

## 7 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—

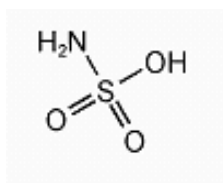
野崎友春<sup>1</sup>

キーワード スルファミン酸, 高速液体クロマトグラフ質量分析法, 共同試験

### 1. はじめに

肥料中の有害成分であるスルファミン酸(別名, アミド硫酸(Fig.1))の定量については, 肥料分析法において亜硝酸ナトリウム法が定められている<sup>1), 2)</sup>が, 外部指示薬による滴定操作において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, 平成 26 年に肥料中のスルファミン酸の分析法として, 高速液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)法が伊藤らによって検討され, 真度, 併行精度, 定量下限等の検討を行った結果, 単一試験室内における試験方法の妥当性が確認された<sup>3)</sup>.

今回, LC-MS 法による肥料中のスルファミン酸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.



スルファミン酸[HOSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>]

Fig.1 Chemical structural formula of sulfamic acid

### 2. 材料及び方法

#### 1) 共同試験用添加溶液

JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質アミド硫酸を用いてスルファミン酸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成し, 均質性の確認を実施したところ, 試料中のスルファミン酸の均一な混合が難しいことが確認された. そのため, 共同試験参加試験室においてスルファミン酸溶液を添加して共同試験を実施することとした.

<sup>1</sup> 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

ブランク試料はスルファミン酸を含まないことを確認した流通している化成肥料, 副産複合肥料, 副産窒素肥料, 硫酸アンモニア及び液状の家庭園芸用複合肥料とした. 家庭園芸用複合肥料以外は目開き 500  $\mu\text{m}$  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 の化成肥料をポリエチレン袋に, 約 1.5 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 20 個を調製した. ブラインド試料を提供するため, 共同試験用試料及スルファミン酸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質量分析計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) 固形肥料(化成肥料, 副産複合肥料, 副産窒素肥料及び硫酸アンモニア)の抽出

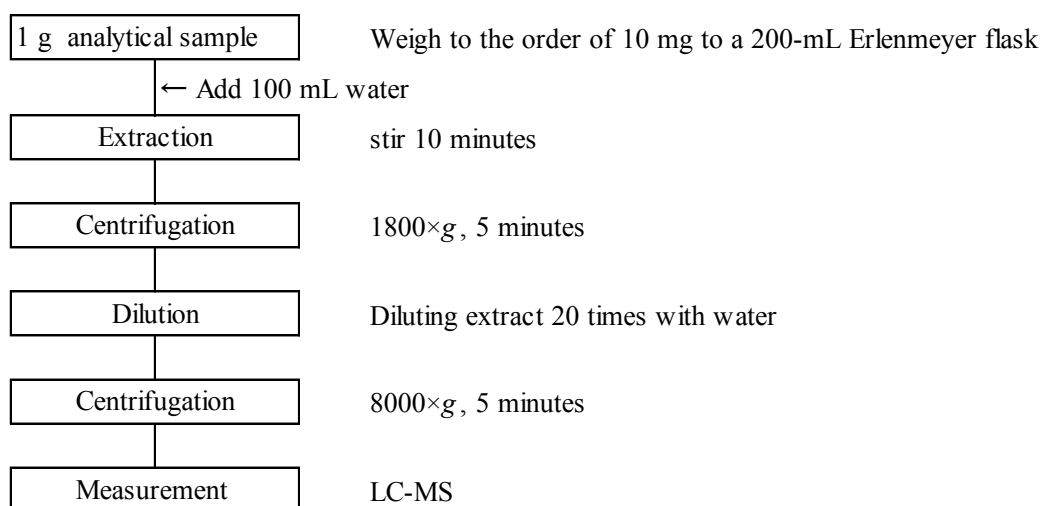
分析試料 1.00 g をはかりとり, 共栓三角フラスコ 200 mL に入れ, 添加溶液を加え 16 時間室温で放置し, 水 100 mL を加え, マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜ, 共栓遠心沈殿管 50 mL にとり, 2000 $\times$ g で約 5 分間遠心分離し, 上澄み液を抽出液とした.

