

土壌中のメラミン及びその関連物質の試験法(参考法)

高速液体クロマトグラフ法

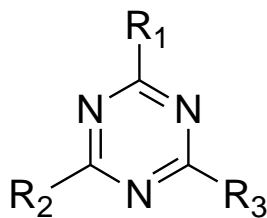
(1) 概要

農用地の土壌に適用する。

土壌中のメラミン、アンメリン及びアンメリドをアセトニトリル-水-ジエチルアミン(50+49+1)で抽出し、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 で測定する。また、シアヌル酸についてはアセトニトリル-水(1+1)で抽出した後、同様の操作により測定する。

なお、共通事項は肥料等試験法(最新版)によるものとする。

備考 1. メラミン及びその関連物質(以下、「メラミン等」という。)の構造式は図 1 のとおりである。



	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

備考 2. 黒ぼく土(2点)及び灰色低地土(2点)にメラミン等として 100 及び 10 mg/kg をそれぞれ添加した試料を用いて回収試験を実施した結果、メラミンの回収率及びその併行相対標準偏差は 91.9~101.2 % 及び 1.3~6.2 % で、アンメリンでは 89.5~106.2 % 及び 0.2~9.3 %、アンメリドでは 88.4~97.4 % 及び 0.6~6.3 % 並びにシアヌル酸では 79.5~108.2 % 及び 1.4~10.0 % であった。

なお、この試験法の定量下限は、メラミン、アンメリド及びシアヌル酸で 0.5 mg/kg 程度、アンメリンで 2 mg/kg 程度である。

(2) 試薬 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水又は同等の品質のもの。
- 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。
- c) アセトニトリル: HPLC の溶離液に使用するアセトニトリルは HPLC 用又は同等の品質の試薬。
- d) ジエチルアミン: 特級又は同等の品質の試薬。
- e) リン酸塩緩衝液⁽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 1,000 mL とする⁽²⁾。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)でろ過する。
- f) メラミン等標準液(0.5 mg/mL): メラミン[C₃H₆N₆]⁽³⁾、アンメリン[C₃H₅N₅O]⁽³⁾、アンメリド[C₃H₄N₄O₂]⁽³⁾及びシアヌル酸[C₃H₃N₃O₃]⁽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。少量のジエチルアミン-水(1+4)で溶かし、それぞれ全量フラスコ 100 mL に移し

入れ、標線まで同溶媒を加える。

- g) **混合標準液(50 µg/mL)⁽¹⁾**: 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-りん酸塩緩衝液(4+1)を加える。
- h) **検量線用混合標準液(2~20 µg/mL)**: 使用時に混合標準液(50 µg/mL)の2~20 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-りん酸塩緩衝液(1+1)を加える。
- i) **検量線用混合標準液(0.1~2 µg/mL)**: 使用時に混合標準液(5 µg/mL)の1~20 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-りん酸塩緩衝液(1+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) りん酸塩緩衝液の pH は 6.7±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 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和光純薬工業、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(HPLC)**: JIS K 0124 に規定する HPLC で次の要件を満たすもの。
 - 1) **カラム**: 内径 4~6 mm、長さ 150~250 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 30~45 °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) **超音波照射機**: 超音波洗浄機を用いることができる。
- c) **高速遠心分離機**: 8,000×g で遠心分離可能なもの。

備考 4. カラムは TSKgel Amide-80 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。

(4.1.1) **メラミン、アンメリン及びアンメリドの抽出**

- a) 分析試料 10.0 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) アセトニトリル-水-ジエチルアミン(50+49+1) 100 mL を加え、振とう機で約 10 分間振り混ぜた後、超音波照射機を用いて 10 分間ごとに振り混ぜながら約 30 分間超音波処理する。
- c) 静置後、上澄み液⁽⁴⁾を共栓遠心沈殿管⁽⁵⁾ 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 8,000×g で約 5 分間遠心分離し⁽⁶⁾、上澄み液をメラミン、アンメリン及びアンメリド測定用試料溶液とする。

注(4) 試料溶液中のメラミン等が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、抽出液の一定量をアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(1+1)で希釈する。

(5) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの

(6) ローター半径 7 cm 及び回転数 10,000 rpm で遠心力 8,000×g 程度となる。

(4.1.2) シアヌル酸の抽出

- a) 分析試料 10.0 g をはかりとり、共栓三角フラスコ 200 mL に入れる。
- b) アセトニトリル-水(1+1) 100 mL を加え、振とう機で約 10 分間振り混ぜた後、超音波照射機を用いて 10 分ごとに振り混ぜながら約 30 分間超音波処理する。
- c) 静置後、上澄み液⁽⁴⁾を共栓遠心沈殿管⁽⁵⁾ 1.5 mL にとる。
- d) 遠心力 8,000×g で約 5 分間遠心分離し⁽⁶⁾、上澄み液をシアヌル酸測定用試料溶液とする。

備考 5. (4.1.1)c)～d) 及び(4.1.2)c)～d) の操作に代えて、遠心力 2,000×g で約 5 分間遠心分離し⁽⁷⁾、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。

