

8 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 —

長谷川正憲¹, 木村康晴²

キーワード 高速液体クロマトグラフィー, 硫青酸化物, チオシアン酸, 亜硝酸

1. はじめに

亜硝酸及び硫青酸化物は多量に含有すると植生を害することから普通肥料の公定規格¹⁾において含有を許される最大量が規定されている。肥料中の亜硝酸及び硫青酸化物の分析法として、高速液体クロマトグラフ(HPLC)法が検討され伊藤ら²⁾によって、真度, 併行精度, 定量下限等の検討が行われ, その結果, 単一試験室内における試験方法の妥当性が確認された。

今回, HPLC 法による肥料中の亜硝酸及び硫青酸化物の測定の性能評価のため, 共通試料を用いて, 試験室間の再現精度を調査したので, その概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 共同試験用添加溶液

JIS K 8019 に規定する亜硝酸ナトリウム及び JIS K 9000 に規定するチオシアン酸アンモニウムを用いて亜硝酸及び硫青酸化物の添加溶液を調製した。

2) 共同試験用試料

共同試験用試料を作製し, 均質性の確認を実施したところ, 試料中の亜硝酸及び硫青酸化物は一定時間放置すると濃度が低下することが確認された。そのため, 共同試験参加試験室において亜硝酸及び硫青酸化物を添加して共同試験を実施することとした。

ブランク試料は亜硝酸及び硫青酸化物を含まないことを確認した流通している化成肥料及び液状の家庭園芸用複合肥料とした。化成肥料は目開き 500 μm のふるいを通過するまで粉碎した。共同試験用試料は約 1.5 g の化成肥料をポリ袋に, 約 1.6 g の家庭園芸用複合肥料を 2 mL バイアルに入れ密封してそれぞれ 50 個を調製した。ブラインド試料を提供するため, 共同試験用試料及び亜硝酸及び硫青酸化物を一定量混合した添加溶液に乱数を付し, 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高速液体クロマトグラフ, 遠心分離機及び高速遠心分離機を使用した。

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 (現) 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神戸センター

4) 亜硝酸及び硫青酸化物の測定

(1) 化成肥料での抽出

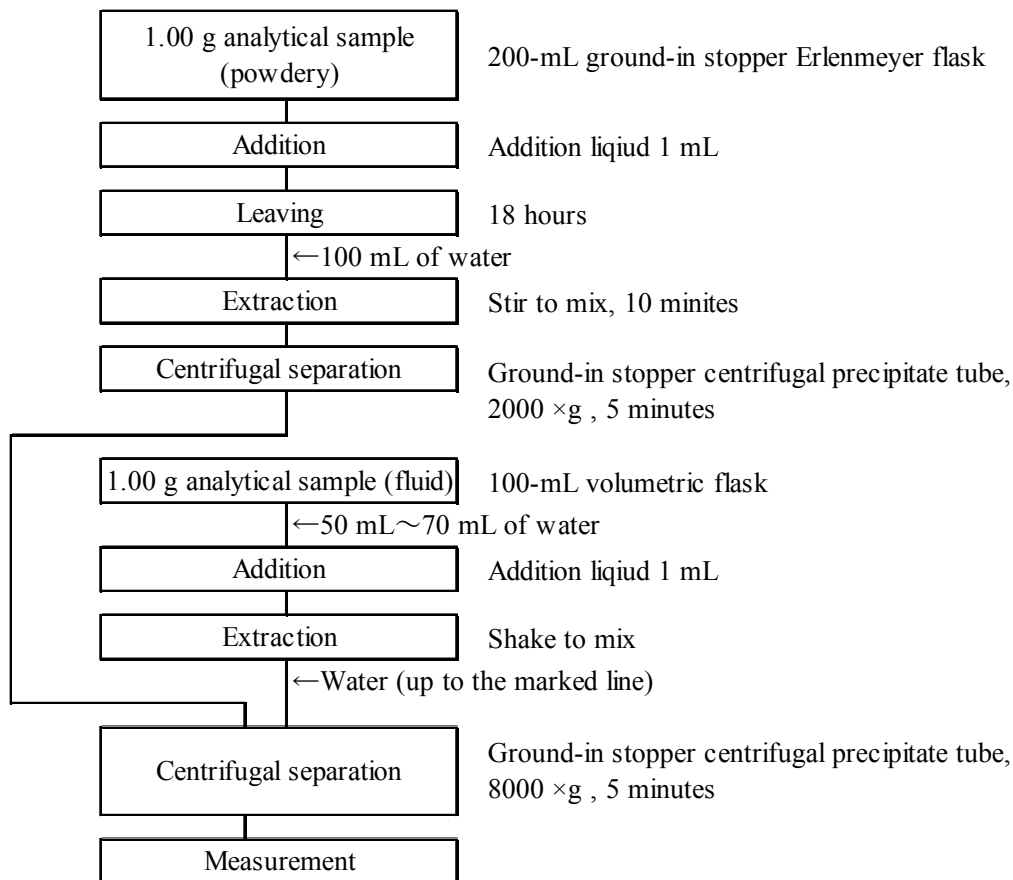
分析試料 1.00 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れ、添加溶液を加え 18 時間室温で放置し、水 100 mL を加え、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜ、共栓遠心沈殿管 50 mL にとり、2000×g で約 5 分間遠心分離し、上澄み液を抽出液とした。

