5.7 スルファミン酸（アミド硫酸）

5.7.b 高速液体クロマトグラフ質量分析法

（1） 概要

この試験法は肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 5.7.b-2017 又は AS-acid.b-1 とする。

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。なお、この試験法の性能は**備考 5** に示す。

（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） ぎ酸： LC-MS 用試薬又は同等の品質のもの。

d） ぎ酸アンモニウム緩衝液（pH 3.2）： 純度 95 %（質量分率）以上のぎ酸アンモニウム 3.153 g を水に溶かして 500 mL とし、ぎ酸で pH 3.2 に調整する。

e） スルファミン酸標準液（1000 μg/mL）： JIS K 8005 に規定する容量分析用標準物質アミド硫酸［$HOSO_2NH_2$］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 100 mL 全量フラスコに移し入れ、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（1000 μg/mL）2.5 mL を 250 mL 全量フラスコにとり、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 250 mL 全量フラスコにとり、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 ng/mL～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 100 mL 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 5 mL～50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、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： JIS K 0136 に規定する高速液体クロマトグラフ質量分析計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*～10 000×*g* で遠心分離可能なもの。

備考 1. LC-MS に代えて高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）を用いることができる。この場合、（**4.3**）**a**）高速液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件（シングルマスモード）を参考にして設定し、**b**）の操作により検量線を作成できることを事前に確認すること。

備考 2. カラムは LUNA HILIC、Shodex ODP2 HP-2D 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 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。

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 50 mL 共栓遠心沈殿管に 50 mL 程度とる。

d） 遠心力約 1700×*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×*g* 程度となる。

備考 3. （**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（簡易抽出）**

a） 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、100 mL 全量フラスコに入れる。

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 2 mL を 200 mL 全量フラスコにとる。

b） 標線まで水を加え、1.5 mL 共栓遠心沈殿管(3)に 1.5 mL 程度とる。

c） 遠心力 8000×*g*～10 000×*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**） ポリプロピレン製等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 10 000 rpm で遠心力 8100×*g*～10 000×*g* 程度となる。

備考 4. （**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。

（**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 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 を高速液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、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た日を変えての分析結果について、一元配置分散分析を用いて解析し、併行精度及び中間精度を算出した結果を表 1 に示す。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 2 に示す。なお、スルファミン酸濃度 0.0116 %（質量分率）では満足する室間再現精度が得られなかったが、スルファミン酸濃度 0.0386 %（質量分率）～0.401 %（質量分率）の範囲で十分な室間再現精度が得られた。

表1　スルファミン酸の日を変えた試験成績の解析結果

試料名	日数[1)] T	平均値[2)] (%)[3)]	併行精度 s_r[4)] (%)[3)]	併行精度 RSD_r[5)] (%)	中間精度 $s_{I(T)}$[6)] (%)[3)]	中間精度 $RSD_{I(T)}$[7)] (%)
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点併行分析を実施した日数
2） 平均値（n= 日数（T）×併行数（2））
3） 質量分率
4） 併行標準偏差
5） 併行相対標準偏差
6） 中間標準偏差
7） 中間相対標準偏差

表2　スルファミン酸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)] (%)
硫酸アンモニア	9(0)	0.203	0.021	10.4	0.024	11.9
副産窒素肥料	9(0)	0.401	0.030	7.5	0.035	8.8
化成肥料	7(2)	0.0957	0.0043	4.5	0.0043	4.5
副産複合肥料	9(0)	0.0166	0.0028	16.8	0.0048	29.1
液状複合肥料1	9(0)	0.0381	0.0022	5.8	0.0049	12.8
液状複合肥料2	9(0)	0.243	0.011	4.5	0.018	7.6

1） 有効試験室数（外れ値を報告した試験室数）
2） 平均値（n=有効試験室数×試料数（2））
3） 質量分率
4） 併行標準偏差
5） 併行相対標準偏差
6） 室間再現標準偏差
7） 室間再現相対標準偏差

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 (2016)

3） 小塚健志, 伊藤浩平, 中村信仁, 白井裕治： 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－, 肥料研究報告, **11**, 47~53 (2018)

