

5 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－

小塚健志¹, 伊藤浩平², 中村信仁¹, 白井裕治¹

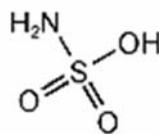
キーワード スルファミン酸, 肥料, 液体クロマトグラフ質量分析計, 共同試験

1. はじめに

スルファミン酸は、普通肥料の公定規格¹⁾で有害成分として含有許容量が規定されている。肥料中のスルファミン酸の定量については、肥料分析法²⁾において亜硝酸ナトリウム法が定められているが、滴定操作において外部指示薬による終点の判定に高度な修練が必要である。また、肥料の種類によっては共存物質の影響により終点の判定が困難となり精確な測定が行えないという問題がある。このことから、肥料中のスルファミン酸の分析法として、平成 26 年度に伊藤ら³⁾が液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)法について真度、併行精度、定量下限等を検討したところ、単一試験室内における試験方法の妥当性が確認された。そこで、平成 27 年度に野崎⁴⁾がこの方法の性能評価のため、共通試料を用いて試験室間の再現精度を調査したところ、室間再現精度における試験方法の妥当性が確認できなかった。

今回、この LC-MS 法による肥料中のスルファミン酸の測定について、機器測定でのマトリックスの影響を低減させるために試験溶液の希釈倍率を見直し、性能評価のため、再度、共通試料を用いて試験室間の再現精度を調査したので、その概要を報告する。

なお、スルファミン酸の構造式を Fig.1 に示した。



Sulfamic acid [HOSO₂NH₂]CAS No: 5329-14-6

Fig.1 Chemical structural formula of sulfamic acid

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料

市販されている硫酸アンモニア、副産窒素肥料、化成肥料及び副産複合肥料を目開き 500 μm のふるいを通

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部(現)農薬検査部

過するまで粉碎し、よく混合した4種類の粉状及び市販されている2種類の液状複合肥料を共同試験用試料とした。これらの試料は対象成分の含有が認められない試料であったため、共同試験参加試験室においてスルファミン酸を添加して共同試験を実施することとした。

粉状の共同試験用試料は約1.5 gをポリエチレン袋に入れ密封して、液状の共同試験用試料は約1.5 mLをガラスバイアルに入れ栓をして調製した。一対のブラインド試料を提供するため、それぞれの共同試験用試料にランダムな番号を付し、参加試験室に配付した。

2) 添加用標準液

市販されているスルファミン酸を水に溶解した標準液の一定量を水で希釈して6種類の濃度の添加用標準液を用意した。

添加用標準液は約1.5 mLをガラスバイアルに入れ、一対のブラインド試料を提供するため、1)の6種類の共同試験用試料と共通した番号をバイアルに付し、参加試験室に配付した。

3) 装置及び器具

各試験室に設置しているLC-MS又はLC-MS/MS、マグネチックスターラー、遠心分離機及び高速遠心分離機を使用した。

4) スルファミン酸の測定

(1) 抽出

(1.1) 粉状分析用試料

分析試料1.00 gをはかって共栓三角フラスコ200 mLに入れ、水100 mLを加え、マグネチックスターラーを用いて10分間かき混ぜた。静置後、上澄み液を共栓遠心沈殿管50 mLに移し、1700×g(3000 rpm)で5分間遠心分離して上澄み液を抽出液とした。