#### (2) 液状肥料(家庭園芸用複合肥料)の抽出

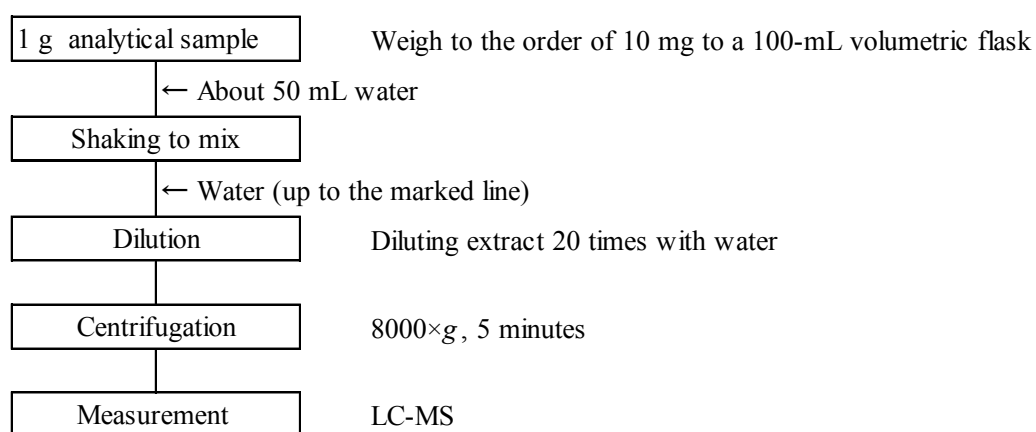
分析試料 1.00 g をはかりとり, 全量フラスコ 100 mL に入れ, 水約 50 mL を加え, 全量フラスコの蓋をして, 振り混ぜて溶かし, 標線まで水を加えて抽出液とした.

#### (3) 測定

各抽出液 5 mL を全量フラスコ 100 mL に入れ, 水約 50 mL を加え, 振り混ぜた後, 標線まで水を加えて希釈抽出液とした. 副産窒素肥料及び硫酸アンモニアは各希釈抽出液 10 mL を全量フラスコに入れ, 水約 20 mL を加え, 振り混ぜた後, 標線まで水を加えて 1/5 希釈抽出液とした. 各希釈抽出液及び 1/5 希釈抽出液を 1.5 mL の共栓遠心沈殿管にとり, 8000 $\times$ g で約 5 分間遠心分離した上澄み液を LC-MS 測定用試料溶液とした (Scheme 1 及び Scheme 2). その試料溶液を高速液体クロマトグラフ質量分析計に供し, 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. 測定に当たっては, 各試験室の高速液体クロマトグラフ質量分析計の操作方法に従った.



Scheme 1 Flow sheet for sulfamic acid in solid fertilizers



Scheme 2 Flow sheet for sulfamic acid in liquid fertilizers

Table 1 Analytical conditions for LC-MS

HPLC conditions	
Column	Silica surface is covered with vross-linked diol groups or polyhydroxymethacrylate
Guard column	Same type as analytical column
Temperature	40 °C±1 °C
Mobile phase	Ammonium formate buffer - Acetonitrile (1+9)
Flow rate	0.2 mL/min
Injection volume	1 µL
MS conditons	
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Ion monitoring	<i>m/z</i> 95.9

### 5) 共同試験用試料の均質性試験

今回の試験では、試料はスルファミン酸の混入がないこと及びスルファミン酸を液体で添加することから、均質性試験を行わなかった。

### 6) 共同試験

試験に参加した7試験室と使用した高速液体クロマトグラフ質量分析計及び使用カラム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 LCMS-2020 システム, Phenomenex Luna 5u HILIC 200A (100 mm×2.0 mm, 5.0 μm))
  - ・ 昭和電工株式会社(島津製作所 Nexera/LCMS-8030 Plus, 昭和電工 Shodex ODP2 HP-2D (150 mm×2.0 mm))
  - ・ 一般社団法人日本海事検定協会(島津製作所 LC/MS-2010C HT, MS-2020, Phenomenex Luna 5u HILIC 200A (100 mm×2.0 mm, 5.0 μm), Phenomenex SecurityGuard Cartridge HILIC (4.0 mm×2.0 mm))
  - ・ 一般財団法人日本食品分析センター(Agilent Technologies 1100 Series, Phenomenex Luna 5u HILIC 200A (100 mm×2.0 mm, 5.0 μm), Phenomenex SecurityGuard Cartridge HILIC (4.0 mm×2.0 mm))
  - ・ 一般財団法人日本冷凍食品検査協会(Waters Alliance 2695, Waters Quattro micro, Phenomenex Luna 5u HILIC 200A (100 mm×2.0 mm, 5.0 μm), Phenomenex SecurityGuard Cartridge HILIC (4.0 mm×2.0 mm))
  - ・ 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(島津製作所 LC/MS-2020 システム, Phenomenex Luna 5u HILIC 200A (100 mm×2.0 mm, 5.0 μm), Phenomenex SecurityGuard Cartridge HILIC (4.0 mm×2.0 mm))
  - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部(島津製作所 LC/MS-2020 システム, Phenomenex Luna 5u HILIC 200A (100 mm×2.0 mm, 5.0 μm), Phenomenex SecurityGuard Cartridge HILIC (4.0 mm×2.0 mm))
- (50音順)

