## 5.9 亜硝酸

### 5.9.a 高速液体クロマトグラフ法

**(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 5.9.a-2017 又は NO2.a-1 とする。

分析試料に水を加えて亜硝酸を抽出し、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、分析試料中の亜硝酸を求める。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、亜硝酸及びチオシアン酸アンモニウム(硫青酸化物)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) 亜硝酸標準液(1000 μg/mL)**(1): JIS K 8019 に規定する亜硝酸ナトリウム 0.147 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、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで水を加える。

**g) 亜硝酸標準液(100 μg/mL)**(1): 使用時に、亜硝酸標準液(1000 μg/mL)10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線まで水を加える。

**h) 検量線用亜硝酸標準液(1 μg/mL～20 μg/mL)**: 使用時に亜硝酸標準液(100 μg/mL)の 1 mL～20 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**: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフ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 ℃～45 ℃ 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*～10 000×*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亜硝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、CAPCELL PAK NH2 UG80 等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 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(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×*g* 程度となる。

**(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) 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 1.5 mL 共栓遠心沈殿管(4)に 1.5 mL 程度とり、**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 100 mL ビーカーにとる。

**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 50 mL 全量フラスコに移し入れる。

**e)** 標線まで水を加え、1.5 mL 共栓遠心沈殿管(4)に 1.5 mL 程度とる。

**f)** 遠心力 8000×*g*～10 000×*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)** ポリプロピレン製等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 10 000 rpm で遠心力 8100×*g*～10 000×*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の操作方法による。

**a) 高速液体クロマトグラフの測定条件**: 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)： りん酸水素二ナトリウム・12 水和物 1.79 g、りん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 を高速液体クロマトグラフに注入し、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亜硝酸量を求め、分析試料中の亜硝酸を算出する。

**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（1000 μg/mL）、チオシアン酸アンモニウム標準液（1000 μg/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）g**）の亜硝酸標準液（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 倍相当量の亜硝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）、0.04 %（質量分率）、0.02 %（質量分率）及び 0.01 %（質量分率）の添加レベルで平均回収率が 99.0 %～100.8 %、100.4 %～102.0 %、103.1 %～106.6 %及び 101.2 %～105.9 %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。亜硝酸は 0.0255 %（質量分率）～0.291 %（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 0.0003 %（質量分率）程度と推定された。

表1　亜硝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)] (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 家庭園芸用複合肥料1 | 10(1) | 0.0502 | 0.0005 | 1.1 | 0.0009 | 1.7 |
| 家庭園芸用複合肥料2 | 11(0) | 0.0255 | 0.0007 | 2.6 | 0.0009 | 3.5 |
| 家庭園芸用複合肥料3 | 10(1) | 0.150 | 0.004 | 2.9 | 0.005 | 3.6 |
| 化成肥料1 | 10(1) | 0.202 | 0.004 | 1.9 | 0.004 | 2.2 |
| 化成肥料2 | 10(1) | 0.291 | 0.004 | 1.3 | 0.005 | 1.7 |
| 化成肥料3 | 10(1) | 0.0498 | 0.0007 | 1.4 | 0.0010 | 2.0 |

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, 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, 日本土壌肥料学雑誌, **87**(2), 120~124 (2016)

**2**)　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)　亜硝酸試験法フローシート**　肥料中の亜硝酸試験法のフローシートを次に示す。

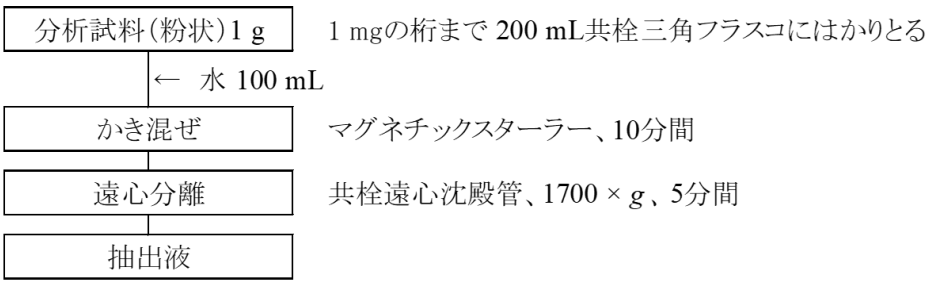



図1-1　肥料中の亜硝酸試験法フローシート (抽出操作(4.1.1))

