

4 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による有機質肥料及び

それを含む肥料中のメラミンの測定

船水悦子¹

キーワード メラミン, 石灰窒素, 有機質肥料, 高速液体クロマトグラフ

1. はじめに

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⁾. 石灰窒素及び石灰窒素を原料とする肥料中のメラミンについては, 平成 25 年 3 月 25 日付けで農林水産省消費・安全局より暫定許容値を 0.4 %とする旨通知されている⁴⁾.

有機質を含まない肥料中の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。)の分析法として, 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 HPLC 法が検討され, 単一試験室内における試験方法の妥当性確認⁵⁾及び共同試験⁶⁾を実施し, 満足な結果を得た. HPLC 法は肥料中のメラミン及びその関連物質の分析法として肥料等試験法⁷⁾に記載された. なお, 有機質を含む肥料については, 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, 測定対象から除外された. 有機質を含む肥料は定量を妨害する夾雑ピークが多く, HPLC 法ではメラミン等 4 成分を同時測定することは困難である.

今回, 既存の HPLC 法を参考に, 測定対象物質をメラミンに限定し, 有機質を含む肥料中のメラミンの測定法を検討したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 供試試料

有機質肥料 9 種類, 有機質を含む化成肥料 7 種類, 有機質を含む配合肥料 2 種類及び有機質を含む指定配合肥料 2 種類をそれぞれ目開き 500 μm のふるいに通し, 通過したものを用いた. 共試試料はポリエチレン袋に入れ, 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: HPLC 用試薬.
- (3) メタノール: 特級試薬.
- (4) ジエチルアミン: 特級試薬.
- (5) 塩酸: 有害金属測定用試薬.
- (6) メタリン酸: 特級試薬.

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

(7) トリクロロ酢酸： 特級試薬.

(8) 酢酸： 特級試薬.

(9) 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 に規定するりん酸二水素ナトリウム二水和物 0.520 g を水に溶かして 1000 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.

(10) メラミン標準液(0.5 mg/mL)： メラミン 0.05 g をその質量を 0.1 mg の桁まではかりとり, 水に溶かして 100 mL とした.

(11) 検量線用標準液(0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~5 $\mu\text{g/mL}$)： メラミン標準液(0.5 mg/mL)をアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(82+18)で順次希釈して 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度の検量線用標準液を調製した.

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： ヤマト科学 B5200

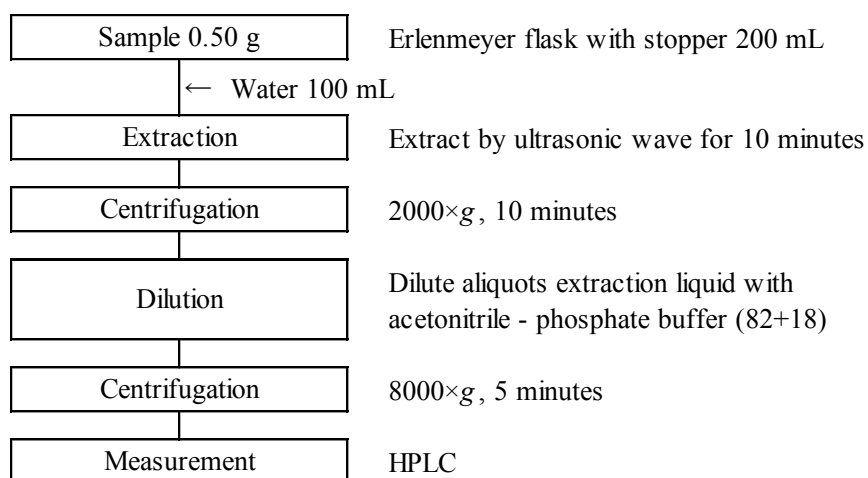
(5) 遠心分離機： KUBOTA 8410

(6) 高速遠心分離機： HITACHI CT15E

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. 抽出溶液として水を 100 mL 加え, 超音波発生器を用いて 10 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, 2000 $\times g$ で約 10 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-りん酸塩緩衝液(82+18)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, 8000 $\times g$ 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 in organic fertilizer and fertilizer containig organic matter

(2) 測定

各検量線用混合標準液 10 μL 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 μL 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

