

タイロシン試験法(畜産物)

1. 分析対象化合物

タイロシンA

タイロシンB

2. 適用食品

タイロシンA：畜産物、はちみつ

タイロシンB：はちみつ

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

タイロシンA標準品 本品はタイロシンA 97%以上を含む。

タイロシンB標準品 純度が明らかなもの。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓の場合

試料を冷凍し、約5 mm角以下に細切した後、正確に量り、重量比で等量のエタノール及び20 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液を加え、磨砕均一化した後、試料10.0 gに相当する量を量り採る。これにアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトン25 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、窒素気流下で約1 mLに濃縮した後、水10 mLを加える。これに*n*-ヘキサン10 mLを加えて振とうした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、*n*-ヘキサン層を捨てる操作を2回繰り返す。

② 乳及び卵の場合

氷冷した試料を正確に量り、重量比で等量のエタノール及び20 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液を加え、均一化した後、試料10.0 gに相当する量を量り採る。これにアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトン25 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、窒素気流下で約1 mLに濃縮した後、水10 mLを加える。これに*n*-ヘキサン10 mLを加えて振とうした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、*n*-ヘキサン層を捨てる操作を2回繰り返す。

③ はちみつの場合

氷冷した試料を正確に量り、重量比で等量のエタノール及び20 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液を加え、均一化した後、試料10.0 gに相当する量を量り採る。これにアセトン50 mLを加えてホモジナイズした

後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物に水5 mLを加えて溶かし、アセトン25 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、窒素気流下で約1 mLに濃縮した後、水10 mLを加える。

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、水5 mL、水及びメタノール (1 : 1) 混液5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、酢酸、水及びメタノール (1 : 29 : 70) 混液10 mLを注入し、溶出液を採り、酢酸、水及びメタノール (1 : 29 : 70) 混液を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

タイロシンA標準品及びタイロシンB標準品を用いてそれぞれ標準原液を調製する。各標準原液を酢酸、水及びメタノール (1 : 29 : 70) 混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.005 mg/kg (タイロシンA換算) に相当する試験溶液中濃度は各化合物とも0.0001 mg/L (タイロシンA換算) である。

7. 定量

1) はちみつ以外の場合

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でタイロシンAの含量を求める。

2) はちみつの場合

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でタイロシンA及びタイロシンBの各含量を求める。タイロシンBを含むタイロシンAの含量を求める場合には、次式により求める。

タイロシンA (タイロシンBを含む。) の含量 (ppm) = $A + B \times 1.187$

A : タイロシンAの含量 (ppm)

B : タイロシンBの含量 (ppm)

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 µm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び0.1 vol%ギ酸含有5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液

(1 : 4) 混液で5分間保持した後、(1 : 4) から (19 : 1) までの濃度勾配を10分間で行う。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (m/z)

タイロシンA：プリカーサーイオン916、プロダクトイオン772、174

タイロシンB：プリカーサーイオン772、プロダクトイオン174、88

注入量：5 μ L

保持時間の目安

タイロシンA：12分

タイロシンB：12分

10. 定量限界

各化合物0.005 mg/kg (タイロシンA換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

タイロシンA及びタイロシンBを、エタノール及び20 vol%酢酸 (1 : 1) 混液で磨砕均一化した試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンで脱脂 (はちみつの場合は省略) した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、タイロシンA及びタイロシンBのそれぞれについて定量を行い、タイロシンBを含むタイロシンAの含量を求める場合には、タイロシンBの含量に換算係数を乗じてタイロシンAの含量に換算し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① タイロシンA及びタイロシンBのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

タイロシンA

定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン917、プロダクトイオン174

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン917、プロダクトイオン772

タイロシンB

定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン772、プロダクトイオン174

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン772、プロダクトイオン88

- ② タイロシンAは常温の試料 (特に肝臓) 中で分解する可能性があるため、筋肉、脂肪及び内臓などの固形試料は冷凍し、包丁等を用いて細切可能な状態 (半解凍状態) になるまで氷冷下で解凍した後、細切する。細切した試料には、速やかに重量比で等量のエタノール及び20 vol%酢酸 (1 : 1) 混液を加え、磨砕均一化する。
- ③ 乳、卵及びはちみつなどの液体試料は氷冷し、速やかに重量比で等量のエタノール及び20 vol%酢酸 (1 : 1) 混液を加え、均一化する。
- ④ 加えるエタノール及び20 vol%酢酸 (1 : 1) 混液は、氷冷下で冷やしたものを用いる。
- ⑤ 均一化した試料は、抽出開始まで0°C以下の温度を保つ。
- ⑥ 遠心分離後の*n*-ヘキサン層を捨てる操作を2回繰り返したときに、*n*-ヘキサンが残る場合には、窒素気流下で完全に除去する。
- ⑦ 試験法開発時には、タイロシンB標準品は高純度の標準品が入手できなかったため、4. 試薬、

試液では「タイロシンB標準品 純度が明らかなもの。」とされたが、入手可能な場合には純度95%以上の標準品を試験に用いることが望ましい。

⑧ タイロシンAは、標準溶液中でもタイロシンBに変換される可能性があることから、タイロシンA及びタイロシンBの標準溶液はそれぞれ単品で調製する。

⑨ 試験法開発時に検討した食品

タイロシンA：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ

タイロシンB：はちみつ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C