

3 脱脂粉乳中の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の開発

沼田 歩美^{*1}, 大島 慎司^{*2}, 高橋 雄一^{*2}

Development of Determination Method of Cyanuric Acid in Dried Skim Milk by LC-MS/MS

NUMATA Ayumi^{*1}, OSHIMA Shinji^{*2} and TAKAHASHI Yuichi^{*2}

(^{*1} Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)
(Now Animal Quarantine Service, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

^{*2} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have studied a quantitative determination method of the cyanuric acid concentration in dried skim milk using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added water to a sample, it was sonicated. Then, cyanuric acid in the sample was extracted with acetonitrile, and the extracted solution was centrifuged. The supernatant (2 mL) was then diluted with acetonitrile-water (1:1) to a volume of 10 mL. The diluted solution was applied to strong anion exchange mini-column (Oasis MAX, Waters Co.; Milford, MA, USA), which was then rinsed with ammonia water (5:23) and acetonitrile. The purified solution was subsequently injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of cyanuric acid.

LC separation was then carried out on a hydrophilic interaction chromatography column (SeQuant ZIC-HILIC, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Merck Millipore Inc.; Burlington, MA, USA) with a gradient of acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (19:1) and 10 mmol/L ammonium acetate dissolved in acetonitrile-water (1:1) as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the negative mode electrospray ionization (ESI⁻) was used.

Recovery tests were conducted on two kinds of dried skim milk. Cyanuric acid was intentionally added at the levels of 0.5 mg/kg and 2.5 mg/kg to samples respectively. The resulting mean recoveries ranged from 89.3 % to 108 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 9.6 %.

In order to verify whether this method can be applied to feeds other than dried skim milk, recovery tests were conducted on two kinds of formula feed, soybean meal and fish meal. Cyanuric acid was intentionally added at the levels of 0.5 mg/kg and 2.5 mg/kg to samples respectively. The resulting mean recoveries ranged from 89.9 % to 99.0 %. The RSD_r was less than 16 %.

Key words: cyanuric acid; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); dried skim milk

キーワード：シアヌル酸；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；脱脂粉乳

1 緒 言

シアヌル酸は、一般にプラスチックに添加する難燃剤や消毒剤の原料、プールの塩素安定剤とし

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 農林水産省動物検疫所

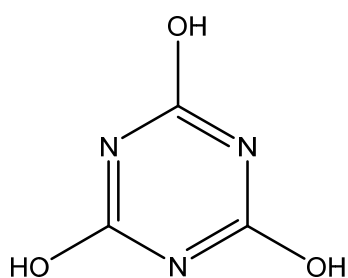
^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

て使用されている¹⁾。シアヌル酸及び類似化合物であるメラミンは、安価で入手が容易であり、窒素原子を多く含んでいるため、食品等に添加され、見かけのたん白質含量を高める欺瞞剤として用いられた事例があった¹⁾。シアヌル酸及びメラミンは、単独で摂取した場合の急性毒性は比較的低いが、同時に摂取した場合、腎不全を誘発する結晶を形成することが示唆されている¹⁾。2007年に米国において、メラミン関連化合物に汚染されたペットフードを摂取したイヌとネコにおける腎不全症例が大規模に発生した。また中国においては、メラミン関連化合物が不正に混入された乳幼児用調製粉乳が原因と思われる乳幼児等の腎結石等の被害が報告されている²⁾。日本において、令和元年8月6日付けで飼料の有害物質の指導基準及び管理基準³⁾が改正され、尿素を除く飼料（飼料原料を含む。）中のメラミン及びシアヌル酸（イソシアヌル酸）として管理基準値が2.5 mg/kgと設定された。改正後の管理基準は令和2年2月6日から適用されているが、シアヌル酸については、その分析法が飼料分析基準⁴⁾に記載されていないことから、分析法の確立が急務となっている。

このため、平成30年度に長久保らは、米国食品医薬品局（FDA）から示されている液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による分析法⁵⁾を基に、飼料中のシアヌル酸のLC-MS/MSによる分析法を開発した⁶⁾。その際、脱脂粉乳について、飼料分析基準別表3の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた併行精度を満たさない結果となり、また内標準である安定同位体元素標識シアヌル酸（以下「シアヌル酸-¹³C₃」という。）の回収率も低い結果であった。

そこで、令和元年度に著者らは、脱脂粉乳中のシアヌル酸の分析法の改良について検討を行ったが、カラム処理の検討において、シアヌル酸とシアヌル酸-¹³C₃の回収率が乖離する結果となった⁷⁾。このことは本来であれば起こりえない現象であることから、今回、令和元年度に得られた結果を精査し、引き続き分析法の改良を検討したので、その概要を報告する。また、改良した分析法が脱脂粉乳以外の試料においても適用可能であるか検討したので、合わせて報告する。