Column	TOSOH corporation TSKgel Amide-80 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm particle size)
Guard column	TOSOH corporation TSKgel guardgel Amide-80 (3.2 mm \times 15 mm)
Column temperatures	40 $^{\circ}\text{C} \pm 1$ $^{\circ}\text{C}$
Mobile phase	Acetonitrile - phosphate buffer (82+18)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector system	UV detector at a wavelength of 214 nm

3. 結果及び考察

1) 測定条件の検討

分析用試料としてなたね油かす及び大豆油かすを用い、肥料等試験法⁷⁾に収載の HPLC 法(有機質を含まない肥料)により分析を行ったところ、メラミンの定量を妨害する夾雑ピークが認められた。測定条件を調整することでメラミンピークと夾雑ピークが分離可能か検討した結果、溶離液の組成をアセトニトリル-5 mmol/L リン酸塩緩衝液(82+18)にすることでメラミンピークと夾雑ピークを分離することができた。

HPLC 条件を Table 1 に、メラミン検量線用標準液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量)の HPLC クロマトグラムを Fig.1 に示した。設定した測定条件におけるメラミンのピーク形状及び分離度は満足するものであった。0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量の範囲で直線性のある検量線が得られた(Fig.2)。

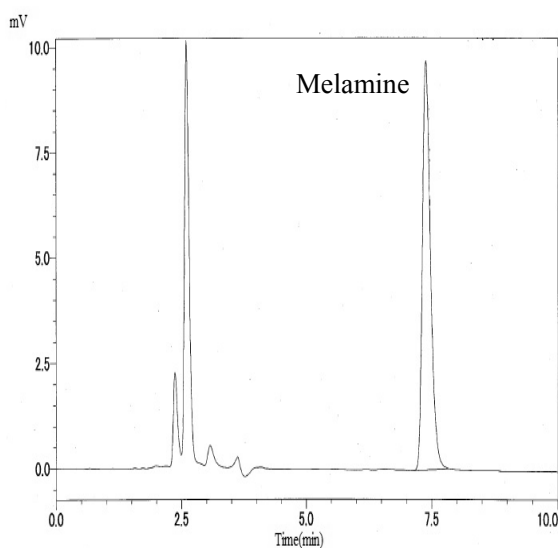


Fig.1 HPLC chromatogram of melamine
Melamine standard solution (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
HPLC condition is shown Table 1.

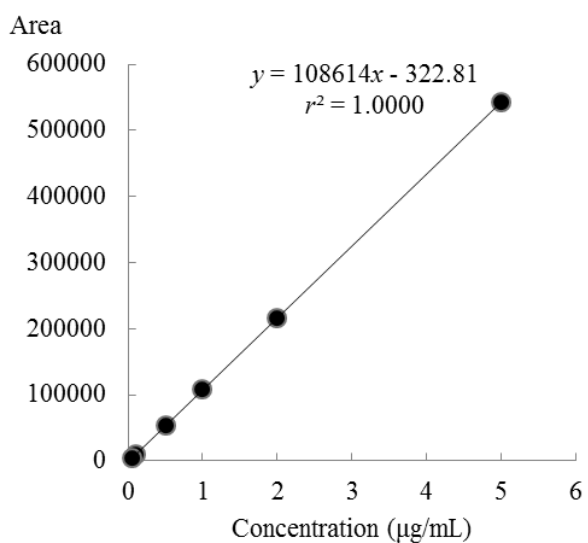


Fig.2 Calibration curve for melamine

2) 抽出溶液の検討

分析用試料としてなたね油かすを用いて抽出溶液の検討を行った結果を Table 2 に示した。

抽出溶液として水, アセトニトリル-水 (1+1), メタノール-水 (5+1), アセトニトリル-水-ジエチルアミン (5+4+1), 塩酸 (1+15), 塩酸 (1+30), 塩酸 (1+150), トリクロロ酢酸水溶液 (5 g/100 mL), メタリン酸水溶液 (5 g/100 mL) 及び酢酸 (0.1 mol/L) を用い, なたね油かすにメラミン濃度が質量分率 0.1 % になるよう標準液を添加した試料及びメラミンを添加しない試料の分析を行った。全ての抽出溶液において定量を妨害する夾雑ピークは検出されず, 0.1 % 添加試料の回収率は 88.7 % ~ 98.5 % であった。抽出溶液の pH は 0 ~ 14 の範囲で, 最も pH の低い塩酸 (1+15) の添加回収率が 88.7 % であり, 他の抽出溶液と比較すると若干低い値となった。各抽出溶液のクロマトグラムを比較したところ, ピークの状態に大きな差はなかったため, 有機溶剤, 酸及びアルカリを加えることなく, 抽出溶液は水のみを用いることとした。

