

2 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による石灰窒素中の メラミン及びその関連物質の同時測定

坂東悦子¹, 廣井利明¹, 恵智正宏¹, 白井裕治¹

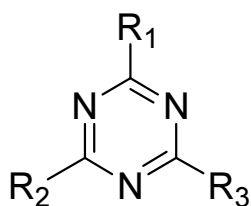
キーワード メラミン, 肥料, 石灰窒素, 高速液体クロマトグラフ

1. はじめに

メラミンは日本国内において肥料として有効性が認められておらず, 国内では流通していない。また, 現時点では肥料取締法に基づく公定規格においてメラミンに関する基準値等はない。今般, 石灰窒素(肥料・農薬)のうち石灰窒素粉状品に水を加えて造粒した粒状製品について, メラミンの含有量が高い製品があることが確認された¹⁾ことから, 肥料中のメラミンに関する規制等が必要か検討することとなった。

肥料中のメラミンに関する調査を行うためには, メラミン及びその関連物質であるアンメリン, アンメリド及びシアヌル酸(以下「メラミン等」という(Fig.1).)の分析方法の検討を行う必要がある。肥料等試験法には肥料中のメラミン等の測定法としてガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法²⁾が記載されているが, この試験法は操作が煩雑であり, また, 誘導体化後の試料溶液中の余剰試薬がGC/MSの試料溶液導入部及びイオン化部にダメージを与えることがあり, 連続分析には適さない。よって, 誘導体化操作を必要としない迅速で汎用性のある試験法として, 高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いた測定法を検討することとなった。

今回, メラミンの含有量が高い製品があることが確認された石灰窒素について, HPLCを用いたメラミン等の定量試験法を検討したので, 概要を報告する。



Substance name	R ₁	R ₂	R ₃	MW	N-content (%)
Melamine	NH ₂	NH ₂	NH ₂	126.12	67
Ammeline	OH	NH ₂	NH ₂	127.10	55
Ammelide	OH	OH	NH ₂	128.09	44
Cyanuric acid	OH	OH	OH	129.07	33

Fig.1 Chemical structural formula of melamine and its related substances

2. 材料及び方法

1) 分析用試料の調製

3種類の石灰窒素をそれぞれ目開き0.5 mmのふるいに通し, 通過したものを分析用試料とした。分析用試料はビニール袋に入れ, 常温で保存した。

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) 試薬等の調製

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水又は同等の品質のもの。
- (2) アセトニトリル: JIS K 8032 に規定する特級試薬. なお, HPLC の溶離液には HPLC 用試薬を使用.
- (3) ジエチルアミン: 特級試薬.
- (4) リン酸塩緩衝液: JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 0.237 g 及び JIS K 9009 に規定するりん酸二水素ナトリウム二水和物 0.520 g を水に溶かして 1,000 mL とした. HPLC の溶離液に使用する場合は, 親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過した.
- (5) メラミン等標準液(0.5 mg/mL): メラミン[$\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$], アンメリン[$\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$], アンメリド[$\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$] 及びシアヌル酸[$\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_3$]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.
- (6) 混合標準液(50 $\mu\text{g/mL}$): 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, 標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加えた.
- (7) 検量線用混合標準液(2~20 $\mu\text{g/mL}$): 使用時に混合標準液(50 $\mu\text{g/mL}$)の 2 mL~20 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり, 標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加えた.
- (8) 検量線用混合標準液(0.1~2 $\mu\text{g/mL}$): 使用時に検量線用混合標準液(5 $\mu\text{g/mL}$)の 1 mL~20 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり, 標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加えた.

