

4 高速液体クロマトグラフ(HPLC)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

坂東悦子¹, 白井裕治²

キーワード メラミン, アンメリン, アンメリド, シアヌル酸, 石灰窒素, 肥料,
高速液体クロマトグラフ

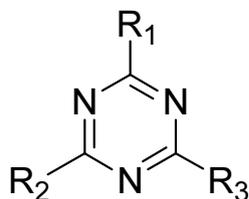
1. はじめに

メラミンはその分子構造の中心にトリアジン環を持つ有機窒素化合物で、尿素を原料として製造される。メラミン由来の窒素は土壌中において無機化しないか又は遅く、有効性が認められておらず、日本国内では肥料として流通していない。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⁾。メラミンは作物によっては吸収し蓄積することがあり²⁾、メラミンとその関連物質であるシアヌル酸が同時に生体内に取り込まれることで健康被害を引き起こすことが知られている³⁾。このため、公定規格におけるメラミンに関する基準設定等の検討を行うこととなった。

肥料中のメラミンに関する基準設定等の検討を行うにあたり、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).)の分析方法を確立する必要がある。肥料中のメラミン等の試験法としては、ガスクロマトグラフ質量分析計(以下「GC-MS」という.)法⁴⁾及び高速液体クロマトグラフ(以下「HPLC」という.)法⁵⁾が報告されているが、GC-MS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。HPLC法は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であるが、石灰窒素中のメラミンに限定した分析方法であり、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸を定量するには更なる検討が必要である。

今回、既存のHPLC法を参考に、石灰窒素中のメラミン等の同時測定法を検討し、石灰窒素以外の肥料にも適用可能か検討したので、概要を報告する。



| Substancen 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

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 (現)札幌センター

² 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. 材料及び方法

1) 分析用試料の調製

石灰窒素 7 種類, 石灰窒素を含む化成肥料 4 種類, 石灰窒素を含む有機入り化成肥料 1 種類, 石灰窒素を含まない化成肥料 5 種類, 配合肥料 1 種類, 硫酸アンモニア 1 種類及び尿素 1 種類をそれぞれ目開き 0.5 mm のふるいを通し, 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.
- (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) 塩酸: 有害金属測定用試薬.
- (5) リン酸塩緩衝液: JIS K 9020 に規定するリン酸水素二ナトリウム 0.237 g 及び JIS K 9009 に規定するリン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.
- (6) メラミン等標準液 (0.5 mg/mL): メラミン[C₃H₆N₆], アンメリン[C₃H₅N₅O], アンメリド[C₃H₄N₄O₂] 及びシアヌル酸[C₃H₃N₃O₃] 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 の桁まではかった. 少量の塩酸(1+15)で溶かし, それぞれ全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで同溶液を加えた.
- (7) 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-リン酸塩緩衝液(4+1)を加えた.
- (8) 検量線用混合標準液(1 $\mu\text{g/mL}$ ~5 $\mu\text{g/mL}$): 使用時に混合標準液(50 $\mu\text{g/mL}$)の 1~5 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-リン酸塩緩衝液(4+1)を加えた.
- (9) 検量線用混合標準液(0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~0.5 $\mu\text{g/mL}$): 使用時に検量線用混合標準液(1 $\mu\text{g/mL}$)の 2.5~25 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-リン酸塩緩衝液(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(HPLC): 島津製作所 LC-VP シリーズ
- (2) 分析カラム: 東ソー TSKgel Amide-80 (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm)
- (3) 分析ガードカラム: 東ソー TSKgel guardgel Amide-80 (内径 3.2 mm, 長さ 15 mm)
- (4) 超音波発生器: YAMATO 8510J-MT
- (5) 遠心分離機: コクサン H-26F
- (6) 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. 抽出溶液を 100 mL 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とり, 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. 抽出液の一定量を 50 mL 容の全量フラスコにとり, 標線までアセトニトリル-リン酸塩緩衝液(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とり, 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(Fig.2).

