

2 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 —

坂東悦子¹, 甲斐茂浩¹

キーワード メラミン, アンメリン, アンメリド, シアヌル酸, 石灰窒素, 肥料,
高速液体クロマトグラフ, 共同試験

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⁾.

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, 有機質を含まない肥料について繰返し精度, 定量下限等の検討を行った結果, 単一試験室内における試験方法の妥当性が確認されたところである⁴⁾.

今回, HPLC 法による有機質を含まない肥料中のメラミン等の同時測定法の性能評価のため, 共通試料を用いて共同試験を実施し, 試験室間の再現精度を調査したので, その概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 共同試験用試料の調製

流通している石灰窒素, 化成肥料及び硫酸アンモニアを収集し, それぞれ目開き 500 μm のふるいを通すまで粉碎したものにメラミン等を添加し, よく混合して 5 種類の濃度の共同試験用試料を調製した.

共同試験用試料は約 0.8 g をラミジップ袋に入れ密封してそれぞれ 50 袋を調製した. ブラインド試料を提供するため, 共同試験用試料の袋に乱数を付し, それぞれ 2 袋(合計 10 袋)を参加試験室に配付した.

2) 装置及び器具

各試験室に設置している高速液体クロマトグラフ, 超音波発生器, 遠心分離機及び高速遠心分離機を使用した.

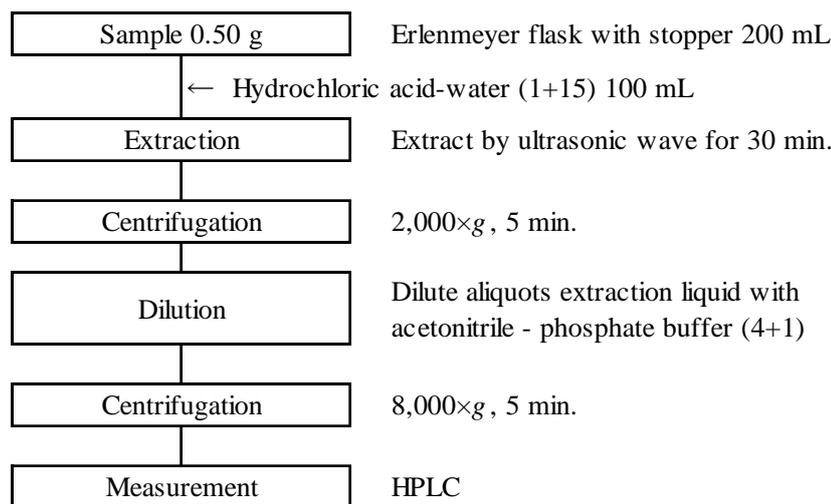
3) メラミン等の測定

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. 塩酸(1+15) 100 mL 加え, 超音波発生器

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

を用いて 30 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、2,000×g で約 5 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 (4+1) 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、8,000×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)。その試料溶液を高速液体クロマトグラフに供し、Table 1 の測定条件で測定し、ピーク面積から試料溶液中の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した。

測定に当たっては、各試験室の高速液体クロマトグラフの操作方法に従った。



Scheme 1 Method flow sheet of melamine and related substances in fertilizer

Table 1 HPLC conditions

Column	TOSOH corporation TSKgel Amide-80 (4.6 mm i.d.×250 mm L, 5 µm particle size)
Guard column	TOSOH corporation TSKgel guardgel Amide-80 (3.2 mm×15 mm)
Column temperatures	40 °C±1 °C
Mobile phase	Acetonitrile - phosphate buffer (4+1)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector system	UV detector at a wavelength of 214 nm

4) 共同試験用試料の均質性試験

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル⁵⁾の均質性試験に従い、各系列の共同試験用試料からそれぞれ 10 試料を抜き取り、各試料につき 2 点併行で 3) に従って分析した。

5) 共同試験

試験に参加した 11 試験室と使用した高速液体クロマトグラフは以下のとおりであり、それぞれの試験室において送付した 10 試料について 3) に従って分析した。

- ・ 一般財団法人材料科学技術振興財団 (Waters 2695 Series)
- ・ 株式会社島津製作所 (島津製作所 Prominence Series)

