

### 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定量法の開発

沼田 歩美\*, 高橋 雄一\*, 長久保 眞平\*

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

Ayumi NUMATA\*, Yuichi TAKAHASHI\* and Shinpei NAGAKUBO\*

(\* Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

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. Next, 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 acetonitrile and ammonia water. 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 three 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 94.6 % to 107 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was less than 15 %.

**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

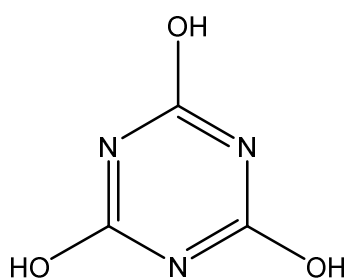
シアヌル酸は、一般にプラスチックに添加する難燃剤や消毒剤の原料、プールの塩素安定剤として使用されている<sup>1)</sup>。シアヌル酸及び類似化合物であるメラミンは、安価で入手が容易であり、窒素原子を多く含んでいるため、食品等に添加され、見かけのたん白質含量を高める欺瞞剤として用いられることがある<sup>2)</sup>。シアヌル酸及びメラミンは、単独で摂取した場合の急性毒性は比較的低いが、同時に摂取した場合、腎不全を誘発する結晶を形成することが示唆されている<sup>3)</sup>。2007年に米国において、メラミン関連化合物に汚染されたペットフードを摂取したイヌとネコにおける腎不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

\* 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

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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>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（令和2年2月6日施行）。しかし、シアヌル酸については、その分析法が飼料分析基準<sup>4)</sup>に収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。

昨年度、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。）による定量法<sup>5)</sup>（以下「FDA 法」という。）を基に、飼料中のシアヌル酸の LC-MS/MS による定量法を開発した<sup>6)</sup>。その際、脱脂粉乳での添加回収試験にお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-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>」という。）の回収率も低い結果であったことから、更なる検討が必要とされた。そこで今回、脱脂粉乳を対象としてシアヌル酸の定量法の改良について検討したので、その概要を報告する。

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

C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> MW: 129.075 CAS No.: 108-80-5

Fig. 1 Chemical structure of cyanuric acid

## 2 実験方法

### 2.1 試料

脱脂粉乳は 1 mm のふるいを通じたものを用いた。

### 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（富士フイルム和光純薬製、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 を含有する。）。
- 3) シアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 内標準原液  
シアヌル酸-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 標準品（林純薬工業製、純度 <sup>13</sup>C<sub>3</sub> 97.3%）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  $\mu\text{g}$  を含有する．）．

#### 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- $^{13}\text{C}_3$  内標準原液の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  $\mu\text{g}$  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 $\mu\text{m}$ ） Waters 製

#### 4) メンブランフィルター：13HP045AN（孔径 0.45 $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$  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 $\times$ 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-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-水（5+23）3 mL を入れたミニカラムに加えて混和し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた．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．）後、アンモニア水-水（5+23）2 mL をミニカラムに加えて全量を流出させた．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．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  $\mu$ L 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 1 及び 2 に示した。

Table 1 LC-MS/MS operating conditions

Column	SeQuant ZIC-HILIC (2.1 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m), Merck Millipore
Mobile phase	Solution A – solution B (19:1) (hold for 8 min) $\rightarrow$ 2 min $\rightarrow$ (2:3) (hold for 10 min) $\rightarrow$ 2 min $\rightarrow$ (19:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.3 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N <sub>2</sub> (3 L/min)
Drying gas	N <sub>2</sub> (15 L/min)
Interface temperature	350 $^{\circ}$ C
Heat block temperature	300 $^{\circ}$ C
Desolvation line temperature	250 $^{\circ}$ C

