

8 ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) 法による肥料中の メラミン及びその関連物質の同時測定

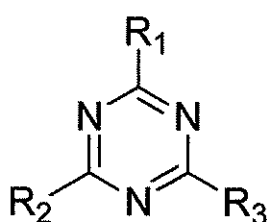
白井裕治¹, 大木 純^{1,2)}

キーワード メラミン, 肥料, ガスクロマトグラフ質量分析法

1. はじめに

メラミンは、尿素の化学合成から得られる化合物であり、主に樹脂の原材料として用いられている。また、メラミンの製造過程において R₁~R₃ の-NH₂ が-OH に置き換わった副産物 (図 1) が生ずることがある。メラミン由来の窒素は、土壤中において無機化しないか又は遅く、肥効が期待できない。ケルダール法又は燃焼法を用いてメラミンが混入した肥料を分析した場合、窒素全量として加味されて評価されるものの、表示された窒素分に応じた肥料効果が望めない。よって、メラミン等 (メラミン及びその関連物質) の混入は肥料の品質を低下させることから、メラミンを定量する試験法が必要となった。

乾燥たん白原料、ペットフード及び畜産用飼料中のメラミンのガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) によるスクリーニング法が FDA 法 (Version 2.1)¹⁾ に記載されており、メラミン等がそれぞれ 10 及び 50 mg/kg 添加された試料を用いた回収試験結果が記載されている。しかしながら、数%のメラミン等が混入された肥料に適用するには、メラミン等の抽出効率、肥料の原料に使用された他の塩類等による測定値への影響等を確認する必要がある。よって、定量範囲、頑健性等の試験方法の妥当性の確認を実施したのでその概要を報告する。



	R ₁	R ₂	R ₃	MW	N含有率(%)
メラミン	NH ₂	NH ₂	NH ₂	126.12	67
アンメリン	OH	NH ₂	NH ₂	127.10	55
アンメリド	OH	OH	NH ₂	128.09	44
シアヌル酸	OH	OH	OH	129.07	33

図1 メラミン及びその関連物質の構造式

2. 材料及び方法

1) 分析試料の調製

植物油かす, 魚かす粉末, 魚廃物加工肥料, 混合有機質肥料, 配合肥料及び化成肥料を目開き 500

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 (現)独立行政法人農林水産消費安全技術センター消費安全情報部

μm のふるいを全通するまで超遠心粉碎機で粉碎し、混合して分析試料とした。分析試料はビニール袋に入れ、常温で保存した。

2) 試薬等の調製

- (1) 水: MILLIPORE Milli-Q Academi A10 で精製した水。
- (2) アセトニトリル: JIS K 8039 に規定する残留農薬・PCB 試験用(濃縮 300)試薬。
- (3) ジエチルアミン: 特級試薬。
- (4) ピリジン(脱水): 純度 99.5%以上及び水分 0.05 mg/mL 以下の有機合成用試薬。なお、開封後は硫酸ナトリウム(無水)適量を加えて密栓して保管した。
- (5) 誘導体化試薬: ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド-トリメチルクロロシラン(99+1)は、SUPELCO から販売されている BSTFA-TMCS(99+1)を用いた。
- (6) メラミン等標準液(0.5 mg/mL): メラミン[$\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$] (和光純薬工業), アンメルン[$\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$] (東京化成工業), アンメリド[$\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$] (東京化成工業)及びシアヌル酸[$\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_3$] (関東化学)各約 0.05 g をそれぞれひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定した。少量のジエチルアミン-水(1+4)で溶かし、それぞれ全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加えた。
- (7) 混合標準液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 各メラミン等標準液(0.5 mg/mL) 5 mL を全量フラスコ 50 mL にとり、標線までジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5)を加えた。

3) 器具及び装置

- (1) ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)
ガスクロマトグラフ: Shimadzu GC-2010
質量分析計: Shimadzu GCMS-QP2010 Plus
カラム: Restek Rtx-5ms(内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm)
- (2) 超音波発生器: AS ONE US-4R(超音波洗浄機: 発信周波数 40 kHz, 出力 160 W)
- (3) 高速遠心分離器: AS ONE MCD-2000
- (4) 遠心エバポレーター: EYELA CVE-3100
- (5) 水浴: BÜCHI B-490