- ・ コーペンエンジニアリング株式会社 新潟分析センター (島津製作所 Prominence Series)
- ・ 東ソー株式会社 (島津製作所 LC-30A 及び LC-20A Series)
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター (Waters 2695 Series)
- ・ 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 (島津製作所 LC-10A Series)
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター (Agilent technologies 1100 Series)
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター (Waters 2487 デュアルス)
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター (Agilent technologies 1100 Series)
- ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部 (Waters 2695 Series)
- ・ 日本ウォーターズ株式会社 (Waters 2695 Series)

(50 音順)

3. 結果及び考察

1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性試験の成績及び繰返し 2 回×10 試料の一元配置分散分析から得られた統計量を Table 2-1~2-4 に示した。硫酸アンモニア中のシアヌル酸を除いたいずれの試料においても、F 値が $F(9, 10; 0.05)$ を下回ったことから、有意水準 5 % において試料間に有意な差は認められず⁵⁾、共同試験に用いることができる均質性を有していることを確認した。硫酸アンモニア中のシアヌル酸については有意水準 5 % において試料間に有意な差は認められたが、併行精度を含む試料間相対標準偏差が 3.8 % と十分に満足する値であり、共同試験に用いることが出来る均質性を有していることを確認した。

Table 2-1 Homogeneity test results of melamine

Sample	No. of sample ¹⁾	Mean ²⁾ (%) ³⁾	s_r ⁴⁾ (%) ³⁾	RSD_r ⁵⁾ (%)	s_{bb} ⁶⁾ (%) ³⁾	s_{b+r} ⁷⁾ (%) ³⁾	RSD_{b+r} ⁸⁾ (%)	F Value ⁹⁾¹⁰⁾
Calcium cyanamide 1	10 (0)	2.76	0.02	0.8	0.02	0.03	1.1	2.85
Calcium cyanamide 2	10 (0)	0.378	0.005	1.3	0.003	0.005	1.4	1.58
Compound fertilizer containing Calcium cyanamide	10 (0)	0.852	0.022	2.6	0.022	0.031	3.7	2.96
Compound fertilizer	10 (0)	0.186	0.002	1.3	0	0.002	1.3	0.39
Ammonium sulfate	10 (0)	0.0366	0.0012	3.3	0	0.0012	3.3	0.99

1) The number of samples used for analysis; (): The number of outliers

2) Grand mean value (n =The number of samples used for analysis×The number of repetition times (2))

3) Mass fraction

4) Standard deviation of repeatability

5) Relative standard deviation of repeatability

6) Standard deviation of sample-to-sample

7) Standard deviation of sample-to-sample include repeatability $s_{b+r} = \sqrt{s_{bb}^2 + s_r^2}$

8) Relative standard deviation of sample-to-sample include repeatability

9) F value calculated based on analysis of variance (ANOVA)

10) F critical value: $F(9, 10; 0.05) = 3.02$

Table 2-2 Homogeneity test results of ammeline

Sample	No. of sample ¹⁾	Mean ²⁾ (%) ³⁾	s_r ⁴⁾ (%) ³⁾	RSD _r ⁵⁾ (%)	s_{bb} ⁶⁾ (%) ³⁾	s_{b+r} ⁷⁾ (%) ³⁾	RSD _{b+r} ⁸⁾ (%)	F Value ⁹⁾¹⁰⁾
Calcium cyanamide 1	10 (0)	1.52	0.01	0.6	0.00	0.01	0.6	1.03
Calcium cyanamide 2	10 (0)	0.104	0.001	1.2	0.001	0.002	1.5	1.82
Compound fertilizer containing Calcium cyanamide	10 (0)	0.707	0.019	2.7	0.017	0.025	3.6	2.57
Compound fertilizer	10 (0)	0.194	0.002	0.9	0.000	0.002	0.9	1.01
Ammonium sulfate	10 (0)	0.0367	0.0011	3.1	0	0.0011	3.1	0.47