参考にシアヌル酸の構造式等を Fig. 1 に示した。



1,3,5-triazinane-2,4,6-trione

C₃H₃N₃O₃ MW: 129.075 CAS No.: 108-80-5

Fig. 1 Chemical structure of cyanuric acid

2 実験方法

2.1 試料

配合飼料（成鶏飼育用、幼すう育成用、ほ乳期子豚育成用、種豚飼育用、ぶり類育成用及びこい育成用）、魚粉、イカミール、エビミール及び大豆油かすは、それぞれ目開き1 mmのスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し、分析用試料とした。脱脂粉乳は、1 mmのふるいを通したも

のを分析用試料として用いた。

魚粉 2 点はマレーシア産及びタイ産を用いた。エビミール 2 点はマレーシア産及びエクアドル産を用いた。イカミール 2 点の産地は不明であった。脱脂粉乳 4 点のうち 1 点はアメリカ産を用いた。その他の試料は国産を用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layers	Grains	55	Corn, rice, wheat
	Oil seed meal	26	Soybean meal, corn germ meal, rapeseed meal, corn gluten meal, sesame meal, linseed meal
	Brans	3	Rice bran, corn gluten feed
	Animal by-products	2	Fish meal
	Others	14	Calcium carbonate, animal fat, corn steep liquor, calcium phosphate, salt, paprika extract, silicate anhydride, fructo-oligo saccharide syrup, rapeseed oil foots, feed additives
For starting chicks	Grains	61	Corn, milo
	Oil seed meal	30	Soybean meal
	Animal by-products	3	Fish meal, swine and poultry by-product meal
	Brans	2	Defatted rice bran, wheat bran, corn gluten feed
	Others	4	Calcium phosphate, calcium carbonate, salt, isomalto-oligo saccharide syrup, animal fat, alfalfa meal, feed additives
For suckling pigs	Animal by-products	46	Dried skim milk, dried whey, fish meal, plasma protein, casein
	Grains	30	Bread crumb, soy by extruder, wheat flour
	Oil seed meal	3	Fermented soybean meal, concentrated soy protein
	Brans	1	Defatted rice bran
	Others	20	Glucose, lactose, animal fat, medium chain fatty acid calcium, salt, lactic acid bacterium, sucrose, cellulose, citric acid, lactic acid, tartrate, malic acid, wood fiber, silicate anhydride, fructo-oligo saccharide syrup, montmorillonite, lactic acid bacteria culture, yeast extract, licorice extract, stevia, yeast, shellac, dry yeast cell wall, calcium carbonate, calcium phosphate, vegetable oil, chocolate, feed additives
For breeding pigs	Grains	64	Corn, milo
	Oil seed meal	20	Soybean meal, rapeseed meal, corn germ meal
	Brans	10	Wheat bran, corn gluten feed, defatted rice bran
	Others	6	Extracted green tea meal, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, montmorillonite, yeast, corn steep liquor, confectionery meal, feed additives
For yellowtail fishes	Animal by-products	53	Fish meal, shrimp meal
	Grains	15	Starch, flour
	Brans	6	Lysine fermented lees meal, glutamic acid fermented lees meal
	Others	26	Fish oil, vegetable oil, yeast, calcium phosphate, garlic powder, seaweed powder, marigold extract, cacao bean husk, feed additives
For carps	Animal by-products	33	Fish meal
	Grains	31	Wheat bran, sesame, heat treated soybean meal, dextrin
	Brans	18	Defatted rice bran
	Oil seed meal	11	Soybean meal
	Others	7	Calcium phosphate, fish oil, vegetable oil, calcium carbonate, feed additives

2.2 試薬

- 1) アセトニトリルは LC-MS 用, アンモニア水は特級 (質量分率 28%), ギ酸は LC-MS 用 (質量分率 99%), 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用を用いた (いずれも富士フイルム和光純薬製). 水は Milli-Q Integral 5 (Merck Millipore 製) により精製した超純水 (JIS K0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた.
- 2) シアヌル酸標準原液
シアヌル酸標準品 (ChromaDex, Inc 製, 純度 99.2%) 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した (この液 1 mL は, シアヌル酸として 500 μg を含有).
- 3) シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準原液
シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 標準品 (林純薬工業製, 純度 $^{13}\text{C}_3$ 97.7%) 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シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準原液を調製した (この液 1 mL は, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ として 250 μg を含有).
- 4) 検量線作成用シアヌル酸標準液
使用に際して, シアヌル酸標準原液及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準原液を超音波処理した後, それぞれの一定量をギ酸-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 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 及び 200 ng を含有し, かつシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ として 10 ng を含有する各検量線作成用シアヌル酸標準液を調製した (用時調製).
- 5) シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準液
使用に際して, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準原液を超音波処理した後, 一定量を水で正確に希釈し, 1 mL 中にシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ として 4 μg を含有する内標準液を調製した (用時調製).
- 6) 溶離液 A アセトニトリル-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (19+1)
- 7) 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 とした.

