

1 イオンクロマトグラフを用いた肥料中のスルファミン酸分析法の改良

大島舞弓¹, 山西正将²

キーワード 肥料, スルファミン酸, イオンクロマトグラフ

1. はじめに

代表的な窒素質肥料である硫酸アンモニアの製法の一つとしてナイロンの原料であるカプロラクタムの製造工程から回収する方法が挙げられるが¹⁾, この方法で製造された硫酸アンモニアの中にはスルファミン酸が含まれる場合があり, 植物の生育に害を及ぼすことが報告されている²⁾.

現在, 肥料中のスルファミン酸の分析法は, イオンクロマトグラフを用いてイオン交換カラムで分離した後, 電気伝導度検出器で測定する分析法と, 高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用いた分析法が肥料等試験法³⁾に記載されているが, イオンクロマトグラフを用いた分析法は平成 23 年度及び平成 24 年度の検討において有機質肥料由来の有機酸の妨害ピークを分離できなかったことから, 対象肥料が硫酸アンモニア(単体)のみに限定されており⁴⁾, この分析法の推定された定量下限は 0.04 % (質量分率)となっている.

肥料の公定規格において, 硫酸アンモニア中のスルファミン酸の含有を許される最大量(含有許容量)は, 窒素 1.0 % (質量分率)につき, 0.01 % (質量分率)と定められており⁵⁾, 現在, 硫酸アンモニアとして登録されている肥料の中で最も窒素保証成分量の少ない肥料のアンモニア性窒素は 20.5 % (質量分率), つまりスルファミン酸の含有許容量は 0.21 % (質量分率)ほどとなり, 上記定量下限の分析法で十分に分析可能である. 一方で, 化成肥料中のスルファミン酸含有許容量は, 窒素, リン酸又は加里のそれぞれの最も大きい主成分の量の合計量の含有率 1.0 % (質量分率)につき, 0.005 % (質量分率)と定められていることから, 仮に主成分の合計量が 8 % (質量分率)であったとすると, スルファミン酸が含有許容量以上含まれていなければ既存の方法では分析できず, また, 登録肥料の中には主成分の保証成分量が 1.0 % (質量分率)程度のものであることから, 硫酸アンモニア以外の肥料には適用できない.

もう一つの分析法である LC-MS を用いた分析法は定量下限が 0.002 % (質量分率)程度と推定されており, すべての肥料に適用可能であるが⁶⁾, 装置が高額であり, 依頼分析費用も高額である. また, 肥料生産工場(150 社)が参加した技能試験(平成 30 年度の全国共通試料を用いた肥料の外部精度管理試験)のアンケート結果によると, LC-MS を所有している会社は 6 社で, イオンクロマトグラフの所有は 30 社であったことから, LC-MS によりスルファミン酸の分析を品質管理の一貫として行うことは難しい状況にある.

このことから, 多数の分析室で分析を可能とするため, イオンクロマトグラフを用いた分析法を硫酸アンモニア以外の肥料にも適用拡大する測定条件について検討を行い, 単一試験室における試験法の妥当性確認を行ったので報告する.

2. 材料及び方法

1) 分析用試料

硫酸アンモニア 2 点, 被覆窒素肥料 2 点, 混合窒素肥料 5 点, 混合加里肥料 2 点, 魚かす粉末 2 点, ひま

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)名古屋センター

し油かす及びその粉末 2 点, 副産肥料 6 点, 液状肥料 1 点, 混合汚泥複合肥料 1 点, 化成肥料 30 点, 混合堆肥複合肥料 1 点の計 54 点を用いた. これらを, 肥料等試験法³⁾2.3.3 に基づき 500 μm のふるいを通過するまで粉砕機で粉砕したものを分析用試料とした.

2) 試薬等の調製

(1) 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 (富士フィルム和光純薬) 0.1 g をひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg の桁まで測定した. 少量の水を加えて溶かし, 全量フラスコに移し入れ, 標線まで水を加えて 100 mL とした.

(2) 検量線用標準液 (0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~0.5 $\mu\text{g/mL}$): (1) の標準液を任意の容量の全量フラスコに一定量とり, 標線まで水を加えて検量線用標準液 (0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 0.3 $\mu\text{g/mL}$, 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 及び 0.5 $\mu\text{g/mL}$) を調製した.

(3) ぎ酸: JIS K 8264 に規定する 98 % (質量分率) 以上の特級試薬 (関東化学)

(4) プロピオン酸: 純度 98 % (質量分率) 以上の特級試薬 (富士フィルム和光純薬)

(5) 硫酸アンモニウム: JIS K 8960 に規定する 99.5 % (質量分率) 以上の特級試薬 (関東化学)

(6) 硝酸アンモニウム: JIS K 8545 に規定する 99.0 % (質量分率) 以上の特級試薬 (富士フィルム和光純薬)

(7) 硝酸カリウム: JIS K 8548 に規定する 99.0 % (質量分率) 以上の特級試薬 (関東化学)

(8) 炭酸ナトリウム溶液 (1 mol/L): イオンクロマトグラフィー用試薬 (関東化学)

(9) 炭酸ナトリウム溶液 (20 mmol/L): (8) の炭酸ナトリウム溶液 20 mL を全量フラスコにとり, 標線まで水を加えて 1000 mL とした.

(10) 炭酸ナトリウム溶液 (0.3 mmol/L): (9) の炭酸ナトリウム溶液 15 mL を全量フラスコにとり, 標線まで水を加えて 1000 mL とした.

