムを比較すると、0.1 mol/L ピロリン酸ナトリウム溶液抽出の方が、1/15 mol/L りん酸緩衝液 (pH 8) 抽出よりも濃度が低いにもかかわらず、ピーク高さは上回り、高感度検出が期待できることが示唆されたが、一方で、0.1 mol/L ピロリン酸ナトリウム溶液抽出では他の 4 溶液に比べて、尿酸の保持時間が極端に早まる傾向があった。

各抽出液の pH を比較すると (Fig. 6)、pH 7 及び pH 8 の 1/15 mol/L りん酸緩衝液は、緩衝能により試料の種類が変わっても抽出液の pH 変動は小さいが、0.1 mol/L ピロリン酸ナトリウムの場合には変動が大きかったことから、試料の種類による抽出力の変動も大きくなることが考えられた。

以上のことから、この後の抽出条件の検討については、緩衝能により試料の種類にかかわらず尿酸の抽出力が安定し易いと考えられる、1/15 mol/L りん酸緩衝液に絞って行うこととした。

なお、この検討の段階では、HPLC 測定時に内径が 3.0 mm のカラムを使用していたので、Fig 5 のクロマトグラムにおける尿酸の保持時間 (4.0 分～5.4 分) は、Fig. 3 のクロマトグラムにおけるそれよりも早くなっている。

Table 3 Contents^{a)} of uric acid by extractive solution (mass fraction (%))

	1/15 mol/L phosphate buffer (pH 7)	1/15 mol/L phosphate buffer (pH 8)	0.1 mol/L sodium diphosphate	0.4 % ^{b)} lithium carbonate	0.1 mol/L sodium hydroxide
Compound fertilizer	0.315	0.423	0.00298	0.227	0.0427
Composted sludge fertilizer	0.822 ^{c)}	0.975 ^{c)}	0.924 ^{c)}	0.536 ^{c)}	0.0390 ^{c)}
Compost mixed fertilizer	0.203	0.207	0.290	0.298	0.243
Compost	0.896 ^{c)}	1.15 ^{c)}	0.967 ^{c)}	0.774 ^{c)}	0.309 ^{c)}

a) Sampling amount: 1.00 g, extractive solution volume: 100 mL and stirring time: 10 minutes

b) Mass fraction

c) Dry wt. : The same applies to the following, for composted sludge fertilizer and Compost.

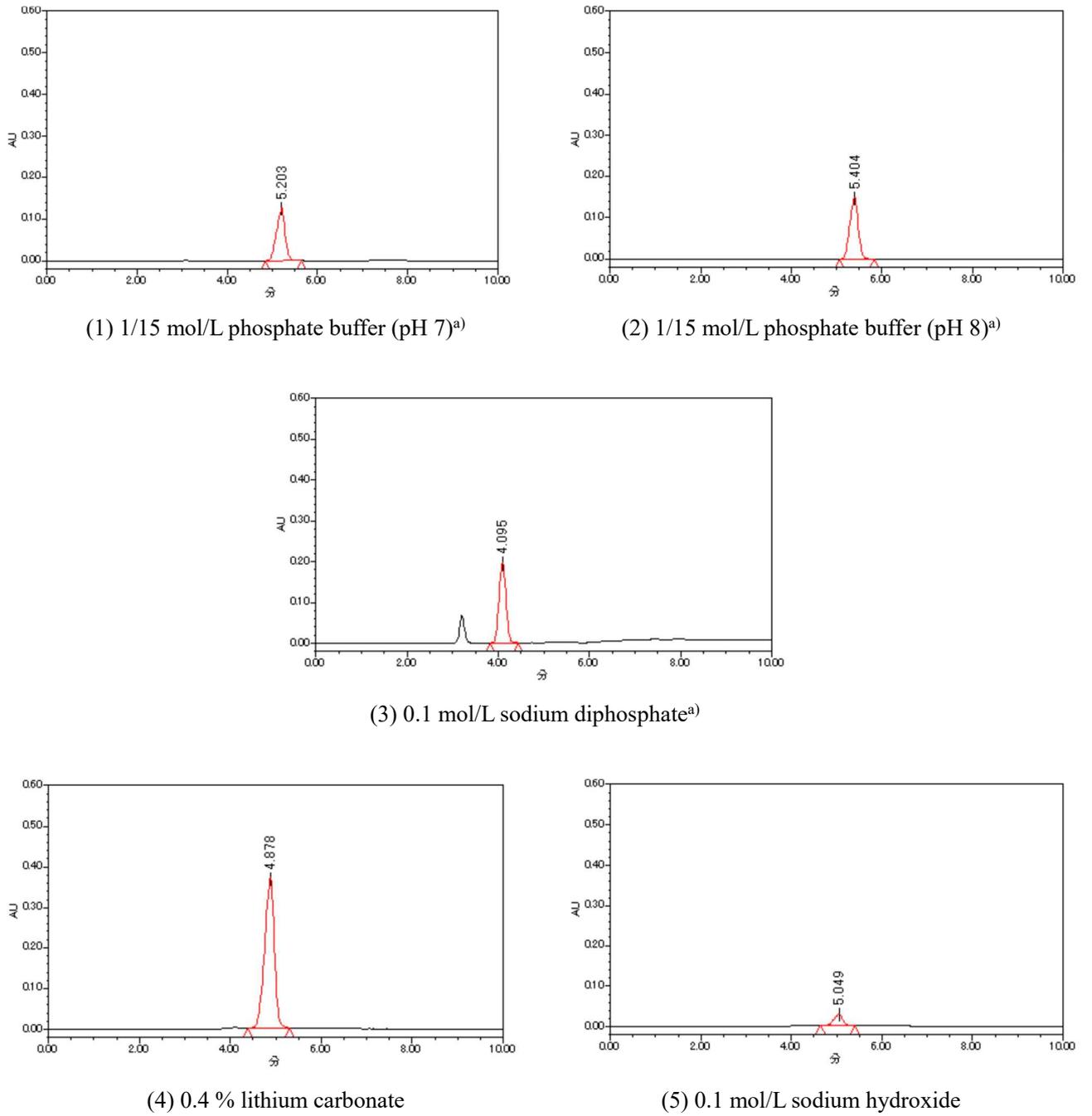


Fig. 5 HPLC chromatogram of composted sludge fertilizer sample solution by extractive solution

