8. その他

8.1 メラミン及びその関連物質

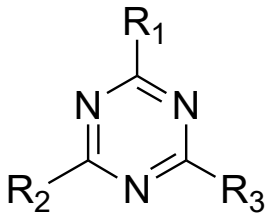
8.1.a ガスクロマトグラフ質量分析法

(1) 概要

この試験法は肥料に適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.1.a-2017 又は Mel.a-1 とする。

有機物及び有機物を含む肥料中のメラミン及びその関連物質(以下、「メラミン等」という。)をジエチルアミン－水－アセトニトリル(1+4+5)で抽出し、BSTFA－TMCS(99+1)で誘導体化した後ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて測定し、分析試料中のメラミン等を求める。なお、この試験法の性能は**備考 8** に示す。

備考 1. メラミン及びその関連物質の構造式は図 1 のとおりである。メラミンの製造過程において R_1～R_3 の-NH_2 が-OH に置き換わった副産物が生ずることがある。



	R_1	R_2	R_3	MW
メラミン	NH_2	NH_2	NH_2	126.12
アンメリン	OH	NH_2	NH_2	127.10
アンメリド	OH	OH	NH_2	128.09
シアヌル酸	OH	OH	OH	129.07

図1 メラミン及びその関連物質の構造式

(2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。

b) 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 以上)又は同等の品質の試薬。

c) ジエチルアミン: 特級又は同等の品質の試薬。

d) ピリジン(脱水)(1): 純度 99.5 %(質量分率)以上及び水分 50 μg/mL 以下の有機合成用又は同等の品質の試薬。

e) 誘導体化試薬(2): 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)。

f) メラミン等標準液(500 μg/mL): メラミン[$C_3H_6N_6$](3)、アンメリン[$C_3H_5N_5O$](3)、アンメリド[$C_3H_4N_4O_2$](3)及びシアヌル酸[$C_3H_3N_3O_3$](3)約 0.05 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量のジエチルアミン－水(1+4)で溶かし、それぞれ 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで同溶媒を加える。

g) 混合標準液(50 μg/mL)(3): 各メラミン等標準液(500 μg/mL)5 mL を 50 mL 全量フラスコにとり、標線までジエチルアミン－水－アセトニトリル(1+4+5)を加える。

注(1) 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する。

(2) 混合された誘導体化試薬は BSTFA－TMCS(99+1)の名称で市販されている。

(3) メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸としてそれぞれ標準試薬が市販されている。

備考 2. BSTFA－TMCS(99+1)は SUPELCO から 1 mL のアンプルで販売されている。開封後は、その日のうちに使用する。

備考 3. メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸の標準試薬は富士フイルム和光純薬、関東化学及び林純薬工業より販売されている。

(**3**) **装置** 装置は、次のとおりとする。

a) **ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)**: JIS K 0123 に規定する GC/MS で次の要件を満たすもの。

1) **ガスクロマトグラフ**:

① 試料導入部: スプリットレス方式が可能なもの。

② キャピラリーカラム: 内径 0.25 mm～0.32 mm、長さ 30 m の溶融シリカ製のキャピラリーカラム。5 %フェニル 95 %メチルポリシロキサンを 0.25 μm 厚さでキャピラリーカラム内表面へ化学結合し、質量分析計仕様のもの。

③ キャリヤーガス: 純度 99.999 %(体積分率)以上の高純度ヘリウム

2) **質量分析計**:

① イオン化法: 電子衝撃イオン化(EI)法

② イオン検出方式: 選択イオン検出(SIM)法

b) **超音波発生器**: 超音波洗浄器を用いることができる。

c) **高速遠心分離機**: 8000×*g*～10 000×*g* で遠心分離可能なもの。

d) **濃縮器**: 70 °C±2 °C に調節できる遠心エバポレーター

e) **水浴**: 70 °C±2 °C に調節できるもの。

備考 4. キャピラリーカラムは DB-5ms、Rtx-5ms、HP-5ms、SLB-5ms、BPX-5、CP-Sil 8CB low Bleed/MS、TC-5HT for GC/MS 等の名称で市販されている。