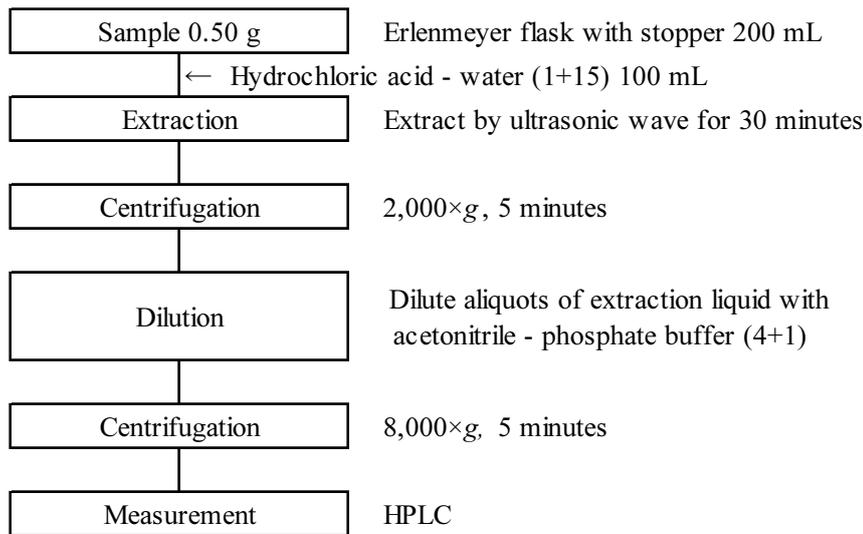


Fig.2 Method flow sheet of melamine and its related substances in fertilizer

(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) |
| Guard column | TOSOH corporation TSKgel guardgel Amide-80 (3.2 mm×15 mm) |
| Column temperatures | 40 °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 1 μ g/mL 相当量)の HPLC クロマトグラムを Fig.3 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⁶⁾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。0.05 μ g/mL～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、0.05 μ g/mL～5 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.4)。

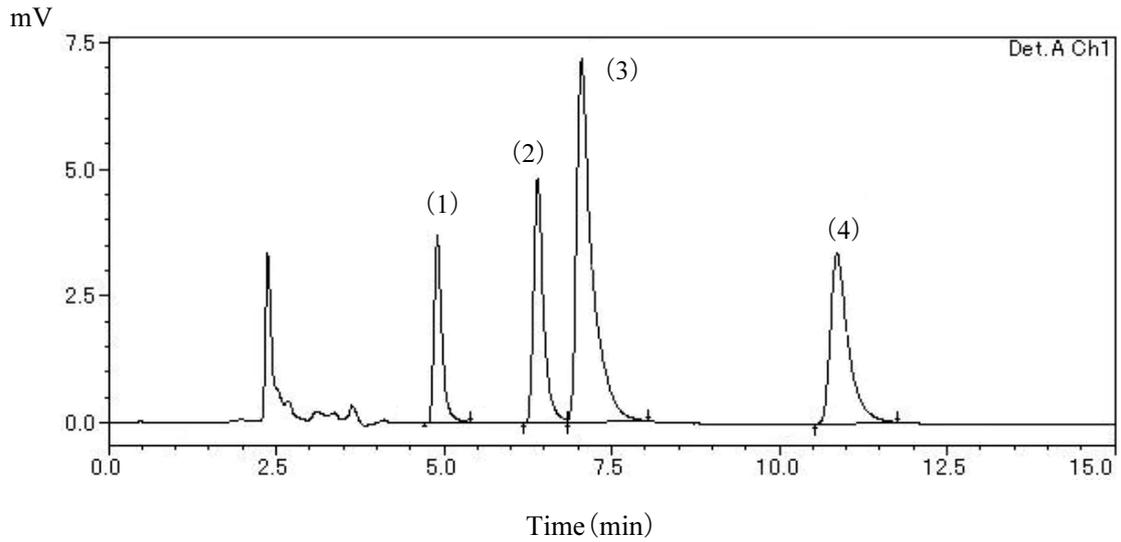


Fig.3 HPLC chromatogram of melamine and its related substances standards
 Substance name (1) Cyanuric acid (2) Ammelide (3) Melamine (4) Ammeline