Injected sample solution: (1)~(3) Diluted in 5 times the volume by extractive solution

(4)~(5) No dilution

Wavelength: 290 nm

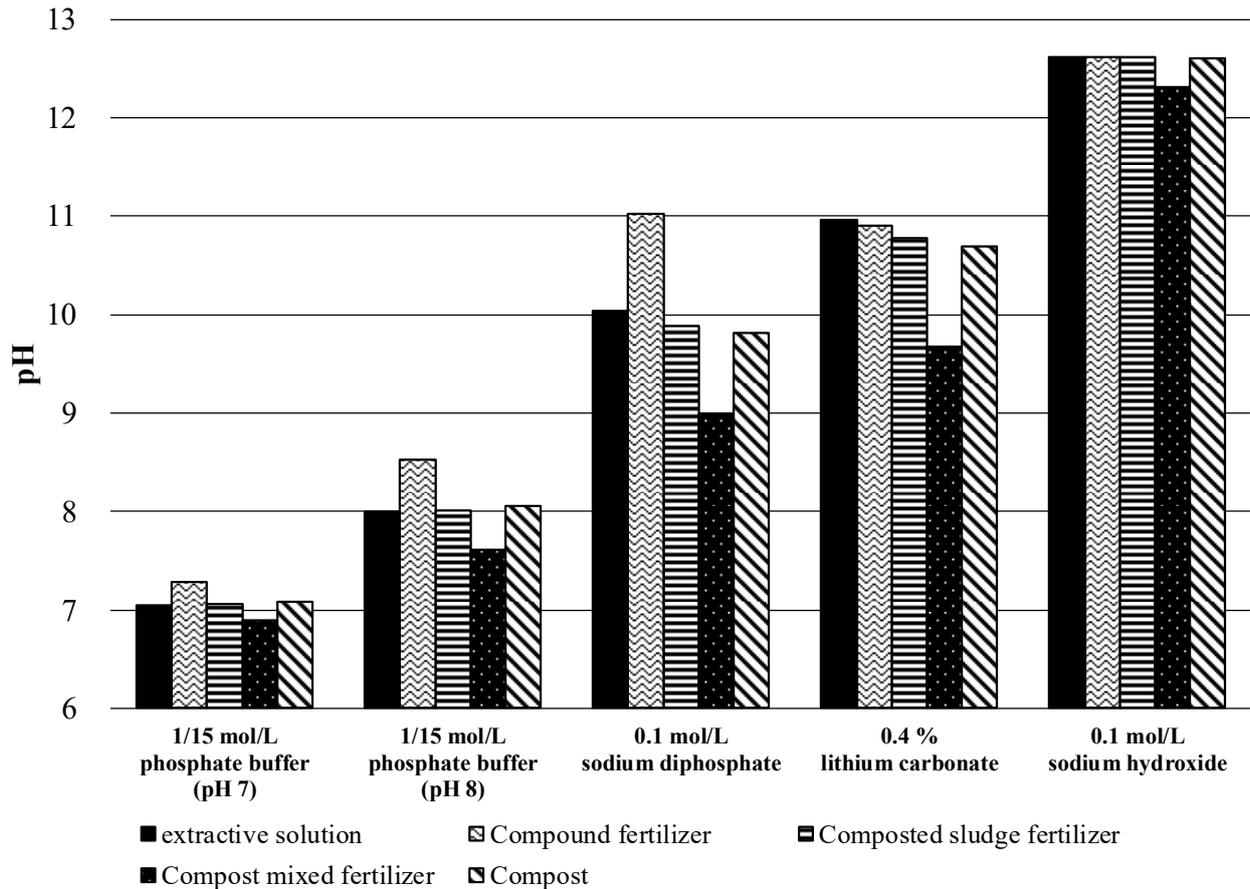


Fig. 6 Change of pH values of all sample solution by extractive solution

4) 抽出条件の最適化 2: 抽出に用いるりん酸緩衝液の pH 及び抽出時間の検討

りん酸緩衝液について、中性～弱アルカリ性領域での pH の最適化を検討することとした。同時に、抽出時間についても検討した。pH については前項で検討した pH 7 及び pH 8 の他に pH 9.0 ± 0.1 (以下 pH 9) を、また、攪拌時間については 10 分間、30 分間、60 分間及び 120 分間の 4 段階を、それぞれ検討した。結果を Fig. 7 に示す。

同じ攪拌時間で比較すると、各試料溶液中の尿酸濃度は、化成肥料の 10 分攪拌を除いて、概ね $\text{pH} 7 < \text{pH} 8 \leq \text{pH} 9$ であった。この結果から、3 種類のりん酸緩衝液のうち pH 9 のものが最も、尿酸の抽出力が優れていることが示唆された。しかしながら、高 pH の溶液を注入することによる HPLC 測定カラムへの負荷も考慮し、この後の検討で使用する 1/15 mol/L りん酸緩衝液の pH は 8 とし、次の抽出温度検討により、pH 8 の緩衝液でも pH 9 の緩衝液に匹敵する抽出力を得ることを目指した。また、どの緩衝液についても、攪拌時間が 10 分及び 30 分では抽出が不十分で、60 分または 120 分は必要であることが示唆された。

