

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(記号: 5.7.a-2017、AS-acid.a-1)は硫酸アンモニウムに適用する。

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(IC)又は高速液体クロマトグラフ(HPLC): JIS K 0127 に規定する IC 又は JIS K 0124 に規定する HPLC 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(IC)又は高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

a) **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)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 IC 又は HPLC 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)⁽¹⁾を調製し、(2)i)の各標準液(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。

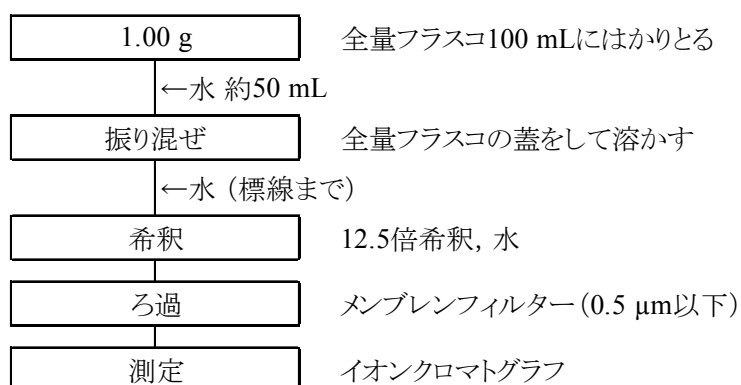
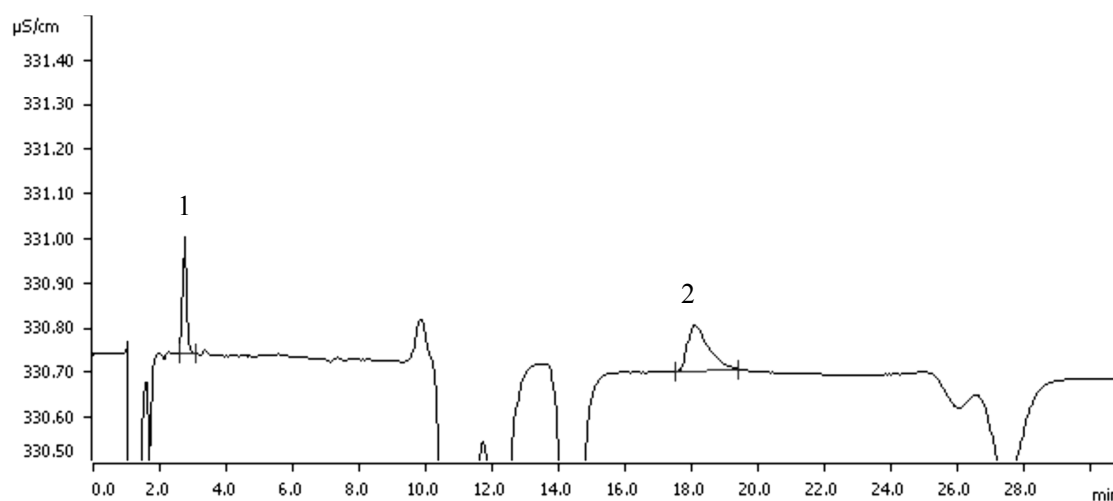
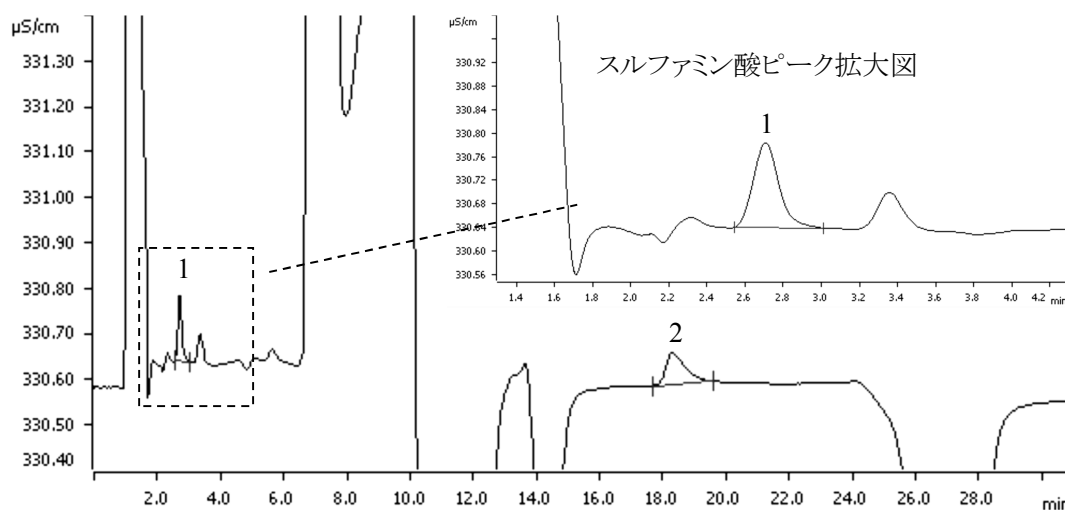