1)~10) Refer to the footnote of Table 2-1

Table 2-3 Homogeneity test results of ammeline

Sample	No. of sample ¹⁾	Mean ²⁾ (%) ³⁾	s_r ⁴⁾ (%) ³⁾	RSD _r ⁵⁾ (%)	s_{bb} ⁶⁾ (%) ³⁾	s_{b+r} ⁷⁾ (%) ³⁾	RSD _{b+r} ⁸⁾ (%)	F Value ⁹⁾¹⁰⁾
Calcium cyanamide 1	10 (0)	1.12	0.02	1.8	0.02	0.03	2.3	2.37
Calcium cyanamide 2	10 (0)	0.367	0.011	3.1	0	0.011	3.1	0.56
Compound fertilizer containing Calcium cyanamide	10 (0)	0.181	0.006	3.3	0.005	0.007	4.1	2.16
Compound fertilizer	10 (0)	0.724	0.025	3.5	0.012	0.028	3.9	1.48
Ammonium sulfate	10 (0)	0.0354	0.0038	10.7	0.0017	0.0042	11.7	1.52

1)~10) Refer to the footnote of Table 2-1

Table 2-4 Homogeneity test results of cyanuric acid

Sample	No. of sample ¹⁾	Mean ²⁾ (%) ³⁾	s_r ⁴⁾ (%) ³⁾	RSD _r ⁵⁾ (%)	s_{bb} ⁶⁾ (%) ³⁾	s_{b+r} ⁷⁾ (%) ³⁾	RSD _{b+r} ⁸⁾ (%)	F Value ⁹⁾¹⁰⁾
Calcium cyanamide 1	10 (0)	1.07	0.01	1.2	0	0.01	1.2	0.67
Calcium cyanamide 2	10 (0)	0.404	0.011	2.8	0	0.011	2.8	0.76
Compound fertilizer containing Calcium cyanamide	10 (0)	0.115	0.003	3.0	0.001	0.004	3.1	1.06
Compound fertilizer	10 (0)	0.799	0.011	1.4	0.011	0.016	2.0	2.96
Ammonium sulfate	10 (0)	0.0374	0.0009	2.4	0.0011	0.0014	3.8	4.22

1)~10) Refer to the footnote of Table 2-1

2) 共同試験成績及び外れ値検定

各試験室から報告された共同試験成績を Table 3 に示した。各系列の分析試料の結果を IUPAC の共同試験プロトコル⁶⁾に従って統計処理した。1 試験室よりプロトコル逸脱によるシアヌル酸の異常値が報告されたため、5

種類全ての試料において 1 試験室のシアヌル酸の試験成績を除外した。プロトコル逸脱による異常値は、溶離液の比率をアセトニトリル-5 mmol/L リン酸塩緩衝液(4+1)から(78+22)に変更したこと及びカラムの劣化によるジシアンジアミドのピークのテーリングが大きいことにより、ジシアンジアミドのテーリングにシアヌル酸のピークが重なったことにより生じた分離不十分によるものであった。同様に溶離液の比率を変更して試験を実施した試験室が 1 試験室あったが、ジシアンジアミドとシアヌル酸のピークの分離が十分であったため、分析値として採用した。プロトコル逸脱による異常値を除外した後、試験成績の外れ値を検出するために Cochran の検定及び Grubbs の検定を実施した結果、11 試験室の試験成績のうちメラミンについては 2 種類の試料で各 2 試験室及び 2 種類の試料で各 1 試験室、アンメリンについては 2 種類の試料で各 2 試験室及び 2 種類の試料で各 1 試験室、アンメリドについては 2 種類の試料で各 2 試験室、シアヌル酸については 3 種類の試料で各 1 試験室の試験成績が外れ値として判定された。

Table 3-1 Individual result of melamine

(mass %)

Lab ID ¹⁾	Calcium cyanamide 1		Calcium cyanamide 2		Compound fertilizer containing Calcium cyanamide		Compound fertilizer		Ammonium sulfate	
A	2.74	2.81	0.384	0.380	0.828	0.837	0.202	0.208	0.0405	0.0383
B	2.82 ²⁾	2.36 ²⁾	0.383	0.383	0.853	0.831	0.203	0.198	0.0392	0.0365
C	2.85	2.85	0.396	0.395	0.877	0.860	0.199	0.195	0.0318	0.0297
D	3.05	3.02	0.440	0.435	1.10 ³⁾	0.962 ³⁾	0.216	0.212	0.0589 ²⁾	0.0472 ²⁾
E	2.96	2.96	0.405	0.401	0.907	0.843	0.207	0.201	0.0374	0.0384
F	2.77	2.80	0.354	0.361	0.807	0.815	0.170	0.171	0.0267	0.0285
G	2.80	2.76	0.410 ²⁾	0.378 ²⁾	0.860	0.827	0.181	0.190	0.0373	0.0338
H	2.83	2.90	0.400	0.404	0.880	0.888	0.208	0.209	0.0365	0.0340
I	2.69	2.81	0.393	0.391	0.868	0.863	0.198	0.195	0.0348	0.0353
J	2.62	2.64	0.362	0.363	0.777	0.786	0.197	0.192	0.0336	0.0335
K	2.37 ²⁾	1.61 ²⁾	0.391	0.399	0.845 ²⁾	0.501 ²⁾	0.191	0.209	0.0287	0.0314