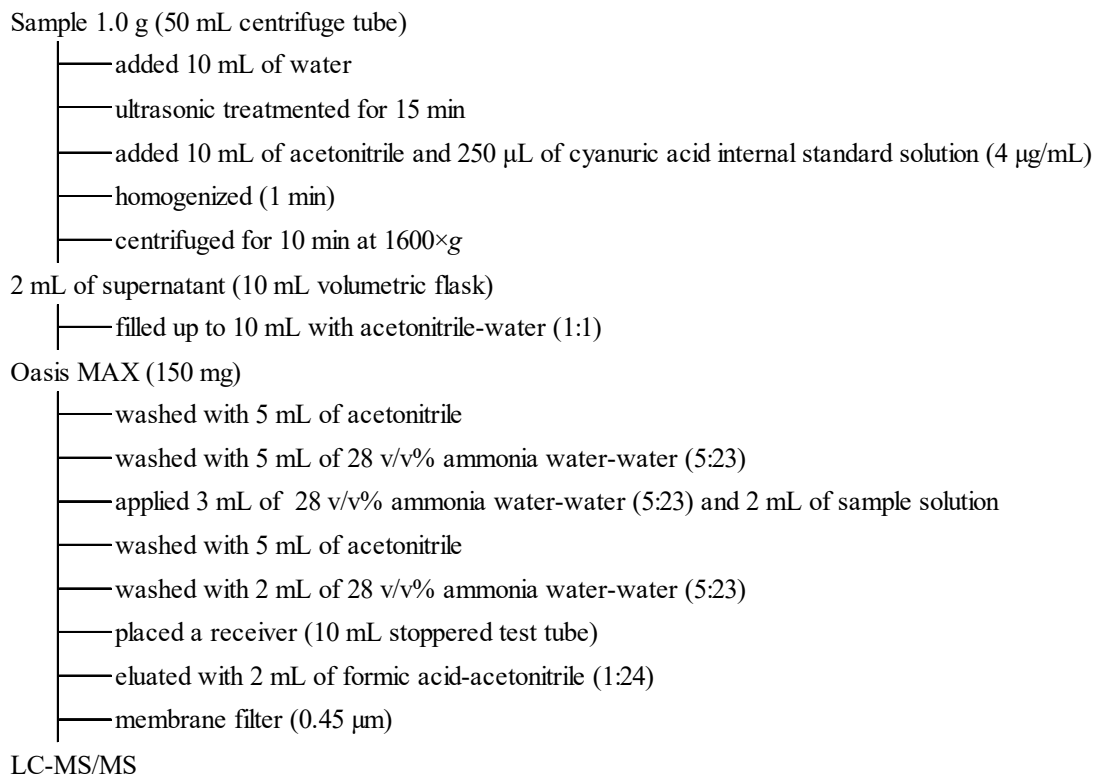
Table 2 MS/MS parameters

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- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	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-<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 dried skim milk

## 2.5 カラム処理の検討方法

2.4 の 1) 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 2.5, 5 及び 10 ng/mL 相当量) を加え、以下、2.4 の 1) から 2) に従って試料溶液をミニカラムに負荷した。更にアンモニア水-水 (5+23) 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。) 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。又は、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後、アンモニア水-水 (5+23) 5 mL をミニカラムに加えて全量を流出させた。以下、2.4 の 2) から 4) に従い操作した。

シアヌル酸及びシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  の回収率は絶対検量線法により算出した。なお、シアヌル酸の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 アンモニア水-水 (5+23) による洗浄液量の検討で用いた定量方法

2.4 により調製した上澄み液 2 mL を正確に入れた 10 mL の全量フラスコに、シアヌル酸を 0.5 又は 2.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 又は 25 ng/mL 相当量), シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  を 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を添加し、以下、2.4 の 1) の全量フラスコの定容から 2) の操作を行った。ただし、2.4 の 2) のアセトニトリルの洗浄後のアンモニア水-水 (5+23) の洗浄液量は、2 mL 及び 5 mL とした。更に 2.4 の 3) に従い LC-MS/MS で測定した後、絶対検量線法によりシアヌル酸の回収率を求めた。なお、シアヌル酸の回収率は各試料のブランク値を差し引いて算出した。

## 2.7 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  $\mu\text{m}$ ） 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） $\rightarrow$   
2 min  $\rightarrow$ （2+3）（10 min 保持） $\rightarrow$  2 min  $\rightarrow$ （19+1）（5 min 保持）  
流速：0.3 mL/min  
カラム槽温度：40  $^{\circ}\text{C}$