図 硫酸アンモニア中のスルファミン酸試験法フローシート

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(記号: 5.7.b-2017、AS-acid.b-1)は肥料に適用する。

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。

(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) **ギ酸:** LC-MS 用試薬又は同等の品質のもの。
- d) **ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 3.2):** 純度 95 % (質量分率) 以上のギ酸アンモニウム 3.153 g を水に溶かして 500 mL とし、ギ酸で 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 2.5 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(LC-MS):** JIS K 0136 に規定する LC-MS 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×g で遠心分離可能なもの。
- d) **高速遠心分離機:** 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。

備考 1. カラムは LUNA HILIC 又は Shodex ODP2 HP-2D 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 分間遠心分離し⁽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 2. (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 5 mL を全量フラスコ 100 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 分間遠心分離し⁽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 3. (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。

備考 4. 家庭園芸用複合肥料は、主成分の合計量が 1%未満で液状の場合、抽出液の希釈は行わず(4.1.2)b) の操作の後(4.2)b) 及び c) の操作を実施することができる。

(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 μm)

- 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 µL
- 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 µL を LC-MS 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 µL 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。

なお、この試験法の定量下限は 0.002 % (質量分率) 程度である。また、**備考 4** に示す、抽出液の希釈操作を省略する方法の定量下限は 0.0002 % (質量分率) 程度である。

表1 日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験		併行精度		中間精度	
	日数	平均値 ²⁾	s_r ⁴⁾	RSD_r ⁵⁾	$s_{I(T)}$ ⁶⁾	$RSD_{I(T)}$ ⁷⁾
	T ¹⁾	(%) ³⁾	(%) ³⁾	(%)	(%) ³⁾	(%)
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

4) 併行標準偏差

2) 平均値(試験日数(T)×併行試験数(2))

5) 併行相対標準偏差

3) 質量分率

6) 中間標準偏差

7) 中間相対標準偏差

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)

(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。

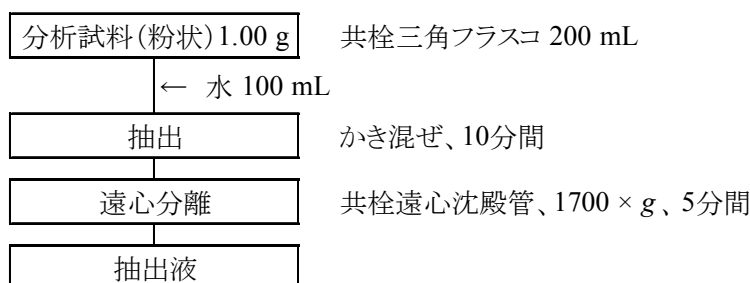


図1-1 肥料中のスルファミン酸試験法フローシート(抽出操作(4.1.1))

