8.1 メラミン及びその関連物質

8.1.d 高速液体クロマトグラフ法（有機物を含む肥料）

（1） 概要

この試験法は有機質肥料及び有機物を含む肥料に適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.1.d-2017 又は Mel.d-1 とする。

水を分析試料に加えてメラミンを抽出し、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を求める。メラミン関連物質であるシアヌル酸、アンメリド及びアンメリンは測定対象成分から除く。この方法の性能は**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） 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。

d） メラミン標準液（500 µg/mL）： メラミン［$C_3H_6N_6$］(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。少量の水で溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで水を加える。

e） メラミン標準液（50 µg/mL）(1)： メラミン標準液（500 µg/mL）5 mL を全量フラスコに 50 mL とり、標線までアセトニトリル－りん酸塩緩衝液（82+18）を加える。

f） 検量線用メラミン標準液（1 µg/mL～5 µg/mL）： 使用時にメラミン標準液（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（82+18）を加える。

g） 検量線用メラミン標準液（0.05 µg/mL～0.5 µg/mL）： 使用時にメラミン標準液（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（82+18）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） りん酸塩緩衝液の pH は 6.7±0.2 となる。

（3） メラミンとして標準試薬が市販されている。

備考 1. メラミン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） 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） 水 100 mL を加え、超音波発生器を用いて約 10 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 1700×*g* で約 10 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（82+18）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**） ローター半径 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**） ローター半径 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（82+18）

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） 各検量線用メラミン標準液 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） 各検量線用メラミン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） 検量線からメラミンの量を求め、分析試料中のメラミンを算出する。

備考 4. 真度の評価のため、なたね油かす、大豆油かす、石灰窒素有機入り化成肥料、有機入り化成肥料及び有機入り配合肥料（各 1 銘柄）を用いて添加回収試験を実施した結果、2 %（質量分率）、0.4 %（質量分率）及び 0.1 %（質量分率）の添加レベルでの平均回収率はそれぞれ 94.6 %～99.8 %、92.4 %～98.5 %及び 93.1 %～98.4 %であった。

精度の評価のため、大豆油かす及び有機入り化成肥料を用いた日を変えての分析結果について、一元配置分散分析を用いて解析し、併行精度及び中間精度を算出した結果 1 を表に示す。

なお、この試験法の定量下限は 0.02 %（質量分率）程度と推定された。

表1　メラミンの日を変えた試験成績の解析結果

試料名	日数[1] T	平均値[2] (%)[3]	併行精度 s_r[4] (%)[3]	併行精度 RSD_r[5] (%)	中間精度 $s_{I(T)}$[6] (%)[3]	中間精度 $RSD_{I(T)}$[7] (%)
大豆油かす	5	1.91	0.03	1.7	0.04	2.2
有機入り化成肥料	5	0.100	0.001	1.4	0.002	2.5

1） 2点併行分析を実施した日数
2） 平均値（n= 日数（T）× 併行数（2））
3） 質量分率
4） 併行標準偏差
5） 併行相対標準偏差
6） 中間標準偏差
7） 中間相対標準偏差

参考文献

1） 船水悦子： 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，肥料研究報告，**9**，33~42 (2016)

（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。

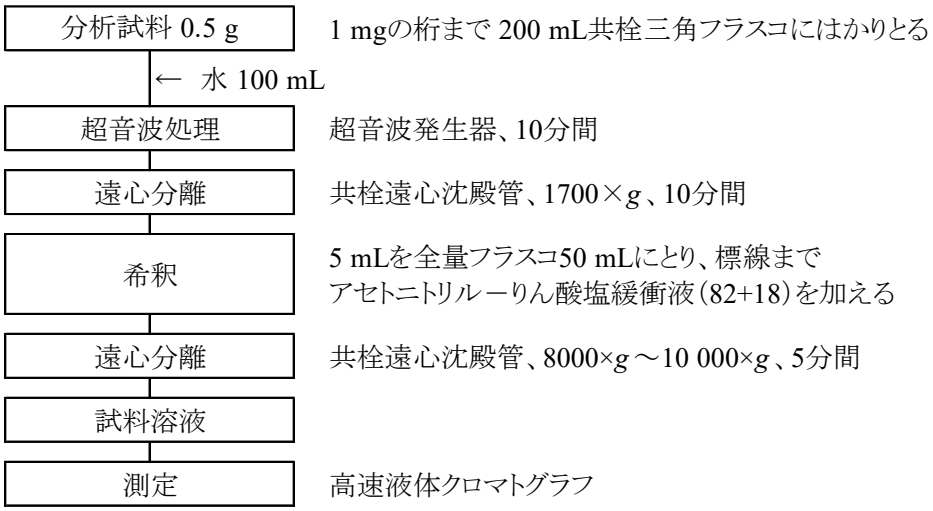
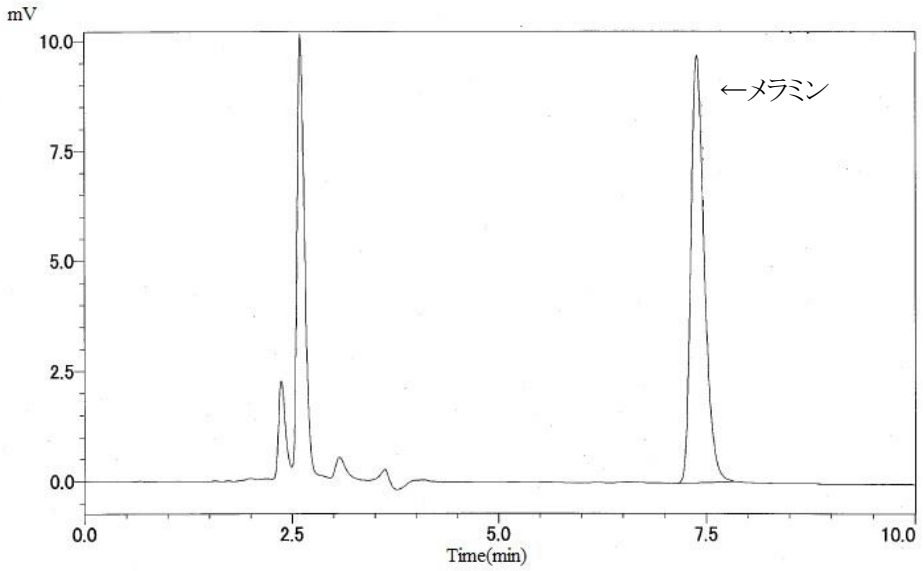


図　有機物を含む肥料中のメラミンの試験法フローシート

参考 メラミンの検量線用標準液の HPLC クロマトグラム例を次に示す。



参考図　メラミンの HPLC クロマトグラム

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）

メラミンの検量線用標準液（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