

## 10 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による土壤中の メラミン及びその関連物質の同時測定

坂東悦子<sup>1</sup>, 恵智正宏<sup>1</sup>, 白井裕治<sup>1</sup>

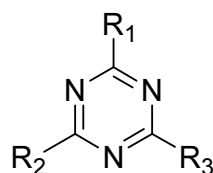
キーワード メラミン, 肥料, 石灰窒素, 高速液体クロマトグラフ

### 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<sup>1)</sup>. このため, 土壤中のメラミンの動態や農作物への移行に関する情報収集及び各種試験を実施し, 公定規格におけるメラミンに関する基準設定等の検討が進められている.

今回, 土壤中のメラミンと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.))の動態を調査するため, 高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いた定量試験方法を検討したので, 概要を報告する.



Substance name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	MW	N-Content (%)
Melamine	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	126.12	67
Ammeline	OH	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	127.10	55
Ammelide	OH	OH	NH <sub>2</sub>	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

黒ぼく土(2点)及び灰色低地土(2点)を目開き1mm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.

#### 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) りん酸塩緩衝液: 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

<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

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  $\mu\text{m}$  以下) でろ過した.

(5) メラミン等標準液 (0.5 mg/mL): メラミン [C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>], アンメリン [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O], アンメリド [C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>] 及びシアヌル酸 [C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>] 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  $\mu\text{g/mL}$ ~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  $\mu\text{g/mL}$ ~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.

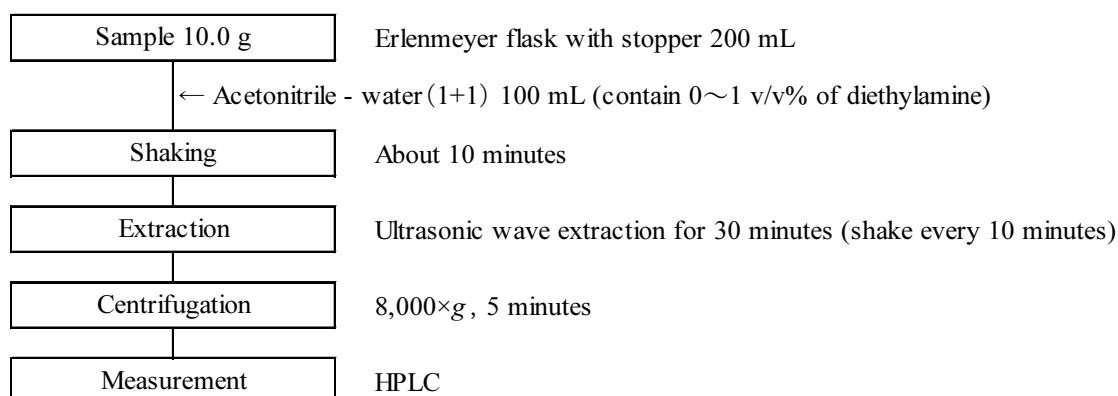
### 3) 器具及び装置

- (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  $\mu\text{m}$ )
- (3) 振とう機: AS ONE AW1
- (4) 超音波発生器: YAMATO 8510J-MT
- (5) 高速遠心分離機: AS ONE MCD-2000

### 4) 試験操作

#### (1) 抽出

分析試料 10.0 g をはかりとり, 共栓三角フラスコ 200 mL に入れた. アセトニトリル-水 (1+1) にジエチルアミン濃度が容量分率 0%~1% になるよう添加した抽出溶媒 100 mL を加え, 振とう機で約 10 分間振り混ぜた後, 超音波発生器を用いて 10 分間ごとに振り混ぜながら 30 分間超音波処理を行った. 静置後, 上澄み液を 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 soil

## (2) 測定

各検量線用混合標準液 10  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入し, Table 1 の条件で測定し, 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  $\mu\text{L}$  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 $\times$ 250 mm, 5 $\mu\text{m}$ particle size)
Column temperatures	40 $^{\circ}\text{C}$
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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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<sup>2)</sup>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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~ 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~ 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  相当量の範囲で直線性のある検量線が得られた.