## 2.8 添加回収試験

2.2 の 2) のシアヌル酸標準原液を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 相当量）になるよう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定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。なお、シアヌル酸の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- $^{13}\text{C}_3$ が低回収率となった原因の究明

昨年度実施した脱脂粉乳を用いた添加回収試験の結果、シアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  の回収率が 30.9 % 以下であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（40 % 以上）を満たしていなかった。そこで、前処理のどの段階がシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  の低回収率の原因となっているのかを、シアヌル酸を指標として次の方法で確認した。

2.4 の各段階（下記 1)~4)）で 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量）の標準液を添加した場合のシアヌル酸の回収率を絶対検量線法により算出した。ただし、2.4 の 1) において、遠心分離後の上澄み液の採取量は 4 mL とした。また、2.4 の 2) において、アンモニア水-水（5+23）2 mL でミニカラムを洗浄する操作は実施していない。

- 1) 試料を入れた 50 mL の共栓遠心沈殿管に水 10 mL を加えた後、シアヌル酸を添加。
- 2) 15 分間超音波処理した後、シアヌル酸を添加。
- 3) 遠心分離後の上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れた後、シアヌル酸を添加。
- 4) ミニカラム処理後の溶出液をメンブランフィルターでろ過したろ液にシアヌル酸を添加。

その結果、1)~4) におけるシアヌル酸の回収率は 29.6~34.4 % であった。回収率がいずれも同程度に低かったことから、シアヌル酸が低回収率となった主な原因は、LC-MS/MS 測定時のイオン化阻害にあると考えられ、昨年度実施した添加回収試験においてシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  が低回収率となった原因も同様であると考えられた。

### 3.2 カラム処理の検討

LC-MS/MS 測定時の共存成分の影響によるイオン化阻害を軽減するため、カラム処理において昨年度の方法から以下の 2 点の変更について検討した。まず、昨年度の方法では、遠心分離後の上澄み液を 2.5 倍希釈した試料溶液をカラム処理に供していたことから、更に上澄み液を希釈することでシアヌル酸の回収率が向上するか検討した。次に、イオン化阻害をもたらす共存成分が水溶性であると推測し、これを除去するためアセトニトリルによるミニカラムの洗浄に加え、アンモニア水-水（5+23）での洗浄を追加することとした。洗浄操作を追加するに当たり、アセトニトリル及びアンモニア水-水（5+23）のミニカラムへの通液の順番がシアヌル酸の回収率

に影響を与えないか検討した。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精製操作での損失やイオン化阻害による見かけの回収率の低下を把握しづらいことから、検討の際にはシアヌル酸の回収率は絶対検量線法により算出した。

脱脂粉乳を用いて 2.5 によりシアヌル酸の回収率を求めたところ、Table 3 の結果が得られた。シアヌル酸の回収率が最も良好な結果であったことから、5 倍希釈した上澄み液をカラム処理に供することとし、試料溶液負荷後のミニカラムの洗浄はアセトニトリル、アンモニア水-水 (5+23) の順で行うこととした。なお、絶対検量線法により算出したシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  の回収率は、全ての試験区においてシアヌル酸と同程度であった。

Table 3 Effect of washing mini column on recoveries of cyanuric acid and cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$

Order of washing solution flow	Dilution factor of supernatant	Recovery <sup>a)</sup> (%)	
		Cyanuric acid	Cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$
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 ( $n = 2$ )

### 3.3 アンモニア水-水 (5+23) による洗浄液量の検討

3.2 の検討において、アンモニア水-水 (5+23) 5 mL でミニカラムを洗浄した後、ギ酸-アセトニトリル (1+24) 2 mL でシアヌル酸を溶出した際、溶出液の白濁が散見された。これは、アンモニア水-水 (5+23) の液量が多かったためと考え、液量を減らすことにより白濁が解消されるか 2.6 により確認した。なお、洗浄液量を減らすことにより水溶性夾雑物の洗浄が不十分となり、イオン化阻害の影響を大きく受けることが考えられた。そこで、洗浄液量を減らすことによりシアヌル酸の回収率が低下しないか確認するため、絶対検量線法によりシアヌル酸の回収率を算出することとした。