(11) メタノール: 特級試薬 (富士フィルム和光純薬)

(12) くえん酸一水和物: JIS K 8283 に規定する特級試薬 (富士フィルム和光純薬)

(13) アンモニア水: JIS K 8085 に規定する 28 % (質量分率) の特級試薬 (富士フィルム和光純薬)

(14) 水: 超純水製造装置 (Direct-Q UV5, Millipore) で精製した JIS K 0557 に規定する A4 の水を用いた.

3) 装置及び器具

(1) イオンクロマトグラフ: メトローム 850 Professional IC

(2) 検出器: 電気伝導度検出器

(3) カラム: Metrosep A Supp 7-250/4.0 (内径 4.0 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm , 充填剤 ポリビニルアルコール基材に第 4 級アンモニウム基を化学結合した陰イオン交換体)

(4) マグネチックスターラー: サンプラテック SMS-6

(5) 遠心分離機: KUBOTA テーブルトップ遠心機 4000

(6) 粉砕機: Retsch ZM-200

(7) 弱陰イオン交換カートリッジカラム: Supelco ENVI-Carb/LC-NH₂ 500 mg/6 mL

(8) メンブレンフィルター: ADVANTEC DISMIC-13HP (孔径 0.45 μm)

(9) ポリプロピレン製ねじ口容器: ジーエルサイエンス DigiTUBEs 50 mL

4) 検討方法

(1) 抽出

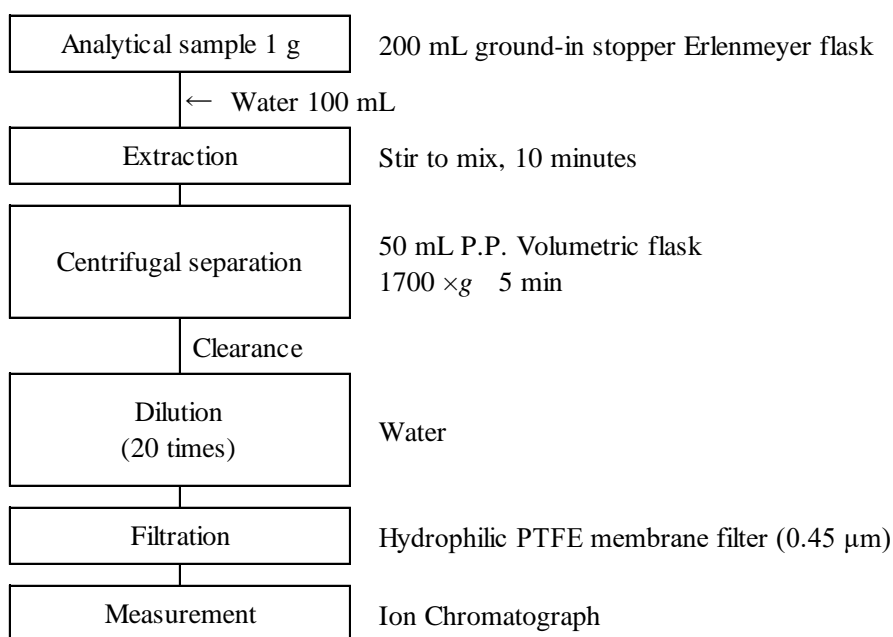
分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れ、水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて 10 分間かき混ぜを行った。さらに、その上澄み液約 50 mL をポリプロピレン製ねじ口容器に移し、1700×g で 5 分間遠心分離した上澄み液を抽出液とした。抽出液の一定量を取り、水で 20 倍に希釈したものをメンブレンフィルター（孔径 0.45 μm）でろ過して試料溶液とした。

(2) 試料溶液の測定

検量線用標準液 20 μL をイオンクロマトグラフに注入し、得られたピーク面積値から検量線を作成した。試料溶液 20 μL をイオンクロマトグラフに注入し、ピーク面積値から検量線により試料溶液中のスルファミン酸の量を求め、分析試料中の濃度を算出した。なお、スルファミン酸の測定条件及び分析フローシートを Table 1 及び Scheme 1 に示した。

Table 1 Measuring conditions of ion chromatography

Detection	Conductivity detector
Column	Metrosep A Supp 7-250/4.0 (4.0 mm I.D., 250 mm L, 5 μm particle size)
Column temp.	45 °C
Eluent	Sodium carbonate 0.3 mmol/L (0-35 min), 0.3-20 mmol/L (35-40 min), 20 mmol/L (40-60 min), 20-0.3 mmol/L (60-65 min), 0.3 mmol/L (65-70 min)
Flow rate	0.7 mL/min
Injection volume	20 μL
Measurement time	70 min



Scheme 1 Flow sheet for sulfamic acid in fertilizers

(3) 機器測定条件の検討

平成 23 年度及び平成 24 年度のイオンクロマトグラフによる分析法の検討の際、原材料として有機物を多く含む化成肥料においては、スルファミン酸のピークと重なる保持時間に有機酸と考えられる多くの妨害物質が検出され除去できなかったことから、硫酸アンモニアのみを適用範囲としている。

このことから、本研究では有機酸等の妨害ピークと測定対象であるスルファミン酸のピークを分離させるため、グラジエント溶出法を検討し、溶離液の初期濃度である 0.3 mmol/L から 20 mmol/L に段階的に上昇するグラジエント条件とした。

