

## シアヌル酸の分析法（暫定法）

シアヌル酸の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法

（適用範囲：飼料（脱脂粉乳を除く。））

### A 試薬の調製

- 1) シアヌル酸標準原液 シアヌル酸 [C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>] 10 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてシアヌル酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、シアヌル酸として 500 µg を含有する。）。
- 2) 内標準原液 安定同位体元素標識シアヌル酸（シアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>）5 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて 1 mL 中にシアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> として 250 µg を含有する内標準原液を調製する。
- 3) 内標準液 使用に際して、内標準原液の一定量を水で正確に希釈し、1 mL 中にシアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> として 2 µg を含有する内標準液を調製する。
- 4) 検量線作成用標準液 使用に際して、シアヌル酸標準原液及び内標準原液の一定量をギ酸-アセトニトリル（1+24）で正確に希釈し、1 mL 中にシアヌル酸として 5~200 ng を含有し、かつシアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> として 10 ng を含有する数点の検量線作成用標準液を調製する。
- 5) 溶離液 A アセトニトリル-10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液（19+1）
- 6) 溶離液 B 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 10 mL にアセトニトリル-水（1+1）を加えて 1 L とする。

### B 定 量

抽出 分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、アセトニトリル-水（1+1）20 mL を加える。更にこの遠心沈殿管に内標準液 250 µL を正確に加えた後、ホモジナイザー<sup>註1</sup>で 1 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 1,600×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れる。全量フラスコの標線までアセトニトリル-水（1+1）を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理<sup>註2</sup> 強塩基性陰イオン交換体ミニカラム<sup>註3</sup>をアセトニトリル 5 mL 及びアンモニア水-水（5+23）5 mL で順次洗浄する。試料溶液 2 mL をあらかじめアンモニア水-水（5+23）3 mL を入れたミニカラムに加え混和し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更にアセトニトリル 5 mL をミニカラムに加えて全量を流出させる。10 mL の共栓試験管をミニカラムの下に置き、ギ酸-アセトニトリル（1+24）2 mL をミニカラムに加えてシアヌル酸を溶出させる。

溶出液をメンブランフィルター（孔径 0.45 µm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフタンデ

ム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各検量線作成用標準液各 5  $\mu\text{L}$  を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カラム：親水性相互作用クロマトグラフィーカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5  $\mu\text{m}$ ）<sup>注4</sup>

溶離液：溶離液 A－溶離液 B（19+1）（8 min 保持）→2 min→（2+3）（10 min 保持）→2 min→（19+1）（5 min 保持）

流速：0.3 mL/min

カラム槽温度：40 °C

(タンデム型質量分析計部<sup>注5</sup>)

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（負イオンモード）

ネブライザーガス：空気（3 L/min）

乾燥ガス：N<sub>2</sub>（15 L/min）

インターフェース温度：350 °C

ヒートブロック温度：300 °C

D L 温度：250 °C

コリジョンガス：Ar（230 kPa）

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表 各物質のモニターイオン条件

測定対象物質	プリカーサー イオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン		コリジョン エネルギー (eV)
		定量用 ( <i>m/z</i> )	確認用 ( <i>m/z</i> )	
シアヌル酸	128	42	-	17
		-	85	10
シアヌル酸- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	131	43	-	16
		-	87	11

計算 得られた選択反応検出クロマトグラムからシアヌル酸及びシアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のシアヌル酸量を算出する。

注 1 POLYTRON PT20SK（KINEMATICA 製）又はこれと同等のもの

2 流速は 1~2 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

3 Oasis MAX (Waters 製、充てん剤量 150 mg、粒径 60 μm、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの

4 SeQuant ZIC-HILIC (Merck Millipore 製、充てん剤はシリカゲル基材にスルホベタイン基 (両性イオン型官能基) を化学結合したもの。本測定条件によるシアヌル酸の保持時間は約 4 分) 又はこれと同等のもの

5 LCMS-8040 (島津製作所製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)
シアヌル酸	成鶏飼育用配合飼料	0.5	5	99.3	4.6
		2.5	5	95.8	0.9
	あまご育成用配合飼料	0.5	5	79.0	5.4
		2.5	5	95.6	3.1
	大豆油かす	0.5	5	103	7.6
		2.5	5	94.8	3.6
魚粉	0.5	5	111	14	
	2.5	5	97.7	1.7	

・定量下限 試料中 0.5 mg/kg

・検出下限 試料中 0.15 mg/kg