

5.7 スルファミン酸(アミド硫酸)

5.7.a イオンクロマトグラフ法

(1) 概要

この試験法は硫酸アンモニウムに適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 5.7.a-2017 又は AS-acid.a-1 とする。

分析試料に水を加えてスルファミン酸を抽出し、イオンクロマトグラフ(IC)又は高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、イオン交換カラムで分離し、電気伝導度検出器で測定し、分析試料中のスルファミン酸(アミド硫酸)を求める。なお、この試験法の性能は備考 5 に示す。

この方法によって、スルファミン酸及び硫青酸化物(チオシアン酸アンモニウム)が同時定量できる(備考 4 参照)。

(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) フタル酸: 純度 98 % (質量分率) 以上の試薬。
- c) *p*-ヒドロキシ安息香酸: 純度 95 % (質量分率) 以上の試薬。
- d) 1-オクタンスルホン酸ナトリウム: 純度 98 % (質量分率) 以上の試薬。
- e) 1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム: 純度 98 % (質量分率) 以上の試薬。
- f) ほう酸: JIS K 8863 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- g) 溶離液⁽¹⁾⁽²⁾: フタル酸 0.083 g、*p*-ヒドロキシ安息香酸 0.552 g、1-オクタンスルホン酸ナトリウム 0.195 g、1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 0.376 g、ほう酸 6.183 g を全量フラスコ 1000 mL にはかりとり、水約 500 mL を加えて溶かし、更に標線まで水を加える。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。
- h) スルファミン酸標準液(1000 mg/L)⁽¹⁾: 容量分析用標準物質 アミド硫酸(HOSO₂NH₂: シリカゲルデシケーター中で 48 時間乾燥したもの) 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。少量の水を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで水を加える。
- i) スルファミン酸標準液(10 mg/L)⁽¹⁾: 使用時に、スルファミン酸標準液(1000 mg/L) 2.5 mL を全量フラスコ 250 mL にとり、標線まで水を加える。
- j) 検量線用スルファミン酸標準液(0.3 mg/L~3 mg/L): 使用時にスルファミン酸標準液(10 mg/L)の 3 mL ~30 mL を全量フラスコ 100 mL 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。

(2) 調製した溶液の濃度は、フタル酸 0.5 mmol/L、*p*-ヒドロキシ安息香酸 4.0 mmol/L、1-オクタンスルホン酸ナトリウム 0.9 mmol/L、1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム 2.0 mmol/L、ほう酸 100 mmol/L となる。

(3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) イオンクロマトグラフ又は高速液体クロマトグラフ: JIS K 0127 に規定するイオンクロマトグラフ又は 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、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5 μm の第 4 級アンモニウム基を結合した親水性メタクリレート系ゲルを充てんしたもの⁽³⁾。
 - 2) カラム槽: カラム槽温度を 55 °C~60 °C で調節できるもの。

- 3) **検出部**: 電気伝導度検出器。
- b) **メンブレンフィルター**: 孔径 0.5 μm 以下、親水性 PTFE 製

注(3) Shodex IC NI-424 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 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 100 mL に入れる。
- b) 水約 50 mL を加え、振り混ぜて溶かし、更に標線まで水を加える。
- c) 溶解液の一定量を取り、水で正確に 12.5 倍希釈する。
- d) メンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過し、試料溶液とする。

(4.2) **測定** 測定は、JIS K 0127 又は JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用するイオンクロマトグラフ又は高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a) **イオンクロマトグラフ又は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**: 第 4 級アンモニウム基を結合した親水性メタクリレート系ゲルカラム(内径 4 mm、長さ 100 mm、粒径 5 μm)
- 2) **カラム槽温度**: 58 $^{\circ}\text{C}$
- 3) **溶離液**: (2)g)により調製したもの。
- 4) **流量**: 1 mL/min
- 5) **注入量**: 20 μL
- 6) **検出器**: 電気伝導度検出器

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 20 μL をイオンクロマトグラフ又は高速液体クロマトグラフに注入し、電気伝導度のクロマトグラムを記録し、ピーク面積を求める。
- 2) 各検量線用標準液の濃度と電気伝導度のピーク面積との検量線を作成する。
検量線の作成は、試料の測定時に行う。