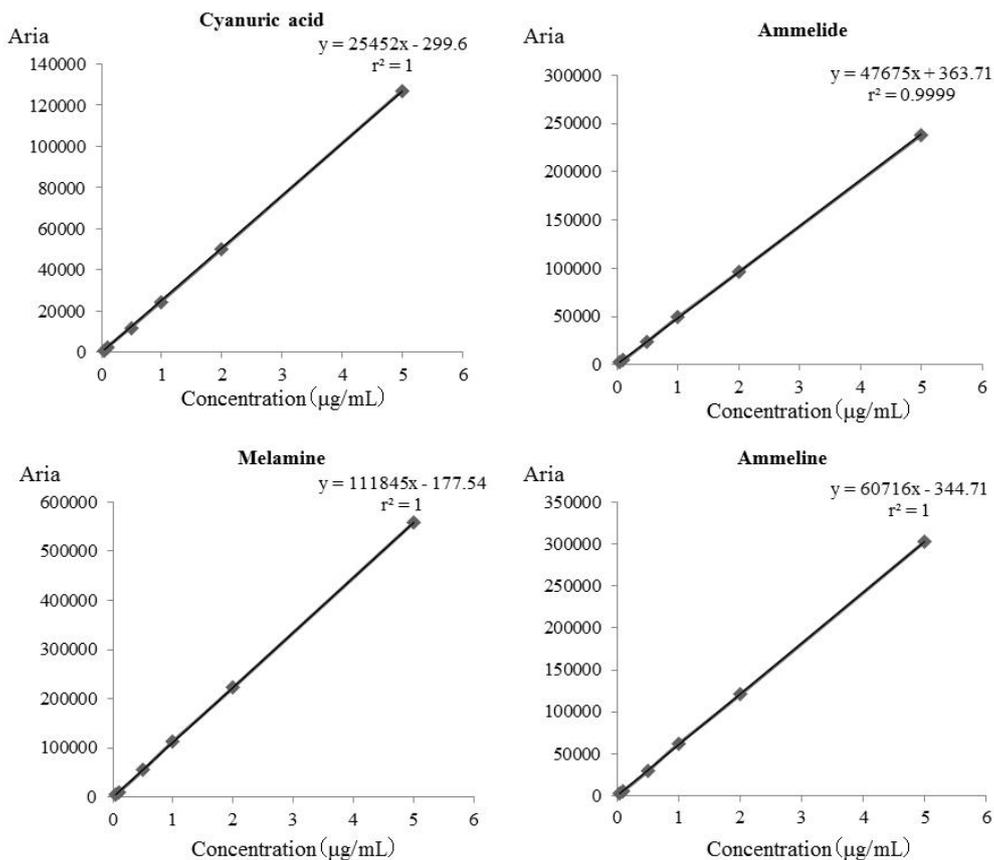


Fig. 4 Calibration curve for melamine and its related substances

2) 抽出溶液の検討

石灰窒素 1 種類及び硫酸アンモニア 1 種類にメラミン等として 4% (質量分率) 添加し, 抽出溶液の検討を行った結果を Table 2 に示した.

HPLC を用いた石灰窒素中のメラミン等の分析方法としては、アセトニトリル-水-ジエチルアミン(5+4+1)を抽出溶液として用いる試験方法が報告されているが⁵⁾、本抽出溶液では石灰窒素中のシアヌル酸は検出されず、アンメルン、アンメリドについても十分な回収率が得られなかった。また、硫酸アンモニア中のアンメルンについても十分な回収率が得られなかった。抽出溶液としてアセトニトリル-水-ジエチルアミン(5+4+1)の代わりに塩酸(1+30)を用いることで、石灰窒素中のメラミン等の回収率がほぼ 90 %以上となったが、硫酸アンモニア中のシアヌル酸については十分な回収率が得られなかった。さらに塩酸を添加して、塩酸(1+15)を抽出溶液として用いたところ、石灰窒素、硫酸アンモニアともに十分な回収率が得られたので、塩酸(1+15)を抽出溶液として用いることとした。