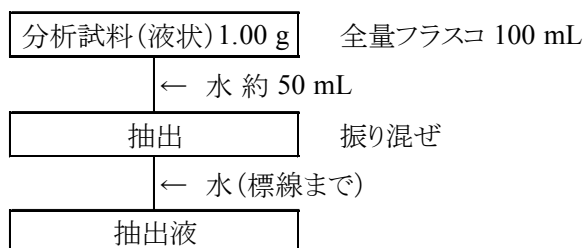


図1-2 肥料中のスルファミン酸試験法フローシート(抽出操作(4.1.2))

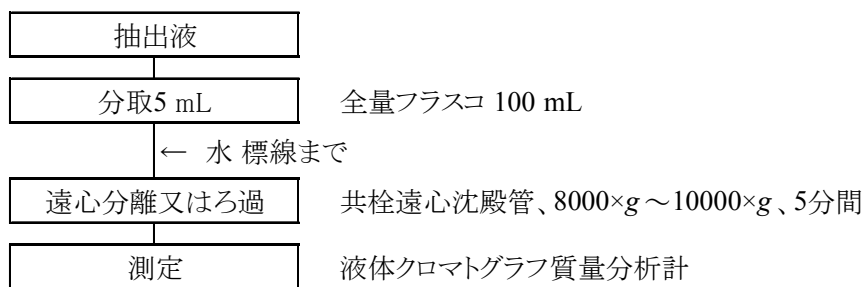
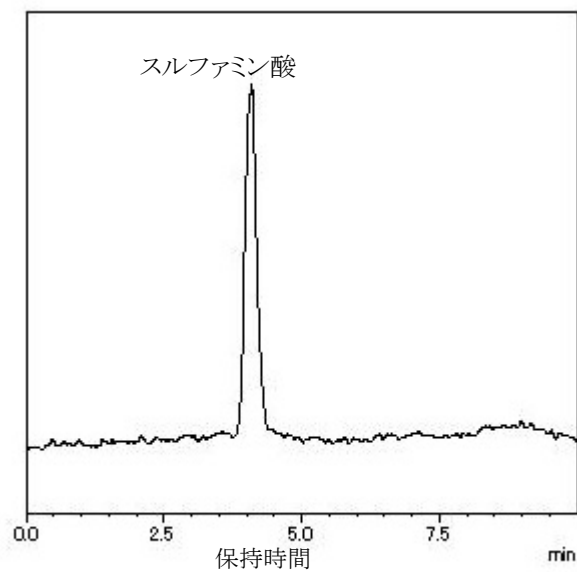
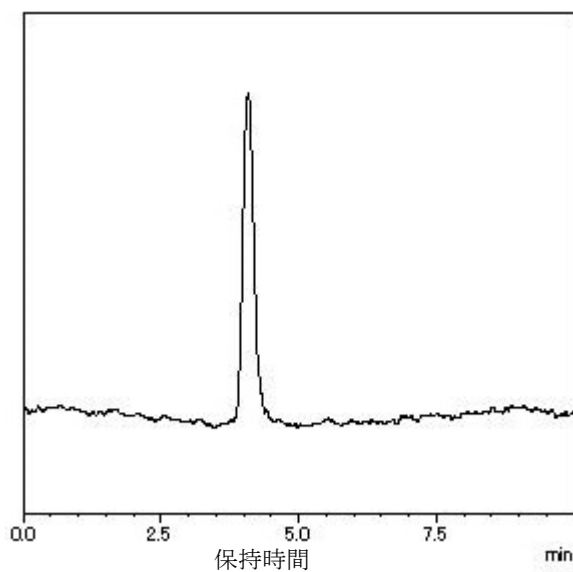


図2 肥料中のスルファミン酸試験法フローシート(測定操作)

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を次に示す。



(A) 標準液
(スルファミン酸として 0.6 ng 相当量)



(B) 試料溶液
(スルファミン酸として質量分率 0.1 %相当量を化成肥料に添加)

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 μm)

その他の条件は(4.3) a) LC-MS 測定条件の例示のとおり

5.8 チオシアン酸アンモニウム(硫青酸化物)