2.3 装置及び器具

- 1) 超音波洗浄機: MCS-6 アズワン販売
- 2) ホモジナイザー: POLYTRON PT20SK KINEMATICA 製
- 3) 強塩基性陰イオン交換体ミニカラム (以下「ミニカラム」という.): Oasis MAX (充てん剤量 150 mg, リザーバー容量 6 mL, 粒径 60 μm) Waters 製
- 4) メンブランフィルター: 13HP045AN (孔径 0.45 μm , 直径 13 mm, ポリテトラフルオロエチレン) 東洋濾紙製
- 5) LC-MS/MS:
LC 部: Nexera X2 島津製作所製
MS 部: LCMS-8040 島津製作所製

2.4 定量方法

1) 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, 水 10 mL を加えた後, 15 分間超音波処理した. この遠心沈殿管にアセトニトリル 10 mL を加え, 更にシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準液 250 μL を正確に加えた後, ホモジナイザーで 1 分間かき混ぜて抽出した. 抽出液を

1600×g で 10 分間遠心分離し，上澄み液 2 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた．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した．

2) カラム処理

ミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及びアンモニア水 (5+23) 5 mL で順次洗浄した．試料溶液 2 mL をあらかじめアンモニア水 (5+23) 3 mL を入れたミニカラムに加えて混和した後，液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた．さらに，アンモニア水 (5+23) 5 mL をミニカラムに加えて流出させた後，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た（流速は 1~2 mL/min 程度となるように吸引マニホールドを使用した．以下同様．）．

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 をミニカラムに正確に加えてシアヌル酸を溶出させた後，全量を流出させた．

溶出液をメンブランフィルターでろ過し，LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした．

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用シアヌル酸標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し，選択反応検出（以下「SRM」という．）クロマトグラムを得た．測定条件を Table 2 及び 3 に示した．

Table 2 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	SeQuant ZIC-HILIC (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Merck Millipore
Mobile phase	Solution A – solution B (19:1) (hold for 8 min) → 2 min → (2:3) (hold for 10 min) → 2 min → (19:1) (hold for 5 min) Solution A: 10 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (1:19) Solution B: 1 mmol/L ammonium acetate solution (10 mL) was filled up to 1 L with acetonitrile-water (1:1)
Flow rate	0.3 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N ₂ (3 L/min)
Drying gas	N ₂ (15 L/min)
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	300 °C
Desolvation line temperature	250 °C

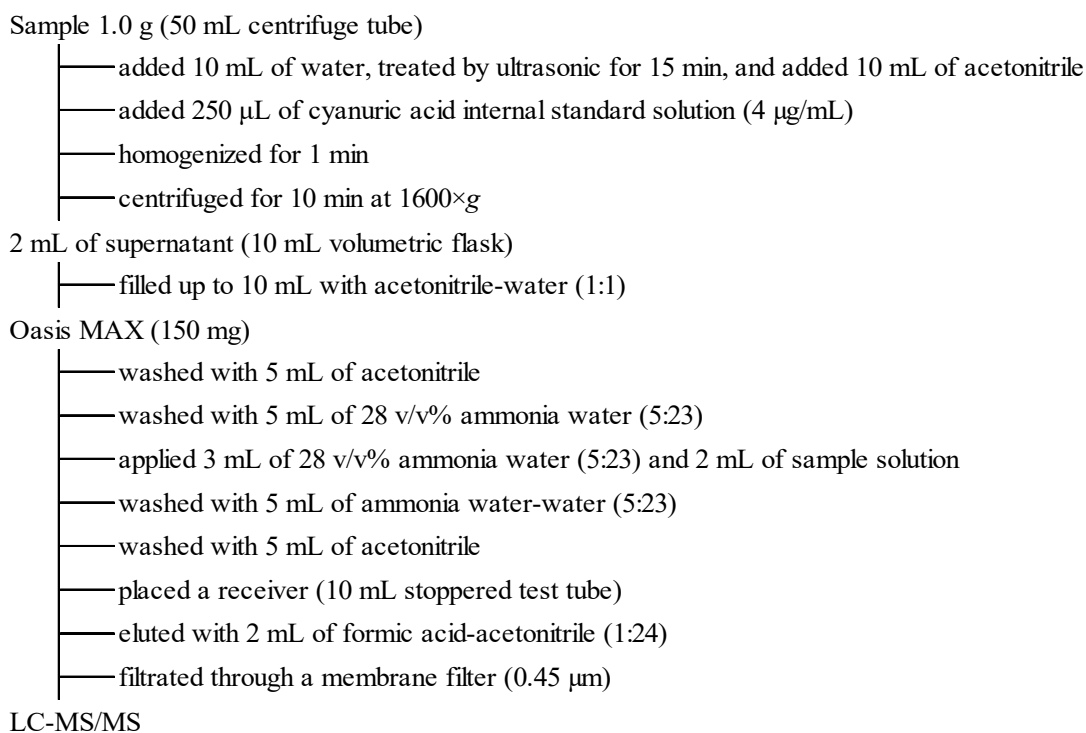
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Cyanuric acid	128	42	-	17
		-	85	10
Cyanuric acid- ¹³ C ₃	131	43	-	16
		-	87	11