(**4**) **試験操作**

(**4.1**) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

a) 分析試料 0.5 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL～300 mL 共栓三角フラスコに入れる。

b) ジエチルアミン－水－アセトニトリル(1+4+5)160 mL～200 mL を加え、超音波発生器を用いて約 30 分間超音波処理する。

c) 1.5 mL 共栓遠心沈殿管[4]に 1.5 mL 程度とり、遠心力 8000×*g*～10 000×*g* で約 5 分間遠心分離する[5]。

d) 上澄み液 1 mL を 5 mL～50 mL 全量フラスコにとり、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、抽出液とする。

注(**4**) ポリプロピレン製等で試験に影響しないことを確認する。

(**5**) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 8100×*g*～10 000×*g* 程度となる。

備考 5. 500 μm のふるいを通過するまで粉砕して分析用試料を調製する。

備考 6. 分析試料 0.5 g をはかりとり、ジエチルアミン－水－アセトニトリル(1+4+5)200 mL で抽出し、**d**)の操作で 50 倍に希釈した場合は、分析試料中のメラミン等の定量範囲は 0.2 %(質量分率)～10 %(質量分率)となる。その定量範囲未満のメラミン等を測定する場合は **d**)の操作の希釈倍率を下げる。また、メラミン等の含有量がそれぞれ 10 %(質量分率)を超える場合は分析試料の採取量を減らす必要がある。

（**4.2**） **誘導体化**　誘導体化は、次のとおり行う。

a） 抽出液 0.2 mL を 5 mL～10 mL スクリュー栓付き試験管にとる。

b） 試験管を濃縮器にいれ、70 °C±2 °C で減圧濃縮し、完全に溶媒を揮散させる(6)。

c） ピリジン（脱水）(1)0.3 mL 及び誘導体化試薬(2)0.2 mL を残留物に加えて混合し、栓をして密封する。

d） 70 °C±2 °C の水浴中で約 45 分間加熱した(7)後、放冷し、試料溶液とする(8)。

注（**6**） 吹きつけ型濃縮機等を用いることができる。

（**7**） **b**）の操作で水分が残留した場合又は **c**）の操作で使用する試薬に水分が含まれていた場合は、**d**）における誘導体化の反応が十分に進まないことがある。

（**8**） 必要に応じて、試料溶液を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管(4)に 1.5 mL 程度とり、8000×*g*～10 000×*g* で約 5 分間遠心分離する(5)。

（**4.3**） **測定**　測定は、JIS K 0123 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用するガスクロマトグラフ質量分析計の操作方法による。

a） **ガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件**　ガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

1） **ガスクロマトグラフ**:

① 試料導入方法： スプリットレス注入法（1 min）

② 試料導入部温度： 280 °C

③ キャピラリーカラム： 5 %フェニル 95 %メチルポリシロキサンをキャピラリーカラム内表面へ化学結合した溶融シリカ製のキャピラリーカラム（内径 0.25 mm～0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm）

④ カラム槽温度： 100 °C（1 min）→（15 °C /min）→320 °C（3 min）

⑤ GC/MS 接続部温度： 250 °C

⑥ キャリヤーガス： ヘリウム、流量： 1.5 mL/min

2） **質量分析計**:

① イオン化法： 電子衝撃イオン化（EI）法

② イオン化電圧： 70 V

③ イオン源温度： 230 °C

④ イオン検出方式： 選択イオン検出（SIM）法

⑤ 測定イオン： 表 1 のとおり

表1　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
DACP（I.S.）	288	289	290	273	275

b） 検量線の作成

1） 混合標準液（50 μg/mL）5 mL を 50 mL 全量フラスコにとり、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（5 μg/mL）とする。

2） 混合標準液（5 μg/mL）1 mL～20 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、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 μg/mL～2 μg/mL）とする。

3） 混合標準液（0.1 μg/mL～2 μg/mL）を（**4.2**）**b**）～**d**）の操作を行って 0.04 μg/mL～0.8 μg/mL 相当量の検量線用混合標準液とする。