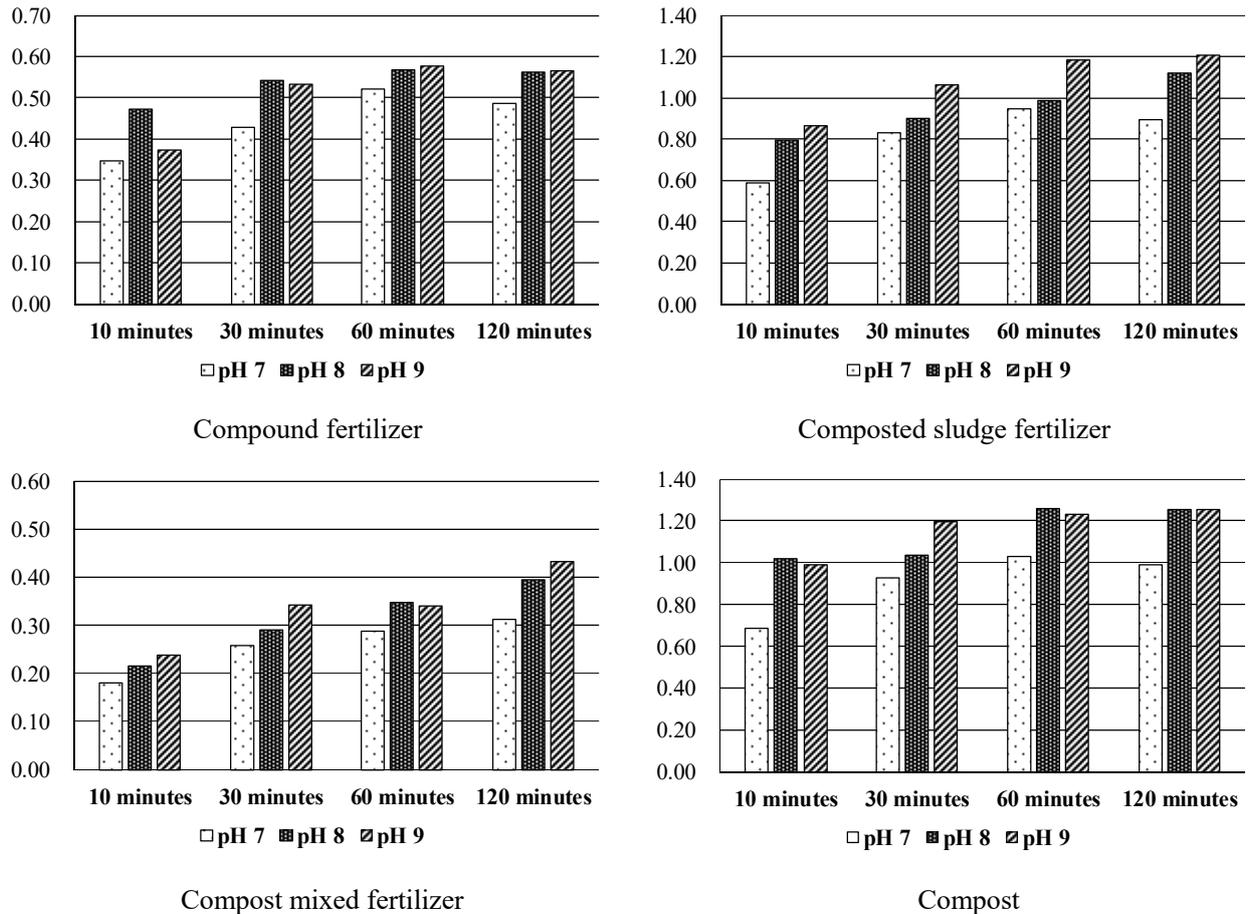


Fig. 7 The variation of content of uric acid by changing pH values of 1/15 mol/L phosphate buffer and stirring time (mass fraction (%))

5) 抽出条件の最適化 3: 抽出温度及び抽出時間の検討

1/15 mol/L リン酸緩衝液(pH 8)抽出での抽出時間の検討においては、どの試料についても攪拌時間を 60 分または 120 分とした際に、最も尿酸濃度が高くなっていたが(Fig. 7)、より短時間での抽出が可能になるよう、加温工程を検討することとした。リン酸緩衝液(pH 8)抽出について、常温で 60 分または 120 分攪拌するのみの方法と、40 °C または 60 °C で 30 分加温後に 10 分または 30 分攪拌する方法とで、尿酸濃度を比較した。さらにそれらの結果と、リン酸緩衝液(pH 9)抽出について常温で 60 分または 120 分攪拌するのみの方法による結果を比較した。それらの結果を Fig. 8 に示す。

どの試料についても、加温条件については加温工程なし < 40 °C 加温工程あり < 60 °C 加温工程ありの順に尿酸濃度が高くなる傾向が見られ、特に 60 °C 加温では、リン酸緩衝液(pH 9)で常温抽出した際と同等またはそれを上回る結果となった。一方で、全ての加温条件において、攪拌時間を 10 分から 30 分に延ばしても尿酸濃度に大きな変動は認められなかった。