## 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<sup>4, 5)</sup>に従って統計処理した。この結果、Cochranの検定で3種類の試料について1試験室の分析値が棄却。また、Grubbsの検定で2種類の試料について1試験室の分析値が棄却された。さらに、2種類の試料では、外れ値検定の結果棄却された試験室が2/9を超えたため、それらの試料の試験成績の統計処理は全ての試験室の結果を用いた。

Table 2 Individual result of sulfamic acid in fertilizer (mass %)

Lab ID <sup>a)</sup>	Compound fertilizer		By-product Compound fertilizer		By-product nitrogen fertilizer		By-product nitrogen fertilizer (dilution)	
A	0.0566	0.0525	0.0327	0.0245	0.0890	0.0845	0.0970	0.101
B	0.0418	0.0441	0.0234	0.0227	0.0529	0.0532	0.0616	0.0632
C	0.0466	0.0466	0.0244	0.0243	0.0672	0.0644	0.0606	0.0629
D	0.0499	0.0507	0.0271	0.0236	0.0662	0.0675	0.0914	0.0927
E	0.0843 <sup>c)</sup>	0.0803 <sup>c)</sup>	0.0395 <sup>c)</sup>	0.0447 <sup>c)</sup>	0.124	0.176	0.140	0.122
F	0.0419	0.0400	0.0215	0.0220	0.108	0.0364	0.0674	0.0629
G	0.0499	0.0606	0.0215	0.0232	0.0724	0.0686	0.0698	0.0790
Lab ID <sup>a)</sup>	Ammonium sulphate		Ammonium sulphate (dilution)		Compound fertilizer for home gardening 1		Compound fertilizer for home gardening 2	
A	0.215	0.210	0.252	0.254	0.0100	0.00937	0.0373	0.0342
B	0.205	0.203	0.215	0.219	0.00963	0.00964	0.0395	0.0389
C	0.196	0.189	0.188	0.216	0.00768	0.00769	0.0371	0.0343
D	0.197	0.186	0.257	0.220	0.00937	0.00930	0.0457	0.0289
E	0.325	0.413	0.411 <sup>b)</sup>	0.306 <sup>b)</sup>	0.429 <sup>b)</sup>	0.499 <sup>b)</sup>	2.34 <sup>b)</sup>	3.19 <sup>b)</sup>
F	0.0850	0.270	0.206	0.217	0.0114	0.0104	0.0347	0.0387
G	0.252	0.242	0.208	0.229	0.0105	0.0108	0.0386	0.0443

a) Laboratory identification

b) Outliers of Cochran's test

c) Outliers 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<sup>4, 5)</sup>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.

外れ値を実施した各試料の平均回収率は 94.2 % ~ 112 % であり, その  $s_r$  は 0.00035 % (質量分率) ~ 0.055 % (質量分率),  $RSD_r$  は 3.7 % ~ 29.4 %,  $s_R$  は 0.00117 % (質量分率) ~ 0.077 % (質量分率),  $RSD_R$  は 9.7 % ~ 44.9 % であった. なお,  $RSD_R$  が  $RSD_r$  より小さかった試料が 1 種類あった.

これらの試料について, 平均回収率は肥料等試験法<sup>6)</sup>に基づく真度の目標の範囲内 (80 % ~ 115 %) であった. 併行相対標準偏差は併行精度の目安の 1.5 倍に入った試料が 1 点, 室間再現相対標準偏差は室間再現精度の目安の 1.5 倍に入った試料が 1 点であった. また, 副産窒素肥料及び硫酸アンモニアの試料溶液を希釈して分析した結果と希釈しないで分析した結果を比較すると, 併行相対標準偏差及び室間相対標準偏差ともに希釈して分析した方が希釈しないで分析したより小さい値となった.