備考 1. 試料溶液の測定において、マトリックスの影響によりピーク高さでの濃度算出では回収率が低下する可能性がある。このため、ピーク面積を用いて検量線を作成すること。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 20 μL を b)1)と同様に操作する。
- 2) ピーク面積から検量線よりスルファミン酸量を求め、分析試料中のスルファミン酸(アミド硫酸)を算出する。

備考 2. 検量線の作成と同様に、試料溶液中のマトリックスの影響を防止するため、ピーク面積から濃度を算出すること。

備考 3. 溶離液にイオンペア試薬を使用しているため、ベースライン安定化のために時間を要するので注意

すること。測定開始前に、約 120 分程度の安定化時間をとるとよい。

備考 4. 本試験法ではスルファミン酸及び硫青酸化物(チオシアン酸アンモニウム)の同時測定が可能である。その場合は、スルファミン酸標準液(1000 mg/L)、チオシアン酸アンモニウム標準液(1000 mg/L)の一定量を混合し、水で希釈して混合標準液(10 mg/L)を調製し、(2) i) のスルファミン酸標準液(10 mg/L)に変えて使用する。以下、(4.2) b) と同様に操作し、分析試料中の各測定対象物質濃度を算出する。

備考 5. 硫酸アンモニア(3 銘柄)の回収試験の結果は、0.25 % (質量分率)及び 0.075 % (質量分率)の添加レベルで平均回収率が 99.4 %～103.5 %及び 94.4 %～100.8 %であった。

なお、この試験法の定量下限は 0.04 % (質量分率)程度である。

参考文献

- 1) 廣井利明, 白井裕治: イオンクロマトグラフ法による硫酸アンモニア中の硫青酸化物及びスルファミン酸同時測定, 肥料研究報告, **5**, 1~23 (2012)

(5) **試験法フローシート** 硫酸アンモニア中のスルファミン酸試験法のフローシートを次に示す。

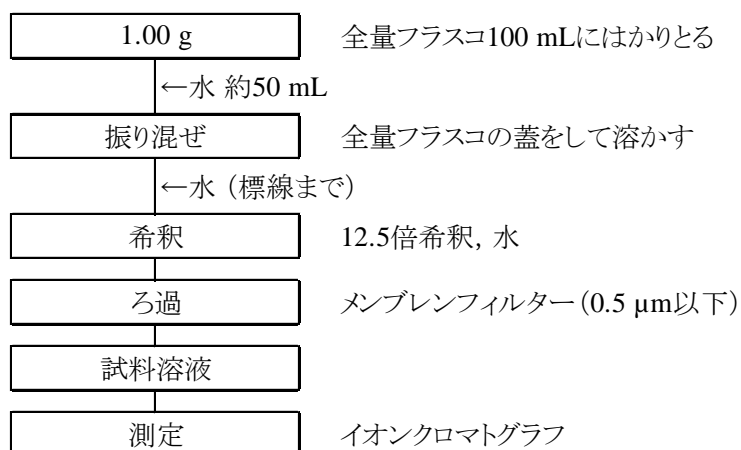
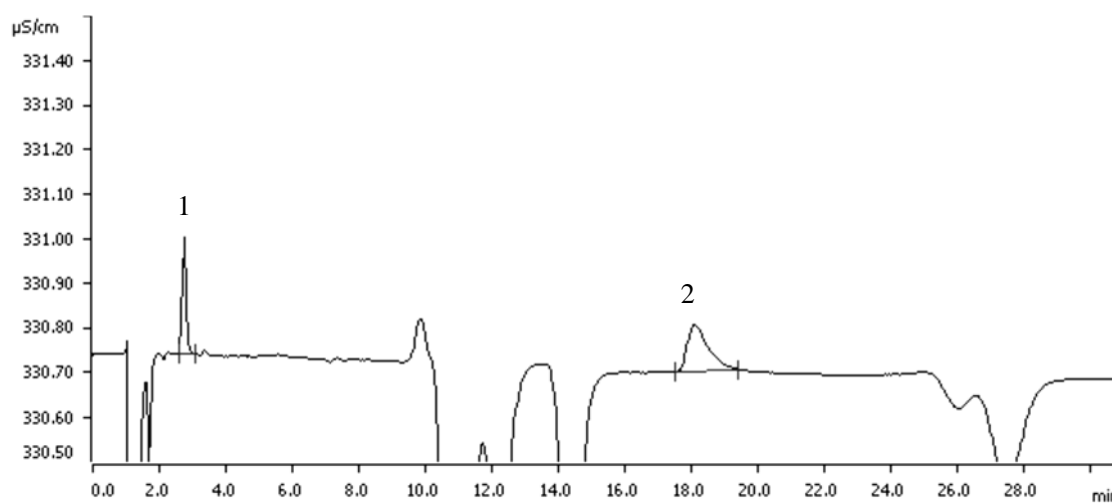
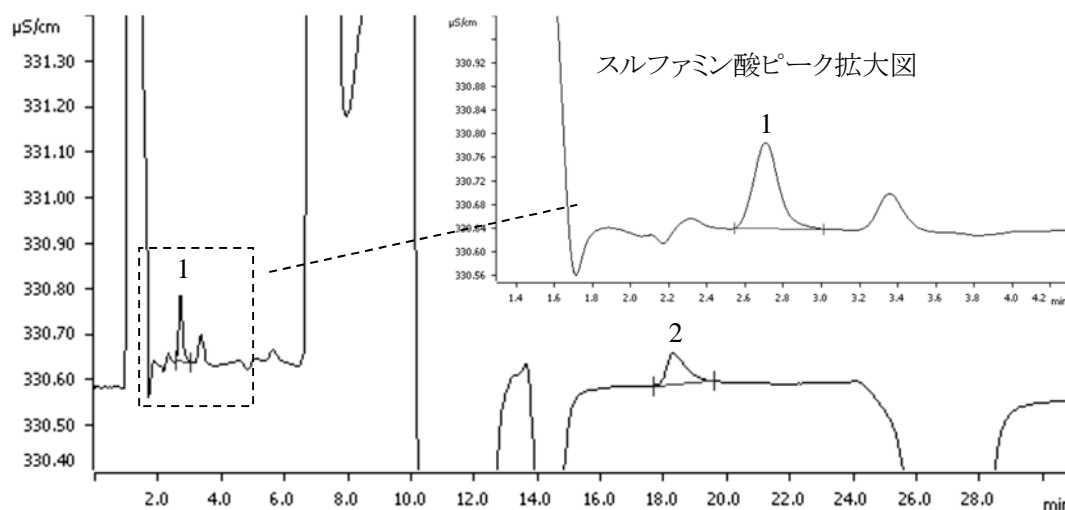