Table 2 Comparison of extraction solvent

| Extraction solvent | Sample | Content (%) ¹⁾ | pH of extract | Recovery (%) | | | |
|--|-------------------|---------------------------|---------------|---------------|----------|----------|----------|
| | | | | Cyanuric acid | Ammelide | Melamine | Ammeline |
| Acetonitril-water-diethylamine (5+4+1) | Ammonium sulfate | 4 | > 12 | 94.5 | 92.5 | 90.5 | 82.3 |
| | Calcium cyanamide | 4 | > 12 | N.D. | 85.3 | 96.0 | 94.4 |
| Hydrochloric acid-water (1+30) | Ammonium sulfate | 4 | 0.6 | 64.4 | 86.0 | 96.4 | 85.5 |
| | Calcium cyanamide | 4 | 0.7 | 95.7 | 96.7 | 97.9 | 88.7 |
| Hydrochloric acid-water (1+15) | Ammonium sulfate | 4 | 0.3 | 107.9 | 105.3 | 111.0 | 108.5 |
| | Calcium cyanamide | 4 | 0.3 | 96.4 | 100.6 | 102.7 | 101.2 |

1) Mass fraction

3) マトリックスの影響

市販の石灰窒素を含まない化成肥料 5 種類、配合肥料 1 種類、尿素 1 種類及び硫酸アンモニア 1 種類を本法に従って測定したところ、化成肥料、配合肥料、硫酸アンモニアについては定量を妨害する夾雑ピークは認められなかった。尿素についてはシアヌル酸が 0.05 % (質量分率) 程度検出された。なお、石灰窒素 7 種類及び石灰窒素を含む化成肥料 4 種類については、一部の試料でメラミン、アンメリド及びアンメルンが検出されたが、測定対象物質付近に定量を妨害するピークは認められなかった。石灰窒素を含む有機入り化成肥料 1 種類については、測定対象物質付近に定量を妨害するピークが認められたため、有機質を含む肥料に関しては測定対象から除くこととした。

4) 添加回収試験

石灰窒素 3 種類、石灰窒素入り化成肥料 1 種類、石灰窒素を含まない化成肥料 2 種類、硫酸アンモニア 1 種類及び尿素 1 種類にメラミン等として 4 % (質量分率) 及び 0.1 % (質量分率) をそれぞれ添加し、3 点併行で添加回収試験を実施した結果を Table 3 に示した。石灰窒素 1 種類におけるシアヌル酸 0.1 % (質量分率) 添加回収試験を除き、回収率はシアヌル酸で 90.5 % ~ 103.3 % 及び 93.6 % ~ 107.0 %、アンメリドで 97.7 % ~ 106.1 % 及び 96.0 % ~ 104.9%、メラミンで 96.1 % ~ 102.8 % 及び 92.2 % ~ 100.8 %、アンメルンで 94.7 % ~ 106.3 % 及び 95.3 % ~ 106.7 % とほぼ満足な結果が得られた。相対標準偏差についても、シアヌル酸で 0.5 % ~ 4.7 % 及び 0.5 % ~ 3.3 %、アンメリドで 0.5 % ~ 3.5 % 及び 0.3 % ~ 2.3%、メラミンで 0.7 % ~ 4.5 % 及び 1.0 % ~ 4.2 %、アンメルンで 1.6 % ~ 2.2 % 及び 0.3 % ~ 2.4 % とほぼ満足な結果が得られた。

Table 3 の石灰窒素-3 については、シアヌル酸のピークに隣接するジシアンジアミドのピークが大きく (Fig.5 左)、メラミン等として 0.1 % (質量分率) 添加した回収試験においてシアヌル酸を定量することが困難であった。

ジシアンジアミドとシアヌル酸のピークを分離するため、HPLC 用溶離液の比率をアセトニトリル-りん酸塩緩衝液 (17+3) に変更して分析を行ったところ、シアヌル酸の定量が可能な程度にピークを分離することができた (Fig.5 右). 回収率及び相対標準偏差についても、94.1 %及び 2.6 %と良好な結果が得られた. 今後ジシアンジアミドの含有量が多いサンプルを分析する際には、低濃度のシアヌル酸の定量を行うときのみ HPLC 用溶離液の比率をアセトニトリル-りん酸塩緩衝液 (17+3) に変更して分析を行うこととした.