4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 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した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for cyanuric acid in feed

2.5 カラム処理の検討方法

本法に従って抽出を行い、遠心分離後の上澄み液 1, 2 及び 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた後、シアヌル酸 (2.5 mg/kg 相当量, 最終試料溶液中で 12.5, 25 及び 50 ng/mL) 及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ (1 mg/kg 相当量, 同 5, 10 及び 25 ng/mL 相当量) を加え、試料溶液をミニカラムに負荷した。更にアンモニア水 (5+23) 5 mL をミニカラムに加えて流出させた後、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た。また、同じ全量フラスコの試料溶液をミニカラムに負荷した後、アセトニトリル 5 mL, アンモニア水 (5+23) 5 mL の順でミニカラムに加えて同様に流出させた。その後、本法に従い操作し、LC-MS/MS で測定した後、絶対検量線法によりシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の回収率を求めた。なお、回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

2.6 妨害物質の検討で用いた定量方法

2.4 に従って得られたピークに妨害ピークが重なっているか確認するため、LC-MS/MS 測定条件のうちカラム及びグラジェントを以下のとおり変更することにより確認を行った。なお、液体クロマトグラフ部の測定条件以外は 2.4 に従った。

カ ラ ム : TSK gel Amide-80 (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm) 東ソー製

溶 離 液：10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (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

2.7 添加回収試験

2.2 の 2) のシアヌル酸標準原液を超音波処理した後、水で正確に希釈し添加に用いた。

シアヌル酸として、0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 25 ng/mL）になるよう試料にそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。なお、回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

3 結果及び考察

3.1 シアヌル酸標準原液の超音波処理

今回の検討において、検量線作成用標準液を LC-MS/MS で測定した際にシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ のピークの強度が低下し、形状が不良となり、定量が困難な場合があった。そこで、ガラスへの吸着が疑われたため、検量線作成用標準液を調製する前にシアヌル酸標準原液及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準原液を超音波処理したところ、当該事項が改善されたため、以後は同操作を実施することとした。

3.2 脱脂粉乳中のシアヌル酸の分析法の検討

1) カラム処理の検討

i 令和元年度の結果の検証

令和元年度の飼料分析基準検討会に報告したカラム処理の検討において、シアヌル酸とシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の回収率が乖離する結果となった。このことは本来であれば起こりえない現象であり、LC-MS/MS のパラメーター設定等に何らかの問題があると飼料分析基準検討会外部委員より指摘を受けた。

当該事項を検証するため、2.5 により令和元年度と同一の脱脂粉乳を用いて再度検討を実施した。なお、内標準法ではシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ によりシアヌル酸の回収率が補正されるため、イオン化阻害等による見かけの回収率の低下を把握しづらいことから絶対検量線法によりシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の回収率を求めた。その結果は Table 4 のとおり、シアヌル酸とシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の回収率に乖離は認められなかった。令和元年度の結果の再現性が得られず、原因究明が困難な状況となったが、結果が改善されたこと、また、LC-MS/MS のパラメーター設定にも問題は認められなかったことから、当該事項の改善を目的とした分析操作、測定条件等について令和元年度からの変更は行わずに以降の検討を進めることとした。なお、当検討の前には機器メーカーのメンテナンスにより LC-MS/MS の MS 部の洗浄を行っている。併せて、LC-MS での測定も検討したが、シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ のピークが妨害ピークと重なり、定量が困難であった。

Table 4 Effects of dilution factor of supernatant and washing mini column on recoveries for cyanuric acid and cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$

Order of washing solution flow	Dilution factor of supernatant	Recovery ^{a)} (%)	
		Cyanuric acid ^{b)}	Cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$ ^{b)}
Acetonitrile	2.5	46.5	44.4
→	5	79.8	78.4
Ammonia water-water (5:23)	10	75.7	71.0
Ammonia water-water (5:23)	2.5	36.7	34.4
→	5	66.2	63.6
Acetonitrile	10	75.4	73.9

 a) Mean ($n = 2$)

b) Absolute calibration curve method

ii カラム処理の洗浄順の検討

試料溶液負荷後のミニカラムの洗浄については、令和元年度の報告ではアセトニトリル、アンモニア水 (5+23) の順で行うこととしたが、カラム処理後に得られた試料溶液に白濁が見られたこと、また、アンモニア水の残存量により溶出液の pH が変わり、LC-MS/MS による測定値に影響が出ることが懸念されることから、洗浄の順番をアンモニア水 (5+23)、アセトニトリルに変更することについて検討を行った。