5.8.a イオンクロマトグラフ法

(1) 概要

この試験法(記号: 5.8.a-2017、SCN.a-1)は硫酸アンモニアに適用する。

分析試料に水を加えて硫青酸化物(以下、「チオシアン酸アンモニウム」という。)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、チオシアン酸を電気伝導度検出器で測定し、分析試料中のチオシアン酸アンモニウム(硫青酸化物)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) チオシアン酸アンモニウム標準液(1000 mg/L)⁽¹⁾: JIS K 9000 に規定するチオシアン酸アンモニウム⁽³⁾ 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) チオシアン酸アンモニウム標準液(10 mg/L)⁽¹⁾: 使用時に、チオシアン酸アンモニウム標準液(1000 mg/L) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- j) 検量線用チオシアン酸アンモニウム標準液(0.3 mg/L~3 mg/L): 使用時にチオシアン酸アンモニウム標準液(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) 潮解性があるのでデシケーター中で保存することを推奨する。

(3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

- a) 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): JIS K 0127 に規定する IC 又は JIS K 0124 に規定する HPLC 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⁽⁴⁾。

- 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(4) 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(IC)又は高速液体クロマトグラフ(HPLC)の操作方法による。

- a) **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)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 °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 IC 又は HPLC 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チオシアン酸アンモニウム量を求め、分析試料中のチオシアン酸アンモニウム(硫青酸化物)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. 本試験法では硫青酸化物(チオシアン酸アンモニウム)及びスルファミン酸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)⁽¹⁾を調製し、(2)i)の各標準液(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 101.8 %～103.7 %及び 93.9 %～97.4 %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チオシアン酸アンモニウム試験法のフローシートを次に示す。

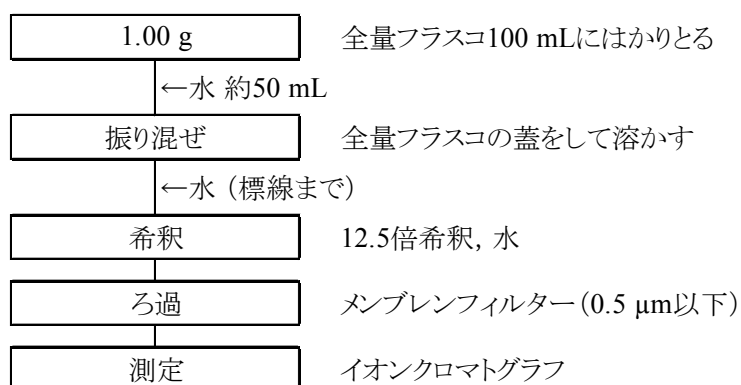
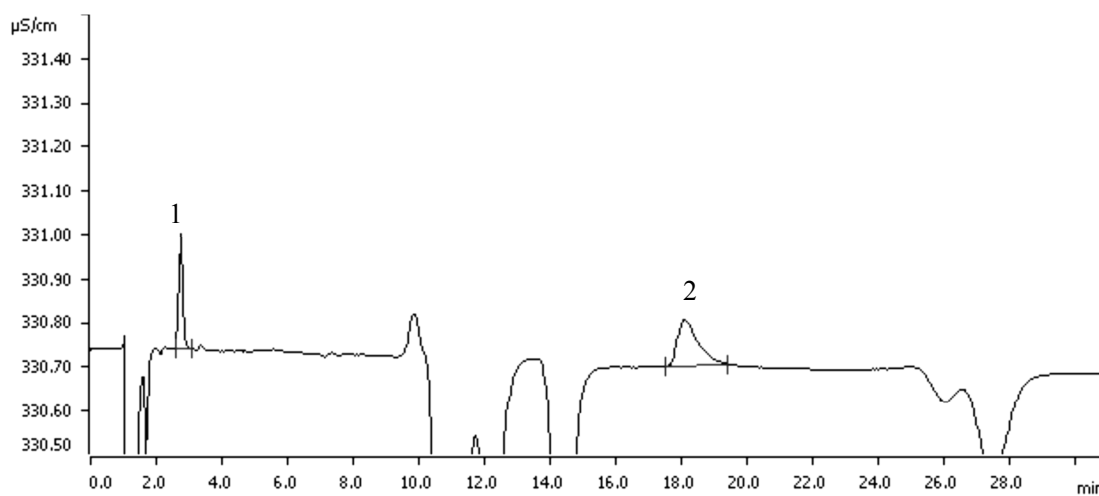
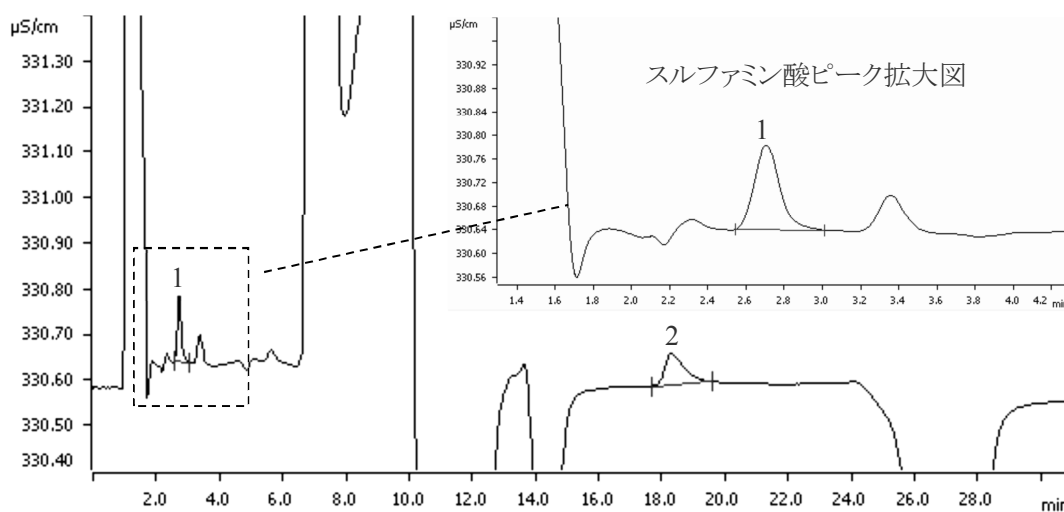