(1.2) 液状分析用試料

分析用試料1.00 gをはかって全量フラスコ100 mLに入れ、水約50 mLを加え、振り混ぜた。その後、標線まで水を加え、抽出液とした。

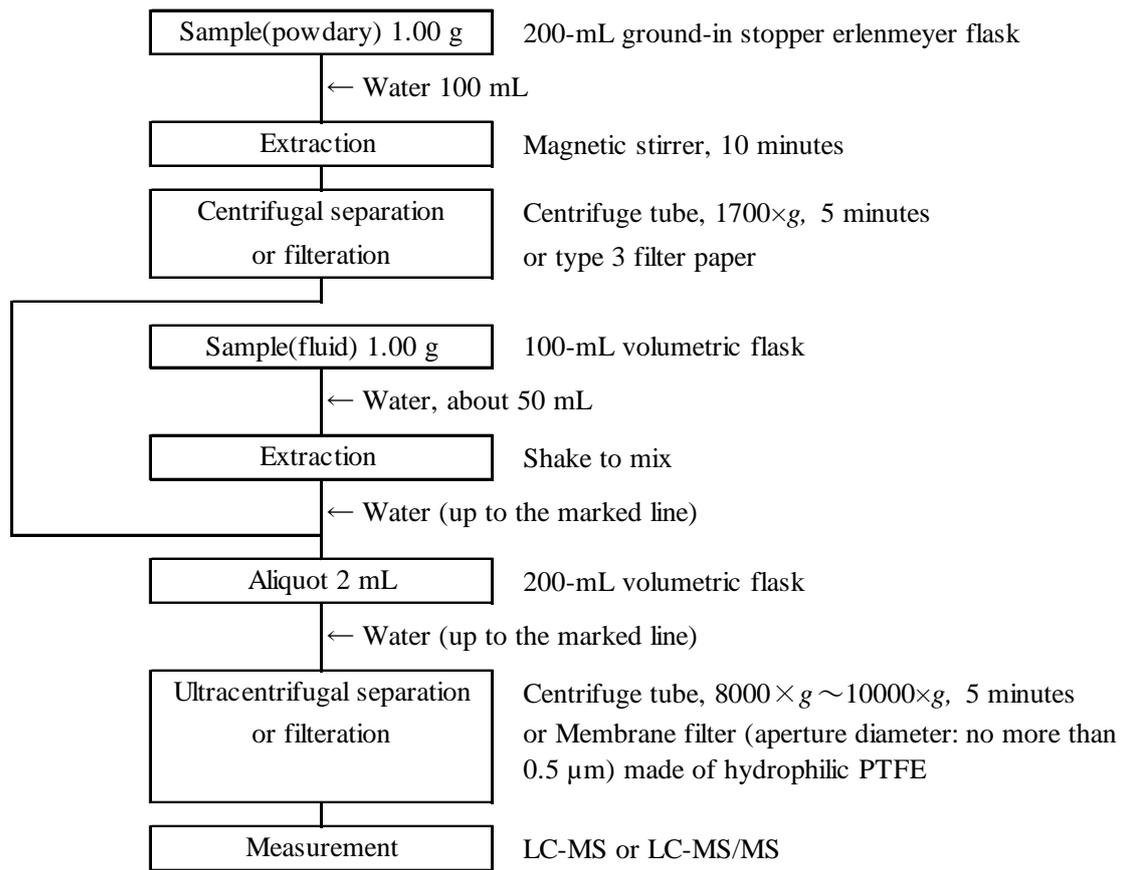
(2) 希 釈

抽出液2 mLを全量フラスコ200 mLにとり、標線まで水を加える。その後、共栓遠心沈殿管1.5 mLに移し、8000×g(10000 rpm)で5分間遠心分離して上澄み液を試料溶液とした。

(3) 測 定

試料溶液及び検量線作成用標準液をLC-MS又はLC-MS/MSに注入し、選択反応検出(SRM)クロマトグラムを得た。得られたSRMクロマトグラムから各成分のピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料溶液中の成分量を求め、分析試料中のスルファミン酸量を算出した。なお、測定にあたっては、LC-MS/MSではMS分析モードを用い、肥料等試験法(2018)5.7.b項⁵⁾を参照して各試験室のLC-MS又はLC-MS/MS操作方法に従った。

なお、定量法の概要をScheme 1に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for sulfamic acid in fertilizer

5) 共同試験

試験に参加した9試験室は以下の通りであり、それぞれの試験室において送付した12試料について4)に従って分析した。なお、各試験室で使用したLC-MS又はLC-MS/MSの機種等をTable 1に示した。

- ・ 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所微量試験部微量試験課
- ・ 株式会社島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター
- ・ 埼玉県環境科学国際センター
- ・ ジーエルサイエンス株式会社総合技術本部カスタマーサポートセンター
- ・ 昭和電工株式会社 Shodex サービスセンター
- ・ 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
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部飼料鑑定第一課
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部肥料鑑定課