4) 試験操作

(1) 抽出

分析試料 0.50 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200~300 mL に入れた。ジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5) 160~200 mL を加え、超音波発生器を用いて 30 分間超音波処理し、約 1.5 mL をポリプロピレン製遠心沈殿管 1.5 mL にとり、10,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上澄み液 1 mL を全量フラスコ 5~50 mL にとり、ジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5)を標線まで加えて抽出液とした。

(2) 誘導体化

抽出液 0.2 mL をスクリュ-栓付き試験管 5~10 mL にとり、70°Cの濃縮器で減圧濃縮し、完全に溶媒を揮散させた。ピリジン(脱水)0.3 mL 及び誘導体化試薬 0.2 mL を残留物に加えて混合し、栓をして密封した。70°C水浴中で 45 分間加熱した後、放冷して試料溶液を調製した。

同時に、混合標準液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 5 mL を全量フラスコ 50 mL にとり、標線までジエチルアミン-水-アセト

ニトリル(1+4+5)を加えて混合標準液(5 µg/mL)とした。混合標準液(5 µg/mL)1~20 mLを全量フラスコ 50 mLに段階的にとり、標線までジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5)を加え、混合標準液(0.1~5 µg/mL)とした。混合標準液(0.1~5 µg/mL)を抽出液と同様の誘導体化操作を行い、0.04~2 µg/mL相当量の検量線用混合標準液を調製した。

(3) 測定

各検量線用混合標準液 1 µLをGC/MSに注入し、表 1-1 及び 1-2 の条件で測定対象物質の定量用イオン(m/z)を測定し、得られたピーク面積又は高さから検量線を作成した。試料溶液 1 µLをGC/MSに注入し、ピーク面積又は高さから試料溶液中の各測定対象物質量を求め、分析試料中の各測定対象物質濃度を算出した。