図 硫酸アンモニア中のスルファミン酸試験法フローシート

参考 検量線用標準液及び試料溶液(硫酸アンモニア)のスルファミン酸及びチオシアン酸の IC クロマトグラム例を次に示す。



(A) 混合標準液(スルファミン酸、チオシアン酸アンモニウムとして各 60 ng 相当量(3 mg/L, 20 µL))



(B) 試料溶液(硫酸アンモニア中にスルファミン酸、チオシアン酸アンモニウムとして各 0.25 % (質量分率) (2500 µg/g) 相当量添加)

参考図 スルファミン酸及びチオシアン酸の IC クロマトグラム
(ピーク: 1.スルファミン酸、2.チオシアン酸アンモニウム)

IC の測定条件

カラム: Shodex IC NI-424(内径 4.6 mm,長さ 100 mm, 粒径 5µm)

その他の条件は(4.2 a)の測定条件の例示のとおり

5.7.b 高速液体クロマトグラフ質量分析法

(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 B** であり、その記号は 5.7.b-2017 又は AS-acid.b-1 とする。

分析試料に水を加えてスルファミン酸を抽出し、高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)に導入して架橋型ジオールを化学結合したシリカゲルカラムで分離し、選択イオン検出(SIM)法で測定し、分析試料中のスルファミン酸(アミド硫酸)を求める。なお、この試験法の性能は**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、LC-MS に導入する溶離液については A4 の水又は同等の品質のものを使用する。
- b) **アセトニトリル**: LC-MS 用試薬又は同等の品質のもの。
- c) **ぎ酸**: LC-MS 用試薬又は同等の品質のもの。
- d) **ぎ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.2)**: 純度 95 % (質量分率) 以上のぎ酸アンモニウム 3.153 g を水に溶かして 500 mL とし、ぎ酸で pH 3.2 に調整する。
- e) **スルファミン酸標準液(1 mg/mL)**: JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質アミド硫酸 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。少量の水を加えて溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで水を加える。
- f) **スルファミン酸標準液(10 µg/mL)⁽¹⁾**: 使用時に、標準液(1 mg/mL) 2.5 mL を全量フラスコ 250 mL にとり、標線まで水を加える。
- g) **スルファミン酸標準液(200 ng/mL)⁽¹⁾**: 使用時に、標準液(10 µg/mL) 5 mL を全量フラスコ 250 mL にとり、標線まで水を加える。
- h) **検量線用スルファミン酸標準液(10~600 ng/mL)**: 使用時にスルファミン酸標準液(10 µg/mL)を 2.5 mL ~6 mL を 100mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。同様に、スルファミン酸標準液(200 ng/mL)の 5 mL~50 mL を全量フラスコ 100 mL 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。