以上のことから、今後の検討での抽出温度及び抽出時間は、60 °C で 30 分加温後 10 分攪拌とした。

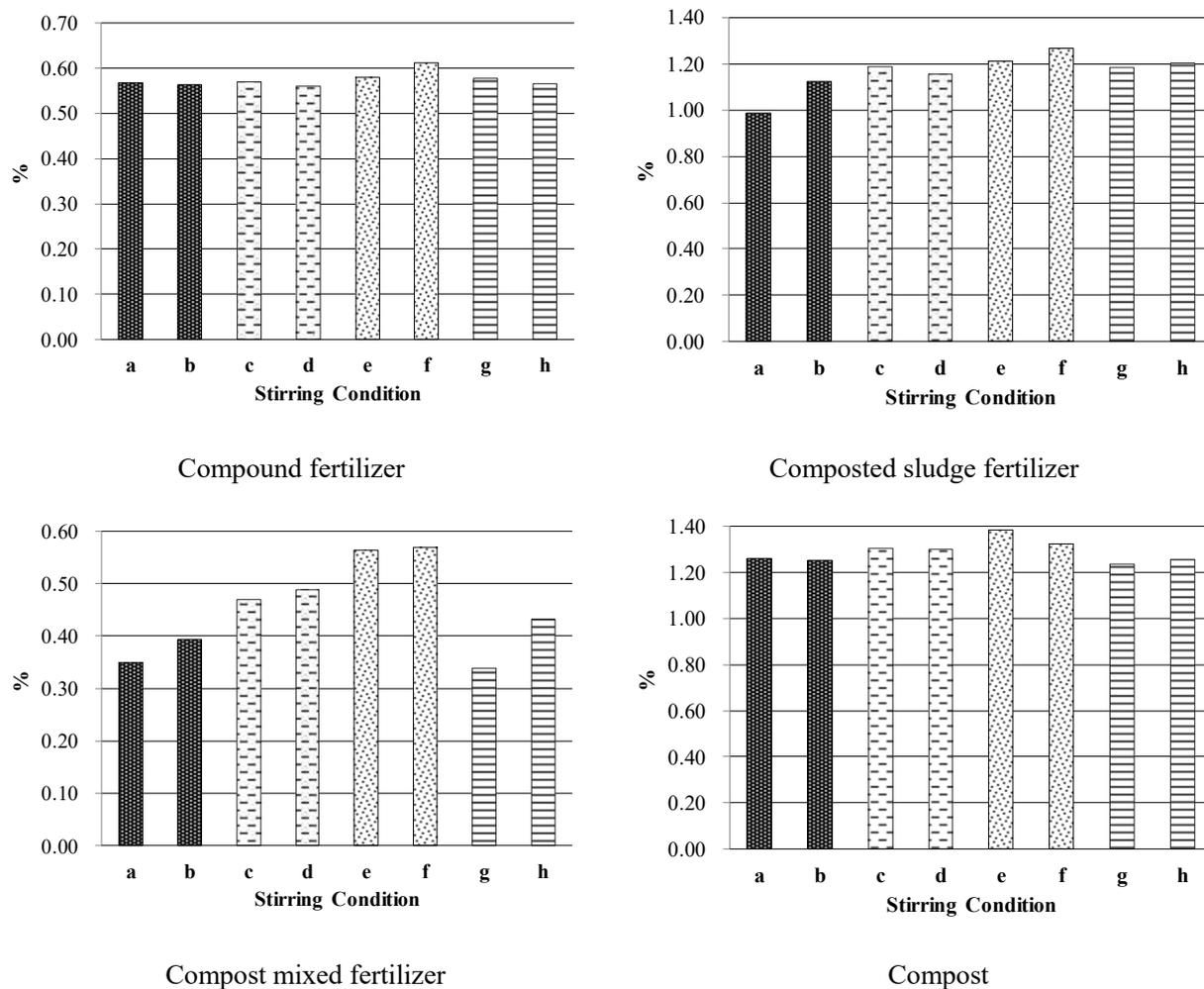


Fig. 8 The variation of content of uric acid by changing heating temperature, stirring time and pH values of 1/15 mol/L phosphate buffer (mass fraction (%))

a: No heating, 60 minutes (pH 8)

b: No heating, 120 minutes (pH 8)

c: Heating in water bath (40 °C), 10 minutes (pH 8)

d: Heating in water bath (40 °C), 30 minutes (pH 8)

e: Heating in water bath (60 °C), 10 minutes (pH 8)

f: Heating in water bath (60 °C), 30 minutes (pH 8)

g: No heating, 60 minutes (pH 9)

h: No heating, 120 minutes (pH 9)

6) 流通肥料の測定

流通肥料 24 点 (家きん由来原料が使用されているもの 22 点, 及び使用されていないもの 2 点) について, 本法に従って尿酸の含有量を測定した結果を Fig. 9 及び Table 4 に示す.