(4) 妨害物質除去の検討

Table 1 のグラジエント条件を用いて妨害物質である有機酸を含む副産肥料を測定したところ、スルファミン酸のピークと妨害ピークが重なり分離できなかったため (Fig. 1, 3. 1) 参照), 固相抽出による前処理の検討を行った。過去の検討によりスルファミン酸のピークと重なる妨害ピークはギ酸、プロピオン酸であることがわかっていたことから、ギ酸、プロピオン酸及びスルファミン酸の 3 種混合標準液を用い、以下の方法で妨害物質の除去を試みた。なお、目的物質であるスルファミン酸の水溶液は強酸であることから、カートリッジカラムは弱陰イオン交換カートリッジカラムを用いることとし、洗浄液及び溶出液は固相抽出ガイドブックを参考に選択した⁷⁾。

カートリッジカラムを予めメタノール約 5 mL 及び水約 5 mL で順次洗浄した。3 種混合標準液 (各 20 µg/mL) 5 mL をカートリッジカラムに負荷し、液面が充填剤の上端に達するまで流出させた。次に 0.5 mol/L クエン酸-メタノール約 10 mL をカートリッジカラムに加え洗浄した。50 mL なすフラスコをカートリッジカラムの下に置き、アンモニア水-メタノール (3+25) 10 mL をカートリッジカラムに正確に加え、スルファミン酸を溶出させた。この溶出液を 40 °C 以下の水浴上で減圧濃縮した後、残留物を少量の水で溶解し、100 mL 全量フラスコに数回移し替えた後、水で定容した。定容した溶液をメンブレンフィルター (孔径 0.45 µm) でろ過し、測定用試料溶液とした (Scheme 2, 3. 1) 参照)。

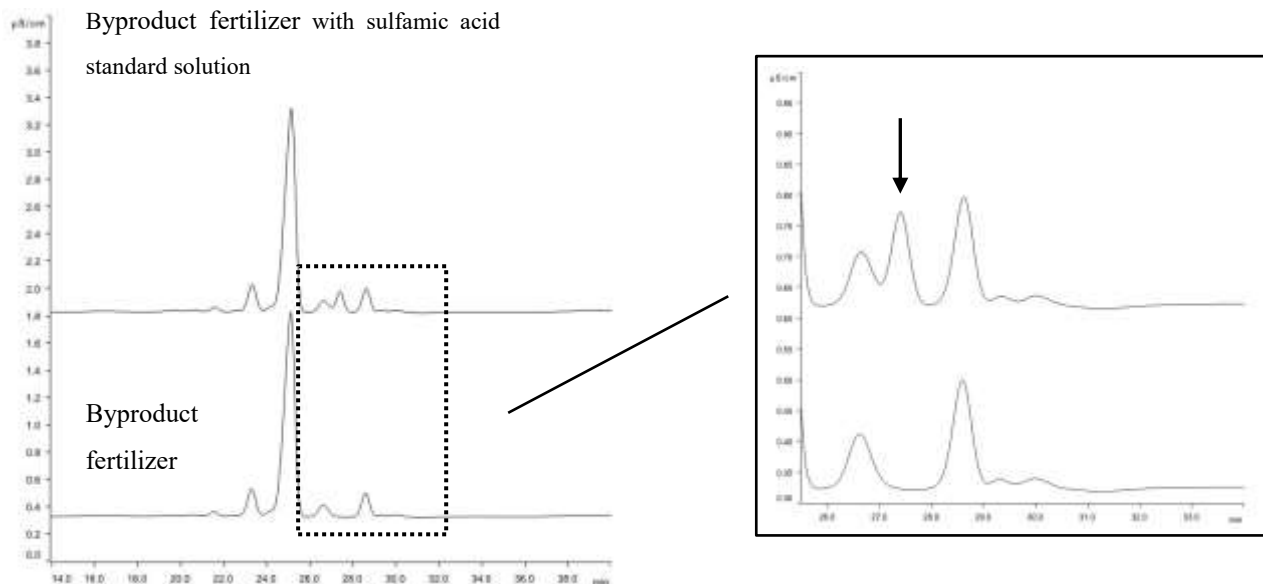
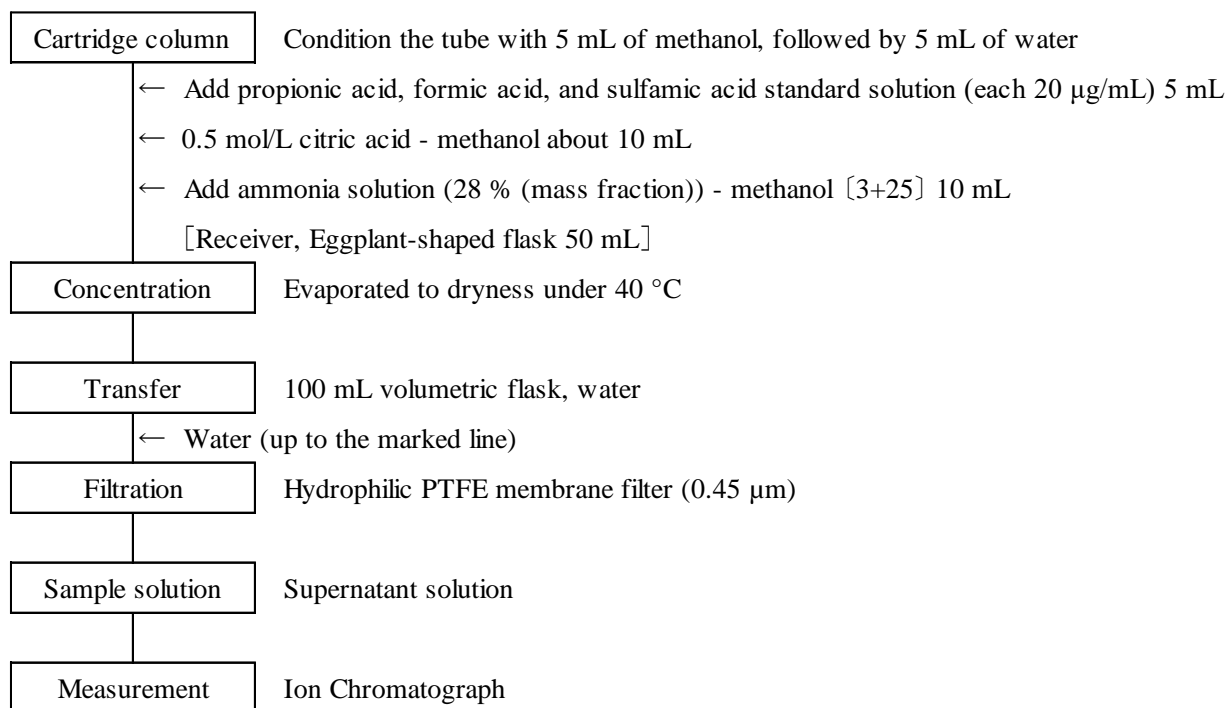