Table 2 Comparison of extraction solvent

Extraction solvent	pH of extract	Content (%)	Measured value ^{a)} (%)	Recovery (%)
Water	7	0.1	0.098	98.5
Acetonitril-water (1+1)	7	0.1	0.095	94.6
Methanol-water (5+1)	9	0.1	0.091	90.9
Acetonitril-water-diethylamine (5+4+1)	14	0.1	0.096	95.6
Hydrochloric acid-water (1+15)	0	0.1	0.089	88.7
Hydrochloric acid-water (1+30)	0	0.1	0.091	91.1
Hydrochloric acid-water (1+150)	1	0.1	0.097	97.4
Trichloroacetic acid (5 g/100 mL)	0	0.1	0.095	94.7
Metaphosphoric acid (5 g/100 mL)	1	0.1	0.090	89.5
Acetic acid (0.1 mol/L)	3	0.1	0.091	90.6

a) $n=1$

3) 抽出時間の検討

分析用試料として石灰窒素有機入り化成肥料及びなたね油かすを用いて抽出時間の検討を行った結果を Fig.3 に示した。

肥料等試験法⁷⁾に記載の HPLC による肥料中のメラミン関連物質の測定方法 (有機質を含まない肥料) では, メラミン, アンメリン, アンメリド及びシアヌル酸の 4 成分全てを抽出溶液に溶解させるために, 抽出時間を 30 分と長く設定している。今回は分析対象物質がメラミンのみなので, 抽出時間を短縮することが可能か検討した。メラミンを 0.2 % 程度含有する石灰窒素有機入り化成肥料及びなたね油かすにメラミン濃度が質量分率 0.1 % になるよう標準液を添加した試料を用い, 水 100 mL を加え, 0, 5, 10, 20, 30 分超音波抽出を行った。結果, 石灰窒素有機入り化成肥料は測定値が質量分率 0.18 % ~ 0.20 % の範囲で推移し, 5 分以降は抽出時間による差は認められなかった。なたね油かすは測定値が質量分率 0.068 % ~ 0.092 %, 回収率が 67.7 % ~ 92.5 % の範囲で推移し, 10 分以降は抽出時間による差は認められなかった。以上の結果より, 抽出時間を 10 分とすることとした。