その結果、アンモニア水-水 (5+23) 2 mL でミニカラムを洗浄することにより、溶出液の白濁は解消された。また、Table 4 のとおり、ミニカラムの洗浄に用いるアンモニア水-水 (5+23) の液量を 2 mL としても、シアヌル酸の回収率が低下することはなかった。また、試験試料液とシアヌル酸標準液中のシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  のピーク面積の比からシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$  の平均回収率を求めたところ、洗浄液量が 2 mL 及び 5 mL の場合において、それぞれ 78.9 %以上、74.5 %以上の結果であった。よって、以降の検討はアンモニア水-水 (5+23) 2 mL でミニカラムを洗浄することとした。

Table 4 Effect of wash volume on recoveries of cyanuric acid

Wash volume of ammonia water-water (5:23) (mL)	Spiked level (mg/kg)	Recovery <sup>a)</sup> (%)
2	0.5	85.3
	2.5	93.0
5	0.5	82.5
	2.5	91.7

a) Mean ( $n = 3$ )

### 3.4 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。なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。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（0.06~0.08 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。さらに、2.7 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、シアヌル酸であると判断した。



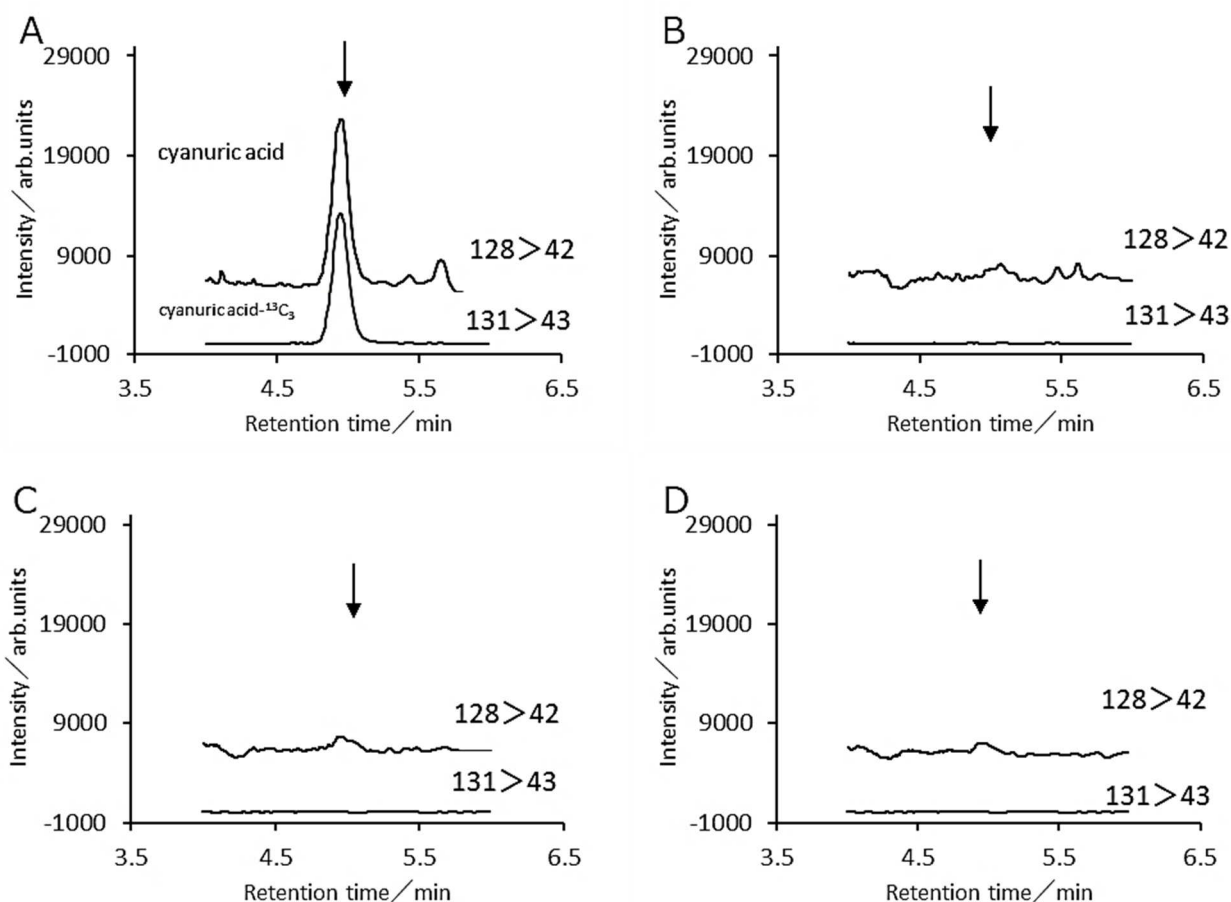


Fig. 2 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of cyanuric acid and cyanuric acid- $^{13}\text{C}_3$  in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of cyanuric acid.)

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

B~D: Blank sample solutions (dried skim milk)

### 3.5 添加回収試験

2.8により添加回収試験を実施した。その結果はTable 5のとおり、シアヌル酸の平均回収率は94.6~107%，その繰返し精度は相対標準偏差（ $\text{RSD}_r$ ）として15%以下の成績が得られた。また、添加回収試験試料液とシアヌル酸標準液のピーク面積の比からシアヌル酸- $^{13}\text{C}_3$ の平均回収率を求めたところ66.0%以上の結果であった。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））を満たす良好な結果であった。