Table 3 Accuracy result and repeatability precision

| Sample | Content (%) ¹⁾ | Cyanuric acid | | Ammelide | | Melamine | | Ammeline | |
|--|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | | Mean ²⁾ (%) | RSD ³⁾ (%) |
| Calcium cyanamide-1 | 4 | 100.5 | 3.0 | 104.5 | 0.6 | 102.8 | 2.6 | 96.7 | 1.6 |
| | 0.1 | 102.8 | 0.5 | 97.0 | 2.1 | 97.2 | 3.7 | 96.6 | 2.1 |
| Calcium cyanamide-2 | 4 | 99.9 | 2.5 | 106.1 | 3.5 | 99.1 | 1.5 | 103.3 | 2.2 |
| | 0.1 | 99.4 | 3.2 | 98.9 | 1.5 | 98.6 | 2.9 | 106.7 | 1.9 |
| Calcium cyanamide-3 | 4 | 100.1 | 0.5 | 105.1 | 0.7 | 102.4 | 2.3 | 98.4 | 0.8 |
| | 0.1 | 94.1 | 2.6 | 98.0 | 2.3 | 92.9 | 4.2 | 101.4 | 0.3 |
| Compound fertilizer containing Calcium cyanamide | 4 | 90.5 | 3.5 | 103.5 | 3.0 | 100.4 | 3.4 | 100.4 | 1.6 |
| | 0.1 | 100.9 | 2.5 | 97.6 | 1.3 | 96.9 | 1.9 | 97.7 | 1.9 |
| Compound fertilizer-1 | 4 | 103.3 | 0.9 | 102.0 | 2.3 | 96.1 | 0.7 | 94.7 | 1.0 |
| | 0.1 | 101.1 | 3.3 | 96.0 | 1.2 | 90.8 | 1.0 | 96.6 | 1.2 |
| Compound fertilizer-2 | 4 | 99.6 | 2.3 | 101.5 | 1.4 | 100.3 | 1.8 | 101.9 | 1.3 |
| | 0.1 | 93.6 | 2.9 | 98.8 | 0.7 | 96.7 | 1.3 | 95.3 | 2.4 |
| Ammonium sulfate | 4 | 97.6 | 2.1 | 104.6 | 2.2 | 102.0 | 4.5 | 106.3 | 2.1 |
| | 0.1 | 107.0 | 0.7 | 96.5 | 0.7 | 92.2 | 1.1 | 100.4 | 0.5 |
| Urea | 4 | 93.4 | 4.7 | 97.7 | 0.5 | 100.7 | 1.6 | 103.1 | 2.1 |
| | 0.1 | 100.5 | 2.9 | 104.9 | 0.3 | 100.8 | 1.2 | 100.2 | 0.6 |

1) Mass fraction

2) $n=3$

3) Relative standard deviation

4) 定量下限の確認

石灰窒素 1 種類を用いたメラミン等の定量下限確認の試験結果を Table 4 に示した. メラミンを 0.06 % (質量分率) 程度含む分析試料にシアヌル酸, アンメリド, アンメリンを含有量として 0.04 % (質量分率) となるように添加して 7 点併行試験を実施したところ, 本法の定量下限はシアヌル酸で 0.02 % (質量分率) 程度, アンメリドで 0.01 % (質量分率) 程度, メラミンで 0.02 % (質量分率) 程度, アンメリンで 0.01 % (質量分率) 程度と推定された. また, 本法の検出下限はシアヌル酸で 0.007 % (質量分率) 程度, アンメリドで 0.004 % (質量分率) 程度, メラミンで 0.008 % (質量分率) 程度, アンメリンで 0.003 % (質量分率) 程度と推定された.