Fig. 1 Ion chromatogram of byproduct fertilizer containing organic acid
(Arrow: sulfamic acid ion peak)



Scheme 2 Flow sheet of solid-phase extraction for sulfamic acid in fertilizers

(5) 妨害ピークの有無の確認

妥当性が確認された LC-MS 法によりスルファミン酸が含まれていないことを確認した流通肥料等について、イオンクロマトグラフ法での妨害ピークの有無を確認した。

(6) 検量線の直線性

スルファミン酸の濃度が 0.05 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.2 µg/mL, 0.3 µg/mL, 0.4 µg/mL 及び 0.5 µg/mL の検量線用標準液について、ランダムな順序で 2 回ずつ測定し、得られたピーク面積値から検量線を作成して直線性の確認をした。

(7) 真度評価

真度を評価するため、硫酸アンモニア 1 点及び化成肥料 2 点を試料とし、各試料を 3 点併行で分析する添加回収試験を実施した。スルファミン酸の濃度はそれぞれ 1.00 % (質量分率), 0.10 % (質量分率) 及び 0.01 % (質量分率) 相当量となるよう標準液を添加した。なお、上限はこれまでの含有許容量超過事案における濃度を基準として設定した。

(8) 精度評価

併行精度及び中間精度を評価するため、スルファミン酸を含有している混合窒素肥料 (原料として硫酸アンモニア及び硝酸アンモニアを混合したもの) 1 点、スルファミン酸の濃度が 0.05 % (質量分率) 相当量となるよう標準液を添加した化成肥料 1 点を試料とし、各試料を 2 点併行で日を変えて 5 回分析を行った。

(9) 定量下限の推定

LC-MS 法によりスルファミン酸を含まないことを確認した化成肥料に、スルファミン酸濃度が 0.01 % (質量分

率)相当量となるよう標準液を添加して 7 点併行で分析し、肥料等試験法³⁾附属書 A 試験法の妥当性確認の手順に従って定量下限及び検出下限を推定した。

3. 結果及び考察

1) 妨害物質除去の検討

ギ酸、プロピオン酸及びスルファミン酸の 3 種混合標準液(各 20 µg/mL)を負荷し、2. 4) (4)に従って固相抽出した試料溶液のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。さらに、比較のため、プロピオン酸及びギ酸標準液(各 20 µg/mL)とスルファミン酸標準液(20 µg/mL)を測定したクロマトグラムを重ね合わせた。固相抽出後の 3 種混合標準液のクロマトグラムでは、ギ酸のピークは残るもののプロピオン酸は除去され、スルファミン酸は定量することができた。また、検討した固相抽出後の 3 種混合標準液中のスルファミン酸の回収率は 92.0 %~93.9 %であった。