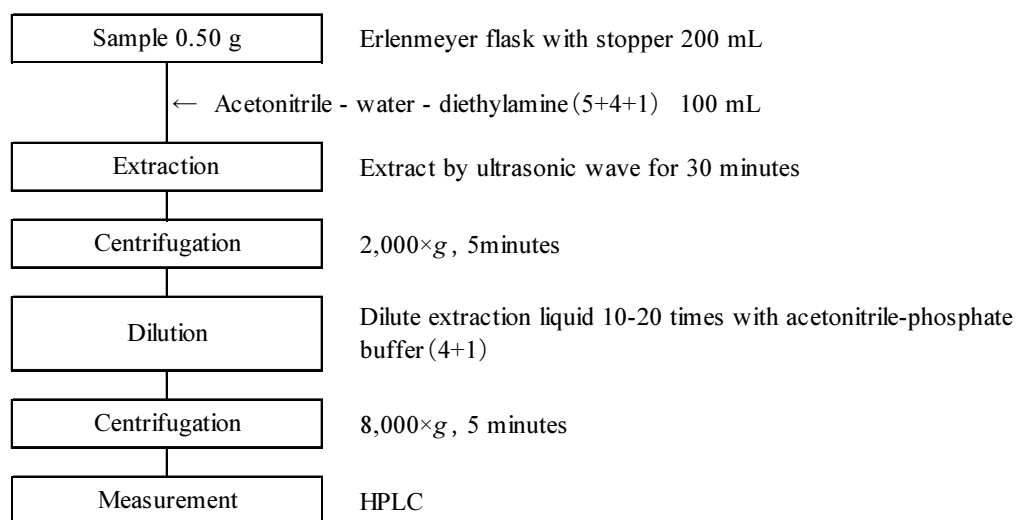
3) 器具及び装置

- (1) 高速液体クロマトグラフ(以下 HPLC): 島津製作所 LC-VP シリーズ
- (2) カラム: 東ソー TSKgel Amide-80(内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm)
- (3) 超音波発生器: YAMATO 8510J-MT
- (4) 遠心分離機: KOKUSAN H-26F
- (5) 高速遠心分離機: AS ONE MCD-2000

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 mL に入れた. 抽出溶媒としてアセトニトリル-水-ジエチルアミン(5+4+1) 100 mL を加え, 超音波発生器を用いて 30 分間超音波処理を行った. 静置後, 上澄み液を 50 mL 容の共栓遠心沈殿管に取り, 2,000 \times g で約 5 分間遠心分離し, 上澄み液を抽出液とした. 抽出液 2.5 mL ~5 mL を 50 mL 容の全量フラスコに取り, 標線までアセトニトリル+りん酸塩緩衝液(4+1)を加えて希釈した. 希釈液を 1.5 mL 容の共栓遠心沈殿管に取り, 8,000 \times g で約 5 分間遠心分離し, 上澄み液を HPLC 測定用試料溶液とした(Scheme 1).



Scheme 1 Method flow sheet of melamine and its related substances in calcium cyanamid

(2) 測定

各検量線用混合標準液 10 μ L を HPLC に注入し, Table 1 の HPLC 条件で測定し, 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 10 μ L を HPLC に注入し, ピーク面積又は高さから検量線により試料溶液中のメラミン等の量を求め, 分析試料中の濃度を算出した.

Table 1 HPLC conditions

HPLC system	Shimadzu corporation LC-VP series
Column	TOSOH corporation TSKgel Amide-80 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m particle size)
Column temperatures	40 $^{\circ}$ C
Mobile phase	Acetonitrile - phosphate buffer (4+1)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector system	UV detector at a wavelength of 214 nm

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 10 μ g/mL 相当量)の HPLC クロマトグラムを Fig.2 に示した. 東ソー株式会社のカラムのテクニカルインフォメーション³⁾を参考に HPLC 条件(Table 1)を設定したところ, メラミン等の各ピーク形状及び分離度は満足するものであった. 0.1 μ g/mL~20 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, 0.1 μ g/mL~20 μ g/mL 相当量の範囲で直線性のある検量線が得られた(Fig. 3).