Table 3 Statistical analysis of collaborative study results

Sample	Labs <sup>a)</sup>	Conc. <sup>b)</sup>	Mean <sup>d)</sup>	Recovery	$s_r$ <sup>e)</sup>	$RSD_r$ <sup>f)</sup>	$CRSD_r$ <sup>g)</sup>	$s_R$ <sup>h)</sup>	$RSD_R$ <sup>i)</sup>	$CRSD_R$ <sup>j)</sup>
	$p$ ( $q$ ) <sup>a)</sup>	(%) <sup>c)</sup>	(%) <sup>c)</sup>	(%)	(%) <sup>c)</sup>	(%)	(%)	(%) <sup>e)</sup>	(%)	(%)
Compound fertilizer	6 (1)	0.05	0.0484	96.9	0.0034	7.1	4	0.0064	13.3	8
By-product Compound fertilizer	6 (1)	0.025	0.0242	97.0	0.0026	10.9	4	0.0031	12.9	8
By-product nitrogen fertilizer <sup>k)</sup>	7 (0)	0.075	0.0807	107.7	0.0237	29.4	4	0.0362	44.9	8
By-product nitrogen fertilizer (dilution)	7 (0)	0.075	0.0837	111.6	0.0057	6.8	4	0.0258	30.9	8
Ammonium sulphate <sup>l)</sup>	7 (0)	0.21	0.228	108.4	0.055	24.1	4	0.0767	33.7	8
Ammonium sulphate (dilution)	6 (1)	0.21	0.223	106.4	0.015	6.8	4	0.0216	9.7	8
Compound fertilizer for home gardening 1	6 (1)	0.01	0.00965	96.5	0.00035	3.7	4	0.0012	12.1	8
Compound fertilizer for home gardening 2	6 (1)	0.04	0.0377	94.2	0.0054	14.3	4	0.0044	14.3 <sup>11)</sup>	8

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

b) Sulfamic acid concentration contributed by spike

c) Mass fraction

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

e) Standard deviation of repeatability

f) Relative standard deviation of repeatability

g) Rough standard of relative standard deviation of repeatability in Testing Methods for Fertilizers 2015

h) Standard deviation of reproducibility

i) Relative standard deviation of reproducibility

j) Rough standard of relative deviation of reproducibility in Testing Methods for Fertilizers 2015

k) Sample of number of outlier / number of laboratories exceed 2/9

l) Value was  $RSD_r$  because  $RSD_R < RSD_r$

#### 4. まとめ

7 試験室において化成肥料, 副産複合肥料, 副産窒素肥料, 硫酸アンモニア及び液状の家庭園芸用複合肥料(計 12 点)にスルファミン酸を添加して LC-MS 法によるスルファミン酸分析法の共同試験を実施し, 試験法の評価を行った. その結果, 平均回収率は 94.2 %~112 %, 併行精度(相対標準偏差)は 3.7 %~29.4 %, 室間再現精度(相対標準偏差)は 9.7 %~44.9 %であり, 平均回収率は肥料等試験法に基づく真度の目標の範囲内であったものの, 併行精度及び室間再現精度は肥料等試験法の併行精度及び室間再現精度の目安の範囲内には入らなかった.

このことから, 今回の共同試験結果からは本試験法が肥料中のスルファミン酸の測定に用いることができる十

分な性能を有しているとは言えないが、昨年度の単一試験室の結果では、問題がなかったことから、今後、試験方法も含めて検討をおこなう必要があると考える。

## 謝 辞

共同試験にご協力頂きました、株式会社島津製作所、昭和電工株式会社、一般社団法人日本海事検定協会、一般財団法人日本食品分析センター及び一般財団法人日本冷凍食品検査協会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 27 年 1 月 9 日, 農林水産省告示第 52 号 (2015)
- 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) LC-MS 法による肥料中のスルファミン酸の測定, 平成 27 年肥料等技術検討会資料
- 4) Horwitz W. : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331~343 (1995)
- 5) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)
- 6) 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/shikhenho\\_2015.pdf](http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2015.pdf) >

## Determination of Sulfamic Acid in Fertilizers using Liquid Chromatography-Mass Spectrometer (LC-MS): A Collaborative Study

Tomoharu NOZAKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

A collaborative study was conducted to evaluate the applicability of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) for determination of sulfamic acid in fertilizers. Sulfamic acid in fertilizer was extracted and diluted with water. The sulfamic acid in the mixture was determined by LC-MS. Six samples of fertilizers, respectively, were sent to 7 collaborators. These samples were analyzed as blind duplicates. Recovery values reported from 94.2 % to 112 %, the relative standard deviation ( $RSD_t$ ) for repeatability ranged from 3.7 % to 29.4 %, the relative standard deviation ( $RSD_R$ ) for reproducibility ranged from 9.7 % to 44.9 %. These results indicated that this method has an unacceptable precision for determination of sulfamic acid in fertilizers.

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

(Research Report of Fertilizer, **9**, 69-76, 2016)