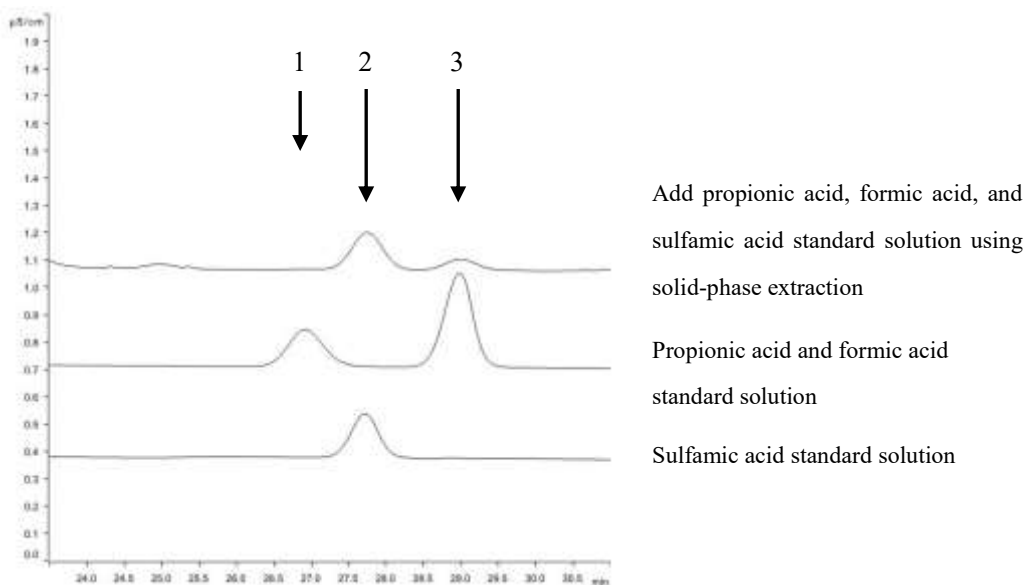


Fig. 2 Propionic acid and formic acid standard solution (each 20 µg/mL), Sulfamic acid standard solution (20 µg/mL), Ion chromatogram of mixed standard solution (each 20 µg/mL)

(1: Propionic acid, 2: Sulfamic acid, 3: Formic acid)

次に、検討した固相抽出の方法を用いて、スルファミン酸を含んだ混合窒素肥料(原料として硫酸アンモニア及び硝酸アンモニアを混合したもの)を測定したところ、固相抽出せずに測定した際にはスルファミン酸のピークが検出されたものの、固相抽出した後に測定した際にはスルファミン酸のピークがほとんど検出されなかった。このことから、混合窒素肥料の原料として使用された硫酸アンモニア又は硝酸アンモニアの影響により、スルファミン酸が精製されない可能性が示唆された。

混合窒素肥料の原料には窒素質肥料の硫酸アンモニア及び硝酸アンモニアが使用されていることから、妨害物質を特定するため試薬の硫酸アンモニウム及び硝酸アンモニウムを用いて固相抽出の有無による測定を行った。また、化成肥料の代表的な原料として使用される硝酸カリウムの試薬についても、固相抽出の有無による測定を行った。これら 3 種類の試薬にスルファミン酸標準液(20 µg/mL)を 5 mL 添加し、抽出した試料液を固相抽出せずに測定したところスルファミン酸のピークは検出されたが、固相抽出した後に測定した際にはスルファ

アミン酸のピークが検出されず、混合窒素肥料と同様に硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム及び硝酸カリウムに含まれるマトリックスの影響によりスルファミン酸がカートリッジカラムに保持されない可能性が示唆された。

有機物を原材料として含む肥料の場合、有機酸であるプロピオン酸やギ酸が妨害ピークとなるためカートリッジカラムを使用した固相抽出による前処理を検討したが、硫酸アンモニア等を原材料として含む肥料の場合、スルファミン酸がカートリッジカラムに保持されない可能性が示唆されたことから、本法の対象肥料は有機物原料を含まない固形肥料のみとし、カートリッジカラムを使用しない Scheme 1 の方法とした。

2) 妨害ピークの有無の確認

妨害ピークの確認のため、スルファミン酸を含まないことを LC-MS により確認した流通肥料等 34 点について 2.4) (1) (2) の条件で測定した。原料に硫酸アンモニアを使用した化成肥料のクロマトグラムを Fig. 3 に示した。スルファミン酸のピークの前後に他成分のピークが認められるものもあったが、分離度は 1.5 以上であり、測定したすべての肥料において妨害ピークは認められなかった。また、流通肥料に使用された原料を Table 2 に示した。

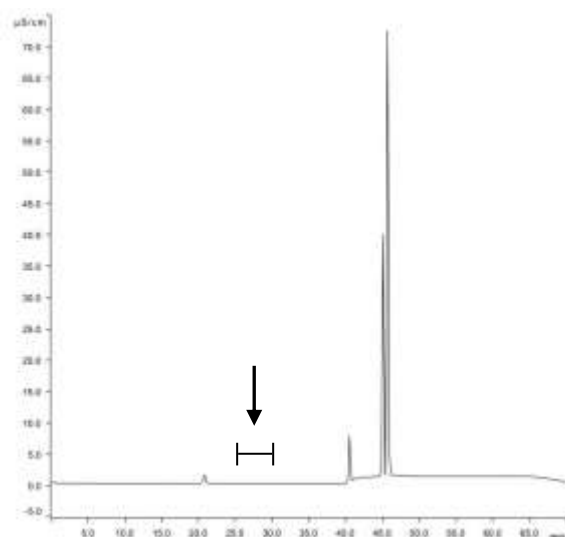


Fig. 3 Ion chromatogram of compound fertilizer with ingredient made from ammonium sulfate
(Arrow: Retention time of sulfamic acid ion peak)

Table 2 Samples and materials

Type and number of samples	Materials
Ammonium sulfate 1	Ammonium sulfate, Ammonium chloride, Ammonium nitrate, Urea, Isobutylidene diurea, Ureaform, Superphosphate, Concentrated
Mixed nitrogen fertilizer 2	superphosphate, Fused magnesium phosphate, Processed phosphate fertilizer, Potassium sulfate, Potassium chloride, Potassium silicate
Coated nitrogen fertilizer 2	fertilizer, Byproduct fertilizer, Ammonium phosphate, Compound fertilizer, Magnesium hydroxide fertilizer, Slag manganese fertilizer,
Mixed potassium fertilizer 1	Borax fertilizer, Boric acid fertilizer, Fritted micronutrient mixture, Nitric acid, Ammonia, Sulfuric acid, Phosphoric acid, Phosphate solution,
Compound fertilizer 28	Sulfur, Polyolefin, Paraffin wax, Chicken manure burning ash