家きん由来原料として加工家きんふん肥料, 発酵鶏ふん, 鶏ふん, うずらふんまたは家きん加工くず肥料を

含む肥料については、一部のものを除いて尿酸が検出されたが、家きん由来原料として鶏ふん燃焼灰のみを含む肥料については、尿酸が検出されたものはなかった。また、各抽出液の pH を測定したところ、りん酸緩衝液 (pH 8) の緩衝作用が弱いためか抽出液の pH の範囲は 7.3~10.1 と試料によって大きな変動が見られたものの、尿酸が検出されたものについては全て 7.5~8.5 の範囲にあった (Fig. 9)。このことから、本法では抽出液の pH が 8 前後になることが、尿酸が安定して抽出されるための条件の一つであると考えられる。

なお、原料の種類がほぼ共通の肥料 (化成肥料 9 及び 10) について、抽出液の pH には差が見られなかったが、尿酸の定量値には差が見られ、値が小さかった方 (Compound fertilizer 10) については、アラントインも検出された、という事例があった (Fig. 10)。このことから、尿酸の含有量を元に肥料中の家きん由来原料の含有の有無を確認する際、肥料の種類によってはアラントインの含有量についても確認する必要があると考えられる。

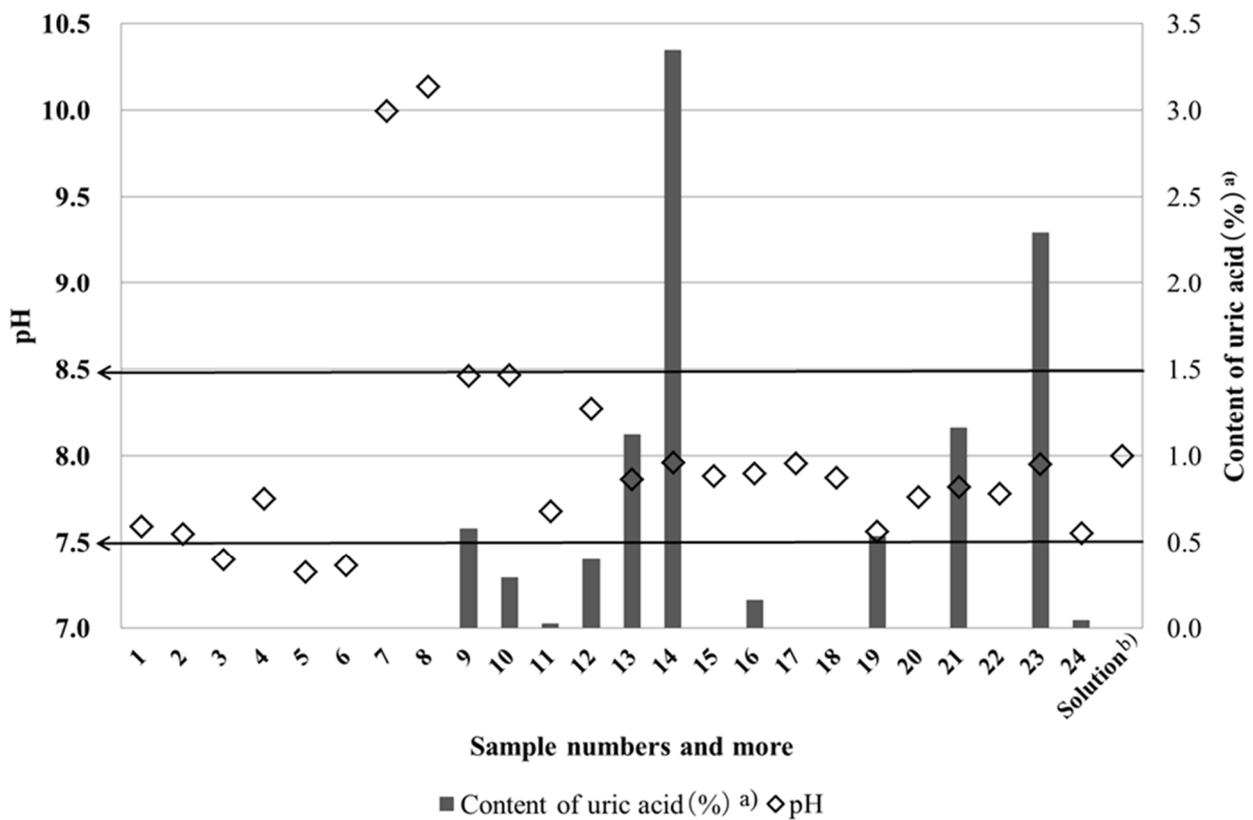


Fig. 9 pH values and content of uric acid of sample solutions

a) Mass fraction

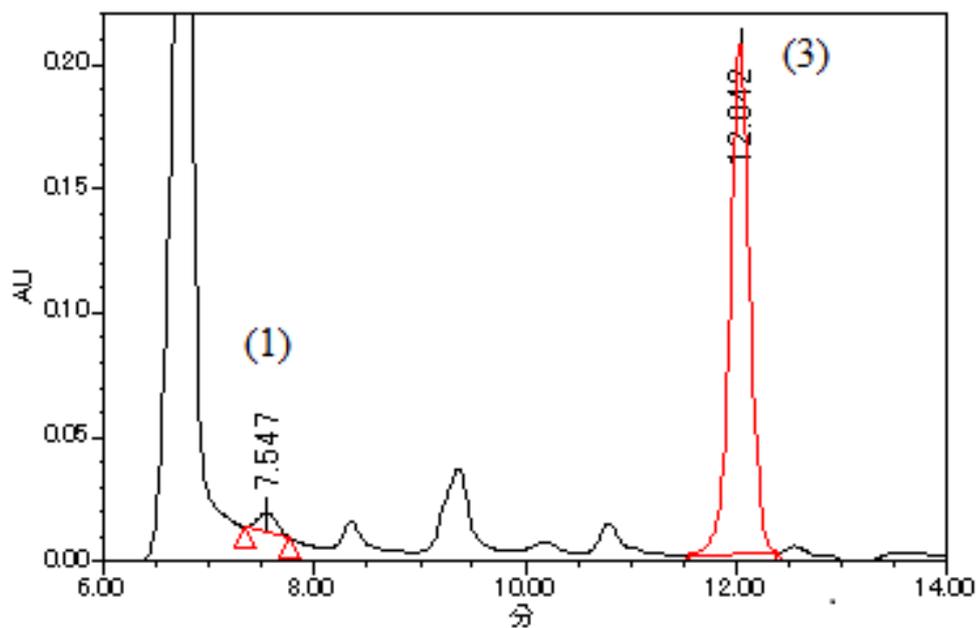
b) Extractive solution (1/15 mol/L phosphate buffer (pH 8))