(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質量分析計**: JIS K 0136 に規定する高速液体クロマトグラフ質量分析計で次の要件を満たすもの。
 - 1) 高速液体クロマトグラフ:
 - ① カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
 - ② カラム: 内径 2 mm~3 mm、長さ 100 mm~150 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5 µm の架橋型ジオールを化学結合したシリカゲル又はポリヒドロキシメタクリレートを充てんしたもの。質量分析計仕様のもの。
 - 2) 質量分析計:
 - ① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法
 - ② イオン検出方式: 選択イオン検出(SIM)法
- b) **マグネチックスターラー**

- c) 遠心分離機: $1700 \times g$ で遠心分離可能なもの。
- d) 高速遠心分離機: $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で遠心分離可能なもの。

備考 1. LC-MS に代えて高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いることができる。この場合、(4.3)a)高速液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件(シングルマスモード)を参考にして設定し、b)の操作により検量線を作成できることを事前に確認すること。

備考 2. カラムは LUNA HILIC、Shodex ODP2 HP-2D 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。

(4.1.1) 粉状分析用試料

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL 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、上澄み液を共栓遠心沈殿管 50 mL にとる。
- d) 遠心力約 $1700 \times g$ で約 5 分間遠心分離⁽²⁾、上澄み液を抽出液とする。

注 (2) 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 $1700 \times g$ 程度となる。

備考 3. (4.1.1)c) 及び d) の操作に代えて、ろ紙 3 種を用いてろ過し、ろ液を抽出液としてもよい。

(4.1.2) 液状分析用試料

- a) 分析試料 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 100 mL に入れる。
- b) 水約 50 mL を加え、振り混ぜる。
- c) 標線まで水を加え、抽出液とする。

(4.2) 希釈 抽出液の希釈は、次のとおり行う。

- a) 抽出液 2 mL を全量フラスコ 200 mL にとる。
- b) 標線まで水を加え、共栓遠心沈殿管⁽³⁾ 1.5 mL にとる。
- c) 遠心力 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で約 5 分間遠心分離⁽⁴⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注 (3) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(4) 回転半径 7.2 cm ~ 8.9 cm 及び回転数 10000 rpm で遠心力 $8100 \times g \sim 10000 \times g$ 程度となる。

備考 4. (4.2)b) 及び c) 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。

(4.3) 測定 測定は、JIS K 0136 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質量分析計の操作方法による。

- a) **高速液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件:** 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) 高速液体クロマトグラフ:

- ① カラム: 架橋型ジオールを化学結合したシリカゲルカラム又はポリヒドロキシメタクリレート(内径 2 mm ~3 mm、長さ 100 mm~150 mm、粒径 5 μ m)
- ② 流量: 0.2 mL/min
- ③ 溶離液: ぎ酸アンモニウム緩衝液-アセトニトリル(1+9)
- ④ カラム恒温槽: 40 °C
- ⑤ 注入量: 1 μ L
- ⑥ 測定時間: 20 分

2) 質量分析計:

- ① イオン化法: エレクトロスプレーイオン(ESI)法
- ② モード: ネガティブ
- ③ キャピラリー電圧: -3.5 kv
- ④ イオン源温度: 300 °C
- ⑤ ネブライザガス流量: 1.5 L/min
- ⑥ デソルベーション温度: 250 °C
- ⑦ モニターイオン: m/z 95.9

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 1 μ L を高速液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、モニターイオン(m/z)のクロマトグラムを記録し、ピーク面積を求める。
- 2) 各検量線用標準液のスルファミン酸濃度とモニターイオンのピーク面積との検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 1 μ L を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線からスルファミン酸量を求め、分析試料中のスルファミン酸(アミド硫酸)を算出する。

