8.1 メラミン及びその関連物質

8.1.c 高速液体クロマトグラフ法（有機物を含まない肥料）

（1） 概要

この試験法は有機物を含まない肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 8.1.c-2017 又は Mel.c-1 とする。

塩酸（1+15）を分析試料に加えてメラミン及びその関連物質（以下、「メラミン等」という。）を抽出し、高速液体クロマトグラフ（HPLC）に導入し、カルバモイル基を化学結合したシリカゲルカラムで分離し、波長 214 nm で測定し、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 4** に示す。

（2） 試薬 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 8032 に規定する特級又は同等の品質の試薬。なお、高速液体クロマトグラフの溶離液には高速液体クロマトグラフ用試薬を使用。

c） 塩酸： 特級又は同等の品質の試薬。

d） りん酸塩緩衝液(1)： 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 とする(2)。高速液体クロマトグラフ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）でろ過する。

e） 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 の桁まで測定する。少量の塩酸（1+15）で溶かし、それぞれ 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで同溶液を加える。

f） 混合標準液（50 μg/mL）(1)： 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、標線までアセトニトリル－りん酸塩緩衝液（4+1）を加える。

g） 検量線用混合標準液（1 μg/mL～5 μg/mL）： 使用時に混合標準液（50 μg/mL）の 1 mL～5 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までアセトニトリル－りん酸塩緩衝液（4+1）を加える。

h） 検量線用混合標準液（0.05 μg/mL～0.5 μg/mL）： 使用時に混合標準液（1 μg/mL）の 2.5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までアセトニトリル－りん酸塩緩衝液（4+1）を加える。

注（1） 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

（2） りん酸塩緩衝液は pH 6.7±pH 0.2 となる。

（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 1. 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、林純薬工業及び東京化成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） 高速液体クロマトグラフ： JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。

1） カラム： 内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm のステンレス鋼のカラム管にカルバモイル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。

2） カラム槽： カラム槽温度を 40 °C±1 °C で調節できるもの。

3） 検出部： 吸光光度検出器で波長 214 nm 付近で測定できるもの。

b） **超音波発生器**： 超音波洗浄機を用いることができる。

c） **遠心分離機**： 1700×*g* で遠心分離可能なもの。

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

備考 2. カラムは TSKgel Amide-80 等の名称で市販されている。メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸を完全に分離できることが確認されたカラムを使用すること。

（**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 共栓三角フラスコに入れる。

b） 塩酸（1+15）100 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） 静置後、上澄み液を 50 mL 共栓遠心沈殿管に 50 mL 程度とる。

d） 遠心力約 1700×*g* で約 5 分間遠心分離し(4)、上澄み液を抽出液とする。

e） 抽出液 5 mL(5)を 50 mL 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（4+1）を加えて希釈する。

f） 希釈液を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管(6)に 1.5 mL 程度とる。

g） 遠心力 8000×*g*～10 000×*g* で約 5 分間遠心分離し(7)、上澄み液を試料溶液とする。

注（**4**） 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 1700×*g* 程度となる。

（**5**） 試料溶液中のメラミン等の濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、上澄み液の分取量 1 mL～2.5 mL とする。

（**6**） ポリプロピレン製等の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

（**7**） 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 3. （**4.1**）**f**）～**g**）の操作に代えて、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、ろ液を試料溶液としてもよい。

（**4.2**） **測定** 測定は、JIS K 0124 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフの操作方法による。

a） **高速液体クロマトグラフの測定条件**： 高速液体クロマトグラフ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） **カラム**： カルバモイル基を化学結合したシリカゲルカラム（内径 4 mm～6 mm、長さ 150 mm～250 mm、粒径 5 μm）

2） **カラム槽温度**： 40 °C±1 °C

3） **溶離液**： アセトニトリル－りん酸塩緩衝液（4+1）

4） **流量**： 1 mL/min

5） **検出器**： 吸光光度検出器、測定波長 214 nm

b） **検量線の作成**

1） 各検量線用混合標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 214 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。

2） 各検量線用混合標準液の濃度と波長 214 nm 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 10 μL を **b**）**1**）と同様に操作する。