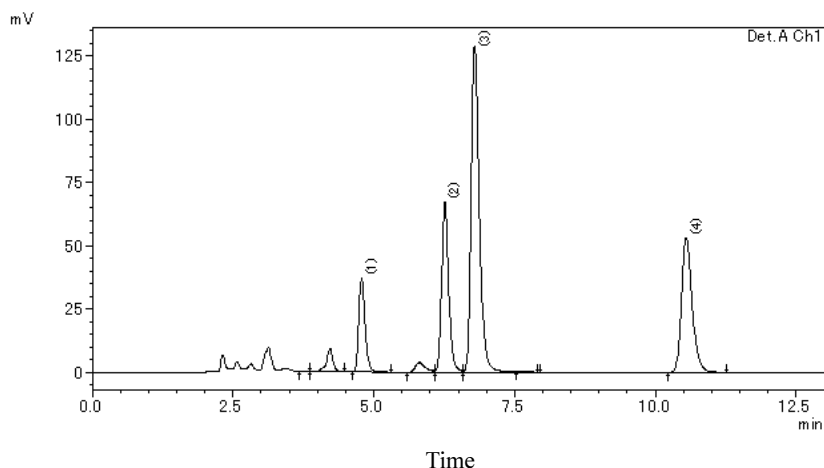


Fig. 2 HPLC chromatogram of standard

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

## 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<sup>3)</sup>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) 100 mL を加えて抽出をしている. この溶媒を土壌中のメラミン等の抽出に用いると, 定量を妨害する夾雑ピークが検出された.

このことから, アセトニトリル-水(1+1)にジエチルアミンを濃度が 0 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.5 %, 1 % になるよう添加したものをを用いて, 最適な抽出溶媒の条件を検討した. 黒ぼく土 1 点及び灰色低地土 1 点にメラミン等を 50

mg/kg もしくは 100 mg/kg になるよう加えて添加回収試験を行ったところ、メラミン、アンメリン、アンメリドに関してはジエチルアミン濃度 1 % での回収率が最も良好であった(Fig. 3)。シアヌル酸に関しては、ジエチルアミン濃度 0 % での回収率が十分に良好であることと、ジエチルアミンを添加することでシアヌル酸のピークと同じ位置に目的以外のピークが検出されるため、シアヌル酸のみジエチルアミンを添加しない溶媒を抽出に用いることとした。

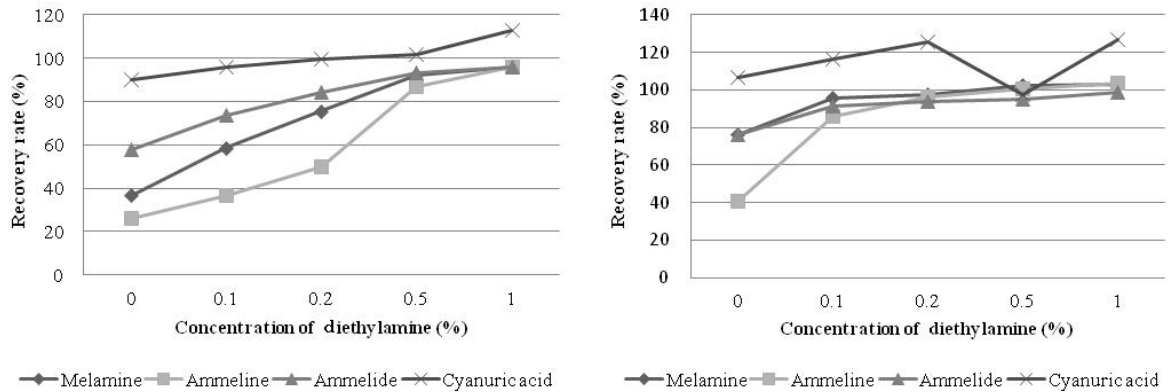


Fig 3. Result of requirement study about extraction solvent (Left: Andosol Right: Gray lowland soil)

### 3) 添加回収試験

メラミン等を含む黒ぼく土 2 点及び灰色低地土 2 点にメラミン等として 100 mg/kg 及び 10 mg/kg をそれぞれ添加し、3 点併行で回収試験を実施した結果、メラミンの回収率及び併行相対標準偏差は 91.9 % ~ 101.2 % 及び 1.3 % ~ 6.2 % で、アンメリンでは 93.1 % ~ 106.2 % 及び 0.2 % ~ 9.3 % で、アンメリドでは 88.4 % ~ 97.4 % 及び 0.6 ~ 6.3 % 並びにシアヌル酸では 79.5 % ~ 108.2 % 及び 1.4 % ~ 10.0 % と良好な回収率及び併行精度が得られた (Table 2)。