図 硫酸アンモニア中のチオシアン酸アンモニウム試験法フローシート

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) (2,500 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)

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

5.8.b 高速液体クロマトグラフ法

(1) 概要

この試験法(記号: 5.8.b-2017、SCN.b-1)は肥料に適用する。

分析試料に水を加えて硫青酸化物(以下、「チオシアン酸アンモニウム」という。)を抽出し、必要に応じて pH を調整し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、アミノ基を化学結合したビニルアルコールポリマーカラム又はアミノ基を化学結合したシリカゲルカラムで分離し、波長 210 nm で測定し、分析試料中のチオシアン酸アンモニウム(硫青酸化物)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、亜硝酸及び硫青酸化物(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 試薬及び水は、次による。

- a) **水**: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) **水酸化ナトリウム**: JIS K 8576 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- c) **りん酸水素二ナトリウム・12 水和物**: JIS K 9019 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- d) **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。
- e) **過塩素酸ナトリウム一水和物**: JIS K 8227 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- f) **チオシアン酸アンモニウム標準液(1 mg/mL)⁽¹⁾**: JIS K 9000 に規定するチオシアン酸アンモニウム 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。
- g) **チオシアン酸アンモニウム標準液(100 µg/mL)⁽¹⁾**: 使用時に、チオシアン酸アンモニウム標準液(1 mg/mL) 10 mL を全量フラスコ 100 mL にとり、標線まで水を加える。
- h) **検量線用チオシアン酸アンモニウム標準液(1~20 µg/mL)**: 使用時にチオシアン酸アンモニウム標準液(100 µg/mL)の 1~20 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(HPLC)**: JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
 - 1) **カラム**: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5 µm のアミノ基を化学結合したポリビニルアルコール又はアミノ基を化学結合したシリカゲル⁽²⁾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) **検出部**: 吸光光度検出器で波長 210 nm 付近で測定できるもの。
- b) **マグネチックスターラー**
- c) **遠心分離機**: 1700×g で遠心分離可能なもの。
- d) **高速遠心分離機**: 8000×g~10000×g で遠心分離可能なもの。
- e) **pH 試験紙**: 指示薬を紙に染み込ませ、乾燥させたもので、pH 1~pH 11 の範囲を測定でき、pH 1 間隔の変色表が添付されているもの。