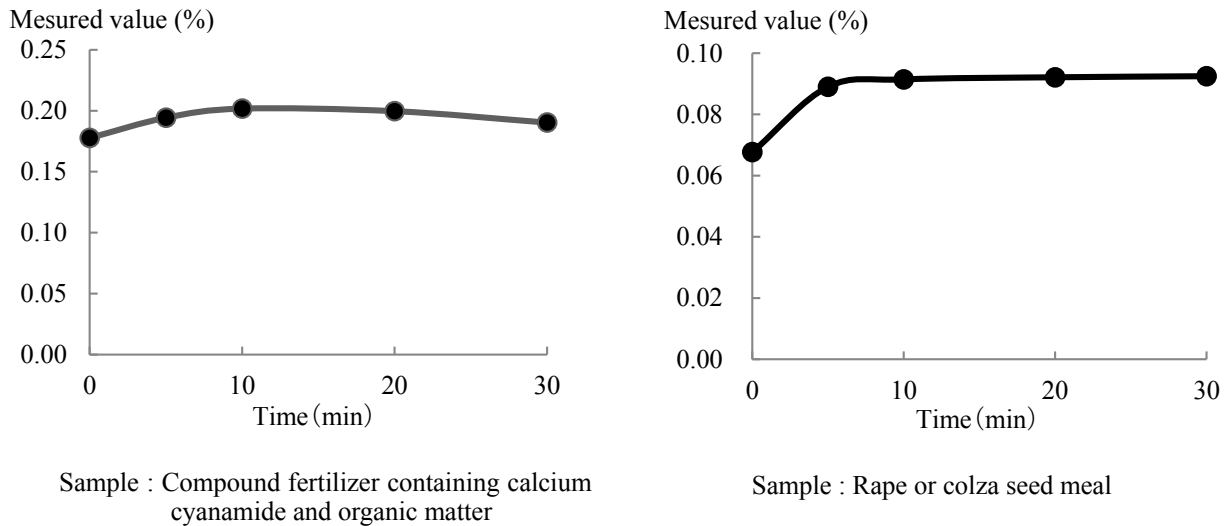


Fig.3 Comparison of extraction time

(%): Mass fraction

4) 抽出液の pH によるメラミンの安定性への影響の検討

分析用試料として春雨粕を用いて試料溶液の pH によるメラミンの安定性への影響を調査した結果を Table 3 に示した。

流通肥料を本法に従って調製した抽出液の pH は 4~10 と広い範囲を示したことから、抽出液の pH がメラミンの安定性に与える影響を調査することとした。メラミンを質量分率 1.2 %程度含有する春雨粕を分析用試料として用い、抽出操作により得られた抽出液 40 mL を 50 mL ビーカーにとり、pH 2, pH 4, pH 7 及び pH 10 となるよう調整した。pH を調整した抽出液を 50 mL 容全量フラスコに移し込み、標線まで水を加えた。pH 未調整の抽出液(pH 5)についても 40 mL を 50 mL 容全量フラスコにはかりとり、標線まで水を加えた。定容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-りん酸塩緩衝液(82+18)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、8000×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、抽出直後、20 時間後及び 45 時間後に HPLC により測定を行い、メラミンの安定性を確認した。結果、抽出液の pH がメラミンの安定性には影響を与えることはなく、測定値は pH 2~pH 10 のいずれの抽出液においても質量分率 1.2 %程度で 45 時間安定していた。

Table 3 Effect of pH of the extract on stability of melamine

Lapse time (hours)	Measured value in the solution on each pH ^{a)}				
	pH 2	pH 4	pH 5.4	pH 7	pH 10
0	1.23	1.24	1.23	1.24	1.25
20	1.22	1.24	1.22	1.23	1.23
45	1.23	1.24	1.22	1.23	1.22

a) Measured value after standing certain period in the extract of vermicelli dregs adjusted to each pH

5) 添加回収試験

なたね油かす 1 点, 大豆油かす 1 点, 石灰窒素有機入り化成肥料 1 点, 有機入り化成肥料 1 点及び有機入

り配合肥料 1 点にメラミンとして質量分率 2 %, 0.4 %及び 0.1 %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 4 に示した. 回収率は質量分率 2 %で 94.6 %~99.8 %, 0.4 %で 92.4 %~98.5 %及び 0.1 %で 93.1 %~98.4 %であり, 肥料等試験法⁷⁾に示されている回収率の目標以内であった.

Table 4 Result of recovery test for melamine

Sample name	Content of melamine (%) ^{a)}	Mean recovery ^{b)} (%)	RSD ^{c)} (%)	Criteria of the truness ^{d)} (%)
Rape or colza seed meal	2	94.6	1.1	85~110
	0.4	95.6	0.9	85~110
	0.1	96.3	0.6	85~110
Soybean meal	2	95.2	2.5	85~110
	0.4	92.4	3.4	85~110
	0.1	93.1	1.8	85~110
Compound fertilizer containing calcium cyanamide and organic	2	98.2	0.4	85~110
	0.4	98.5	0.1	85~110
	0.1	97.6	2.1	85~110
Compound fertilizer containing organic	2	99.8	1.2	85~110
	0.4	97.9	0.8	85~110
	0.1	96.2	2.2	85~110
Mixed fertilizers containing organic	2	98.6	3.0	85~110
	0.4	97.7	5.6	85~110
	0.1	98.4	2.2	85~110

a) Mass fraction

b) $n=3$

c) Relative standard deviation

d) Criteria of the truness (recovery) of Testing Methods for Fertilizer requires

6) 併行精度及び中間精度の評価

併行精度及び中間精度を確認するため, 大豆油かすにメラミンが質量分率 2 %となるよう標準液を添加した試料及び有機入り化成肥料にメラミンが質量分率 0.1 %となるよう標準液を添加した試料を用い, それぞれ 2 点併行で日を変えて 5 回試験を実施して得られた結果を Table 5 及び Table 6 に示した.

大豆油かすのメラミンの平均値は質量分率 1.91 %, 併行相対標準偏差は 1.7 %, 中間相対標準偏差は 2.2 %, 有機入り化成肥料のメラミンの平均値は質量分率 0.100 %, 併行相対標準偏差は 1.4 %, 中間相対標準偏差は 2.5 %であり, いずれの相対標準偏差も肥料等試験法⁷⁾に示されている精度の目安以内であった.