注(7) ローター半径 18.7 cm 及び回転数 3,000 rpm で遠心力 2,000×g 程度となる。

(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(HPLC)の操作方法による。

- a) **高速液体クロマトグラフ(HPLC)の測定条件:** 高速液体クロマトグラフ(HPLC)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4～6 mm、長さ150～250 mm、粒径 5 μm)
 - 2) **カラム槽温度:** 30～40 °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 HPLC 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の関係線を作成する。
- c) **試料の測定**
 - 1) メラミン、アンメリン及びアンメリド測定用及びシアヌル酸測定用試料溶液をそれぞれ 10 μL を **b) 1)** と同様に操作する。
 - 2) 検量線からメラミン等の量を求め、分析試料中のメラミン等の濃度を算出する。

(5) **メラミン等の試験法フローシート** 土壤中のメラミン等の試験法のフローシートを次に示す。

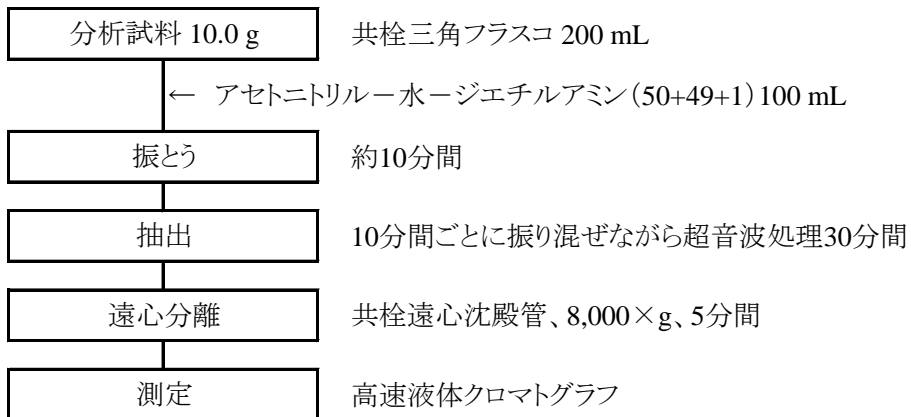


図2 土壤中のメラミン、アンメリン及びアンメリドの試験法フローシート

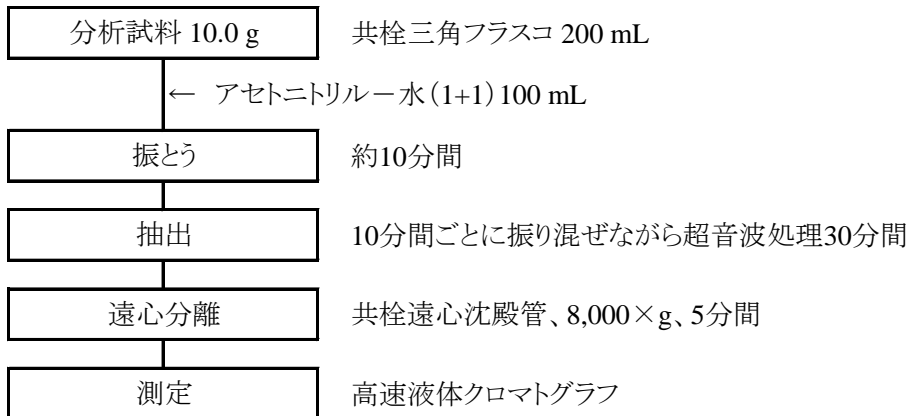
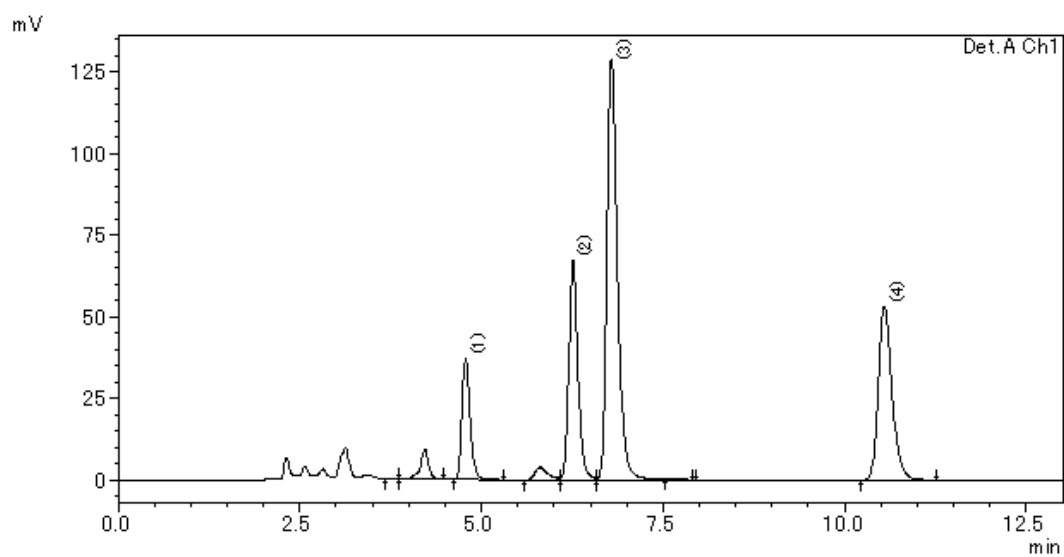


図3 土壤中のシアヌル酸の試験法フローシート

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 μ m)

メラミン及びその関連物質の検量線用混合標準液(各 100 ng 相当量(10 μ g/mL, 10 μ L))

その他の条件は(4.2 a) HPLC の測定条件の例示のとおり