4） 各検量線用混合標準液 1 μL を GC/MS に注入し、測定対象物質の定量用イオン（*m*/*z*）及び確認用イオン（*m*/*z*）のクロマトグラムを記録し、それぞれのピーク面積又は高さを求める。

5） 各測定対象物質の定量用イオン（*m*/*z*）と確認用イオン（*m*/*z*）のピーク面積比又は高さ比を算出する。

6） 各検量線用混合標準液の測定対象物質濃度と定量用イオン（*m*/*z*）のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c） 試料の測定

1） 試料溶液を 1 μL を **b**）**4**）～**5**）と同様に操作する[9]。

2） 検量線から各測定対象物質量を求め、分析試料中の各測定対象物質を算出する。

注（9） 試料溶液の定量用イオン（*m*/*z*）と確認用イオン（*m*/*z*）のピーク面積比又は高さ比が、標準液のピーク面積比又は高さ比に対して±30 %程度の範囲内であることを確認する。なお、ピーク面積比又は高さ比は濃度によって異なることがある。

備考 7. メラミン等の感度の変動が確認された場合は、次の **a**）又は **b**）の方法により測定を行う。

a） （**4.3**）**c**）**1**）の操作で試料溶液を GC/MS に一定回数注入した後、（**4.3**）**b**）**4**）～**6**）に従って操作し検量線を修正する。

b） 内標準物質として 2,6-ジアミノ-4-クロロピリミジン（0.5 μg 相当量）を標準液及び試料溶液に加え、（**4.2**）**c**）～**d**）、（**4.3**）**b**）**4**）～**6**）及び **c**）**1**）と同様の操作をする。ただし、各測定対象物質と内標準物質の定量用イオン（*m*/*z*）のピーク面積比又は高さ比から検量線の作成及び分析試料中の各測定対象物質濃度を算出する。

備考 8. 大豆油かす、魚粉、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おけるメラミン等の回収試験の結果は、10 %（質量分率）及び 0.2 %（質量分率）の添加レベルで平均回収率が 92.1 %～102.9 %及び 90.3 %～102.2 %であった。

なお、この試験法のメラミン等の定量下限はそれぞれ 0.01 %（質量分率）程度と推定された。

参考文献

1） 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) メラミン等の試験法フローシート 肥料中のメラミン等の試験法のフローシートを次に示す。

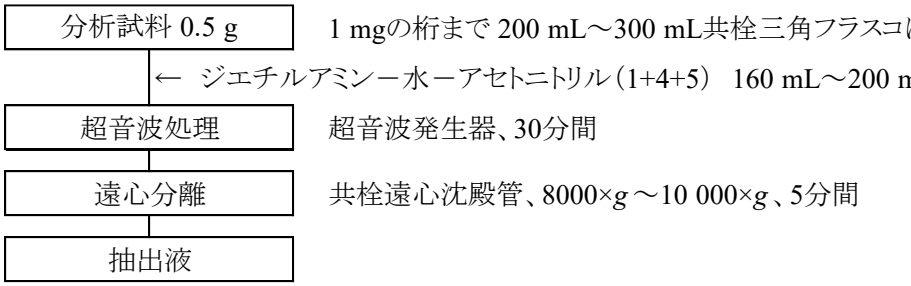


図1　肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート(抽出操作)