(2) 家庭園芸用複合肥料での抽出

分析試料 1.00 g をはかりとり、全量フラスコ 100 mL に入れ、添加溶液、水約 50 mL を加え、全量フラスコの蓋をして、振り混ぜて溶かし、標線まで水を加えて抽出液とした。

(3) 測定

各抽出液を 1.5 mL の共栓遠心沈殿管にとり、8000×g で約 5 分間遠心分離した上澄み液または、親水性 PTFE メンブランフィルターを用いてろ過した溶液を HPLC 測定用試料溶液とした (Scheme 1)。その試料溶液を高速液体クロマトグラフに供し、Table 1 の測定条件で測定し、ピーク面積から試料溶液中の亜硝酸及び硫青酸化物の量を求め、分析試料中の濃度を算出した。測定に当たっては、各試験室の高速液体クロマトグラフの操作方法に従った。



Scheme 1 Flow sheet for nitrous acid and ammonium thiocyanate in fertilizers

Table 1 HPLC condition

Column	Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm particle size) or SHISEIDO corporation CAPCELL PAK NH2 UG80 (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm particle size)
Guard column	Shodex Asahipak NH2P-50G 4A (4.6 mm i.d.×10 mm, 5 μm particle size) or SHISEIDO corporation CAPCELL NH2 UC80 (4.0 mm i.d.×10 mm)
Column temperatures	40 °C±1 °C
Mobile phase	phosphate buffer
Injection volume	10 μL
Flow rate	1.0 mL/min
Detector system	UV detector at a wavelength of 210 nm

5) 共同試験用試料の均質性試験

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル³⁾の均質性試験に従い、6 種類の共同試験用添加溶液からそれぞれ 10 試料を抜き取り、各試料につき 2 点併行で 4)に従って分析した。

6) 共同試験

試験に参加した 11 試験室と使用した高速液体クロマトグラフは以下のとおりであり、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。

- ・ 株式会社島津製作所(島津製作所 Prominence)
 - ・ 公益財団法人日本肥糧検定協会(島津製作所 LC-20AD, SPD-20A, CTO-20A)
 - ・ 昭和電工株式会社(島津製作所 Nexera X2)
 - ・ ジーエルサイエンス株式会社(ジーエルサイエンス GL7700)
 - ・ 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(Waters 2695 Series)
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター(Agilent technologies 1100 Series)
 - ・ 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(Agilent technologies 1100 Series)
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター(Waters 2487 デュアルλ)
 - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター(Agilent technologies 1100 Series)
 - ・ 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(島津製作所 Prominence Series)
 - ・ 日本ウォーターズ株式会社(Waters Alliance e2695 セパレーションモジュール)
- (50 音順)