Table 4 Poultry origin materials used and content of uric acid in samples

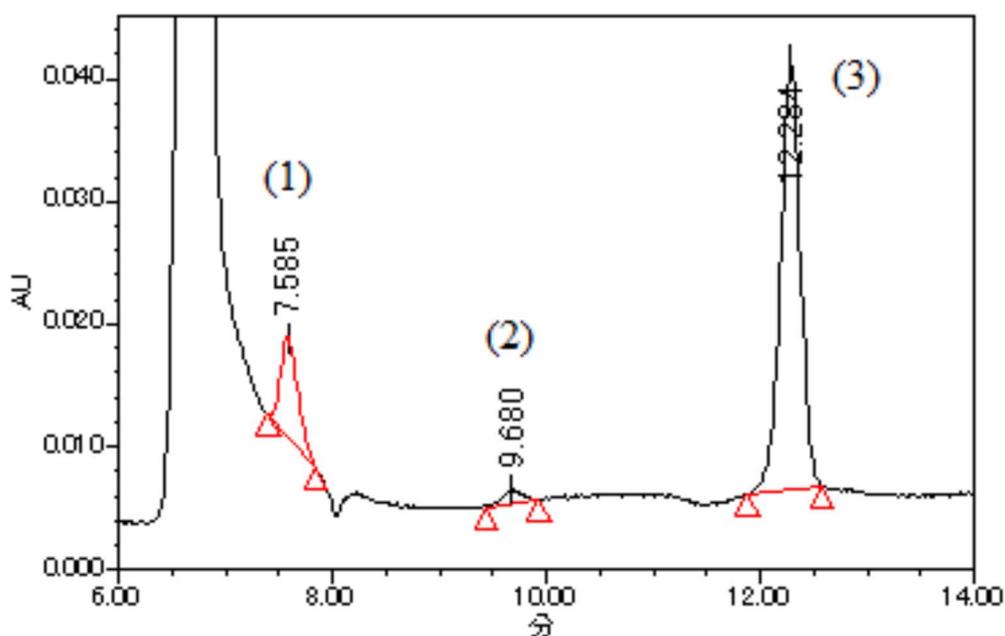
Fertilizer	Sample Number	Content of uric acid(%) ^{a)}	Poultry origin materials
Compound fertilizer	1	N.D.	Calcined manure
	2	N.D.	Calcined manure
	3	N.D.	Calcined manure
	4	N.D.	Calcined manure
	5	N.D.	Calcined manure
	6	N.D.	Calcined manure
	7	N.D.	Calcined manure
	8	N.D.	Calcined manure
	9	0.572	Calcined manure, Processed manure fertilizer, Composted manure
	10	0.293	Calcined manure, Processed manure fertilizer, Composted manure
	11	0.0249	Processed manure fertilizer
	12	0.398	Calcined manure, Composted manure
Composted sludge fertilizer	13	1.12 ^{b)}	Manure
	14	3.35 ^{b)}	Manure
	15	N.D. ^{b)}	Manure
	16	0.157 ^{b)}	Manure, Processed waste fertilizer
	17	N.D. ^{b)}	Manure, Feather meal
Compost mixed fertilizer	18	N.D.	-
	19	0.533	Manure
	20	N.D.	Calcined manure
Compost	21	1.16 ^{b)}	Manure
	22	N.D. ^{b)}	-
	23	2.29 ^{b)}	Composted quail manure
Animal manure	24	0.0249 ^{b)}	Quail manure

a) Mass fraction

b) Dry wt.



Compound fertilizer 10: detected to uric acid and allantoin



Standard solution (50 µg/mL): equal to 0.05 % (mass fraction) in fertilizer

(1) Allantoin (2) Allantoic Acid (3) Uric Acid

Fig. 10 HPLC Chromatogram of solution of compound fertilizer detected on uric acid and allantoin
(Wavelength: 210 nm)

7) 添加回収試験による真度の評価

添加回収試験は、本法で尿酸が検出されなかった化成肥料, 汚泥発酵肥料, 混合堆肥複合肥料及び堆肥各

1点を供試した。添加用溶液は、血清の勧告法¹¹⁾におけるHPLC測定用標準液と同様に、尿酸を0.01 mol/L炭酸リチウム溶液に溶解して調製したものをを用いた。添加濃度は、尿酸の0.01 mol/L炭酸リチウム溶液に対する溶解度が概ね1000 µg/mLであったことから、この濃度(質量分率で0.1%)を最大とし、3段階の濃度を添加して計12通りを3点併行分析した。平均回収率は85.5%~114.1%、併行相対標準偏差(RSD_r)は0.3%~2.1%であり、すべて肥料等試験法¹⁶⁾における各濃度レベルの回収率の許容範囲を満たした(Table 5)。