注 (2) シリカゲルの残存シラノール基はイオンの測定に影響を及ぼすことがあるので、そのシラノール基を処理してチオシアン酸の測定に影響しないカラムを使用すること。処理例として、シリコーンポリマーの均一な薄膜によるシリカゲルの完全な被覆等がある。

備考 1. カラムは Asahipak NH2P-50 4E の名称又は CAPCELL PAK NH2 UG80 の名称で市販されている。

備考 2. pH 試験紙は UNIV 試験紙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 分間遠心分離し⁽³⁾、上澄み液を抽出液とする。

注 (3) 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。

(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) pH 調整 抽出液の pH 調整は、次のとおり行う。

- a) 抽出液の一部(少量)をとり、pH 試験紙を用いて pH を確認する。
- b) a) で抽出液の pH が pH 5 以上の場合は、抽出液を共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾ 1.5 mL にとり、f) の操作を実施し、試料溶液を調製する。
- c) a) で抽出液の pH が pH 4 以下の場合は、抽出液 40 mL をビーカー 100 mL にとる。
- d) pH 計を用いて水酸化ナトリウム溶液(5 mg/mL)を加えて pH 5~pH 7 に調整し、水で全量フラスコ 50 mL に移す。
- e) 標線まで水を加え、共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾ 1.5 mL にとる。
- f) 遠心力 $8000 \times g \sim 10000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁵⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注 (4) 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。

(5) 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 3. (4.2)b) 及び e)~f) 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 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(HPLC)の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)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:** アミノ基を化学結合したビニルアルコールポリマーカラム(内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~

250 mm、粒径 5 μm) 又はアミノ基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm、粒径 5 μm)

- 2) **カラム槽温度**: 30 °C～40 °C
- 3) **溶離液**⁽¹⁾: リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 1.79 g、リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.78 g 及び過塩素酸ナトリウム一水和物 14.04 g を水に溶かして 1000 mL とする。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**: 0.9 mL/min～1.0 mL/min
- 5) **注入量**: 10 μL
- 6) **検出器**: 吸光光度検出器、測定波長 210 nm

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 10 μL を HPLC に注入し、波長 210 nm 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波長 210 nm 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 10 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チオシアン酸アンモニウム量を求め、分析試料中のチオシアン酸アンモニウム(硫青酸化物)を算出する。

備考 4. 本試験法ではチオシアン酸アンモニウム(硫青酸化物)及び亜硝酸の同時測定が可能である。その場合は、亜硝酸標準液(1 mg/mL)、チオシアン酸アンモニウム標準液(1 mg/mL)の一定量を混合し、水で希釈して混合標準液(100 μg/mL)⁽¹⁾を調製し、**(2) h)**のチオシアン酸アンモニウム標準液(100 μg/mL)に変えて使用する。以下、**(4.3) 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 1 銘柄、被覆窒素肥料 1 銘柄、配合肥料 2 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 1/2～5 倍相当量のチオシアン酸アンモニウムを添加した試料を用いて回収試験を行った結果は、0.025 % (質量分率)、0.01 % (質量分率)、0.005 % (質量分率) 及び 0.0025 % (質量分率) の添加レベルで平均回収率が 95.4 %～100.5 %、94.7 %～103.8 %、83.3 %～109.0 % 及び 87.2 %～103.3 %であった。

また、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 1 に示す。チオシアン酸アンモニウムは 0.00476 % (質量分率)～0.204 % (質量分率) の範囲で十分な室間再現精度を有していた。