備考 5. 硫酸アンモニア 1 銘柄, 副産窒素肥料 1 銘柄, 副産複合肥料 1 銘柄, 化成肥料 1 銘柄, 液状複合肥料 1 銘柄に含有許容量の 1/5~4 倍相当量のスルファミン酸を添加した試料を用いて回収試験を行った結果は、0.1 % (質量分率)、0.025 % (質量分率) 及び 0.005 % (質量分率) の添加レベルで平均回収率が 97.6 %~104.2 %、95.2 %~107.0 % 及び 96.4 %~111.2 % あった。

精度の評価のため、硫酸アンモニア、副産窒素肥料及び化成肥料を用いて日を変えての反復試験の試験成績について一元配置分散分析を用いて解析し、中間精度及び併行精度を算出した結果を表 1 に示す。試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表 2 に示す。なお、スルファミン酸濃度 0.0116 % (質量分率) では満足する室間再現精度が得られなかったが、スルファミン酸濃度 0.0386 % (質量分率)~0.401 % (質量分率) の範囲で十分な室間再現精度が得られた。

表1 スルファミン酸の日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験 日数(T) ¹⁾	平均値 ²⁾ (%) ³⁾	s_r ⁴⁾ (%) ³⁾	RSD_r ⁵⁾ (%)	$s_{I(T)}$ ⁶⁾ (%) ³⁾	$RSD_{I(T)}$ ⁷⁾ (%)
硫酸アンモニア	5	0.0974	0.0011	1.1	0.0027	2.7
副産窒素肥料	5	0.0656	0.0014	2.1	0.0017	2.6
化成肥料	5	0.00510	0.00012	2.4	0.00029	5.8

1) 2点併行試験を実施した試験日数

2) 平均値(試験日数(T)×併行試験数(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 スルファミン酸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⁾ (%)
硫酸アンモニア	9	0.203	0.021	10.4	0.024	11.9
副産窒素肥料	9	0.401	0.030	7.5	0.035	8.8
化成肥料	7	0.0957	0.0043	4.5	0.0043	4.5
副産複合肥料	9	0.0166	0.0028	16.8	0.0048	29.1
液状複合肥料1	9	0.0381	0.0022	5.8	0.0049	12.8
液状複合肥料2	9	0.243	0.011	4.5	0.018	7.6

1) 解析に用いた試験室数

2) 平均値(n =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) 伊藤浩平, 藤田真理子, 橋本良美, 白井裕治: 液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)による肥料中のスルファミン酸の測定, 肥料研究報告, **8**, 38~49 (2015)
- 2) 野崎友春: 液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)法による肥料中のスルファミン酸の測定 —共同試験成績—, 肥料研究報告, **9**, 69~76 (2015)
- 3) 小塚健志, 伊藤浩平, 中村信仁, 白井裕治: 液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)法による肥料中のスルファミン酸の測定 —共同試験成績—, 肥料研究報告, **11**, 47~53 (2018)

(5) 試験法フローシート 肥料中のスルファミン酸試験法のフローシートを次に示す。

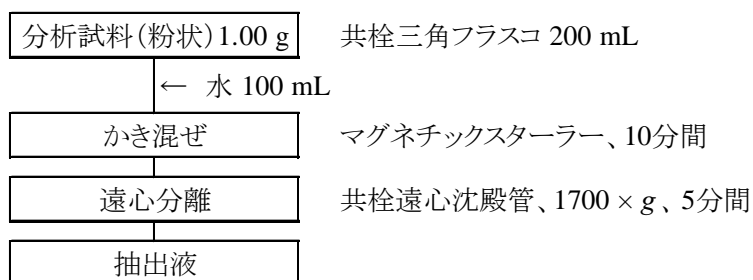


図1-1 肥料中のスルファミン酸試験法フローシート(抽出操作(4.1.1))

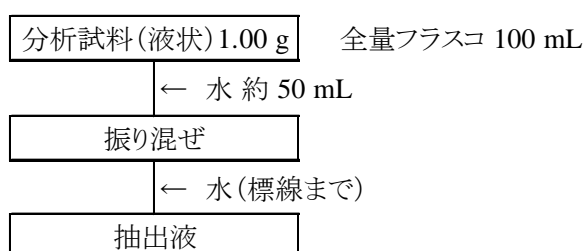


図1-2 肥料中のスルファミン酸試験法フローシート(抽出操作(4.1.2))