2） 検量線から各メラミン等の量を求め、分析試料中の各メラミン等を算出する。

備考 4. 石灰窒素 3 銘柄、石灰窒素入り化成肥料 1 銘柄、石灰窒素を含まない化成肥料 2 銘柄、硫安 1 銘柄及び尿素 1 銘柄を用いて回収試験を実施した結果、メラミン等として 4 %（質量分率）及び 0.1 %（質量分率）の濃度レベルでの回収率は 90.5 %～106.3 %及び 92.2 %～107.0 %であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表 1 に示す。

なお、この試験法の定量下限はメラミン、シアヌル酸で 0.02 %（質量分率）程度、アンメリン、アンメリドで 0.01 %（質量分率）程度と推定されたが、アンメリド及びシアヌル酸については、アンメリドで 0.188 %（質量分率）～1.10 %（質量分率）の範囲で、シアヌル酸で 0.105 %（質量分率）～1.15 %（質量分率）の範囲で十分な室間再現精度を有していた。

表1 メラミン及びその関連物質試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

農薬名	試料名	試験室数[1)]	平均値[2)] (%)[3)]	s_r[4)] (%)[3)]	RSD_r[5)] (%)	s_R[6)] (%)[3)]	RSD_R[7)] (%)
メラミン	石灰窒素1	9(2)	2.83	0.04	1.4	0.12	4.3
	石灰窒素2	10(1)	0.391	0.003	0.8	0.023	5.8
	石灰窒素入り化成肥料	9(2)	0.845	0.019	2.2	0.036	4.2
	化成肥料	11(0)	0.198	0.005	2.6	0.012	6.2
	硫酸アンモニア	10(1)	0.0343	0.0015	4.5	0.0040	11.6
アンメリン	石灰窒素1	9(2)	1.60	0.02	1.3	0.06	3.8
	石灰窒素2	10(1)	0.105	0.001	1.3	0.002	2.3
	石灰窒素入り化成肥料	9(2)	0.629	0.027	4.3	0.023	3.7
	化成肥料	11(0)	0.195	0.004	2.1	0.009	4.5
	硫酸アンモニア	10(1)	0.0346	0.0013	3.7	0.0024	6.9
アンメリド	石灰窒素1	9(2)	1.10	0.02	2.1	0.08	7.6
	石灰窒素2	11(0)	0.361	0.008	2.2	0.023	6.5
	石灰窒素入り化成肥料	9(2)	0.188	0.004	2.2	0.014	7.5
	化成肥料	11(0)	0.718	0.028	3.9	0.052	7.2
	硫酸アンモニア	11(0)	0.0345	0.0031	8.9	0.0056	16.1
シアヌル酸	石灰窒素1	9(2)	1.15	0.06	4.8	0.09	7.7
	石灰窒素2	10(1)	0.390	0.018	4.5	0.029	7.4
	石灰窒素入り化成肥料	9(2)	0.105	0.003	2.9	0.014	13.2
	化成肥料	9(2)	0.788	0.026	3.2	0.054	6.8
	硫酸アンモニア	10(1)	0.0365	0.0015	4.2	0.0067	18.3

1） 有効試験室数（外れ値を報告した試験室数）

2） 平均値（n=有効試験室数×試料数(2)）

3） 質量分率

4） 併行標準偏差

5） 併行相対標準偏差

6） 室間再現標準偏差

7） 室間再現相対標準偏差

参考文献

1） 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)

2） 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－, 肥料研究報告, **7**, 10~21 (2014)

（**5**） **メラミン等の試験法フローシート** 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法のフローシートを次に示す。