1) Laboratory identification

2) Outlier of Cochran

3) Outlier of Grubbs

Table 3-2 Individual result of ammeline

(mass %)

Lab ID ¹⁾	Calcium cyanamide 1		Calcium cyanamide 2		Compound fertilizer containing Calcium cyanamide		Compound fertilizer		Ammonium sulfate	
A	1.53	1.57	0.105	0.103	0.585 ³⁾	0.591 ³⁾	0.192	0.187	0.0381	0.0341
B	1.58 ²⁾	1.37 ²⁾	0.106	0.106	0.635	0.622	0.196	0.192	0.0378	0.0356
C	1.59	1.58	0.102	0.101	0.634	0.630	0.195	0.194	0.0311	0.0290
D	1.48	1.47	0.104	0.105	0.685	0.581	0.191	0.191	0.0457 ²⁾	0.0292 ²⁾
E	1.64	1.65	0.106	0.108	0.656	0.610	0.200	0.195	0.0368	0.0372
F	1.62	1.63	0.102	0.103	0.619	0.627	0.185	0.189	0.0320	0.0323
G	1.68	1.67	0.115 ²⁾	0.105 ²⁾	0.648	0.645	0.212	0.214	0.0345	0.0326
H	1.61	1.65	0.104	0.107	0.629	0.635	0.197	0.199	0.0345	0.0330
I	1.57	1.63	0.108	0.108	0.641	0.631	0.199	0.199	0.0360	0.0365
J	1.62	1.63	0.107	0.106	0.598	0.601	0.204	0.193	0.0355	0.0350
K	1.24 ²⁾	0.91 ²⁾	0.110	0.106	0.557 ²⁾	0.307 ²⁾	0.175	0.187	0.0345	0.0354

1) Laboratory identification

2) Outlier of Cochran

3) Outlier of Grubbs

Table 3-3 Individual result of ammeline

(mass %)

Lab ID ¹⁾	Calcium cyanamide 1		Calcium cyanamide 2		Compound fertilizer containing Calcium cyanamide		Compound fertilizer		Ammonium sulfate	
A	1.02	1.10	0.364	0.359	0.185	0.183	0.660	0.699	0.0388	0.0382
B	1.21 ²⁾	0.929 ²⁾	0.367	0.357	0.193	0.185	0.695	0.716	0.0424	0.0348
C	1.13	1.11	0.368	0.365	0.198	0.195	0.747	0.700	0.0284	0.0302
D	1.19	1.17	0.411	0.404	0.246 ²⁾	0.214 ²⁾	0.790	0.782	0.0460	0.0437
E	1.15	1.14	0.373	0.377	0.207	0.192	0.772	0.777	0.0377	0.0356
F	1.21	1.23	0.357	0.368	0.202	0.205	0.745	0.721	0.0299	0.0372
G	0.988	1.01	0.353	0.327	0.163	0.165	0.716	0.749	0.0358	0.0306
H	1.13	1.16	0.331	0.349	0.187	0.189	0.784	0.718	0.0337	0.0290
I	1.06	1.08	0.373	0.374	0.201	0.200	0.747	0.705	0.0330	0.0387
J	0.983	0.969	0.322	0.317	0.170	0.169	0.641	0.630	0.0313	0.0298
K	1.04 ²⁾	0.522 ²⁾	0.358	0.365	0.189 ²⁾	0.108 ²⁾	0.611	0.684	0.0266	0.0268

1) Laboratory identification

2) Outlier of Cochran

Table 3-4 Individual result of cyanuric acid

(mass %)