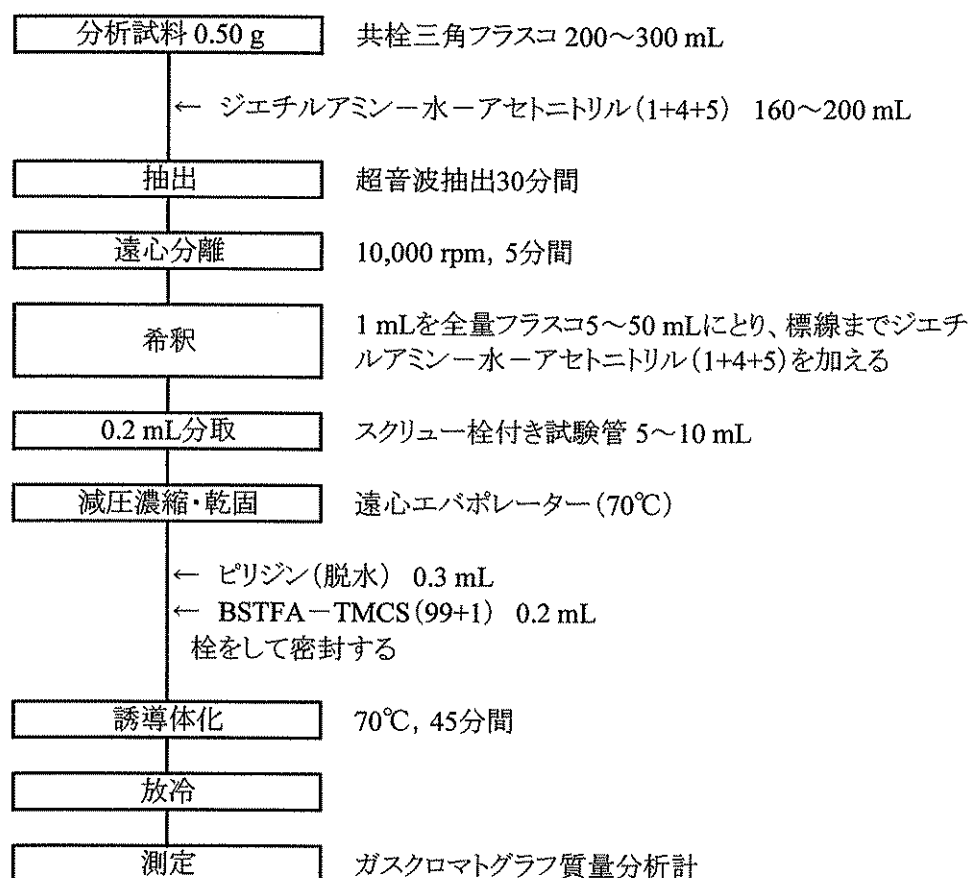


図2 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート

表1-1 GC/MS条件

(GC部)	
装置	Shimadzu GC-2010
カラム	Rtx-5ms(内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μ m)
昇温条件	100°C (1 min) – 15°C/min – 320°C (3 min)
試料導入方法	スプリットレス(1 min)
試料導入部温度	280°C
キャリアガス	ヘリウム 1.5 mL/min
インターフェース温度	250°C
(MS部)	
装置	Shimadzu GCMS-QP2010Plus
イオン化モード	電子衝撃イオン化法(EI)
イオン化電圧	70 V
イオン源温度	230°C
イオン検出方式	選択イオン検出法(SIM)

表1-2 測定対象物質のフラグメントイオン

測定対象物質	測定フラグメントイオン(m/z)				
	定量用	確認用	確認用	確認用	確認用
メラミン	342	344	327	285	213
アンメリン	328	345	343	285	214
アンメリド	344	346	329	214	198
シアヌル酸	345	347	330	215	188

3. 結果及び考察

1) 測定条件

メラミン等検量線用混合標準液(各 2 μ g/mL 相当量)の GC/MS の定量用イオンのクロマトグラムを図 3 に示した。メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸の各ピーク形状及び分離度は満足するものであった。0.01~5 μ g/mL 相当量の検量線用混合標準液を調製し、本法に従って検量線を作成した。その結果、0.04~2 μ g/mL 相当量の範囲で直線性のある検量線が得られた。

2) 抽出方法

FDA 法では分析試料 0.5 g を抽出溶媒 20 mL を加えて抽出し、希釈せずに誘導体化の操作を行って試料溶液を調製している。この場合、分析試料中のメラミン等の含有量が 0.25%を超えると検量線の範囲を逸脱することになる。また、ジエチルアミン-水(1+4)をアンメリン 0.1 g に加えて超音波処理したところ、アンメリンの不溶物が残存していた。

これらのことから、抽出溶媒 20 mL を 160~200 mL とし、更に希釈操作(5~50 倍)を追加することとした。50 倍に希釈した場合、分析試料中のメラミン等の定量範囲は 0.2~10%となり、その定量範囲未満のメラミン等を測定する場合は希釈倍率を下げた。なお、メラミン等の含有量がそれぞれ 10%を超える場合は分析試料の採取量を更に減らす必要が生じた。