なお、この試験法の定量下限は 0.002 % (質量分率) 程度である。

表1 チオシアン酸アンモニウム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⁾ (%)
家庭園芸用複合肥料1	10	0.00476	0.00019	4.1	0.00060	12.7
家庭園芸用複合肥料2	9	0.00976	0.00029	2.9	0.00050	4.7
家庭園芸用複合肥料3	9	0.0506	0.0019	3.7	0.0022	4.3
化成肥料1	10	0.101	0.002	2.3	0.003	2.6
化成肥料2	11	0.204	0.006	2.7	0.008	3.7
化成肥料3	9	0.00989	0.00037	3.8	0.00060	6.5

- | | |
|----------------------------|---------------|
| 1) 解析に用いた試験室数 | 5) 併行相対標準偏差 |
| 2) 平均値 (n =試験室数×試料数(2)) | 6) 室間再現標準偏差 |
| 3) 質量分率 | 7) 室間再現相対標準偏差 |
| 4) 併行標準偏差 | |

参考文献

- 伊藤浩平, 木村康晴, 長谷川正憲, 白井裕治: 高速液体クロマトグラフ法を用いた肥料中の亜硝酸およびチオシアン酸塩の同時測定, 日本土壤肥料学雑誌, **87**(2), 120~124 (2016)
- 長谷川正憲, 木村康晴: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の亜硝酸及びチオシアン酸アンモニウム(硫青酸化物)の測定 -共同試験成績-, 肥料研究報告, **8**, 70~78 (2015)

- (5) **試験法フローシート** 肥料中のチオシアン酸アンモニウム試験法のフローシートを次に示す。

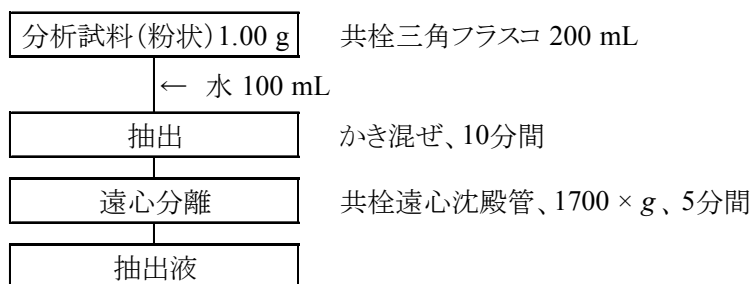


図1-1 肥料中のチオシアン酸アンモニウム試験法フローシート(抽出操作(4.1.1))

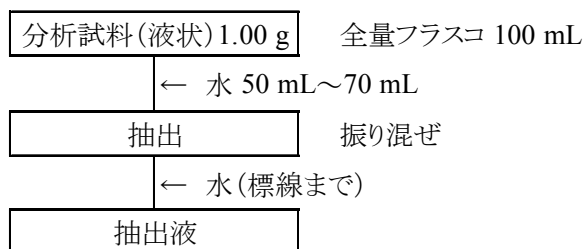


図1-2 肥料中のチオシアン酸アンモニウム試験法フローシート(抽出操作(4.1.2))