Lab ID ¹⁾	Calcium cyanamide 1		Calcium cyanamide 2		Compound fertilizer containing Calcium cyanamide		Compound fertilizer		Ammonium sulfate	
A	1.06	1.14	0.398	0.417	0.130	0.124	0.685	0.720	0.0375	0.0367
B	1.03	0.971	0.359	0.342	0.0807	0.0835	0.841	0.827	0.0415	0.0408
C	1.24	1.28	0.397	0.433	0.0965	0.102	0.846	0.852	0.0336	0.0330
D	1.23	1.21	0.408	0.411	0.122	0.119	0.776	0.818	0.0530	0.0502
E	1.25	1.07	0.335	0.391	0.104	0.100	0.831 ²⁾	0.665 ²⁾	0.0359	0.0345
F	1.17	1.21	0.383	0.360	0.0935	0.0892	0.819	0.750	0.0287	0.0294
G	1.03 ⁴⁾	0.977 ⁴⁾	0.241 ⁴⁾	0.252 ⁴⁾	0.0454 ⁴⁾	0.0486 ⁴⁾	0.740 ⁴⁾	0.744 ⁴⁾	0.0295 ⁴⁾	0.0278 ⁴⁾
H	1.21	1.23	0.412	0.412	0.110	0.107	0.831	0.818	0.0363	0.0320
I	1.10	1.19	0.405	0.409	0.105	0.108	0.827	0.820	0.0378	0.0414
J	1.09	1.10	0.395	0.416	0.107	0.102	0.744	0.735	0.0337	0.0347
K	0.928 ²⁾	0.541 ²⁾	0.350	0.360	0.0854 ²⁾	0.0422 ²⁾	0.710	0.769	0.0284	0.0303

1) Laboratory identification

2) Outlier of Cochran

4) Unexpected value deviated from a protocol

3) 併行精度及び室間再現精度

試験成績より算出した平均値, 併行標準偏差(s_r)及び併行相対標準偏差(RSD_r)値, 並びに室間再現標準偏差(s_R), 室間再現相対標準偏差(RSD_R)及び室間再現 HorRat 値を Table 4-1~Table 4-4 に示した. 室間再現 HorRat 値は食品分析分野の化学分析方法の精度の評価をするために用いられており, 現在のところ肥料に使用している事例は少ないが参考に記載した. HorRat 値は RSD_R/PRSD_Rにより求められる. なお, PRSD_Rは平均定量値から Horwitz 修正式⁷⁾により求めた.

メラミンの平均値は 0.0343 % (質量分率)~2.83 % (質量分率)であり, その併行標準偏差は 0.0015 % (質量分率)~0.04 % (質量分率), 併行相対標準偏差は 0.8 %~4.5 %, 室間再現標準偏差は 0.0040 % (質量分率)~0.12 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差は 4.2 %~11.6 %であった.

アンメリンの平均値は 0.0346 % (質量分率)~1.60 % (質量分率)であり, その併行標準偏差は 0.0013 % (質量分率)~0.027 % (質量分率), 併行相対標準偏差は 1.3 %~4.3 %, 室間再現標準偏差は 0.0024 % (質量分率)~0.06 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差は 2.3 %~6.9 %であった.

硫酸アンモニアを除くアンメリドの平均値は 0.188 % (質量分率)~1.10 % (質量分率)であり, その併行標準偏差は 0.004 % (質量分率)~0.028 % (質量分率), 併行相対標準偏差は 2.1 %~3.9 %, 室間再現標準偏差は 0.052 % (質量分率)~0.08 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差は 6.5 %~7.6 %であった. 硫酸アンモニア中のアンメリドの平均値は 0.0345 % (質量分率)であり, その併行標準偏差は 0.0031 % (質量分率), 併行相対標準偏差は 8.9 %, 室間再現標準偏差は 0.0056 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差は 16.1 %であった.

硫酸アンモニアを除くシアヌル酸の平均値は 0.105 % (質量分率)~1.15 % (質量分率)であり, その併行標準偏差は 0.003 % (質量分率)~0.06 % (質量分率), 併行相対標準偏差は 2.9 %~4.8 %, 室間再現標準偏差は 0.014 % (質量分率)~0.09 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差は 6.8 %~13.2 %であった. 硫酸アンモニア中のシアヌル酸の平均値は 0.0365 % (質量分率)であり, その併行標準偏差は 0.0015 % (質量分率), 併行相対標準偏差は 4.2 %, 室間再現標準偏差は 0.0067 % (質量分率), 室間再現相対標準偏差は 18.3 %であった.