(5) スルファミン酸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。

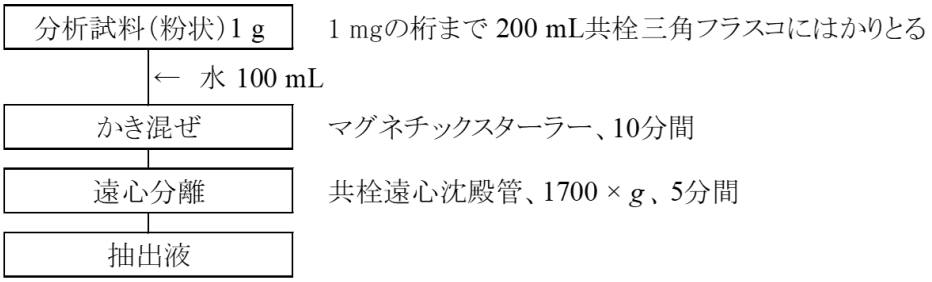


図1-1　肥料中のスルファミン酸試験法フローシート（抽出操作(4.1.1)）

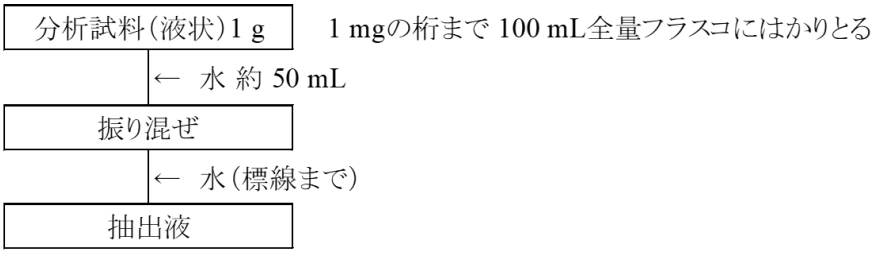


図1-2　肥料中のスルファミン酸試験法フローシート（抽出操作(4.1.2)）

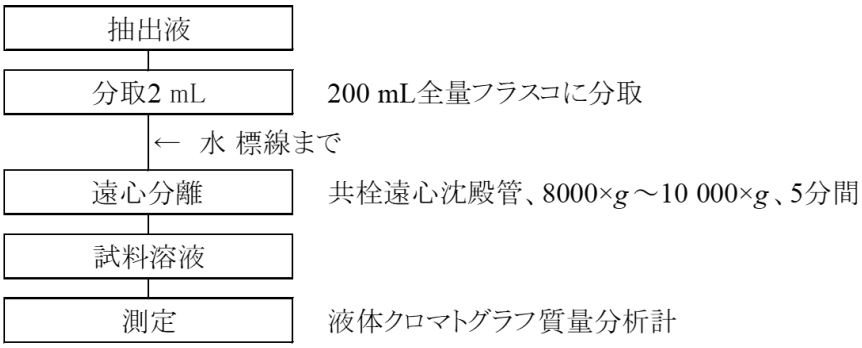
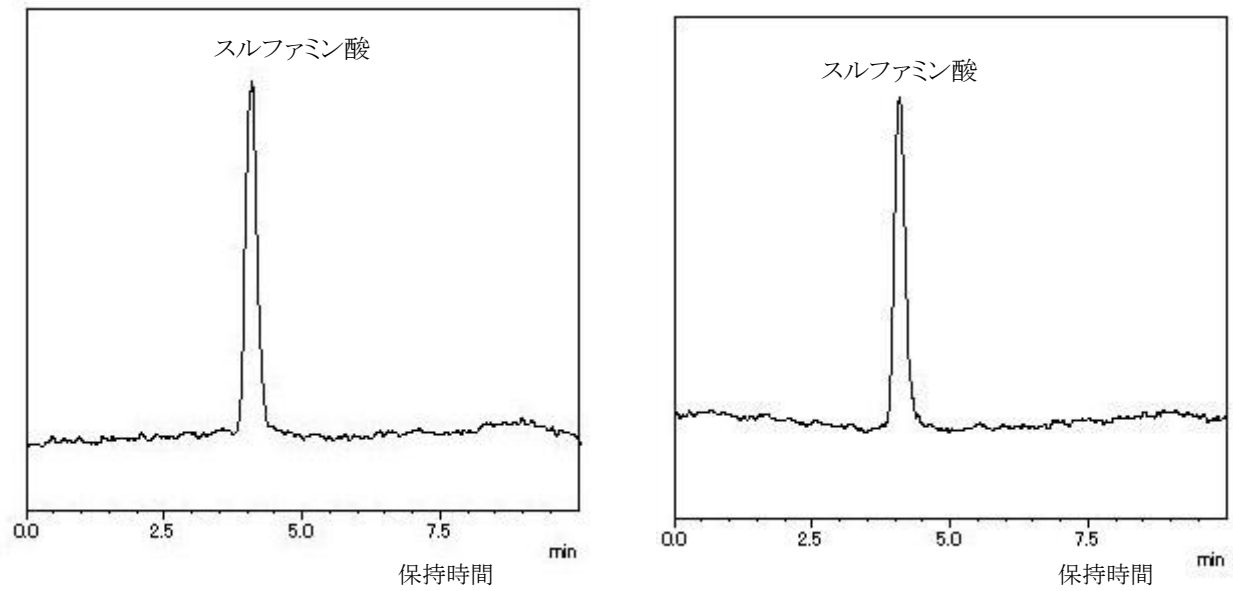


図2　肥料中のスルファミン酸試験法フローシート（希釈及び測定操作）

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例を次に示す。



（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）
キャピラリー電圧： - 3.5 kV
イオン源温度： 300 °C
ネブライザガス流量： 1.5 L/min
デソルベーション温度： 250 °C
その他の条件は（**4.3**）**a**）LC-MS 測定条件の例示のとおり