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性試験の試験成績について、Cochran 検定による外れ値を除外し、一元配置分散分析から得られた統

計量を Table 2-1 及び 2-2 に示した. いずれの添加溶液においても, 併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び併行精度を含む試料間相対標準偏差 (RSD_{b+r}) は肥料等試験法⁴⁾の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度 (併行相対標準偏差及び中間相対標準偏差) の目安の 1.5 倍以内であり, F 値が F 限界値を下回ったことから, 有意水準 5 %において試料間に有意な差は認められなかった³⁾. これらのことから, 添加溶液は共同試験に用いることができる均質性を有していることを確認した.

Table 2-1 Homogeneity test results of nitrous acid

Addition liquid	Sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ^{c)}	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%) ^{c)}	s_{b+r} ^{g)} (%) ^{c)}	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j)k)}
1	10 (0)	0.0501	0.0002	0.5	0	0.0002	0.5	4	0.18
2	10 (0)	0.0252	0.0003	1.0	0	0.0003	1.0	4	0.19
3	10 (0)	0.151	0.0006	0.4	0.0002	0.0006	0.4	4	1.22
4	9 (1)	0.201	0.0003	0.2	0.0002	0.0004	0.2	4	1.46
5	10 (0)	0.301	0.003	1.1	0	0.003	1.1	4	0.65
6	10 (0)	0.0501	0.0003	0.5	0	0.0003	0.5	4	0.34

a) The number of samples used for analysis; (): The number of outliers

b) Grand mean value (n =The number of samples used for analysis×The number of times of recetition(2))

c) Mass fraction

d) Standard deviation of repeatability

e) Relative standard deviation of repeatability

f) Standard deviation of sample to sample

g) Standard deviation of sample to sample include repeatability $s_{b+r} = \sqrt{s_{bb}^2 + s_r^2}$

h) Relative Standard deviation of sample to sample include repeatability

i) The aim of Relative standard deviation of repeatability for Testing Methods For Fertilizers

j) F value calculated based on analysis of variance (ANOVA)

k) F critical value; $F(9,10;0.05)=3.02$

F critical value; $F(8,9;0.05)=3.23$

Table 2-2 Homogeneity test results of ammonium thiocyanate

Addition liquid	Sample ^{a)}	Mean ^{b)} (%) ^{c)}	s_r ^{d)} (%) ³⁾	RSD_r ^{e)} (%)	s_{bb} ^{f)} (%) ³⁾	s_{b+r} ^{g)} (%) ³⁾	RSD_{b+r} ^{h)} (%)	$CRSD_r$ ⁱ⁾ (%)	F Value ^{j)k)}
1	10 (0)	0.00604	0.0004	6.9	0	0.0004	6.9	6	0.12
2	10 (0)	0.0107	0.0007	6.4	0	0.0007	6.4	6	0.06
3	10 (0)	0.0487	0.0011	2.2	0	0.0011	2.2	4	0.39
4	10 (0)	0.0980	0.0014	1.4	0.0006	0.0015	1.5	4	1.40
5	10 (0)	0.200	0.004	1.9	0.0009	0.004	2.0	4	1.11
6	10 (0)	0.0110	0.0002	1.9	0.00005	0.0002	1.9	6	1.11

a)~k) Refer to the footnote of Table 2-1

2) 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 3-1 及び 3-2 に示した. 各系列の分析試料の結果を IUPAC

の共同試験プロトコル^{5, 6)}に従って統計処理した。試験成績の外れ値を検出するために Cochran の検定及び Grubbs の検定を実施した。その結果, 11 試験室の試験成績のうち亜硝酸については 5 種類の試料で各 1 試験室, 硫青酸化物については 2 種類の試料で各 1 試験室及び 3 種類の試料で各 2 試験室が外れ値として判定された。

Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
A	0.197	0.197	0.293	0.293	0.0515	0.0497
B	0.200	0.200	0.290	0.293	0.0493	0.0500
C	0.205	0.200	0.292	0.284	0.0505	0.0492
D	0.229 ^{b)}	0.202 ^{b)}	0.273 ^{c)}	0.268 ^{c)}	0.0470	0.0489
E	0.202	0.204	0.298	0.288	0.0506	0.0507
F	0.215	0.203	0.293	0.302	0.0510	0.0506
G	0.198	0.198	0.290	0.294	0.0494	0.0494
H	0.200	0.205	0.287	0.289	0.0495	0.0503
I	0.207	0.198	0.293	0.294	0.0489 ^{b)}	0.0798 ^{b)}
J	0.202	0.200	0.283	0.283	0.0492	0.0492
K	0.207	0.204	0.288	0.286	0.0504	0.0499

Lab ID ^{a)}	Home garden-use mixed fertilizer 1		Home garden-use mixed fertilizer 2		Home garden-use mixed fertilizer 3	
A	0.0492	0.0503	0.0280	0.0256	0.155	0.146
B	0.0483	0.0501	0.0252	0.0249	0.0747 ^{b)}	0.137 ^{b)}
C	0.0487	0.0494	0.0259	0.0243	0.149	0.136
D	0.0512	0.0512	0.0259	0.0258	0.154	0.153
E	0.0509	0.0502	0.0258	0.0256	0.154	0.153
F	0.0512	0.0510	0.0254	0.0257	0.153	0.152
G	0.0502	0.0509	0.0250	0.0252	0.151	0.153
H	0.0506	0.0505	0.0255	0.0251	0.151	0.161
I	0.0501 ^{b)}	0.0448 ^{b)}	0.0243	0.0235	0.146	0.151
J	0.0503	0.0505	0.0256	0.0263	0.151	0.151
K	0.0495	0.0493	0.0264	0.0260	0.144	0.143

a) Laboratory identification

b) Outlier of Cochran test

c) Outlier of Grubbs test

Table 3-2 Individual results of ammonium thiocyanate (%(mass fraction))

Lab ID ^{a)}	Compound fertilizer 1		Compound fertilizer 2		Compound fertilizer 3	
	A	0.0985	0.0987	0.201	0.201	0.00984
B	0.0995	0.0988	0.197	0.197	0.00965	0.00990
C	0.0990	0.103	0.197	0.191	0.00918	0.00896
D	0.119 ^{b)}	0.100 ^{b)}	0.202	0.199	0.00961	0.0100
E	0.100	0.101	0.211	0.202	0.00968	0.00952
F	0.106	0.0992	0.209	0.222	0.0104	0.00959
G	0.106	0.105	0.216	0.204	0.0114 ^{b)}	0.0151 ^{b)}
H	0.101	0.0978	0.195	0.210	0.00901	0.00953
I	0.102	0.0969	0.201	0.202	0.0101 ^{b)}	0.0164 ^{b)}
J	0.101	0.103	0.205	0.209	0.00989	0.0103
K	0.0992	0.100	0.211	0.211	0.0111	0.0110