メラミン及びアンメリンについては、共同試験のすべての共同試験用試料(濃度範囲)ではほぼ満足する室間再現精度が得られた。しかしながら、硫酸アンモニア中のアンメリド及びシアヌル酸の室間再現精度が比較的大きな値を示した。このため、均質性確認試験成績及び共同試験成績を比較し、更に硫酸アンモニアより調製されたクロマトグラムを確認し、この原因を調査した。硫酸アンモニア中のこれらの均質性確認試験及び共同試験の平均値は、アンメリドが0.0354% (質量分率)及び0.0345% (質量分率)で、シアヌル酸が0.0374% (質量分率)及び0.0365% (質量分率)であり、均質性確認試験実施から共同試験実施の期間における化学変化によるこれらの濃度の変動があるとは考えられなかった。また、均質性確認試験の試料間再現標準偏差及び共同試験の併行標準偏差は、アンメリドが0.0042% (質量分率)及び0.0031% (質量分率)で、シアヌル酸が0.0014% (質量分率)及び0.0015% (質量分率)であり、大きな差は認められなかった。共同試験の併行標準偏差は試料間の要因も含むことから、均質性確認試験の試料間再現標準偏差と同じ要因となる。ゆえに、これらの試験の実施期間における試料間のばらつきの要因の変動及び各試験室における試料間を含む室内精度の差は認められず、共同試験に不具合があったとは考えられない。次に、硫酸アンモニウムから調製した試料溶液のクロマトグラム(Fig.1)を確認したところ、アンメリド及びシアヌル酸のピークの近傍にそれらの定量値に影響する夾雑ピーク及びベースラインのドリフトは認められなかった。硫酸アンモニアは単体肥料であり、複合肥料ではより多くの夾雑成分が抽出され、測定値により大きな影響が考えられることから、硫酸アンモニア中の濃度レベルのアンメリド及びシアヌル酸の室間再現精度は不満足とし、妥当性確認された濃度範囲としなかった。

Table 4-1 Statistical analysis of collaborative study results for melamine

Sample	No. of labs p (q) ¹⁾	Mean ²⁾ (%) ³⁾	s_r ⁴⁾ (%) ³⁾	RSD _r ⁵⁾ (%)	s_R ⁶⁾ (%) ³⁾	RSD _R ⁷⁾ (%)	HorRat ⁸⁾
Calcium cyanamide 1	9 (2)	2.83	0.04	1.4	0.12	4.3	1.27
Calcium cyanamide 2	10 (1)	0.391	0.003	0.8	0.023	5.8	1.25
Compound fertilizer containing calcium cyanamide	9 (2)	0.845	0.019	2.2	0.036	4.2	1.03
Compound fertilizer	11 (0)	0.198	0.005	2.6	0.012	6.2	1.22
Ammonium sulfate	10 (1)	0.0343	0.0015	4.5	0.0040	11.6	1.74

1) Number of laboratories, where p =number of laboratories retained after outlier removed and (q)=number of outliers.

2) Grand mean value

(n =The number of participating testing laboratories (p) \times The number of times of repetition (2))

3) Mass fraction

4) Standard deviation of repeatability

5) Relative standard deviation of repeatability

6) Standard deviation of reproducibility

7) Relative standard deviation of reproducibility

8) Horwitz ratio of reproducibility

Table 4-2 Statistical analysis of collaborative study results for ammeline

Sample	No. of labs <i>p</i> (<i>q</i>) ¹⁾	Mean ²⁾ (%) ³⁾	<i>s_r</i> ⁴⁾ (%) ³⁾	RSD _r ⁵⁾ (%)	<i>s_R</i> ⁶⁾ (%) ³⁾	RSD _R ⁷⁾ (%)	HorRat ⁸⁾
Calcium cyanamide 1	9 (2)	1.60	0.02	1.3	0.06	3.8	1.02
Calcium cyanamide 2	10 (1)	0.105	0.001	1.3	0.002	2.3	0.41
Compound fertilizer containing calcium cyanamide	9 (2)	0.629	0.027	4.3	0.023	3.7	0.86
Compound fertilizer	11 (0)	0.195	0.004	2.1	0.009	4.5	0.87
Ammonium sulfate	10 (1)	0.0346	0.0013	3.7	0.0024	6.9	1.04