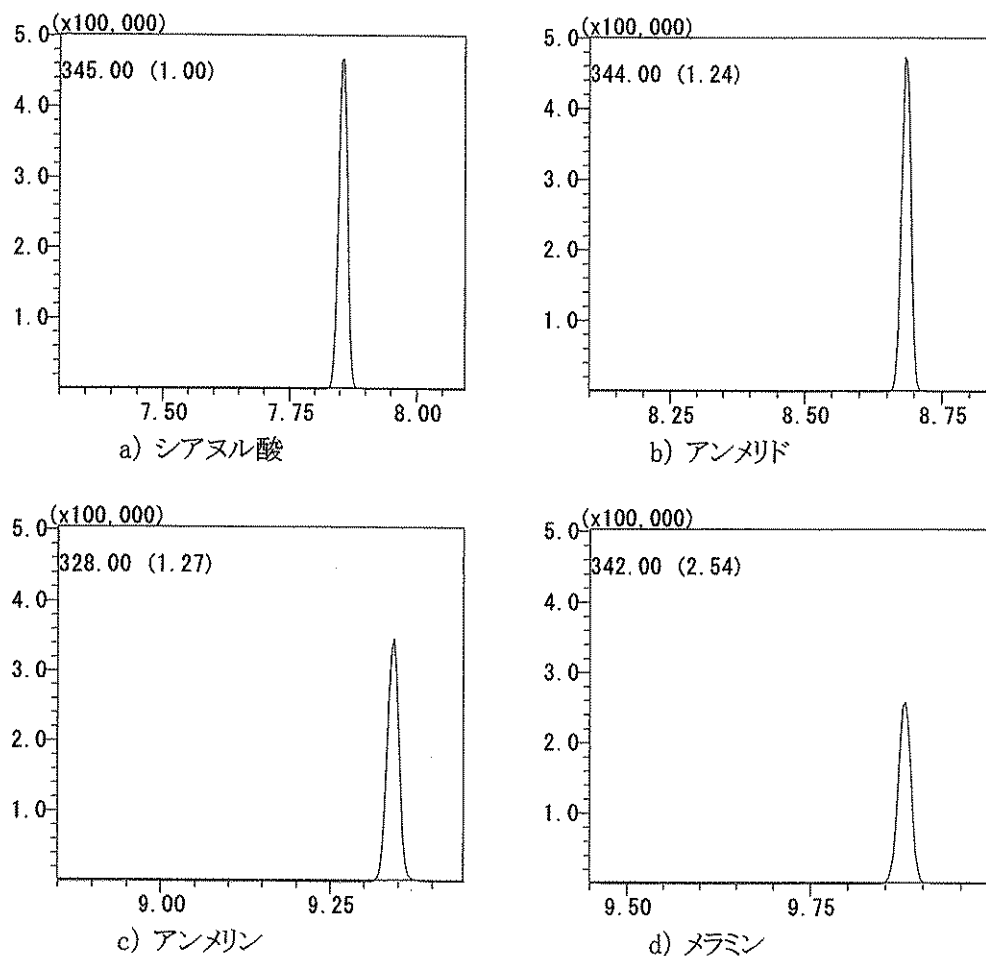


図3 メラミン及びその関連物質のGC/MSの定量用イオン(SIM)のクロマトグラム
 メラミン及びその関連物質各2 ng相当量
 GC/MSの測定条件 表1-1及び1-2を参照のとおり

3) マトリックスの影響

市販の大豆油かす、米ぬか油かす、魚かす粉末(3点)、魚廃物加工肥料(2点)、混合有機質肥料(3点)、配合肥料(2点)及び化成肥料(3点)を本法に従って測定したところ、定量を妨害する夾雑ピークはなかった。

4) 添加回収試験

大豆油かす、魚かす粉末、魚廃物加工肥料、混合有機質肥料、配合肥料及び化成肥料に添加したメラミン等の回収試験結果を表2に示した。各分析試料中のメラミン等の含有量として10%及び0.2%になるようにそれぞれ添加し、3点併行試験を実施したところ、平均回収率は92.1~102.9%及び90.3~102.2%で、それら繰り返し精度は相対標準偏差0.9~10.5%及び0.9~9.1%であった。

表2 メラミン及びその関連物質の回収試験結果 (%)

	含有量 ¹⁾	メラミン		アンメリン		アンメリド		シアヌル酸	
		Mean ²⁾	RSD ³⁾	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
大豆油かす	10	101.6	5.3	93.6	3.1	98.1	3.6	98.6	3.2
	0.2	101.0	2.6	96.3	4.4	96.7	6.0	100.1	4.0
魚かす粉末	10	100.6	3.6	94.8	4.0	98.1	1.9	97.2	2.7
	0.2	97.5	9.1	99.7	2.6	98.4	1.4	100.3	0.6
魚廃物加工肥料	10	96.3	3.2	97.1	2.1	95.4	2.6	92.1	0.9
	0.2	101.5	7.9	102.2	3.8	99.8	1.1	98.5	2.3
混合有機質肥料	10	99.0	10.5	98.2	4.0	96.0	7.2	95.4	5.4
	0.2	99.8	7.9	99.2	2.0	96.4	5.1	98.9	2.9
配合肥料	10	100.7	2.5	94.5	4.5	94.6	1.4	96.0	1.1
	0.2	92.7	6.6	98.2	5.1	94.0	4.6	91.5	2.4
化成肥料	10	102.9	5.9	97.4	5.3	93.9	1.7	94.0	3.0
	0.2	96.2	5.8	95.7	3.2	94.0	3.4	90.3	2.6