なお, HPLC 用溶離液の比率をアセトニトリル-りん酸塩緩衝液 (17+3) に変更した際のシアヌル酸の定量下限は 0.02 % (質量分率) 程度, 検出下限は 0.006 % (質量分率) 程度と推定され, 溶媒比率変更後も同程度の定量下限及び検出下限であった (Table 5).

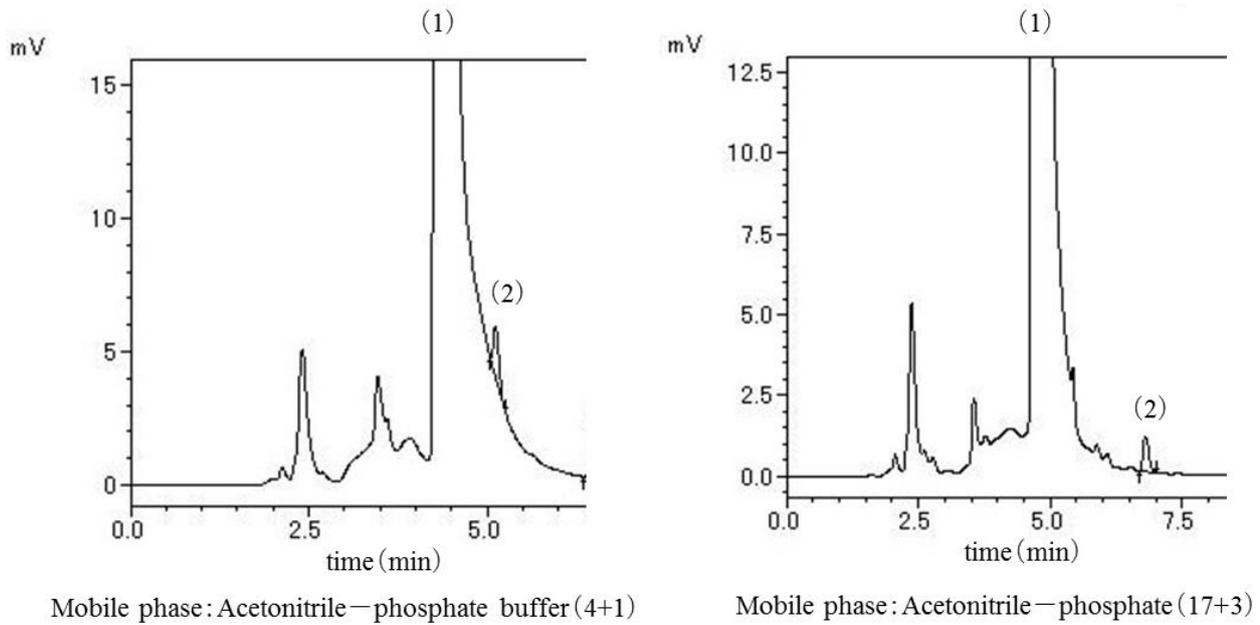


Fig.5 HPLC chromatogram of dicyandiamide and cyanuric acid
Substance name (1) Dicyandiamide (2) Cyanuric acid

Table 4 Calculated LOQ and LOD values (Mobile phase: Acetonitrile - phosphate buffer (4+1))

| Substancen name | Content (%) ⁵⁾ | Mean ¹⁾ (%) ⁵⁾ | SD ²⁾ (%) ⁵⁾ | LOQ ³⁾ (%) ⁵⁾ | LOD ⁴⁾ (%) ⁵⁾ |
|-----------------|------------------------------|---|---------------------------------------|--|--|
| Cyanuric acid | 0.04 | 0.038 | 0.002 | 0.02 | 0.007 |
| Ammelide | 0.04 | 0.036 | 0.001 | 0.01 | 0.004 |
| Melamine | - | 0.059 | 0.002 | 0.02 | 0.008 |
| Ammeline | 0.04 | 0.043 | 0.001 | 0.01 | 0.003 |