令和元年度とは異なる脱脂粉乳を用いて 2.5 によりシアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の回収率を求めた。Table 4 の結果から、遠心分離後の上澄み液を 10 倍希釈した場合でも良好な結果であったが、目標とする定量下限相当濃度 (0.5 mg/kg 相当量、最終試料溶液中で 2.5 ng/mL) を測定した時に得られるピークの SN 比が 10 未満となることが懸念されたため、5 倍希釈で実施することとした。その結果は Table 5 のとおりであり、アンモニア水 (5+23)、アセトニトリルの順で洗浄した方法では、カラム処理後に得られた試料溶液に白濁が見られず、シアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の回収率はアセトニトリル、アンモニア水 (5+23) の順で洗浄した方法と同様に良好な結果であった。よって、試料溶液負荷後のミニカラムの洗浄はアンモニア水 (5+23)、アセトニトリルの順で行うこととした。

Table 5 Effects of washing mini column on recoveries for cyanuric acid and cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$

Order of washing solution flow	Dilution factor of supernatant	Recovery ^{a)} (%)	
		Cyanuric acid ^{b)}	Cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$ ^{b)}
Acetonitrile → Ammonia water-water (5:23)	5	75.8	81.8
Ammonia water-water (5:23) → Acetonitrile	5	87.2	89.2

 a) Mean ($n = 2$)

b) Absolute calibration curve method

2) 妨害物質の検討

脱脂粉乳 3 検体を用い、2.4 により調製 (ただしシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ 内標準液は添加せず。) した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認した。その結果、全

てシアヌル酸と同じ保持時間にピークが認められ (0.13~0.27 mg/kg) , 定量イオンと確認イオンの比も標準液と同等であった. そこで, 2.6 に従ってカラム及びグラジェント条件を変更して確認を行ったところ, シアヌル酸の定量値に大きな違いがなかったことから, 当該ピークはシアヌル酸であると判断し, いずれの試料においてもシアヌル酸の定量を妨げるピークは認められなかった. また, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ については保持時間にピークは認められなかった.

なお, 得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した.

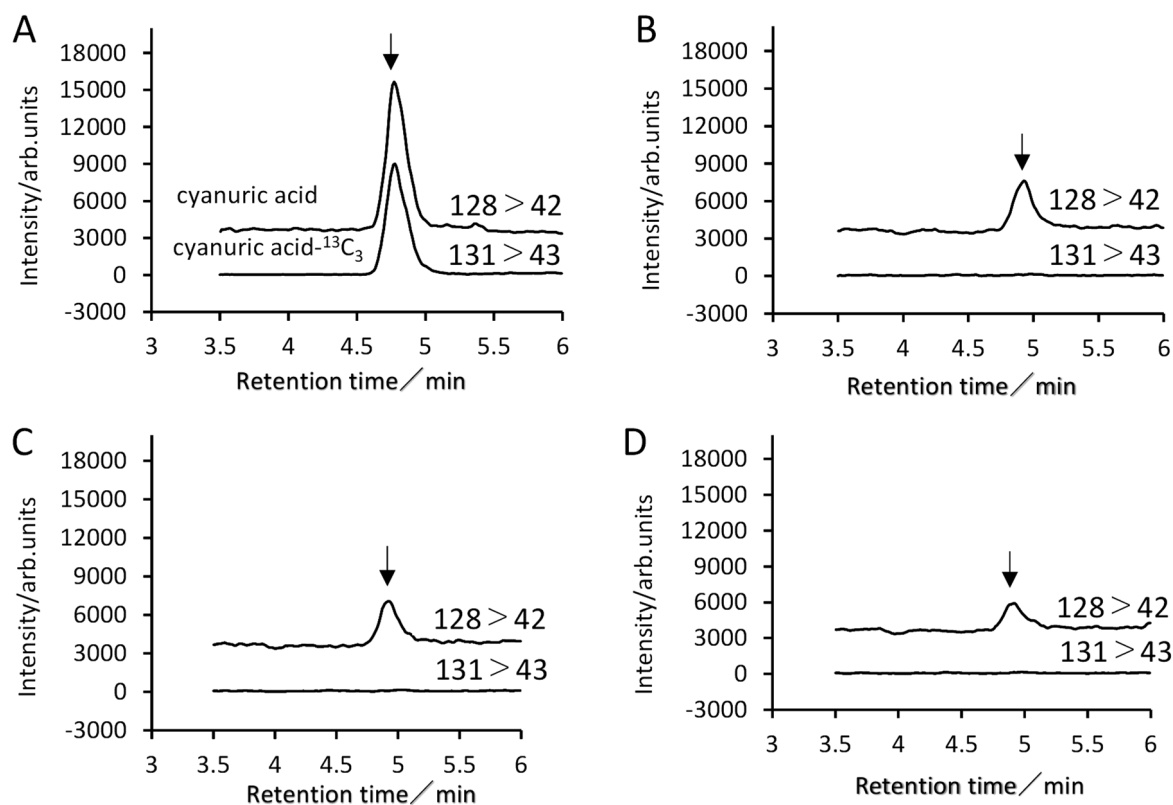


Fig. 2 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of cyanuric acid and cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$ in standard and sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention times of cyanuric acid and cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$.)