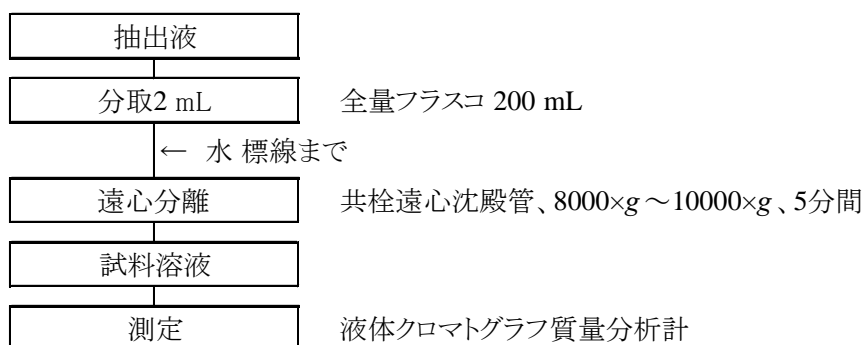
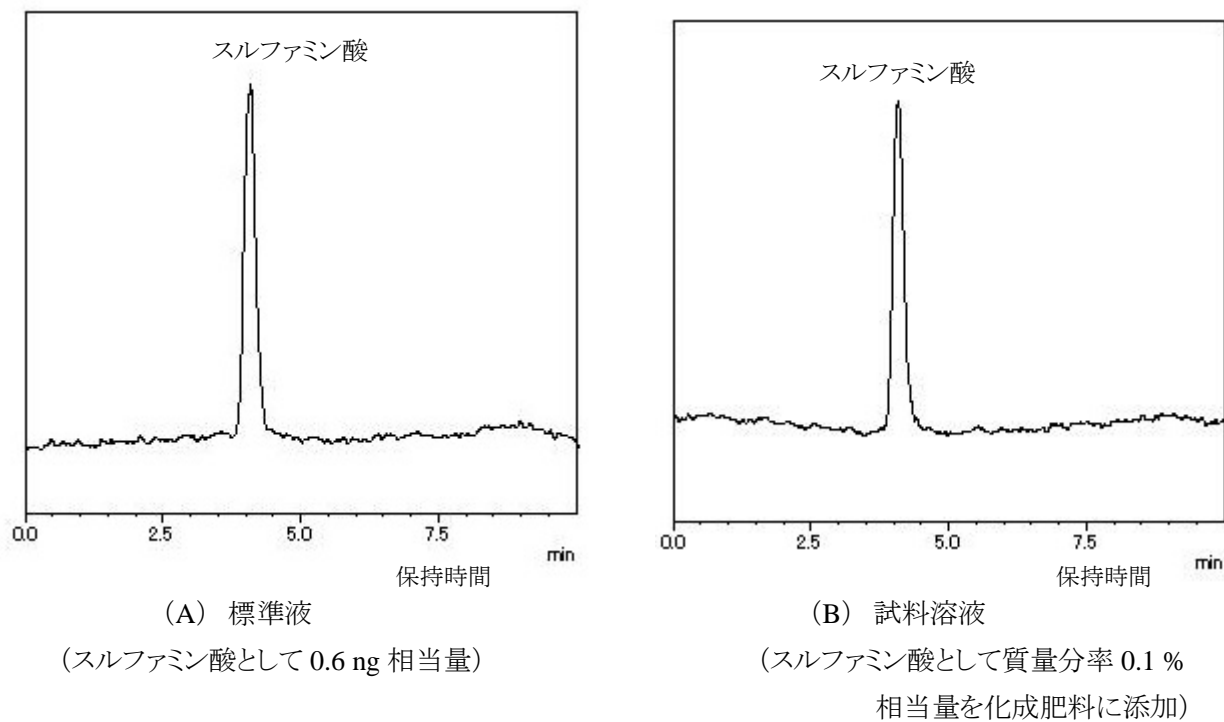


図2 肥料中のスルファミン酸試験法フローシート(希釈及び測定操作)

参考 スルファミン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 スルファミン酸のクロマトグラム

LC-MS の測定条件

カラム: LUNA HILIC (内径 2.0 mm、長さ 100 mm、粒径 5 μ m)

その他の条件は(4.3 a) LC-MS 測定条件の例示のとおり