Lab ID ^{a)}	Home garden-use mixed fertilizer 1		Home garden-use mixed fertilizer 2		Home garden-use mixed fertilizer 3	
	A	0.00503	0.00508	0.0114 ^{b)}	0.00981 ^{b)}	0.0517
B	0.00482	0.00503	0.00977	0.00953	0.0240 ^{b)}	0.0453 ^{b)}
C	0.00396	0.00431	0.00946	0.00892	0.0497	0.0448
D	0.00504	0.00529	0.0106	0.0104	0.0506	0.0511
E	0.00330	0.00364	0.00909	0.00928	0.0507	0.0488
F	0.00566	0.00561	0.00963	0.0103	0.0499	0.0518
G	0.00476	0.00494	0.00948	0.00965	0.0521	0.0490
H	0.00492	0.00487	0.00970	0.00983	0.0573 ^{c)}	0.0610 ^{c)}
I	0.00487	0.00450	0.0100	0.00962	0.0533	0.0551
J	0.00513 ^{b)}	0.200 ^{b)}	0.00994 ^{b)}	0.209 ^{b)}	0.0501	0.0496
K	0.00450	0.00498	0.0105	0.0100	0.0514	0.0523

a) Laboratory identification

b) Outlier of Cochran test

c) Outlier of Grubbs test

3) 併行精度及び室間再現精度

外れ値を除外した試験成績より算出^{5, 6)}した平均値, 併行標準偏差 (s_f) 及び併行相対標準偏差 (RSD_f) 値, 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 4-1 及び 4-2 に示した.

家庭園芸用複合肥料の亜硝酸の平均値は 0.0255 % (質量分率) ~ 0.150 % (質量分率) であり, その s_f は 0.0005 % (質量分率) ~ 0.004 % (質量分率), RSD_f は 1.1 % ~ 2.9 %, s_R は 0.0009 % (質量分率) ~ 0.005 % (質量分率), RSD_R は 1.7 % ~ 3.6 % であった. 化成肥料の亜硝酸の平均値は 0.0498 % (質量分率) ~ 0.291 % (質量分率) であり, その s_f は 0.0007 % (質量分率) ~ 0.004 % (質量分率), RSD_f は 1.3 % ~ 1.9 %, s_R は 0.0010 % (質量分率) ~ 0.005 % (質量分率), RSD_R は 1.7 % ~ 2.0 % であった.

家庭園芸用複合肥料の硫青酸化物の平均値は 0.00476 % (質量分率) ~ 0.0506 % (質量分率) であり, その s_f は 0.00019 % (質量分率) ~ 0.0019 % (質量分率), RSD_f は 3.7 % ~ 4.1 %, s_R は 0.0005 % (質量分率) ~ 0.0022 % (質量分率), RSD_R は 4.3 % ~ 12.7 % であった. 化成肥料の硫青酸化物の平均値は 0.00989 % (質量

分率)~0.204 % (質量分率)であり, その s_r は 0.00037% (質量分率)~0.006 % (質量分率), RSD_r は 2.3 %~3.8 %, s_R は 0.0006 % (質量分率)~0.008 % (質量分率), RSD_R は 2.6 %~6.5 %であった。

いずれの併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差も肥料等試験法⁴⁾の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度(併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差)の目安の 1.5 倍以内であることから, 本法の精度は同試験法の性能評価規準の要求事項に適合していることを確認した。

Table 4-1 Statistical analysis of collaborative study results for nitrous acid

Sample	No. of labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	10(1)	0.202	0.004	1.9	4	0.004	2.2	8
Compound fertilizer 2	10(1)	0.291	0.004	1.3	4	0.005	1.7	8
Compound fertilizer 3	10(1)	0.0498	0.0007	1.4	4	0.0010	2.0	8
Home garden-use mixed fertilizer 1	10(1)	0.0502	0.0005	1.1	4	0.0009	1.7	8
Home garden-use mixed fertilizer 2	11(0)	0.0255	0.0007	2.6	4	0.0009	3.5	8
Home garden-use mixed fertilizer 3	10(1)	0.150	0.004	2.9	4	0.005	3.6	8

a) Number of laboratories, where p =number of laboratories retained after outlier nad (q)=number of outliers.