A: Standard solution (10 ng/mL: 0.05 ng as cyanuric acid)

B~D: Sample solutions (dried skim milk)

3) 添加回収試験

脱脂粉乳 2 検体について, 2.7 により添加回収試験を実施した. その結果は Table 6 のとおり, シアヌル酸の平均回収率は 89.3~108 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 9.6 %以下の成績が得られた. また, シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の平均回収率は 50.4~76.7 %であった. これらは, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値 (真度: 70 %以上 120 %以下, 内標準の回収率: 40 %以上, 精度: 17.7 %以下 (添加濃度: 0.5 mg/kg) 又は 13.9 %以下 (添加濃度: 2.5 mg/kg)) を満たす結果であった.

なお, 得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した.

Table 6 Recoveries for cyanuric acid

Spiked level (mg/kg)	Dried skim milk 1		Dried skim milk 2	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.5	108	9.0	107	9.6
2.5	89.3	2.2	100	4.8

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

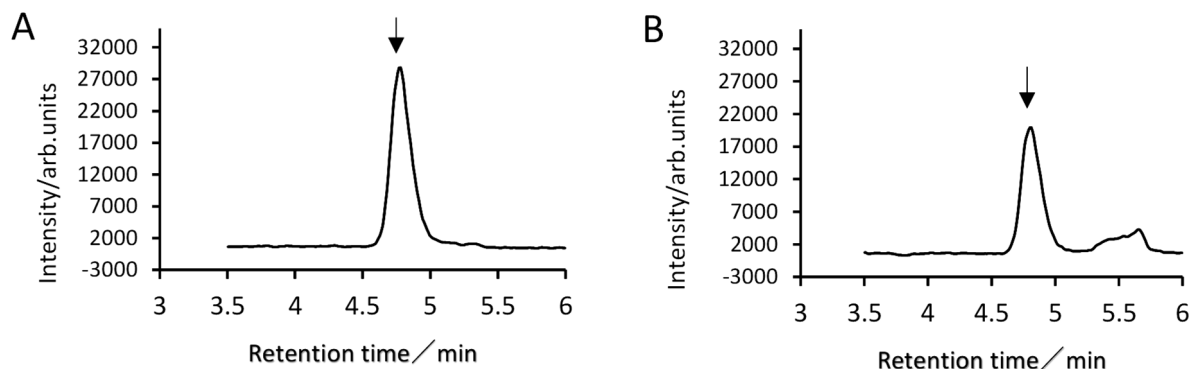


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of cyanuric acid in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of cyanuric acid.)

A: Standard solution (25 ng/mL: 0.125 ng as cyanuric acid)

B: Sample solution of dried skim milk (spiked at 2.5 mg/kg of cyanuric acid (as 25 ng/mL in sample solution))

3.3 脱脂粉乳以外の試料への適用拡大の検討

飼料全般について同一の分析法で効率的に分析できるようにするため、本法が脱脂粉乳以外の試料においても適用可能かどうか、以下の検討を行い確認した。

1) 妨害物質の検討

鶏用配合飼料 2 検体（幼すう育成用及び成鶏飼育用），豚用配合飼料 2 検体（ほ乳期子豚育成用及び種豚飼育用），養魚用配合飼料 2 検体（ぶり類育成用及びこい育成用），大豆油かす 2 検体，魚粉 2 検体，イカミール 2 検体，エビミール 2 検体を用い，3.2 と同様に妨害物質の検討を行った．その結果，全てシアヌル酸と同じ保持時間にピークが認められ（0.04~0.54 mg/kg），定量イオンと確認イオンの比も標準液と同等であった．そこで，2.6 に従ってカラム及びグラジェント条件を変更して確認を行ったところ，その定量値に大きな違いがなかったことから，当該ピークはシアヌル酸であると判断し，いずれの試料においてもシアヌル酸の定量を妨げるピークは認められなかった．また，シアヌル酸-¹³C₃ については保持時間にピークは認められなかった．