(50音順)

Table 1 Instruments used in the collaborative study

LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
LC: 1100 Series, Agilent Technologies MS: 1956B, Agilent Technologies	Inertsil HILIC, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: TQD, Waters	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 μm)
LC: LC800 System, GL Sciences MS/MS: API 4000 Q TRAP, AB SCIEX	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 μm)
LC: Nexera, Shimadzu MS/MS: LCMS-8030 Plus, Shimadzu	Shodex ODP2 HP-2D, Showa Denko (2 mm×150 mm, 5 μm)
LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 μm)
LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 μm)
LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 μm)
LC: Prominence, Shimadzu MS: LCMS-2010EV, Shimadzu	Luna HILIC, Phenomenex (2 mm×100 mm, 5 μm)

3. 結果及び考察

1) 共同試験成績及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験成績を Table 2-1 及び Table 2-2 に示した。各系列の試料の結果を IUPAC の共同試験プロトコル⁶⁾に従って統計処理した。試験成績の外れ値を検定するために Cochran 検定及び Grubbs 検定を実施した。その結果、9 試験室の試験成績のうち 1 種類の試料で 2 試験室が外れ値として判定された。

Table 2-1 Individual result of sulfamic acid

Lab ID ^{a)}	Ammonium sulphate		By-product nitrogen fertilizer		% (Mass fraction) Compound fertilizer	
	A	0.239	0.224	0.457	0.443	0.118 ^{b)}
B	0.193	0.189	0.387	0.370	0.0962	0.0980
C	0.195	0.193	0.399	0.389	0.102	0.0890
D	0.202	0.191	0.391	0.350	0.0954	0.0954
E	0.187	0.198	0.421	0.400	0.0961	0.102
F	0.241	0.188	0.468	0.396	0.115 ^{b)}	0.113 ^{b)}
G	0.204	0.140	0.363	0.370	0.0953	0.0923
H	0.240	0.215	0.461	0.369	0.0940	0.0996
I	0.211	0.207	0.395	0.390	0.0899	0.0939

a) Laboratory identification

b) Outlier of Grubbs test

Table 2-2 Individual result of sulfamic acid

% (Mass fraction)

Lab ID ^{a)}	By-product compound fertilizer		Liquid compound fertilizer 1		Liquid compound fertilizer 2	
A	0.0173	0.00879	0.0320	0.0356	0.283	0.263
B	0.0170	0.0150	0.0368	0.0335	0.230	0.238
C	0.0251	0.0224	0.0404	0.0418	0.264	0.255
D	0.0175	0.0120	0.0354	0.0319	0.214	0.229
E	0.0185	0.0202	0.0385	0.0378	0.240	0.237
F	0.0201	0.0170	0.0316	0.0358	0.250	0.214
G	0.0193	0.0228	0.0466	0.0453	0.225	0.232
H	0.0116	0.0124	0.0416	0.0460	0.252	0.255
I	0.0107	0.0107	0.0397	0.0362	0.253	0.247

Table 3 Statistical analysis of collaborative study results for sulfamic acid

Sample	Labs	Mean ^{b)}	s_r ^{c)}	RSD_r ^{d)}	$CRSD_r$ ^{e)}	s_R ^{f)}	RSD_R ^{g)}	$CRSD_R$ ^{h)}
		$p(q)$ ^{a)}	% (Mass fraction)	% (Mass fraction)	%	%	% (Mass fraction)	%
Ammonium sulphate	9(0)	0.203	0.021	10.4	4	0.024	11.9	8
By-product nitrogen fertilizer	9(0)	0.401	0.030	7.5	4	0.035	8.8	8
Compound fertilizer	7(2)	0.0957	0.0043	4.5	4	0.0043	4.5	8
By-product compound fertilizer	9(0)	0.0166	0.0028	16.8	4	0.0048	29.1	8
Liquid compound fertilizer 1	9(0)	0.0381	0.0022	5.8	4	0.0049	12.8	8
Liquid compound fertilizer 2	9(0)	0.243	0.011	4.5	4	0.018	7.6	8

a) Number of laboratories, where p =number of laboratories retained after outlier removed and (q) =number of outlier

b) Grand mean value of the results of duplicate sample which were reported from laboratories retained after outlier removed ($n=p \times$ number of samples (2))

c) Standard deviation of repeatability

d) Relative standard deviation of repeatability

e) Rough standard of relative standard deviation of repeatability in Testing Methods for Fertilizers 2018

f) Standard deviation of reproducibility

g) Relative standard deviation of reproducibility

h) Rough standard of relative standard deviation of reproducibility in Testing Methods for Fertilizers 2018