Table 2 Recovery and precision data

Content <sup>1)</sup> (mg/kg)	Melamine		Ammeline		Ammelide		Cyanuric acid		
	Mean <sup>2)</sup> (%)	RSD <sup>3)</sup> (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	
Andosol-1	100	93.9	2.0	93.1	3.4	94.5	1.4	86.2	5.8
	10	91.9	2.3	94.7	9.3	88.4	1.4	91.3	5.3
Andosol-2	100	93.8	1.3	95.6	0.2	92.6	1.0	86.9	7.9
	10	101.2	6.2	95.1	5.3	92.0	6.3	96.1	1.4
Gray lowland soil-1	100	100.8	2.3	101.3	2.4	97.4	1.6	89.9	2.3
	10	98.1	2.2	94.3	4.5	97.1	0.9	106.6	9.4
Gray lowland soil-2	100	97.5	1.3	100.6	0.7	95.9	0.6	79.5	10.0
	10	94.4	3.5	106.2	6.1	89.6	1.8	108.2	3.7

1) Content of melamine and its related substances

2)  $n=3$

3) Relative standard deviation

### 4) 定量下限の確認

灰色低地土を用いたメラミン等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等の含有量として 1 mg/kg もしくは 2 mg/kg になるようにそれぞれ添加して 7 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、アンメリド及びシアヌル酸で 0.5 mg/kg 程度、アンメリンで 2 mg/kg 程度と推定された。また、本法の検出限界はメラミン、アンメリド及びシアヌル酸で 0.2 mg/kg 程度、アンメリドで 0.6 mg/kg 程度と推定された。

Table 3 Calculated LOQ and LOD

	Content <sup>1)</sup> (mg/kg)	Mean <sup>2)</sup> (mg/kg)	SD (mg/kg)	LOQ <sup>3)</sup> (mg/kg)	LOD <sup>4)</sup> (mg/kg)
Melamine	1.00	0.87	0.03	0.3	0.1
Ammeline	2.00	1.90	0.16	1.6	0.6
Ammelide	1.00	0.86	0.03	0.3	0.1
Cyanuric acid	1.00	1.02	0.04	0.4	0.2

1) Content of melamine and its related substances

2)  $n=7$

3) Standard deviation $\times 10$

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

#### 4. まとめ

土壌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、次のとおり満足する成績を得た。

1) 抽出溶媒の検討を行った結果、メラミン、アンメリン、アンメリドはアセトニトリル-水-ジエチルアミン(50+49+1) (ジエチルアミン 1%含有)、シアヌル酸はアセトニトリル-水(1+1)が最適であった。

2) メラミン等の含有量が 100 mg/kg 及び 10 mg/kg になるよう添加した黒ぼく土 2 点、灰色低地土 2 点を用いて回収試験を実施した結果、メラミンの回収率及び併行相対標準偏差は 91.9%~101.2%及び 1.3%~6.2% で、アンメリンでは 93.1%~106.2%及び 0.2%~9.3%で、アンメリドでは 88.4%~97.4%及び 0.6%~6.3%並びにシアヌル酸では 79.5%~108.2%及び 1.4%~10.0%と良好であった。

3) 本法の定量下限はメラミン、アンメリド及びシアヌル酸で 0.5 mg/kg 程度、アンメリンで 2 mg/kg 程度、検出下限はメラミン、アンメリド及びシアヌル酸で 0.2 mg/kg 程度、アンメリドで 0.6 mg/kg 程度と推定された。

なお、この試験法は FAMIC ホームページに参考法として掲載されている<sup>4)</sup>。

#### 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) 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> >
- 3) 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)
- 4) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):土壌中のメラミン及びその関連物質の試験法(参考法)  
< <http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/sub9.pdf> >

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

Etsuko BANDO<sup>1</sup>, Masahiro ECHI<sup>1</sup> and Yuji SHIRAI<sup>1</sup>

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

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for determination of melamine was validated. Melamine, Ammeline and Ammelied were extracted with diethylamide-water-acetonitrile (1+49+50). Cyanuric acid was extracted with water-acetonitrile (1+1). The extract was centrifuged and a portion of the supernatant was analyzed by HPLC.

As a result of 3 replicate analysis used two types of soil (2 andosol and 2 gray lowland soil), the mean recoveries and the relative standard deviations (RSD) of Melamine were 91.9 %~101.2 % and 1.3~6.2 % respectively. Ammeline were 93.1 %~106.2 % and 0.2 %~9.3 %, Ammelied were 88.4 %~97.4 % and 0.6 %~6.3 %, and Cyanuric Acid were 79.5 %~108.2 % and 1.4 %~10.0 % respectively. On the basis of 7 replicate measurement of Melamine and its degradation products added samples the LOQ values were 0.5mg/kg for Melamine, Ammelied and Cyanuric acid, 2mg/kg for Ammeline. The results demonstrated the validity of the HPLC method for determination of Melamine and its degradation products in soil.

*Key words* melamine, fertilizer, calcium cyanamid, HPLC

(Research Report of Fertilizer, **5**, 108~113, 2012)