Table 5 Intermediate precision of confirmatory test results by the day

Day	% (Mass fraction)			
	Soybean meal		Compound fertilizer containing organic material	
	(Content of melamine: 2 %)		(Content of melamine: 0.1 %)	
1	1.94	1.85	0.0979	0.0938
2	1.94	1.93	0.100	0.100
3	1.90	1.92	0.100	0.100
4	1.85	1.90	0.101	0.102
5	1.95	1.97	0.102	0.101

Table 6 Results of statistical analysis for the intermediate precision in the confirmation test results

Sample name	Mean ^{a)} (%) ^{b)}	s_r ^{c)} (%) ^{b)}	RSD_r ^{d)} (%)	$CRSD_r$ ^{e)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{f)} (%) ^{b)}	$RSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{h)} (%)
Soybean meal	1.91	0.03	1.7	4	0.04	2.2	6.5
Compound fertilizer ⁱ⁾	0.100	0.001	1.4	4	0.002	2.5	6.5

a) Total mean (Test dates (5)×2 Samples replicate analysis)

b) Mass fraction

c) Repeatability standard deviation

d) Repeatability relative standard deviation

e) Criteria of repeatability (repeatability relative standard deviation) of Testing Methods for Fertilizer requires

f) Intermediate standard deviation

g) Intermediate relative standard deviation

h) Criteria for intermediate precision (Intermediate relative standard deviation) of Testing Methods for Fertilizer requires

i) Compound fertilizer containing organic material

7) 定量下限の確認

大豆油かす 1 点を用いたメラミンの定量下限確認の試験結果を Table 7 に示した。大豆油かすにメラミンとして質量分率 0.04 %を添加して 7 点併行試験を実施したところ、本法の定量下限は質量分率 0.02 %程度と推定された。また、本法の検出下限は質量分率 0.007 %程度と推定された。

Table 7 Calculated *LOQ* and *LOD* values

Sample name	Content of melamine (%) ^{a)}	Mean value ^{b)} (%) ^{a)}	<i>SD</i> ^{c)} (%) ^{a)}	<i>LOQ</i> ^{d)} (%) ^{a)}	<i>LOD</i> ^{e)} (%) ^{a)}
Soybean meal	0.04	0.039	0.002	0.02	0.007

a) Mass fraction

b) $n=7$

c) Standard deviation

d) Standard deviation $\times 10$

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

8) 流通肥料の分析

有機質肥料としてなたね油かす 2 種類, 大豆油かす 1 種類, 魚かす粉末 3 種類, カポック油かす 1 種類, 蒸製皮革粉 1 種類及び春雨粕 1 種類, 有機質を含む化成肥料として石灰窒素を含む肥料 2 種類, 含まない肥料 5 種類, 有機質を含む配合肥料 2 種類及び有機質を含む指定配合肥料 2 種類を本法に従って測定した。

有機質肥料については, 魚かす粉末 3 種類、蒸製皮革粉及び春雨粕でメラミンピークと同位置にピークが検出された。魚かす粉末で検出されたピークについては, メラミンとして質量分率 0.01 %~0.04 % 検出され, 抽出溶液の検討, 測定条件の検討及び抽出カラムの検討を行ったが, 除去することが出来なかった。魚かす粉末中にメラミンが混入している可能性も考え, 魚かす粉末 1 種類について, 飼料分析基準⁸⁾に記載の液体クロマトグラフトンデム型質量分析計による測定法を用いて分析を行った。結果, メラミンは検出されず, 魚かす粉末で検出されたピークはメラミンではなく夾雑ピークであることを確認した。以上の結果より, 本試験法は魚かす粉末を測定対象から除くこととした。蒸製皮革粉については, メラミンとして質量分率 0.008 % 程度検出されたが, 本試験法のメラミンの検出下限が 0.007 % 程度であることから, 分析に影響を及ぼさない程度の夾雑ピークと考えられる。春雨粕については, 肥料等試験法⁷⁾に記載のガスクロマトグラフ質量分析計法でメラミンの含有が確認されているサンプルであり, メラミンとして質量分率 1.2 % 検出された。その他の有機質肥料については, 定量を妨害する夾雑ピークは検出されなかった。