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した．

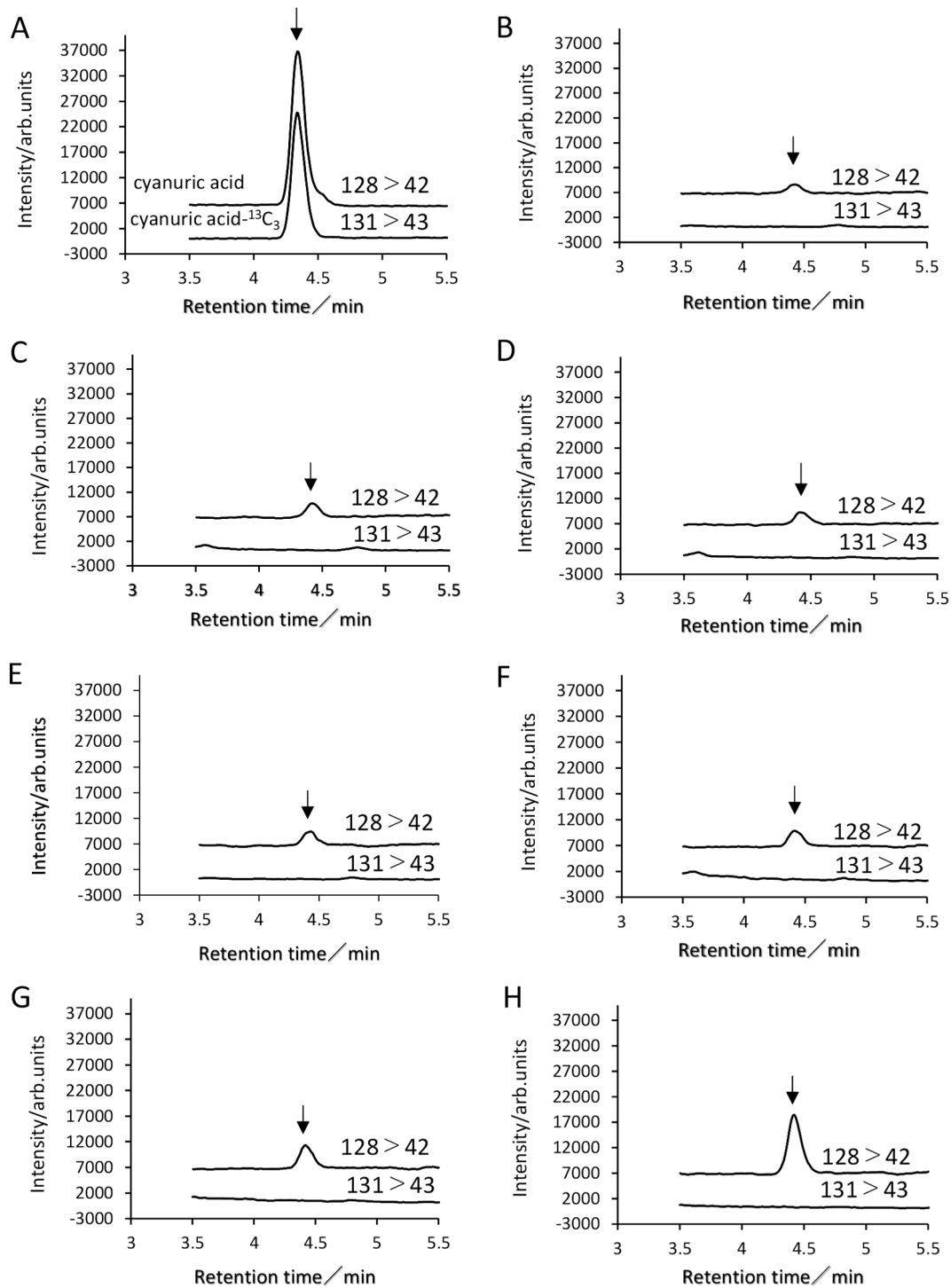


Fig. 4 Typical SRM chromatograms of cyanuric acid and cyanuric acid-¹³C₃ in standard and sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention times of cyanuric acid and cyanuric acid-¹³C₃)

A: Standard solution (10 ng/mL: 0.05 ng as cyanuric acid)

B~H: Blank sample solutions (B: formula feed for layers, C: formula feed for breeding pigs,

D: formula feed for carps, E: soybean meal, F: fish meal, G: squid meal, H: shrimp meal)

2) 添加回収試験

配合飼料（成鶏飼育用及びぶり類育成用），大豆油かす及び魚粉について，2.7 により添加回収試験を実施した．その結果は Table 7 のとおり，シアヌル酸の平均回収率は 89.9~99.0 %， RSD_r は 16 % 以下の成績が得られた．また，シアヌル酸- $^{13}C_3$ の平均回収率は 72.0~79.4 % であった．これらは，妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値（真度：70 % 以上 120 % 以下，内標準の回収率：40 % 以上，精度：17.7 % 以下（添加濃度：0.5 mg/kg）又は 13.9 % 以下（添加濃度：2.5 mg/kg））を満たす結果であった．

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した．

Table 7 Recoveries for cyanuric acid

Spiked level (mg/kg)	Formula feed for layers		Formula feed for yellowtail fish		Soybean meal		Fish meal	
	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0.5	99.0	7.2	93.3	2.5	89.9	5.8	98.1	16
2.5	98.9	1.7	95.3	1.0	94.4	1.0	96.2	2.5