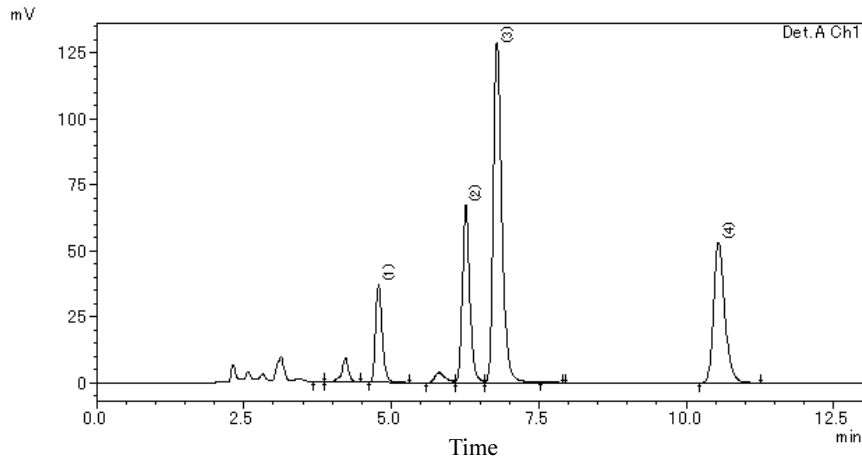


Fig. 2 HPLC chromatogram of standard

Substance name (1) Cyanuric acid (2) Ammelide (3) Melamine (4) Ammeline

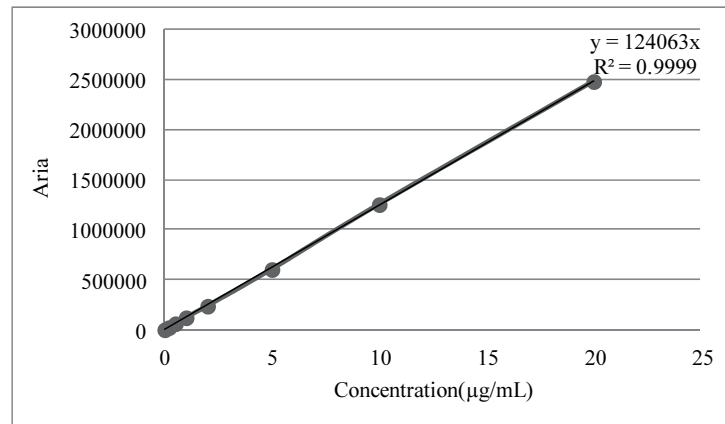


Fig. 3 Calibration curve of melamine

2) 抽出方法の検討

GC/MS 法による肥料中のメラミン等の分析方法²⁾では、分析試料にアセトニトリル-水-ジエチルアミン(5+4+1)を加えて抽出をしている。この溶媒を石灰窒素中のメラミン等の抽出に用いたところ、メラミン、アンメリド、アンメリンは検出されたが、シアヌル酸は検出されなかった。抽出溶媒にジエチルアミンの代わりに塩酸を添加して pH 2 以下にすることでシアヌル酸を検出することは出来たが、カラムの性能低下が見られた。

このことから、アセトニトリル-水-ジエチルアミン(5+4+1)を抽出溶媒として用いることとし、シアヌル酸に関しては測定対象成分から除くこととした。

3) 添加回収試験

メラミンを 0%~0.02% 程度含有する 3 種類の石灰窒素にメラミン等として 4% 及び 0.4% をそれぞれ添加し、3 点併行で回収試験を実施した結果、メラミンの回収率は 95.7%~103.2% 及び 93.6%~102.5%、相対標準偏差は 0.8%~2.3% 及び 0.5%~1.0% と良好な回収率及び併行精度が得られた (Table 2)。一方、アンメリドの回収率は 93.9%~99.2% 及び 87.8%~101.2%、相対標準偏差は 1.6%~3.0% 及び 0.8%~3.1% で、アンメリドの回収率は 86.3%~94.1% 及び 80.3%~96.8%、相対標準偏差は 0.7%~2.5% 及び 0.6%~1.1% であり、

良好な回収率が得られなかった。よって、本試験法はメラミン関連物質のうち、メラミンのみを測定対象成分とすることとした。

Table 2 Recovery and precision data (%)