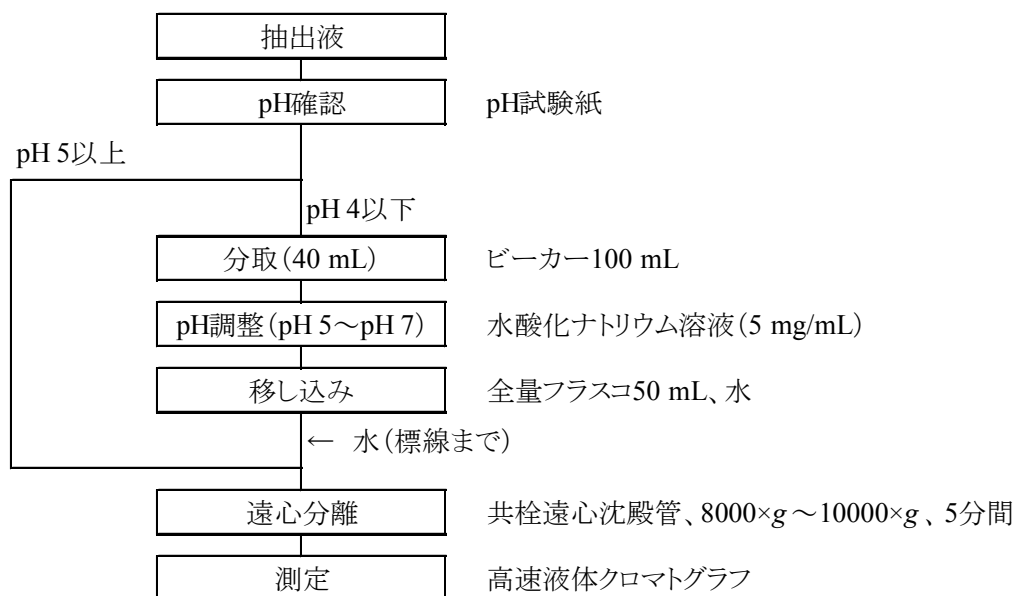
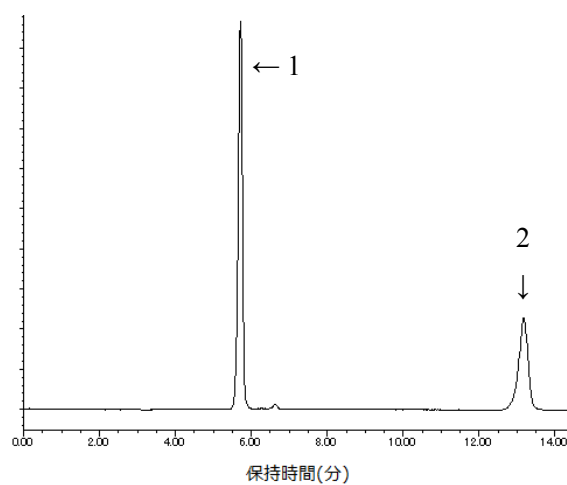


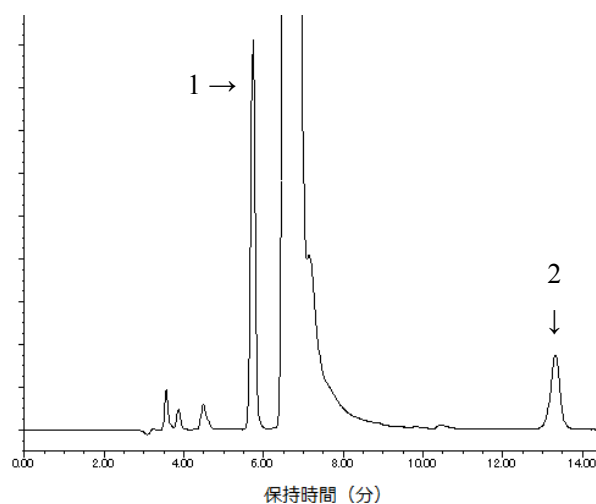
図2 肥料中のチオシアン酸アンモニウム試験法フローシート(測定操作)

参考 亜硝酸及びチオシアン酸アンモニウムの HPLC クロマトグラムを次に示す。



(A) 混合標準液

(亜硝酸、チオシアン酸アンモニウムとして各 100 ng 相当量(10 µg/mL、10 µL))



(B) 試料溶液

(亜硝酸、チオシアン酸アンモニウムとして各質量分率 0.1 %相当量を配合肥料に添加)

参考図 亜硝酸及びチオシアン酸アンモニウムの HPLC クロマトグラム
(ピーク: 1.亜硝酸、2.チオシアン酸)

HPLC の測定条件

カラム: CAPCELL PAK NH2 UG80(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm)

その他の条件は(4.3 a) HPLC 測定条件の例示のとおり