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

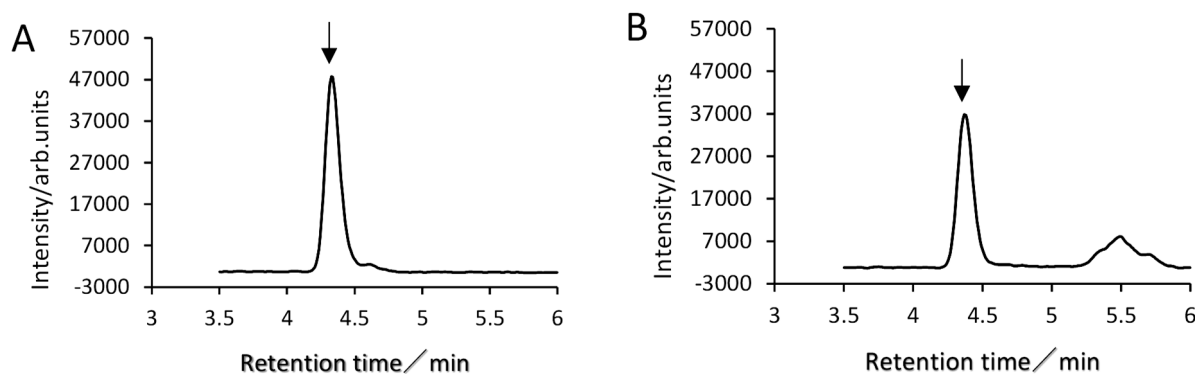


Fig. 5 Typical SRM chromatograms of cyanuric acid in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of cyanuric acid.)

A: Standard solution (25 ng/mL: 0.125 ng as cyanuric acid)

B: Sample solution of fish meal (spiked at 2.5 mg/kg of cyanuric acid (as 25 ng/mL in sample solution))

3.4 定量下限及び検出下限の検討

シアヌル酸の検量線が直線性を示した範囲，各 2.5~200 ng/mL の下端付近となる濃度（試料中で 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中濃度 5 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果は良好であり（Table 6 及び 7），得られたピークの SN 比が 10 以上であったため，本法のシアヌル酸の定量下限の濃度は試料中で 0.5 mg/kg とした．この濃度は，飼料中のシアヌル酸の基準値 2.5 mg/kg に対して 1/5 であり，妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値に対して 1/5 以下）を満たしていた．

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 以上となる濃度を求めた。その結果、検出下限は試料中で 0.2 mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値に対して 1/10 以下）を満たしていた。

4 まとめ

脱脂粉乳中に含有するシアヌル酸について、LC-MS/MS を用いた分析法の飼料分析基準への収載の可否を検討した。さらに、脱脂粉乳以外の試料で本法が適用可能か検討した。ミニカラムの洗浄を令和元年度に検討した順番とは逆の、アンモニア水（5+23）、アセトニトリルの順に変更し、以下の結果が得られた。

- 1) 脱脂粉乳 3 検体、鶏用配合飼料 2 検体（幼すう育成用及び成鶏飼育用）、豚用配合飼料 2 検体（ほ乳期子豚育成用及び種豚飼育用）、養魚用配合飼料 2 検体（ぶり類育成用及びこい育成用）、大豆油かす 2 検体、魚粉 2 検体、イカミール 2 検体、エビミール 2 検体について、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 2) 脱脂粉乳、配合飼料（成鶏飼育用及びぶり類育成用）、大豆油かす及び魚粉にシアヌル酸として 0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 3) 本法のシアヌル酸の定量下限は 0.5 mg/kg、検出下限は 0.15 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

文 献

- 1) E. Braekevelt, B. P.-Y. Lau, S. Feng, C. Ménard and S. A. Tittlemier : Determination of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid in infant formula purchased in Canada by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Additives and Contaminants*, **28**, 698-704 (2011).
- 2) Sherri Turnipseed, Christine Casey, Cristina Nochetto and David N. Heller : Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LC-MS/MS, *Laboratory Information Bulletin No.4421*, **24**, 1-14 (2008), U.S. Food and Drug Administration.
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) Michael Smoker and Alexander J. Krynitsky : Interim method for determination of melamine and cyanuric acid residues in foods using LC-MS/MS: Version 1.0, *Laboratory Information Bulletin No.4422*, 1-26 (2008), U.S. Food and Drug Administration.
- 6) 長久保 眞平, 野村 昌代, 青山 幸二 : 飼料中の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の検討, *飼料研究報告*, **44**, 38-48 (2019).
- 7) 沼田 歩美, 高橋 雄一, 長久保 眞平 : 脱脂粉乳中の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定量法の開発, *飼料研究報告*, **45**, 28-38 (2020).