	Content ¹⁾	Melamine		Ammeline		Ammelide	
		Mean ²⁾	RSD ³⁾	Mean	RSD	Mean	RSD
Calcium cyanamid-1	4	103.2	2.3	99.2	3.0	94.1	2.5
	0.4	102.5	0.5	101.2	0.8	96.8	0.6
Calcium cyanamid-2	4	95.7	0.8	94.3	1.6	86.3	1.1
	0.4	95.5	1.0	88.0	1.4	86.7	1.1
Calcium cyanamid-3	4	96.7	2.2	93.9	2.7	88.0	0.7
	0.4	93.6	0.6	87.8	3.1	80.3	1.0

1) Content of melamine and its related substances

2) $n=3$

3) Relative standard deviation

4) 定量下限の確認

石灰窒素 1 点を用いたメラミンの定量下限確認の試験結果を Table 3 に示した。分析試料にメラミンの含有量として 0.04 % になるように添加して 10 点併行試験を実施したところ、本法の定量下限はメラミンで 0.01 % 程度と推定された。また、本法の検出下限は 0.004 % 程度と推定された。

Table 3 Calculated LOQ and LOD (%)

	Content ¹⁾	Calcium cyanamid		LOQ ⁴⁾	LOD ⁵⁾
		Mean ²⁾	SD ³⁾		
Melamine	0.04	0.038	0.001	0.01	0.004

1) Content of melamine

2) $n=10$

3) Standard deviation

4) Standard deviation $\times 10$

5) Standard deviation $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$

4. まとめ

石灰窒素中のメラミン及びその関連物質の試験法の検討を行ったところ、次のとおりの成績を得た。

1) 抽出溶媒の検討を行った結果、メラミン、アンメリン、アンメリドは GC/MS 法で抽出に使用するアセトニトリル-水-ジエチルアミン(5+4+1)で抽出可能であったが、シアヌル酸は抽出不能だったため測定対象成分から除くこととした。

2) メラミン等の含有量が 4 % 及び 0.4 % になるよう添加した石灰窒素 3 点を用いて回収試験を実施した結果、メラミンに関しては回収率 95.7 % ~ 103.2 % 及び 93.6 % ~ 102.5 %、相対標準偏差 0.8 % ~ 2.3 % 及び 0.5 % ~ 1.0 % と良好な回収率と併行精度が得られた。また、アンメリン及びアンメリドは良好な回収率が得られなかったため、本測定法は石灰窒素中のメラミンのみを測定対象とした。

3) 本法のメラミンの定量下限は 0.01 % 程度、検出下限は 0.004 % 程度と推定された。

なお、メラミン以外のメラミン関連物質については、引き続き試験方法を検討するとともに、石灰窒素以外の肥料についても随時試験方法の適用拡大を行う予定である。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局農産安全管理課長通知:石灰窒素の肥料登録に関する当面の取扱いについて,平成23年4月15日,23消安第524号(2011)
- 2) 白井裕治,大木純: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,肥料研究報告,1,114~121(2008)
- 3) 東ソー株式会社:テクニカルインフォメーション No.109 順相クロマトグラフィーによるメラミン及びその加水分解物の分析
<<http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/7F1EAA68-798B-494F-B4C5-487A397B5536/0/109.pdf>>

Validation of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Determination of Melamine and Its Related Substances in Calcium Cyanamid

Etsuko BANDO¹, Toshiaki HIROI¹, Masahiro ECHI¹ and Yuji SHIRAI¹

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

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for determination of melamine was validated. Melamine was extracted with diethylamide-water-acetonitrile (1+4+5). The extract was centrifuged and a portion of the supernatant was diluted to analyze by HPLC. It was impossible to extract cyanuric acid, Ammeline and Ammelide with diethylamide-water-acetonitrile.

As a result of 3 replicate analysis of 3 calcium cyanamid samples, the mean recoveries and the relative standard deviations (RSD) were 93.6 %~102.5 % and 0.5 %~2.3 %, respectively. On the basis of 10 replicate measurement of melamine added samples the LOQ values were 0.01 % for all melamine samples. The results demonstrated the validity of the HPLC method for determination of melamine in calcium cyanamid.

Key words melamine, fertilizer, calcium cyanamid, HPLC

(Research Report of Fertilizer, **5**, 24~30, 2012)