- 1) $n=7$
- 2) Standard deviation
- 3) Standard deviation $\times 10$
- 4) Standard deviation $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$
- 5) Mass fraction

Table 5 Calculated LOQ and LOD values (Mobile phase: Acetonitrile - phosphate buffer (17+3))

| Substancen name | Content (%) ⁵⁾ | Mean ¹⁾ (%) ⁵⁾ | SD ²⁾ (%) ⁵⁾ | LOQ ³⁾ (%) ⁵⁾ | LOD ⁴⁾ (%) ⁵⁾ |
|-----------------|------------------------------|---|---------------------------------------|--|--|
| Cyanuric acid | 0.04 | 0.038 | 0.002 | 0.02 | 0.007 |

- 1) $n=7$
- 2) Standard deviation
- 3) Standard deviation $\times 10$
- 4) Standard deviation $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$
- 5) Mass fraction

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、塩酸(1+15)を抽出溶液として用いることとした。
- 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、尿素でシアヌル酸が0.05%(質量分率)程度検出されたことを除き、定量を妨害する夾雑ピークは検出されなかった。石灰窒素及び石灰窒素を含む化成肥料については、一部試料でメラミン、アンメド及びアンメリンが検出されたが、測定対象物質付近に定量を妨害するピークは認められなかった。石灰窒素を含む有機入り化成肥料については、測定対象付近に定量を妨害するピークが認められたため、有機質を含む肥料に関しては測定対象から除くこととした。
- 3) メラミン等の含有量が4%(質量分率)及び0.1%(質量分率)になるよう添加した8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90.5%~106.3%及び92.2%~107.0%、相対標準偏差0.5%~4.7%及び0.3%~4.2%とほぼ満足な回収率と併行精度が得られた。
- 4) 本法の定量下限及び検出下限は、シアヌル酸で0.02%(質量分率)及び0.007%(質量分率)程度、アンメドで0.01%(質量分率)及び0.004%(質量分率)程度、メラミンで0.02%(質量分率)及び0.008%(質量分率)程度、アンメドで0.01%(質量分率)及び0.003%(質量分率)程度と推定された。

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) 阿部文浩, 八木寿治, 坂東悦子:メラミンを添加した土壌におけるコマツナに対する害の確認試験とメラミン等の吸収, 肥料研究報告, **5**, 101~107(2012)
- 3) 食品安全委員会:メラミン等による健康影響について, 平成20年10月9日(2008)
- 4) 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)
- 5) 坂東悦子, 廣井利明, 恵智正宏, 白井裕治: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, 肥料研究報告, **5**, 24~30(2012)
- 6) 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 Fertilizer

Etsuko BANDO¹ and Yuji SHIRAI²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Sapporo Regional Center

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for determination of melamine and its related substances, in fertilizer was validated. The melamine and its related substances were extracted with hydrochloric acid-water (1+15). The extract was centrifuged, and a portion of the supernatant was diluted with mobile phase. The melamine and its related substances were analyzed by HPLC on carbamoyl-modified silica gel column with UV detection at 214 nm.

As a result of 3 replicate analysis of 8 fertilizer samples, the mean recoveries and the relative standard deviations (RSD) were 90.5 % ~ 107.0 % and 0.3 % ~ 4.7 %, respectively. On the basis of 7 replicate measurements of melamine and its related substances added samples the LOQ values were 0.01 % ~ 0.02 % for all melamine and its related substances samples. The results demonstrated the validity of the HPLC method for determination of melamine and its related substances in fertilizer. However, this method was not applicable to fertilizer containing organic matter.

Key words melamine, ammeline, ammeliid, cyanuric acid, calcium cyanamid, fertilizer, HPLC

(Research Report of Fertilizer, **6**, 27~35, 2013)