3) 検量線の直線性の検討

検量線用標準液(0.5 $\mu\text{g/mL}$)について 2. 4) (2)に従って測定して得られたクロマトグラムを Fig. 4 に示した。また、各濃度の検量線用標準液をそれぞれ 2 回繰り返し測定し、ピーク面積値の濃度に対する一次回帰式を用いて検量線を作成したところ、切片の 95%信頼区間に原点(0)が含まれ、決定係数(r^2)は 0.99 以上であった(Fig. 5)。

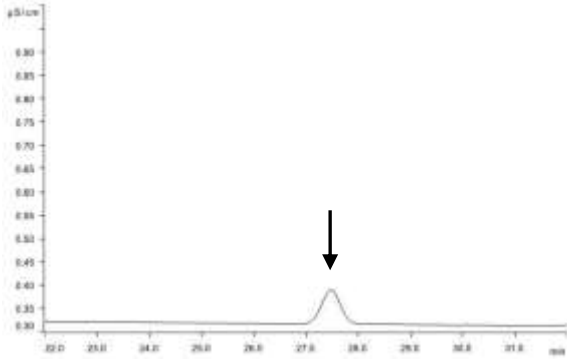


Fig. 4 Ion chromatogram of sulfamic acid standard solution
(Arrow: sulfamic acid ion peak)

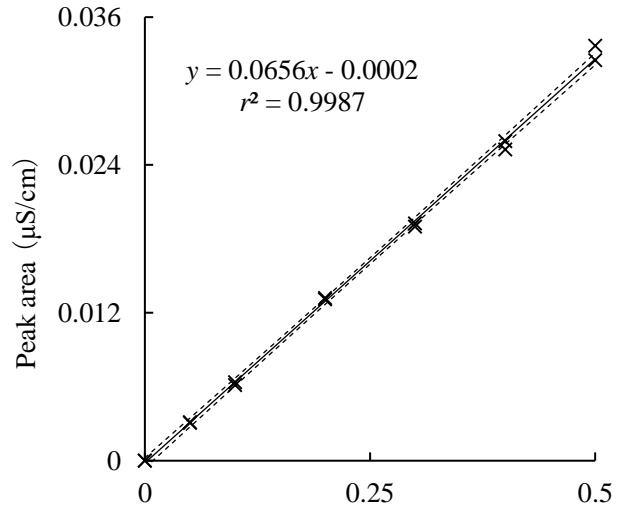


Fig. 5 Calibration curves of sulfamic acid
(0.05 $\mu\text{g/mL}$ -0.5 $\mu\text{g/mL}$)

4) 添加回収試験による真度の評価

真度を評価するため、硫酸アンモニア 1 点及び化成肥料 2 点を試料とし、各試料を 3 点併行で分析する添加回収試験を実施した結果を Table 3 に示した。添加濃度はそれぞれ 1 % (質量分率)、0.1 % (質量分率) 及び 0.01 % (質量分率) 相当量とし、上限はこれまでの含有許容量超過事案における濃度を基準として設定した。いずれの回収率も肥料等試験法³⁾に示されている真度の目標を満たしていた。

Table 3 Result of recovery test

Sample	Spiked level (%) ^{a)}	Recovery (%)	Criteria of the trueness ^{b)} (%)
Ammonium sulfate	1	95.0	85 ~ 110
		95.3	
		94.2	
Compound fertilizer ^{c)}	0.1	92.8	85 ~ 110
		95.6	
		94.2	
Compound fertilizer ^{c)}	0.01	102.6	85 ~ 110
		100.9	
		105.8	

a) Mass fraction

b) Criteria of the trueness (recovery) shown in Testing Method of Fertilizers

c) Materials : Ammonium sulfate, Ammonium phosphate, Potassium chloride, Byproduct fertilizer

5) 併行精度及び中間精度の評価

本法の併行精度及び中間精度を評価するため、スルファミン酸を含有している混合窒素肥料(原料として硫酸アンモニア及び硝酸アンモニアを混合したもの)1点、スルファミン酸標準液を0.05%(質量分率)相当量となるように添加した化成肥料1点を用いて、それぞれ2点併行で日を変えて5回分析を行った結果をTable 4に示した。また、その結果を基に、一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度をTable 5に示した。

いずれの相対標準偏差も肥料等試験法³⁾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)の許容範囲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 4 Individual results of repetition of the test on different days (% (mass))

Test day	Mixed nitrogen fertilizer ^{a)}		Compound fertilizer ^{b)}	
1	1.06	1.06	0.048	0.048
2	1.03	1.07	0.050	0.049
3	1.07	1.07	0.049	0.049
4	1.05	1.03	0.048	0.048
5	1.04	0.96	0.049	0.048

a)Materials : Ammonium sulfate, Ammonium nitrate

b)Materials : Ammonium sulfate, Ammonium phosphate, Superphosphate, Potassium chloride, Potassium sulfate, Byproduct fertilizer

Table 5 Statistical analysis of repetition of the test results for estimating precision

Sample	Quantitative value of sulfamic acid ^{a)} (%) ^{b)}	Repeatability			Intermediate precision		
		s_r ^{c)}	RSD_r ^{d)}	$CRSD_r$ ^{e)}	$s_{I(T)}$ ^{f)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)}	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)}
		(%) ^{b)}	(%)	(%)	(%) ^{b)}	(%)	(%)
Mixed nitrogen fertilizer	1.04	0.03	2.8	4.0	0.03	3.3	6.5
Compound fertilizer	0.049	0.0005	1.1	4.0	0.0008	1.6	6.5

a) Mean value (n = sample number of parallel test (2) × number of test days (5))