1) メラミン等の含有量

2) 3点併行試験の平均値

3) 相対標準偏差

5) 定量下限の確認

配合肥料を用いてメラミン等の定量下限確認の試験結果を表3に示した。分析試料中のメラミン等の含有量として0.02%になるようにそれぞれ添加して8点併行試験を実施したところ、平均定量値は0.0199~0.0203%で、それら繰り返し精度は標準偏差0.0009~0.0013%であった。定量下限値は(標準偏差)×10、また、検出下限は(標準偏差)×2×t(n-1,0.05)として示される⁵⁾ので、本法の定量下限値及び検出下限は0.01%程度及び0.005%程度と推定された。

表3 メラミン及びその関連物質の定量下限の確認 (%)

	含有量 ¹⁾	配合肥料		定量下限 推定値 ⁴⁾	検出下限 推定値 ⁵⁾
		Mean ²⁾	SD ³⁾		
メラミン	0.02	0.0203	0.0009	0.009	0.003
アンメリン	0.02	0.0200	0.0010	0.010	0.004
アンメリド	0.02	0.0201	0.0013	0.013	0.005
シアヌル酸	0.02	0.0199	0.0011	0.011	0.004

1) メラミン等の含有量

2) 8点併行試験の平均値

3) 標準偏差

4) 標準偏差×10

5) 標準偏差×2×t(n-1,0.05)

4. まとめ

肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法の妥当性確認のための試験を実施したところ、つぎのとおり満足する成績を得た。

- 1) 分析試料の採取量及び抽出溶媒量を変更し、更に希釈操作を追加することにより、肥料中のメラミン等の含有量 10%まで定量することが可能となった。
- 2) 市販の肥料についてメラミン等の測定を実施した結果、定量を妨害する夾雑ピークはなかった。
- 3) メラミン等の含有量が 10%及び 0.2%になるように添加した 6 種類の肥料を用いて回収試験を実施した結果、平均回収率は 92.1~102.9%及び 90.3~102.2%で、それらの相対標準偏差は 0.9~10.5%及び 0.6~9.1%であった。
- 4) 本法のメラミン等の定量下限はそれぞれ 0.01%程度と推定された。
なお、参考のため、試験方法を FAMIC ホームページに掲載した^{2, 3)}。

文 献

- 1) U.S. Food and Drug Administration (FDA), GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide and Cyanuric Acid (Version 2.1) (2007)
- 2) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): メラミンの試験法
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub5_4/LI_1.htm>
- 3) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料等試験法 (2008)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/bunseki/sub9_shiken2008.html>

Validation of Gas Chromatography/Mass Spectrometry for Determination of Melamine and Its Degradation Products in Fertilizer

Yuji SHIRAI¹ and Jun OKI^{1, (2)}

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

² (Now) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Food Safety and Consumer Affairs Information Department

Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS method) for determination of melamine was validated. Melamine was extracted with diethylamide-water-acetonitrile. The extract was centrifuged and a portion of the supernatant was removed and dried using a centrifuge-evaporator. After pyridine and BSTFA-TMCS (99+1) was added, the solution was heated at 70°C for derivatization. The melamine derivations were analyzed by a GC/MS connecting Rtx-5ms (0.25 mm internal diameter, 30 m length, 0.25 µm thick). As a result of 3 replicate analysis of 5 fertilizer samples, the mean recoveries and the relative standard deviations (RSD) were 90.3~102.2% and 0.6~10.5%, respectively. On the basis of 7 replicate measurements of melamine added samples the LOQ values were 0.01% for all melamine samples. The results demonstrated the validity of the GC/MS method for determination of melamine in fertilizer.

Key words melamine, melamine degradation products, fertilizer, gas chromatograph/mass spectrography

(Research Report of Fertilizer, 1, 114~121, 2008)