有機質を含む化成肥料については, 石灰窒素を含む肥料 2 種類でメラミンピークと同位置にピークが検出された。石灰窒素を含む肥料であることから, 検出されたピークはメラミンであると考えられる。含有量は質量分率 0.01 %~0.18 % であった。石灰窒素を含まない肥料については, 定量を妨害する夾雑ピークは検出されなかった。

配合肥料及び指定配合肥料については, 定量を妨害する夾雑ピークは検出されなかった。

4. まとめ

有機質肥料及びそれを含む肥料中のメラミン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) 既存の HPLC 法の溶離液の比率を調整することで, 夾雑ピークとメラミンピークの分離が可能であった。
- (2) 検量線は 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~ 5 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で直線性を示し, 決定係数は $r^2=0.999$ 以上であった。
- (3) 抽出溶液を検討した結果, 水を抽出溶液として用いることとした。
- (4) 石灰窒素中のメラミンの暫定許容値 0.4 % (質量分率) を基準とし, 5 種類の有機質肥料及びそれを含む肥料に, メラミンとして質量分率 2 %, 0.4 % 及び 0.1 % となるよう添加し, 3 点併行分析を実施した。平均回収率

は 92.4 %～99.8 %であり、肥料等試験法に示されている真度(回収率)の目標を満たしていた。

(5) 大豆油かす及び有機入り化成肥料にメラミンとして質量分率 2.0 %及び 0.1 %となるようにそれぞれ添加し、2 点併行で日を変えて 5 日間試験を実施し、併行精度及び中間精度の確認を行った。併行相対標準偏差は 1.4 %～1.7 %、中間相対標準偏差は 2.2 %～2.5 %であり、肥料等試験法に示されている精度の目安を満たしていた。

(6) 大豆油かすにメラミンとして質量分率 0.04 %となるよう添加し、7 点併行試験を実施し定量下限と検出下限の確認を行った結果、本試験法におけるメラミンの定量下限は質量分率 0.02 %程度、検出下限は質量分率 0.007 %程度と推定された。

(7) 20 種類の有機質及びそれを含む流通肥料中のメラミンを測定した結果、魚かす粉末でメラミンの定量を妨害する夾雑ピークが確認されたため、本試験法は魚かす粉末を測定対象外とすることとした。

以上の結果より、本試験法は、有機質肥料及びそれを含む肥料中のメラミンを測定するために十分な性能を有していることを確認した。

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) 農林水産省消費・安全局農産安全管理課長通知:石灰窒素中のメラミンの暫定許容値の設定について, 平成 25 年 3 月 25 日, 24 消安第 6116 号 (2013)
- 5) 坂東悦子, 白井裕治: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, 肥料研究報告, **6**, 27~35 (2013)
- 6) 坂東悦子, 甲斐茂浩: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—共同試験成績—, 肥料研究報告, **7**, 10~21 (2014)
- 7) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC):肥料等試験法 (2015)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2015.pdf>
- 8) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC):飼料分析基準
<<http://www.famic.go.jp/ffis/feed/bunseki/bunsekikijun.html>>

Determination Method for Melamine in Organic Fertilizer and Fertilizer Containing Organic Matter using High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

Etsuko FUNAMIZU¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

An HPLC method for determination of melamine in organic fertilizer and fertilizer containing organic matter was developed and validated as a single-laboratory validation. The melamine was extracted from analytical sample with water. The extract was centrifuged, and a portion of the supernatant was diluted with mobile phase. The melamine was analyzed by HPLC on carbamoyl-modified silica gel column with UV detection at 214 nm. As a result of 3 replicate analysis of 5 fertilizer samples spiked with melamine at 2 %, 0.4 % and 0.1 % (mass fraction), the mean recovery of melamine was 92.4 % ~ 99.8 %. In the train of duplicate analysis per 5 days, the repeatability and intermediate precision of melamine were 1.4 % ~ 1.7 % and 2.2 % ~ 2.5 %, respectively. On the basis of 7 replicate measurements of melamine added to samples, the *LOQ* value was 0.02 %. These results demonstrated that this method was validated for the determination of melamine in organic fertilizer and fertilizer containing organic matter with the exception of fish meal.

Key words melamine, calcium cyanamid, organic fertilizer, HPLC, single-laboratory validation

(Research Report of Fertilizer, **9**, 33-42, 2016)