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability (repeatability relative standard deviation) shown in Testing Methods for Fertilizers

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

h) Criteria of intermediate precision (intermediate relative standard deviation) shown in Testing Methods for Fertilizers

6) 定量下限等の推定

LC-MS を用いてスルファミン酸が含まれないことを確認した化成肥料に、スルファミン酸濃度が0.01%(質量分率)相当量となるよう標準液を添加して7点併行で分析し、肥料等試験法³⁾附属書A 試験法の妥当性確認の手順に従って定量下限及び検出下限をTable 6のとおり算出した。その結果、定量下限は0.004%(質量分率)、検出下限は0.002%(質量分率)とそれぞれ推定された。

化成肥料の公定規格で定められている含有すべき主成分の最小量(%)は窒素成分の場合1.0%(質量分率)

であることから、スルファミン酸の最少含有許容量は 0.005 % であり、流通肥料中のスルファミン酸含有量を測定することは問題ないと判断した。一方で、肥料等試験法³⁾ 附属書 A 試験法の妥当性確認の手順では、有害成分、制限成分等の定量下限は、含有許容量及びそれに準ずる水準が 1.0 mg/kg 以上の場合ではその 1/5 以下であるとされていることから、一部の化成肥料、家庭園芸用複合肥料等の水準は本法における推定された定量下限を下回る可能性があるため、留意する必要がある。

Table 6 Result of estimation of the lower limit of quantitation and detection of sulfamic acid

Sample	Spiked level (%) ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{a)}	S_r ^{c)} (%) ^{a)}	LOQ ^{d)f)} (%) ^{a)}	LOD ^{e)f)} (%) ^{a)}
Compound fertilizer	0.01	0.00987	0.0004	0.004	0.002

a) Mass fraction

b) Mean value ($n=7$)

c) Repeatability standard deviation

d) Estimation of the lower limit of quantitation of sulfamic acid

e) Estimation of the lower limit of detection of sulfamic acid

f) Procedure(3.6.1) and (3.7.1) for validating the testing method in annex of Testing Methods of Fertilizers

7) 測定時間の短縮を目的としたグラジエント条件の検討

妥当性確認を行った試験法の測定時間は 1 試料あたり 70 分間となり、スルファミン酸の保持時間は約 27 分であったことから、測定時間を短縮したグラジエント条件を検討した。まず、スルファミン酸の保持時間を短縮するため、0.3 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液を 90 %、20 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液を 10 %の混合比率で調製した溶離液を初期濃度とし、Table 7 に示したグラジエント条件を用いて検量線用標準液(0.5 µg/mL)を 2. 4) (2) に従い測定した。その結果、スルファミン酸の保持時間は 14 分付近となり、全体の測定時間は 35 分に短縮することができた(Fig. 6)。

また、各濃度の検量線用標準液をそれぞれ 2 回繰り返し測定し、ピーク面積値の濃度に対する一次回帰式を用いて検量線を作成したところ、切片の 95%信頼区間に原点(0)が含まれ、決定係数(r^2)は 0. 999 以上であった(Fig. 7)。このグラジエント条件は今回の検討で使用した機器とカラムに合わせて設定した条件であり、実際に各試験室で短縮した条件を用いて測定する場合には機器の流路やカラムのイオン交換容量によって、試験室ごとにグラジエントの調製を行う必要がある。

Table 7 The time program of gradient elution

Time (min)	0.3 mmol/L Na ₂ CO ₃ (%)	20 mmol/L Na ₂ CO ₃ (%)
1 - 2	90	10
2 - 5	90 → 100	10 → 0
5 - 20	100	0
20 - 25	100 → 0	0 → 100
25 - 35	0	100

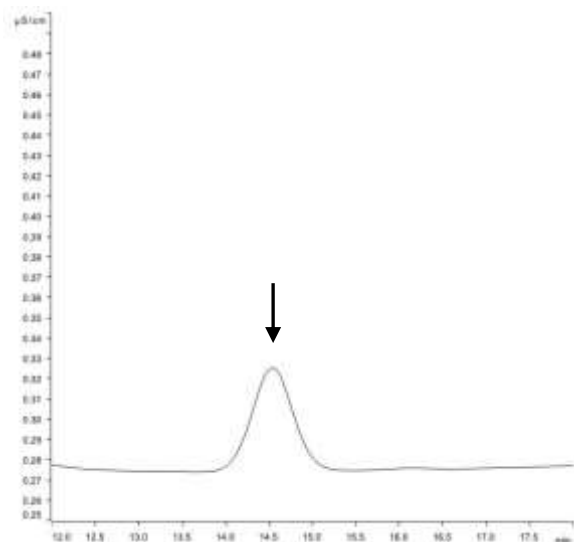


Fig. 6 Ion chromatogram of sulfamic acid standard solution
(Arrow: sulfamic acid ion peak)