b) Grand mean value (n =The number of participating testing laboratoried(p)×The number of times of recetition(2))

c) Mass fraction

d) Standard deviation of repeatability

e) Relative standard deviation of repeatability

f) The aim of Relative standard deviation of repeatability for Testing Methods For Fertilizers

g) Standard deviation of reproducibility

h) Relative standard deviation of reproducibility

i) The aim of Relative standard deviation of reproducibility for Testing Methods For Fertilizers

Table 4-2 Statistical analysis of collaborative study results for ammonium thiocyanate

Sample	No. of labs	Mean ^{b)}	s_r ^{d)}	RSD_r ^{e)}	$CRSD_r$ ^{f)}	s_R ^{g)}	RSD_R ^{h)}	$CRSD_R$ ⁱ⁾
	$p(q)$ ^{a)}	(%) ^{c)}	(%) ^{c)}	(%)	(%)	(%) ^{c)}	(%)	(%)
Compound fertilizer 1	10(1)	0.101	0.002	2.3	4	0.003	2.6	8
Compound fertilizer 2	11(0)	0.204	0.006	2.7	4	0.008	3.7	8
Compound fertilizer 3	9(2)	0.00989	0.00037	3.8	6	0.0006	6.5	11
Home garden-use mixed fertilizer 1	10(1)	0.00476	0.00019	4.1	6	0.0006	12.7	11
Home garden-use mixed fertilizer 2	9(2)	0.00976	0.00029	2.9	6	0.0005	4.7	11
Home garden-use mixed fertilizer 3	9(2)	0.0506	0.0019	3.7	4	0.0022	4.3	8

a)~i) Refer to the footnote of Table 4-1

4. まとめ

11 試験室において 6 種類(12 点)の家庭園芸用複合肥料及び化成肥料を用いて共同試験を実施し、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硫酸化物測定の評価を行った。その結果、亜硝酸の平均値 0.0255 % (質量分率) ~ 0.291 % (質量分率) の範囲でその室間再現精度 (RSD_R) は 1.7 % ~ 3.6 % であり、硫酸化物の平均値 0.00476 % (質量分率) ~ 0.204 % (質量分率) の範囲でその室間再現精度 (RSD_R) は 2.6 % ~ 12.7 % であった。この濃度におけるいずれの相対標準偏差も肥料等試験法に示されている併行精度及び室間再現精度の目安の 1.5 倍以内であり、肥料等試験法の要求する精度に適合していることを確認した。

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 27 年 1 月 9 日,農林水産省告示第 52 号 (2015)
- 2) 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定量, 日本土壤肥料学雑誌 (投稿中)
- 3) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78** (1), 145~196 (2006)
- 4) 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 (2015)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2015.pdf >
- 5) Horwitz, W., : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331~343 (1995)
- 6) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

Determination of Nitrous Acid and Ammonium Thiocyanate in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography (HPLC): A Collaborative Study

Masanori HASEGAWA¹ and Yasuharu KIMURA²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now) Fertilizer and Feed Inspection Department

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

A collaborative study was conducted to evaluate high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of nitrous acid and ammonium thiocyanate in fertilizers. The nitrous acid and ammonium thiocyanate were extracted with water. The extract was centrifuged. The nitrous acid and ammonium thiocyanate were analyzed by HPLC on amino-modified silica gel column or amino-modified polyvinyl alcohol gel column with UV detection at 210 nm. We sent eleven collaborators 6 blank materials and additional liquids in a blind duplicate design. After identification of outliers with Cochran test and Grubbs test, the mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) of determination of nitrous acid were reported 0.0255 % ~ 0.291 % as a mass fraction and 1.7 % ~ 3.6 %, respectively. Those of determination of ammonium thiocyanate were reported 0.00476 % ~ 0.204 % as a mass fraction and 2.6 % ~ 12.7 %, respectively. These results indicated that this method has acceptable precision for determination of nitrous acid and thiocyanate in these concentration ranges.

Key words nitrous acid, ammonium thiocyanate, high performance liquid chromatography (HPLC)

(Research Report of Fertilizer, **8**, 70~78, 2015)