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 5 Recoveries for cyanuric acid

Spiked level (mg/kg)	Dried skim milk 1		Dried skim milk 2		Dried skim milk 3	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
0.5	101	15	107	11	94.6	6.1
2.5	105	2.2	96.7	1.7	97.6	2.0

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

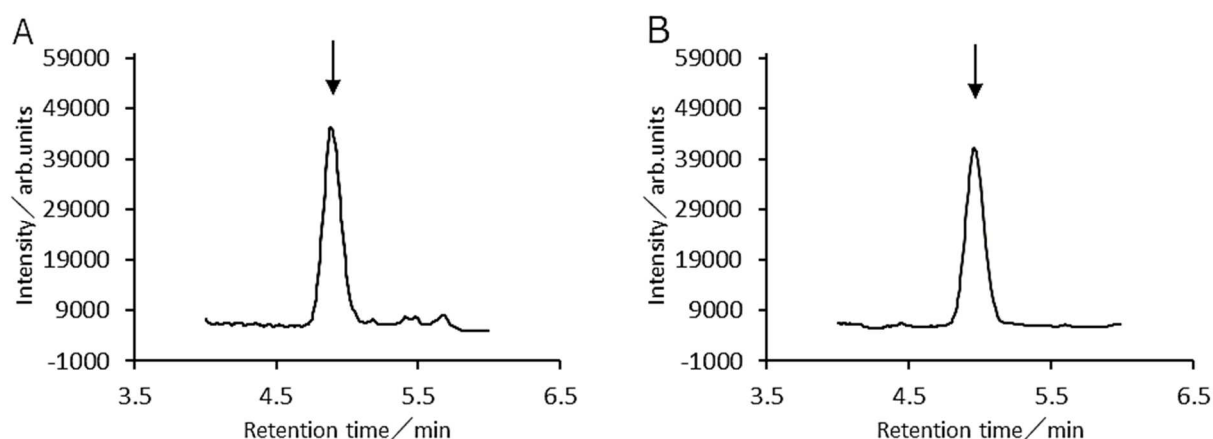


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of cyanuric acid in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of cyanuric acid.)

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 0.25 ng/mL in sample solution))

### 3.6 定量下限及び検出下限の検討

シアヌル酸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, 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, 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 (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 となる濃度を求めた. その結果, 検出下限は試料中でシアヌル酸 0.15 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 (1/10 以下) を満たしていた.

なお, Table 5 に示したとおり, 当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった.

## 4 まとめ

脱脂粉乳中に残留するシアヌル酸について, LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ, 遠心分離後の上澄み液の希釈倍率の変更及びアンモニア水による強塩基性陰イオン交換体ミニカラムの洗浄を追加することで, 以下の結果が得られ, 適用が可能で

あると考えられた。

- 1) 脱脂粉乳 3 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).