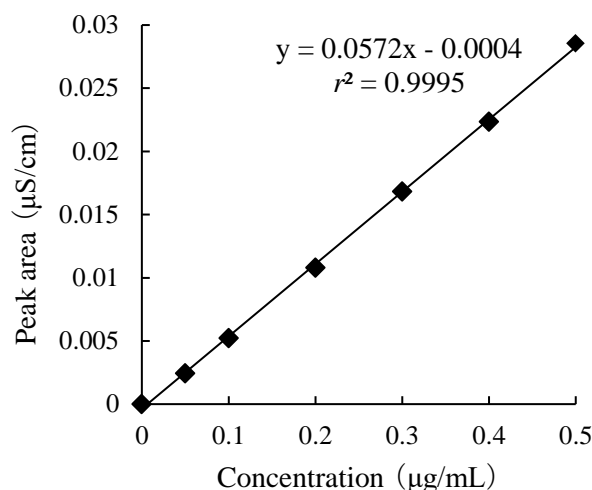


Fig. 7 Calibration curves of sulfamic acid
(0.05 μg/mL-0.5 μg/mL)

4. まとめ

イオンクロマトグラフを用いた肥料中のスルファミン酸分析法の改良を検討後、単一試験室による妥当性確認を実施したところ、次の結果を得た。

(1)過去の検討においてスルファミン酸の妨害ピークとして障害となった有機酸について、イオン交換カートリッジカラムを使用した固相抽出による前処理の検討を行ったが、マトリックスの影響によりスルファミン酸を精製できなかったため、本法の対象肥料は無機肥料のみとした。

(2)有機酸等の妨害ピークと測定対象であるスルファミン酸のピークを分離させるため、グラジエント溶出法を検討し、溶離液の初期濃度である 0.3 mmol/L から 20 mmol/L に段階的に上昇するグラジエント条件とした。

(3)スルファミン酸を含まないことを LC-MS により確認した無機肥料 34 点を用いて本法により分析した結果、スルファミン酸の測定を妨害する夾雑ピークは認められなかった。

(4)スルファミン酸として 0.05 μg/mL~0.5 μg/mL の検量線を作成したところ、切片の 95 %信頼区間に原点 (0) が含まれ、決定係数 (r^2) は 0.99 以上であった。

(5)硫酸アンモニア及び化成肥料を用いて 3 濃度 (質量分率 0.01 %~1.0 %) で添加回収試験を行った結果、スルファミン酸の回収率は 92.8 %~105.8 %であった。この結果は、肥料等試験法³⁾に示されている真度の目標を満たしていた。

(6)併行精度及び中間精度を評価するため、混合窒素肥料及び化成肥料を用いて 2 点併行で日を変えて 5 回分析を行った結果、併行相対標準偏差は 1.1 %~2.8 % であり、中間相対標準偏差は 1.6 %~3.3 %であった。この結果は、肥料等試験法³⁾に示されている併行精度及び中間精度の許容範囲内であった。

(7)スルファミン酸の濃度が 0.01 % (質量分率) 相当量となるよう標準液を添加した化成肥料を用いて併行試験 ($n=7$) を行った結果、定量下限は 0.004 % (質量分率) 程度、検出下限は 0.002 % (質量分率) 程度と推定された。

以上のことから、本法は肥料中のスルファミン酸を測定するために、十分な性能を有していることが確認された。

文 献

- 1) 栗原淳, 越野正義: 肥料製造学, p.40~45, 株式会社養賢堂, 東京 (1986)
- 2) 東京肥飼料検査所肥料鑑定課: 肥検回報, **47(1)**, 23~26 (1994)
- 3) 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 (2022)
< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html> >
- 4) 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) 農林水産省告示: 肥料の品質の確保等に関する法律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
- 6) 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**, 38~48 (2015)
- 7) ジーエルサイエンス 固相抽出ガイドブック編集委員会: 固相抽出ガイドブック, 青葉印刷株式会社, 東京 (2012)

Determination of Sulfamic Acid by Ion Chromatography

OSHIMA Mayu¹, YAMANISHI Masayuki²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Fertilizer and Feed Inspection Department

² FAMIC, Fertilizer and Feed Inspection Department, (Now) FAMIC, Nagoya Regional Center

The analytical methods for sulfamic acid described in Testing Methods for Fertilizers (2022) include an analytical method using ion chromatograph (IC) and an analytical method using liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS). However, in past studies, the analytical method using IC could not separate the interference peak of organic acids contained in fertilizers made from organic matter, so the target fertilizer is limited to ammonium sulfate. Then we examined the measurement conditions of the IC, validated the IC measurement method in a single laboratory for determination method of sulfamic acid in fertilizer.

We extracted the sample by adding water and stirred for ten minutes. After centrifugation, we analyzed sample solution by IC, on an anion exchange column (4.0 mm internal diameter, 250 mm length, 5 μ m particle size) at a flow-rate of 0.7 mL/min, using mobile phase of sodium carbonate.

As a result of 3 replicate analysis of 3 fertilizer samples (ammonium sulfate and compound fertilizer) spiked with sulfamic acid (0.01 %, 0.1 % and 1.0 % (mass fraction)), the recovery range were 92.8 % - 105.8 %. Repeatability relative standard deviation of sulfamic acid were estimated 1.1 % - 2.8 % by analyzing 2 fertilizer samples (mixed nitrogen fertilizer and compound fertilizers). Similarly, intermediate relative standard deviations of there were estimated 1.6 % - 3.3 %. The limits of quantification of there were estimated 0.004 %, and the limits of detection of there were estimated 0.002 %. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of sulfamic acid in fertilizers.

Key words fertilizer, sulfamic acid, ion chromatograph

(Research Report of Fertilizer, **16**, 1-13, 2023)