3) 併行精度及び室間再現精度

試験成績より算出した平均値, 併行標準偏差 (s_r) 及び併行相対標準偏差 (RSD_r) 並びに室間再現標準偏差 (s_R) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を Table 3 に示した。

スルファミン酸の平均値は 0.0166 % (質量分率) ~ 0.401 % (質量分率) であり, その併行標準偏差は 0.0022 % (質量分率) ~ 0.030 % (質量分率), 併行相対標準偏差は 4.5 % ~ 16.8 %, 室間再現標準偏差は 0.0043 % (質量分率) ~ 0.035 % (質量分率) 及び室間再現相対標準偏差は 4.5 % ~ 29.1 % であった。

今回配付した共同試験用試料(濃度範囲)において, 最も低い濃度の結果では, 併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差が肥料等試験法⁵⁾における試験法の妥当性確認の手順に示している各濃度レベルにおける精度の目安の 2 倍を超えていた。その他の結果では, 室間再現相対標準偏差はこの精度の目安の 2 倍以

内に収まっていた。なお、この内の 1 種類の肥料で併行相対標準偏差がこの精度の目安の 2 倍以上にあった。

4. まとめ

9 試験室において 6 種類(12 点)の肥料を用いて共同試験を実施し、LC-MS 法による肥料中のスルファミン酸の測定の評価を行った。その結果、スルファミン酸の平均値 0.0166 % (質量分率)~0.401 % (質量分率)において室間再現精度(相対標準偏差)は 4.5 %~29.1 %であった。試験室間の比較による本試験法の室間再現精度は、最も低い濃度のスルファミン酸の平均値 0.0166 % (質量分率)では肥料等試験法に示している精度の目安の 2 倍を上回っており目標とする精度を満たさなかったが、0.0381 % (質量分率)~0.401 % (質量分率)の濃度範囲では肥料等試験法に示している精度の目安の 2 倍以内で満足な精度にあった。

謝辞

共同試験にご協力頂きました一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所微量試験部微量試験課、株式会社島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター、埼玉県環境科学国際センター、ジーエルサイエンス株式会社総合技術本部カスタマーサポートセンター、昭和電工株式会社 Shodex サービスセンターの各位に謝意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省告示:肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件,昭和61年2月22日,農林水産省告示第284号,最終改正平成30年1月22日,農林水産省告示第134号(2018)
- 2) 農林水産省農業環境技術研究所:肥料分析法(1992年版),日本肥糧検定協会,東京,(1992)
- 3) 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)法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)
- 4) 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,肥料研究報告, **9**, 69~76 (2016)
- 5) 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 >
- 6) Horwitz W. : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331~343 (1995)

Determination of Sulfamic acid in Fertilizer by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry (LC-MS): A Collaborative Study

Kenji KOZUKA¹, Kohei ITOU², Nobuhito NAKAMURA¹, and Yuji SHIRAI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

(Now) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station

A collaborative study was conducted to evaluate liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) for determination of sulfamic acid in fertilizer. Sulfamic acid in fertilizer was extracted and diluted with water. The sulfamic acid was analyzed by LC-MS. Six samples, respectively, were sent to 9 collaborators. These samples were analyzed as blind duplicates. The mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) were 0.0166 % (mass fraction) ~ 0.401 % (mass fraction) and 4.5 % ~ 29.1 %, respectively. These results indicated that this method has an acceptable precision in 0.0381 % (mass fraction) ~ 0.401 % (mass fraction), but an unacceptable precision in 0.0166 % (mass fraction) for determination of sulfamic acid.

Key words sulfamic acid, fertilizer, LC-MS, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **11**, 47~53 2018)