

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取りまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質 の試験法開発事業報告書

タイロシン試験法（畜産物）

タイロシン試験法（畜産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的

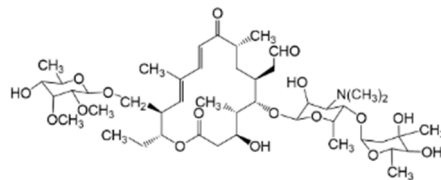
タイロシンはマクロライド系抗生物質であり、細菌のリボソーム 50S サブユニットに結合してタンパク質合成を阻害し、菌の増殖を抑制する。主に、グラム陽性菌、マイコプラズマ及びある種のグラム陰性菌に対し有効である。国内では、動物用医薬品として、タイロシン塩基の牛及び豚用注射剤、リン酸塩の豚及び鶏用飼料添加剤並びに酒石酸塩の牛、豚及び鶏用飲水添加剤が承認されている。また、リン酸塩が豚を対象動物とした飼料添加物として指定されている。海外では、EU、北米、アジア諸国等において、牛、豚、羊、鶏、七面鳥等を対象とした動物用医薬品として承認されている。また、米国、カナダ等において、みつばちのアメリカ腐蛆病の予防等のために使用されている。なお、ヒト用医薬品としては使用されていない。

令和元年9月20日付で、食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）の一部が改正され、食品中のタイロシンの残留基準値が設定されたが、その定義については「タイロシンとは、はちみつにあってはタイロシンA及びタイロシンBをタイロシンAに換算したものの和とし、その他の食品にあってはタイロシンAとする」とされた。そこで今回の検討においては、はちみつを除く畜産物についてはタイロシンAを、はちみつについてはタイロシンA及びタイロシンBを対象とした試験法を開発した。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

(1) 分析対象化合物：タイロシンA

構造式：



分子式：C₄₆H₇₇NO₁₇

分子量：916.10

IUPAC名：(10*E*,12*E*)-(3*R*,4*S*,5*S*,6*R*,8*R*,14*S*,15*R*)-14-((6-Deoxy-2,3-di-*O*-methyl-β-*D*-allopyranosyl)oxymethyl)-5-((3,6-dideoxy-4-*O*-(2,6-dideoxy-3-*C*-methyl-*L*-ribo-hexopyranosyl)-3-dimethylamino-β-*D*-glucopyranosyl)oxy)-6-formylmethyl-3-hydroxy-4,8,12-trimethyl-9-oxoheptadeca-10,12-dien-15-olide

CAS番号：1401-69-0

外観：白色～微褐色、結晶性粉末～粉末

溶解性：低級アルコール、エステル、ケトン、塩素化炭化水素、ベンゼン、エーテルに可溶。水に徐々に溶ける（25℃：5 mg/mL）。

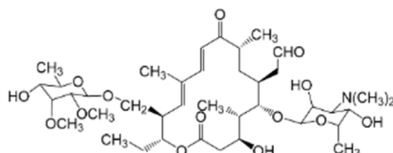
融点：128～132℃

比旋光度：-46° (25/D) (c=2, メタノール)

[出典] 富士フイルム和光純薬(株)ホームページ (<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0232-3399.html>)

(2) 分析対象化合物：タイロシン B

構造式：



分子式：C₃₉H₆₅NO₁₄

分子量：771.93

IUPAC名：2-((4R,5S,6S,7R,9R,11E,13E,15R,16R)-6-((2R,3R,4S,5S,6R)-4-(Dimethylamino)-3,5-dihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxy-16-ethyl-4-hydroxy-15-(((2R,3R,4R,5R,6R)-5-hydroxy-3,4-dimethoxy-6-methyloxan-2-yl)oxymethyl)-5,9,13-trimethyl-2,10-dioxo-1-oxacyclohexadeca-11,13-dien-7-yl)acetaldehyde

CAS番号：11032-98-7

外観：白～淡いベージュ色の固体

溶解性：DMSO、メタノールに微溶

[出典] BOC Sciences ホームページ (<https://www.bocsci.com/product/tylosin-b-cas-11032-98-7-476988.html?nid=1335>)