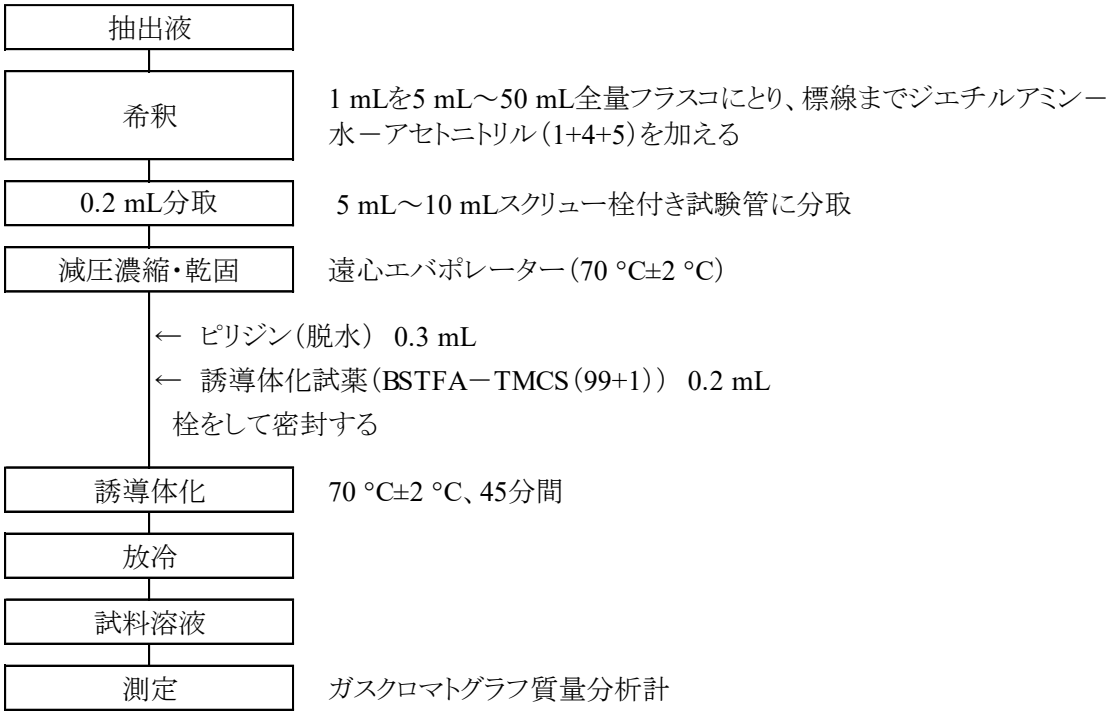


図2　肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート (誘導体化及び測定操作)

参考 メラミン等の検量線用混合標準液の GC/MS の全イオンのクロマトグラム（TIC）例を次に示す。

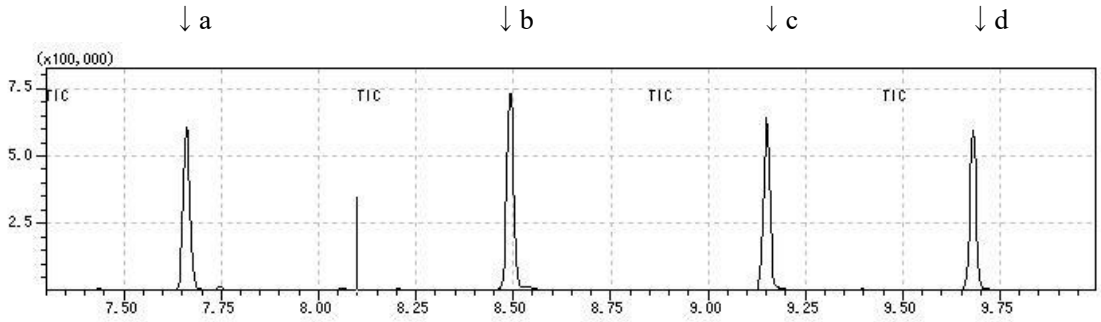


図 3 メラミン及びその関連物質の GC/MS の全イオンのクロマトグラム（TIC）

GC/MS の測定条件

キャピラリーカラム： Rtx-5ms（内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm）

その他の条件は（**4.3**）**a**）ガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件の例示のとおり

各全イオンクロマトグラムのピーク名

a） シアヌル酸　　b） アンメリド

c） アンメリン　　d） メラミン

GC/MS に導入した試料及び導入量

導入した試料： メラミン及びその関連物質の検量線用混合標準液（各 2 μg/mL 相当量）

導入量： 1 μL（メラミン及びその関連物質各 2 ng 相当量）