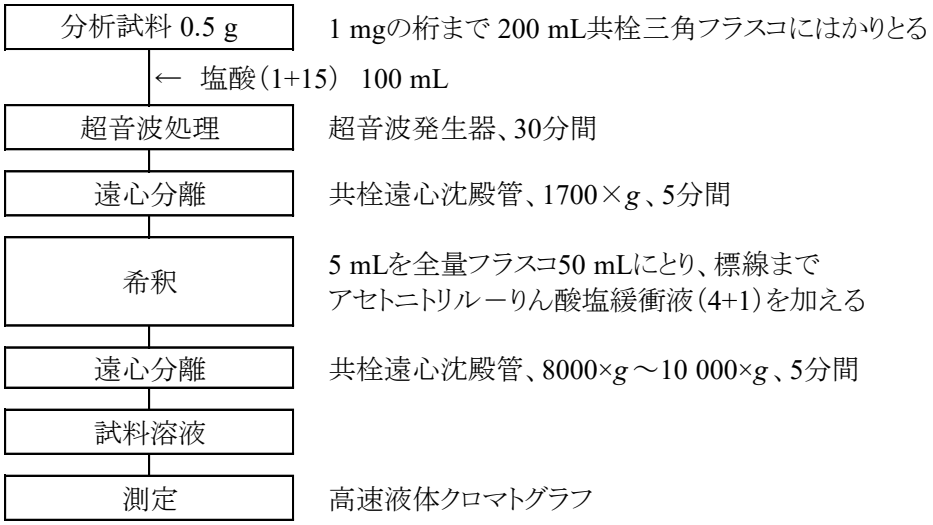
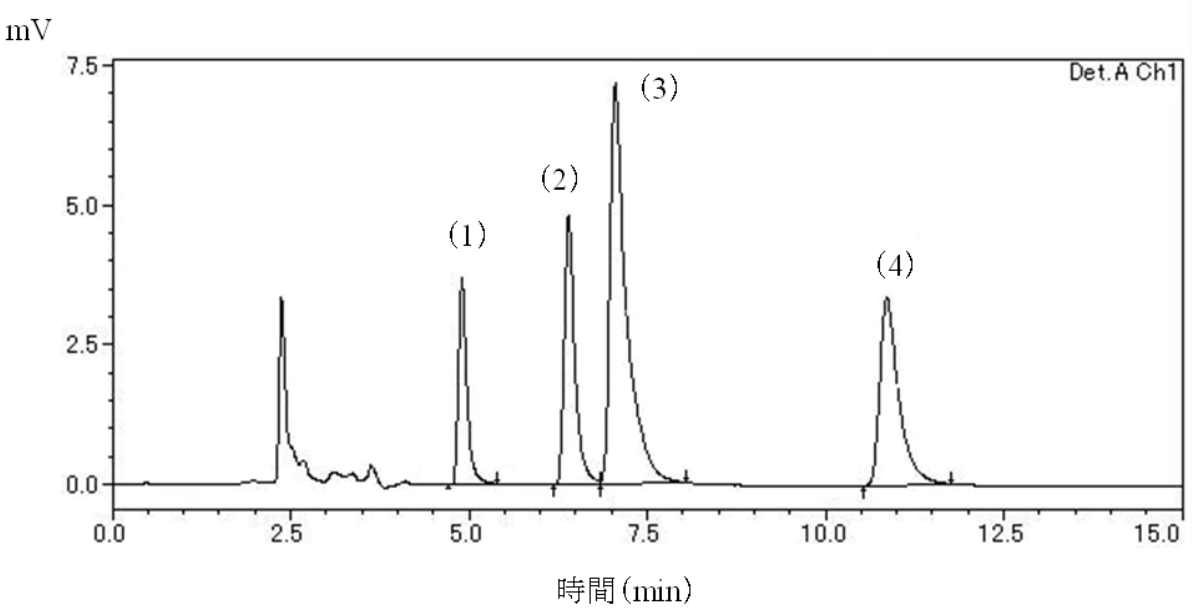


図　肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート

参考 メラミン等の検量線用混合標準液の HPLC クロマトグラム例を次に示す。



参考図 メラミン及びその関連物質の HPLC クロマトグラム

各ピークの物質名

(1) シアヌル酸 (2) アンメリド (3) メラミン (4) アンメリン

HPLC の測定条件

カラム: TSKgel Amide-80(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm)

メラミン及びその関連物質の検量線用混合標準液(各 10 ng 相当量(1 µg/mL、10 µL))

その他の条件は(**4.2**)**a**)HPLC の測定条件の例示のとおり