3. 基準値

タイロシンとは、はちみつにあってはタイロシン A 及びタイロシン B をタイロシン A に換算したものの和とし、その他の食品にあってはタイロシン A とする。

食品名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.1
豚の筋肉	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物*1の筋肉	0.1
牛の脂肪	0.1
豚の脂肪	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.1
牛の肝臓	0.1
豚の肝臓	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.1
牛の腎臓	0.1
豚の腎臓	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.1

牛の食用部分	0.1
豚の食用部分	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分*2	0.1
乳	0.1
鶏の筋肉	0.1
鶏の脂肪	0.1
鶏の肝臓	0.1
鶏の腎臓	0.1
鶏の食用部分	0.1
鶏の卵	0.3
はちみつ	0.7

*1 「その他の陸棲哺乳類に属する動物」とは、陸棲哺乳類に属する動物のうち、牛及び豚以外のものをいう。

*2 「食用部分」とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。

〔出典〕厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知“食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について”令和元年9月20日、生食発0920第2号

〔実験方法〕

1. 試料

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及びはちみつ（百花蜜）は、札幌市内の小売店で購入した。

（1）牛の筋肉

低温（半解凍）状態で可能な限り脂肪層を取り除き、約5 mm角以下に細切した試料を正確に量り、重量比で等量の氷冷したエタノール及び20 vol%酢酸（1：1）混液を加えて、フードプロセッサーで均一化した。

（2）牛の脂肪

低温（半解凍）状態で可能な限り筋肉層を取り除き、約5 mm角以下に細切した試料を正確に量り、重量比で等量の氷冷したエタノール及び20 vol%酢酸（1：1）混液を加えて、フードプロセッサーで均一化した。

（3）牛の肝臓

低温（半解凍）状態で約5 mm角以下に細切した試料を正確に量り、重量比で等量の氷冷したエタノール及び20 vol%酢酸（1：1）混液を加えて、フードプロセッサーで均一化した。

（4）牛乳

低温（氷冷下）状態の試料を正確に量り、重量比で等量の氷冷したエタノール及び20 vol%酢酸（1：1）混液を加えて、よく混合した。

（5）鶏卵

低温（氷冷下）状態の試料を正確に量り、重量比で等量の氷冷したエタノール及び20 vol%酢酸（1：1）混液を加えてホモジナイザーで均一化した。

（6）はちみつ

低温（氷冷下）状態の試料を正確に量り、重量比で等量の氷冷したエタノール及び20 vol%酢酸（1：1）混液を加えて、よく混合した。

2. 試薬・試液

タイロシン A 標準品：純度 97.2% [富士フィルム和光純薬（株）製]

タイロシン B 標準品：純度 97.2% [林純薬工業（株）製]

アセトン、エタノール、*n*-ヘキサン、メタノール：残留農薬試験用 [関東化学（株）製]

アセトニトリル：LC/MS 用 [関東化学（株）製]

塩酸：特級 [関東化学（株）製]

ギ酸：LC/MS 用 [富士フィルム和光純薬（株）製]

ギ酸アンモニウム：特級 [富士フィルム和光純薬（株）製]

酢酸：特級 [富士フィルム和光純薬（株）製]

酢酸アンモニウム：特級 [純正化学（株）製]

蒸留水：LC/MS 用 [関東化学（株）製] 及び高速液体クロマトグラフィー用 [関東化学（株）製]

リン酸：特級 [富士フィルム和光（株）]

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）：Bond Elut C18 [500 mg、6 mL、Agilent technologies 社製]（以下 C18 ミニカラムとする）

標準原液：タイロシン A 標準品 10 mg を精密に秤量し、アセトン 50 mL に溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。タイロシン B 標準品 10 mg を精密に秤量し、アセトン 50 mL に溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：タイロシン A 標準原液を適宜アセトンで希釈し、0.1 mg/L、2 mg/L、6 mg/L 及び 14 mg/L の標準溶液をそれぞれ調製した。タイロシン B 標準原液をアセトンで適宜希釈し、0.08 mg/L 及び 14 mg/L の標準溶液をそれぞれ調製した。

検量線用標準溶液：添加用標準溶液を酢酸、水及びメタノール（1：29：70）混液で適宜希釈し、タイロシン A は 0.000025～0.021 mg/L、タイロシン B は 0.00002～0.021 mg/L の標準溶液を調製した。

3. 装置

フードプロセッサー：MK-K80P [パナソニック（株）製]