Table 5 Results of recovery test

Samples	Sample Content (%) ^{a)}	Recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)	Criteria of the trueness ^{d)} (%)
Compound fertilizer	0.005	114.1	2.1	70~120
	0.01	105.0	0.6	80~115
	0.10	100.2	1.0	85~110
Composted sludge fertilizer	0.005	104.4	1.0	70~120
	0.01	90.1	1.3	80~115
	0.10	93.3	0.2	85~110
Compost mixed fertilizer	0.005	97.4	1.5	70~120
	0.01	85.5	1.7	80~115
	0.10	92.4	0.4	85~110
Compost	0.005	92.5	1.0	70~120
	0.01	85.3	1.1	80~115
	0.10	101.8	0.3	85~110

a) Mass fraction

b) Mean recovery ($n = 3$)

c) Repeatability relative standard deviation

d) Criteria of trueness (recovery) show in Testing Methods for Fertilizers (2018)

8) 併行精度及び中間精度

本法で尿酸が検出されなかった化成肥料, 汚泥発酵肥料, 混合堆肥複合肥料及び堆肥各1点に2濃度(質量分率で0.1%及び0.01%)の尿酸溶液を添加して, 本法の併行精度及び中間精度を確認した。2点併行で日を変えて5回分析を行った結果をTable 6に, それを基に一元配置分散分析を行って得られた統計解析結果をTable 7に, それぞれ示す。いずれの相対標準偏差も肥料等試験法¹⁶⁾に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安内であったことから, 本法は十分な精度を有していることが確認された。

Table 6 Repeatability test results on different days (mass fraction (%))

Test day	Compound fertilizer				Composted sludge fertilizer			
	0.1 %		0.01 %		0.1 %		0.01 %	
1	0.0994	0.0998	0.0105	0.0107	0.0922	0.0920	0.00947	0.00948
2	0.100	0.0996	0.0103	0.0102	0.0946	0.0943	0.00961	0.00953
3	0.0982	0.0972	0.0102	0.0103	0.0918	0.0905	0.00945	0.00934
4	0.100	0.100	0.0102	0.0102	0.0950	0.0946	0.00876	0.00896
5	0.0963	0.0975	0.00943	0.00953	0.0936	0.0934	0.00956	0.00967

Test day	Compost mixed fertilizer				Compost			
	0.1 %		0.01 %		0.1 %		0.01 %	
1	0.0919	0.0926	0.00946	0.00953	0.100	0.0983	0.00976	0.00980
2	0.0935	0.0937	0.00948	0.00945	0.103	0.102	0.0101	0.0100
3	0.0903	0.0900	0.00917	0.00925	0.0984	0.0976	0.00952	0.00941
4	0.0925	0.0917	0.00875	0.00866	0.0957	0.0939	0.00862	0.00860
5	0.0941	0.0940	0.00912	0.00922	0.102	0.102	0.00871	0.00917

Table 7 Repeatability and intermediate precision

Samples	Spiked Level (%) ^{b)}	Total Mean ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability			Intermediate precision		
			s_r ^{c)} (%) ^{b)}	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{f)} (%) ^{b)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)} (%)
Compound fertilizer	0.1	0.0989	0.0006	0.6	4	0.0015	1.6	6.5
	0.01	0.0102	0.0001	0.7	4	0.00042	4.2	6.5
Composted sludge fertilizer	0.1	0.0932	0.0004	0.5	4	0.0016	1.7	6.5
	0.01	0.00938	0.00009	0.9	4	0.00031	3.3	6.5
Compost mixed fertilizer	0.1	0.0924	0.0004	0.4	4	0.0015	1.7	6.5
	0.01	0.00921	0.00005	0.6	4	0.00032	3.5	6.5
Compost	0.1	0.101	0.001	1.3	4	0.0029	2.8	6.5
	0.01	0.00966	0.00018	1.8	4	0.00049	5.0	6.5

a) $n = 10$ (2 repetition \times 5 days)

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability relative standard deviation

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

h) Criteria of intermediate relative standard deviation

9) 検出下限及び定量下限の確認

定量下限を確認するため、対象成分を含まない汚泥発酵肥料を用い、試料中濃度が 0.002 %となるよう尿酸を添加した試料を調製して7回繰り返し分析を行い、求めた回収率を Table 8 に示した。肥料等試験法が示す真度(回収率)を満たしており、本法の定量下限は 0.0008 %程度、検出下限は 0.0003 %程度、とそれぞれ確認された。

Table 8 Spiking and recovery test (minimum limit of quantification and detectification)

Sample	Confirmation by recovery test						Criteria of the trueness ^{f)} (%) ^{a)}
	Spiked Level (%) ^{a)}	Mean Value ^{b)} (%) ^{a)}	Recovery (%)	RSD ^{c)} (%) ^{a)}	LOQ ^{d)} (%) ^{a)}	LOD ^{e)} (%) ^{a)}	
Composted sludge fertilizer	0.002	0.00213	106	0.00008	0.0008	0.0003	70 ~ 120

a) Mass Fraction

b) $n=7$

c) Relative standard deviation

d) Minimum limit of quantification

e) Minimum limit of detectification

f) Criteria of trueness (recovery) show in Testing method of Fertilizers

4. まとめ

HPLC を用いて肥料中の尿酸の分析について検討したところ、次のことを明らかにした。

1) 試料溶液は、試料 1.00 g を採取して 1/15 mol/L りん酸緩衝溶液 (pH 8) 100 mL を加えて 60 °C で 30 分加温してからマグネチックスターラーで 10 分間攪拌後、遠心分離した溶液が最適であった。HPLC の使用カラムを Scherzo SS-C18, 移動相を 20 mmol/L りん酸緩衝液+メタノール (9+1) とすることで、尿酸及びその代謝体である 2 物質 (アラントイン及びアラントイン酸) は完全に分離し、約 13 分までに対象成分はすべて検出された。