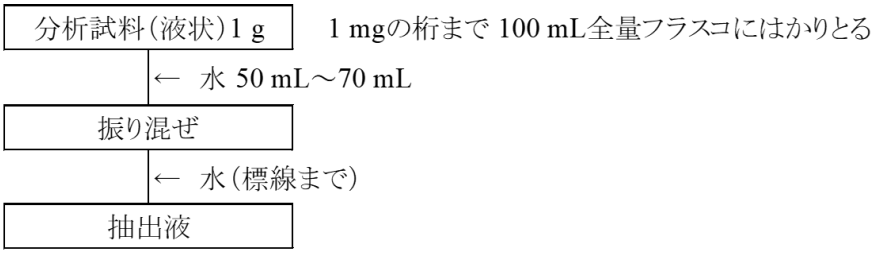



図1-2　肥料中の亜硝酸試験法フローシート (抽出操作(4.1.2))

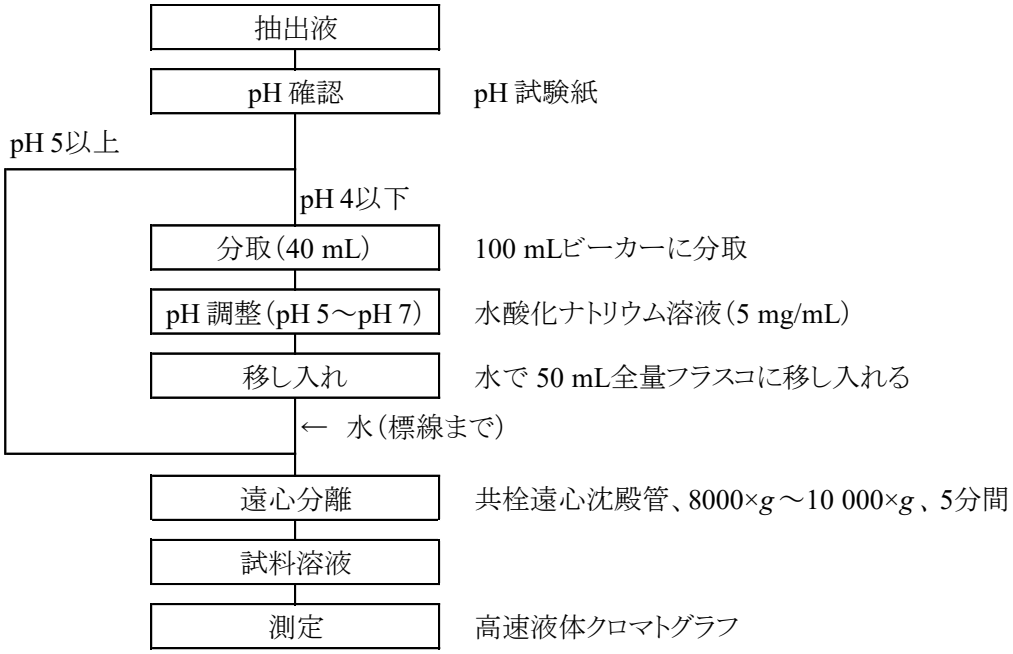
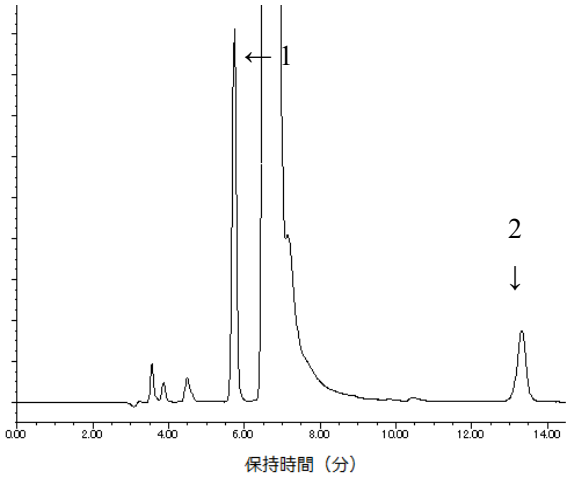


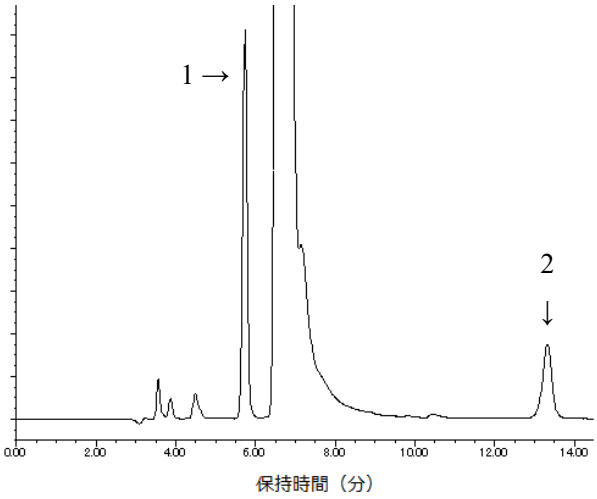

図2　肥料中の亜硝酸試験法フローシート（pH 調整及び測定操作）

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




（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、10µL））




（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

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