ホモジナイザー：ウルトラタラックス T25 デジタル（シャフトジェネレーターは S25N-18G）（IKA 社製）

遠心分離機：ユニバーサル冷却遠心機 5930 [久保田商事（株）製]

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	LCMS-8050	(株) 島津製作所
LC	Prominence 高圧グラジエントシステム	
ポンプ	LC-20AD	(株) 島津製作所

デガッサー	DGU-20A3R	(株) 島津製作所
インジェクター	SIL-20AC	(株) 島津製作所
システムコントローラ	CBM-20A	(株) 島津製作所
カラムオープン	CTO-20AC	(株) 島津製作所
データ処理	LabSolution	(株) 島津製作所

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件																								
カラム	Inertsil ODS-4 [内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス (株) 製]																							
移動相流速	0.20 mL/min																							
注入量	5 μL																							
カラム温度	40°C																							
移動相	A 液 : 0.1 vol% ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 B 液 : 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>25.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>25.01</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>35.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	80	20	5.0	80	20	15.0	5	95	25.0	5	95	25.01	80	20	35.0	80	20
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	80	20																						
5.0	80	20																						
15.0	5	95																						
25.0	5	95																						
25.01	80	20																						
35.0	80	20																						
MS 条件																								
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)																							
イオン化モード	ESI (+)																							
インターフェース電圧	1 kV																							
脱溶媒管 (DL) 温度	150°C																							
インターフェース温度	300°C																							
ヒートブロック温度	500°C																							
ネブライザー流量	3.0 L/min																							
ドライイングガス流量	10.0 L/min																							
ヒーティングガス流量	10.0 L/min																							
コリジョンガス	アルゴン																							
定量イオン (m/z)	タイロシン A : +916.4 \rightarrow 174.1 (CE 38 V) タイロシン B : +772.3 \rightarrow 174.1 (CE 30 V)																							
定性イオン (m/z)	タイロシン A : +916.4 \rightarrow 772.3 (CE 31 V) タイロシン B : +772.3 \rightarrow 88.1 (CE 55 V)																							
保持時間 (min)	タイロシン A : 12.4 分 タイロシン B : 11.8 分																							

5. 定量

添加用標準溶液を酢酸、水及びメタノール（1：29：70）混液で希釈して、以下の濃度の検量線用標準溶液を調製した。

- ・ 定量限界濃度 [タイロシン A：0.005 mg/kg タイロシン B：0.004 mg/kg（タイロシン A 換算 0.0047 mg/kg）] を添加した場合の検量点濃度
タイロシン A：0.000025、0.00005、0.000075、0.0001、0.000125 及び 0.00015 mg/L
タイロシン B：0.00002、0.00004、0.00006、0.00008、0.0001、0.00012 mg/L
- ・ 基準値濃度を添加した場合の検量点濃度
牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳（基準値 0.1 mg/kg）
0.0005、0.001、0.0015、0.002、0.0025 及び 0.003 mg/L
鶏卵（基準値 0.3 mg/kg）
0.0015、0.003、0.0045、0.006、0.0075 及び 0.009 mg/L
はちみつ（基準値 0.7 mg/kg）
0.0035、0.007、0.0105、0.014、0.0175 及び 0.021 mg/L

この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いてタイロシン A 及びタイロシン B の検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法によりタイロシン A 及びタイロシン B の含量を算出した。（タイロシン B のタイロシン A への換算係数は 1.187）

6. 添加試料の調製

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳（タイロシン A 添加濃度：定量限界 0.005 mg/kg、基準値 0.1 mg/kg）：前処理し、氷冷した試料 10.0 g 相当量に定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL、基準値濃度添加の場合は 2 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL を添加し、混合した後、氷冷した状態で 30 分間放置した。

鶏卵（タイロシン A 添加濃度：定量限界 0.005 mg/kg、基準値 0.3 mg/kg）：前処理し、氷冷した試料 10.0 g 相当量に定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL、基準値濃度添加の場合は 6 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL を添加し、混合した後、氷冷した状態で 30 分間放置した。