2) 検量線の直線性は、尿酸は 0.1 µg/mL ~ 100 µg/mL の範囲で直線性 (決定係数 $r^2=0.999$ 以上) を示した。アラントインは 2.5 µg/mL ~ 100 µg/mL, アラントイン酸は 5 µg/mL ~ 100 µg/mL で、いずれも決定係数 $r^2 = 0.999$ 以上の直線性を示した。

3) 24 点の流通肥料を本法により測定したところ、加工家きんふん肥料、発酵鶏ふん、鶏ふん、うずらふんまたは家きん加工くず肥料を含む肥料について、一部を除いて尿酸またはアラントインが検出された。また、各抽出液の pH を確認したところ、尿酸を検出したものについては全て 7.5 ~ 8.5 の範囲にあった。

4) 添加回収試験は、4 種類の肥料に、3 段階の濃度の尿酸を添加した計 12 通りを 3 点併行分析した。平均回収率は 85.3 % ~ 114.1 %, 併行相対標準偏差 (RSD) は 0.3 % ~ 2.1 % であり、肥料等試験法における各濃度レベルの回収率の許容範囲をすべて満たした。

5) 同一濃度を添加した試料を毎回調製して 5 日間の反復試験を行ったところ、測定値は安定しており良好な成績であった。

6) 本法における尿酸の定量下限は 0.0008 % 程度、検出下限は 0.0003 % 程度、とそれぞれ確認された。

以上の結果より、本試験法は、化成肥料、汚泥発酵肥料、混合堆肥複合肥料及び堆肥中の尿酸を測定するために十分な性能を有していることを確認した。

参考文献

- 1) 越野正義: 第二改訂詳解肥料分析法, p.93~96, 養賢堂, 東京(1988)
- 2) 三重科技・農業研究部・生物機能開発グループ: 鶏ふん堆肥における尿酸分析による可給態窒素量の迅速推定法, 三重県農業研究所平成13年度研究成果情報(2001)
<<http://www.pref.mie.lg.jp/common/content/000396817.pdf>>
- 3) 三重科技・農業研究部・生物機能開発グループ: 鶏ふん堆肥における尿酸態窒素の簡易定量法, 三重県農業研究所平成14年度研究成果情報(2002)
<<http://www.pref.mie.lg.jp/common/content/000396799.pdf>>
- 4) 原正之, 村上圭一: 高窒素鶏ふんペレット堆肥の生産と還元技術の開発, 畜産環境情報(24), 26-29(2004)
- 5) 中谷洋, 市川明, 伊藤裕和: 鶏ふん堆肥の窒素肥効特性に対する処理日数及び季節の影響, 愛知農総試研報, **34**, 239-243(2002)
- 6) 橘田安正, 茂角正延, 水落勁美: 採卵鶏由来鶏糞の窒素成分と窒素無機化率との関係, 日本土壤肥科学雑誌, **73**(3), 263-269(2002)
- 7) 藤原俊六郎: おが屑混合鶏ふん堆積物の腐熟度と施用方法について, 神奈川園試研報, **36**, 1-100(1988)
- 8) 大羽裕: 弘法・大羽法, ペトロジスト, **8**(2), 108-116(1964)
- 9) 日高秀俊, 新妻成一, 大澤元成, 久保省三: 各種鶏ふんの窒素無機化量の簡易評価法, 日本土壤肥科学雑誌, **75**(1), 21-28(2004)
- 10) 樋口太重: 土壌中における施用窒素の有機化と再無機化, 農業技術研究所報告B, **34**, 1-81(1983)
- 11) 日本臨床化学会試薬専門委員会: HPLCを用いる血清尿酸測定 of 勧告法, 臨床化学, **22**(4), 300-307(1993)
- 12) Noriyuki Ohtake et al.: Quantitative and Isotopic Analysis of Amino Acids, Allantoin, and Allantoic Acid in Soybeans by LC-MS Using the Atmospheric Pressure Chemical Ionization Method, Soil Sci. Plant Nutr., **50**, 241-248(2004)
- 13) GL Sciences: Analysis of purine derivatives by LC/MS/MS, InertSearch™ for LC, Inertsil® Applications, LA621-0696(2018)
<http://www.gls.co.jp/technique/inertsearch_lc/pdf/LA621.pdf>
- 14) 宮本紫織, 井上智, 小笠原光憲, 金本昭, 大瀬戸光明, 井上博雄: 親水性相互クロマトグラフ(HILIC)によるアラントインの分析, 平成16年度愛媛衛環研年報, **7**(2004)
- 15) Imtakt: Allantoin, allantoic acid and uric acid, Technical Information, T701E(2018)
<<http://www.imtakt.com/TecInfo/TI701E.pdf>>
- 16) 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(2018)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2018.pdf>

Determination of Uric Acid in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography

Norio FUNAKI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

A High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for simultaneous determination of uric acid in fertilizer was developed and validated as a single-laboratory validation. Samples were extracted by heating in water bath (60 °C), shaking and diluted with 1/15 mol/L phosphate buffer (pH 8). After centrifugation, sample solution was analyzed by HPLC, on multi-mode ODS column with UV detection at 290 nm. As a result of 3 replicate analysis of 4 fertilizer samples spiked with uric acid, the mean recoveries were 85.3 %~114.1 %. Repeatability standard deviation of uric acid were 0.3 % ~ 2.1 %. Intermediate relative standard deviations of there were 1.6 % ~ 5.0 %. The limits of quantification of there were 0.0008 %. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of uric acid in a fertilizer.

Key words uric acid, HPLC, phosphate buffer, poultry origin material

(Research Report of Fertilizer, **11**, 86~105, 2018)