1)~8) Refer to the footnote of Table 4-1

Table 4-3 Statistical analysis of collaborative study results for ammeline

Sample	No. of labs <i>p</i> (<i>q</i>) ¹⁾	Mean ²⁾ (%) ³⁾	<i>s_r</i> ⁴⁾ (%) ³⁾	RSD _r ⁵⁾ (%)	<i>s_R</i> ⁶⁾ (%) ³⁾	RSD _R ⁷⁾ (%)	HorRat ⁸⁾
Calcium cyanamide 1	9 (2)	1.10	0.02	2.1	0.08	7.6	1.92
Calcium cyanamide 2	11 (0)	0.361	0.008	2.2	0.023	6.5	1.39
Compound fertilizer containing Calcium cyanamide	9 (2)	0.188	0.004	2.2	0.014	7.5	1.46
Compound fertilizer	11 (0)	0.718	0.028	3.9	0.052	7.2	1.72
Ammonium sulfate	11 (0)	0.0345	0.0031	8.9	0.0056	16.1	2.43

1)~8) Refer to the footnote of Table 4-1

Table 4-4 Statistical analysis of collaborative study results for cyanuric acid

Sample	No. of labs <i>p</i> (<i>q</i>) ¹⁾	Mean ²⁾ (%) ³⁾	<i>s_r</i> ⁴⁾ (%) ³⁾	RSD _r ⁵⁾ (%)	<i>s_R</i> ⁶⁾ (%) ³⁾	RSD _R ⁷⁾ (%)	HorRat ⁸⁾
Calcium cyanamide 1	9 (2)	1.15	0.06	4.8	0.09	7.7	1.97
Calcium cyanamide 2	10 (1)	0.390	0.018	4.5	0.029	7.4	1.61
Compound fertilizer containing Calcium cyanamide	9 (2)	0.105	0.003	2.9	0.014	13.2	2.35
Compound fertilizer	9 (2)	0.788	0.026	3.2	0.054	6.8	1.65
Ammonium sulfate	10 (1)	0.0365	0.0015	4.2	0.0067	18.3	2.78

1)~8) Refer to the footnote of Table 4-1

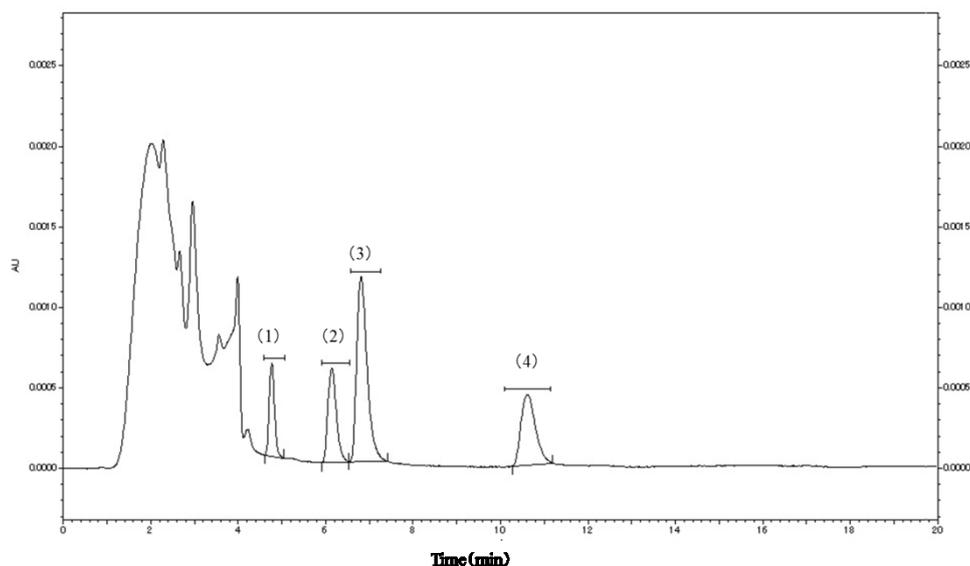


Fig.1 HPLC chromatogram of melamine and its related substances in ammonium sulfate

Substance name (1) Cyanuric acid (2) Ammelide (3) Melamine (4) Ammeline

4. まとめ

11 試験室において 5 種類 (10 点) の石灰窒素, 化成肥料及び硫酸アンモニアを用いて共同試験を実施し, 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測定法の評価を行った. その結果, メラミンの平均値 0.0343 % (質量分率) ~ 2.83 % (質量分率) において室間再現精度 (相対標準偏差) は 4.2 % ~ 11.6 %, アンメルインの平均値 0.0346 % (質量分率) ~ 1.60 % (質量分率) において室間再現精度 (相対標準偏差) は 2.3 % ~ 6.9 % であり, 試験室間の比較による本試験法のメラミン及びアンメルインの室間再現精度はこれらの濃度範囲で満足な成績であった. アンメルドの平均値 0.188 % (質量分率) ~ 1.10 % (質量分率) において室間再現精度 (相対標準偏差) は 6.5 % ~ 7.6 %, シアヌル酸の平均値 0.105 % (質量分率) ~ 1.15 % (質量分率) において室間再現精度 (相対標準偏差) は 6.8 % ~ 13.2 % であり, 試験室間の比較による本試験法のアンメルド及びシアヌル酸の室間再現精度はこれらの濃度範囲で満足な成績であった. 硫酸アンモニア中のアンメルドの平均値 0.0345 % (質量分率) において室間再現精度 (相対標準偏差) は 16.1 %, シアヌル酸の平均値 0.0365 % (質量分率) において室間再現相対標準偏差は 18.3 % であり, この濃度範囲において満足な成績は得られなかった.

石灰窒素及び石灰窒素を原料とする肥料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⁸⁾. 本共同試験の結果より, 0.4 % 程度のメラミン及びその関連物質を含む肥料 (有機質肥料を含まない) の測定は十分に可能であることが確認された.

謝 辞

一般財団法人材料科学技術振興財団, 株式会社島津製作所, コープエンジニアリング株式会社新潟分析センター, 東ソー株式会社及び日本ウォーターズ株式会社の各位に謝意を表します.

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局農産安全管理課長通知:メラミンを含む石灰窒素(水和造粒品)の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) 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)
- 5) Thompson, M., L. R. Ellison S., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78**(1), 145~196 (2006)
- 6) Horwitz W. : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331~343 (1995)
- 7) Thompson, M.: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385~386 (2000)
- 8) 農林水産省消費・安全局長通知: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)

Determination of Melamine and Its Related Substances in Fertilizer by High Performance Liquid Chromatography (HPLC): A Collaborative Study

Etsuko BANDO¹ and Sigehiro KAI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center

A collaborative study was conducted to evaluate high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of melamine and its related substances in fertilizers. The melamine and its related substances were extracted with hydrochloric acid-water (1+15). The extract was centrifuged, and a portion of the supernatant was diluted with mobile phase. The melamine and its related substances were analyzed by HPLC on carbamoyl-modified silica gel column with UV detection at 214 nm. Eleven collaborators were sent 5 sample materials in a blind duplicate design. After identification of outliers with Cochran's test and Grubbs' test, the mean values and the reproducibility relative standard deviation (RSD_R) of determination of melamine were reported 0.0343 % ~ 2.83 % and 4.2 % ~ 11.6 %, respectively. Those of determination of ammeline were reported 0.0346 % ~ 1.60 % and 2.3 % ~ 6.9 %, respectively. Those of determination of ammelide were reported 0.188 % ~ 1.10 % and 6.5 % ~ 7.6 %, respectively. Those of determination of cyanuric acid were reported 0.105 % ~ 1.15 % and 6.8 % ~ 13.2 %, respectively. These results indicated that this method has acceptable precision for determination of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid in this density range. The mean values and the RSD_R of determination of ammelide in ammonium sulfate were reported 0.0345 % and 16.1 %, respectively. Those of determination of cyanuric acid in ammonium sulfate were reported 0.0365 % and 18.3 %, respectively. These results didn't indicate that this method has acceptable precision for determination of ammelide and cyanuric acid in this density range.

Key words melamine, ammeline, ammelide, cyanuric acid, calcium cyanamid, fertilizer, HPLC, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, 7, Collaborative Study 10~21, 2014)