はちみつ（タイロシン A 添加濃度：定量限界 0.005 mg/kg、基準値 0.7 mg/kg、タイロシン B 添加濃度：定量限界 0.004 mg/kg、基準値 0.7 mg/kg）：前処理し、氷冷した試料 10.0 g に定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液（タイロシン A）0.5 mL または 0.08 mg/L 添加用標準溶液（タイロシン B）0.5 mL、基準値濃度添加の場合は 14 mg/L 添加用標準溶液（タイロシン A）0.5 mL または 14 mg/L 添加用標準溶液（タイロシン B）0.5 mL を添加し、混合した後、氷冷した状態で 30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

タイロシン A 及びタイロシン B を重量比で等量のエタノール及び 20 vol% 酢酸（1：1）混液を加えて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

び確認した。

(1) 抽出

① 筋肉、脂肪及び肝臓の場合

低温（半解凍）状態の試料を約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った。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、上澄液を採った。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とした。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を加えた。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回繰り返した。残った*n*-ヘキサン層は窒素を吹き付けて除去した。

② 乳及び卵の場合

低温（氷冷下）状態の試料を正確に量り、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った。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、上澄液を採った。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とした。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を加えた。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回繰り返した。残った*n*-ヘキサン層は窒素を吹き付けて除去した。

③ はちみつの場合

低温（氷冷下）状態の試料を正確に量り、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った。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、上澄液を採った。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とした。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を加えた。

(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、各流出液は捨てた。このカラムに（1）で得られた溶液を注入した後、容器を水5 mLで洗い、洗液をカラムに注入し、さらに水及びメタノール（1：1）混液5 mLを注入し、各流出液は捨てた。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した。

[分析法フローチャート]

秤取

- ↓ 牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓：冷凍した試料を氷冷下で半解凍状態として細切
- ↓ し、重量比で等量の氷冷したエタノール及び 20 vol%酢酸（1：1）混液を加え、磨碎
- ↓ 均一化した後、20.0 g（試料 10.0 g 相当）を量り採る
- ↓ 牛乳、鶏卵及びはちみつ：氷冷した試料に、重量比で等量の氷冷したエタノール及
- ↓ び 20 vol%酢酸（1：1）混液を加え、均一化した後、20.0 g（試料 10.0 g 相当）を量
- ↓ り採る

抽出

- ↓ アセトン 50 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離、上澄液を採る
- ↓ 残留物（はちみつの場合は水 5 mL を加えて溶解）にアセトン 25 mL を加え、ホモ
- ↓ ジナイズ
- ↓ 遠心分離後、上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、アセトンで 100 mL に定容
- ↓ 抽出液 2 mL を分取し、窒素気流下で約 1 mL まで濃縮し、水 10 mL を加える

脱脂（はちみつ以外）

- ↓ *n*-ヘキサン 10 mL を加えて振とう
- ↓ 遠心分離後、*n*-ヘキサン層を捨てる
- ↓ 水層に *n*-ヘキサン 10 mL を加えて振とう
- ↓ 遠心分離後、*n*-ヘキサン層を捨てる
- ↓ 残った *n*-ヘキサン層を窒素気流下で除去

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）精製

- ↓ メタノール 5 mL、水 5 mL でコンディショニング
- ↓ 上記で得られた溶液を注入し、流出液を捨てる
- ↓ 水 5 mL で容器を洗い、洗液をカラムに注入し、流出液を捨てる
- ↓ 水及びメタノール（1：1）混液 5 mL を注入し、流出液を捨てる
- ↓ 酢酸、水及びメタノール（1：29：70）混液 10 mL を注入し、溶出液を採る
- ↓ 酢酸、水及びメタノール（1：29：70）混液で正確に 10 mL とする

試験溶液

↓

LC-MS/MS 測定

8. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品のブランク試験溶液から 0.2 mL を分取し、窒素気流下で溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度の検量線用標準溶液 0.2 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS条件の検討

タイロシンA及びタイロシンBは、スキャン測定において十分な感度が得られたESI(+)

モードで測定することとした。タイロシンAのスクラン測定におけるマススペクトルを図1-1に示した。モノアイソトピック質量が915.52であるタイロシンAのプロトン付加分子 (m/z 916.4 [M+H]⁺) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンに選択した。図1-2及び図1-3にタイロシンAのプロトン付加分子 (m/z 916.4 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを示した。プロダクトイオンには、強度の強かった m/z 174.1及び772.3を選択し、これらのイオンのうち、より強度の強かった m/z 916.4 → 174.1を定量イオン、次に強度の強かった m/z 916.4 → 772.3を定性イオンとした。

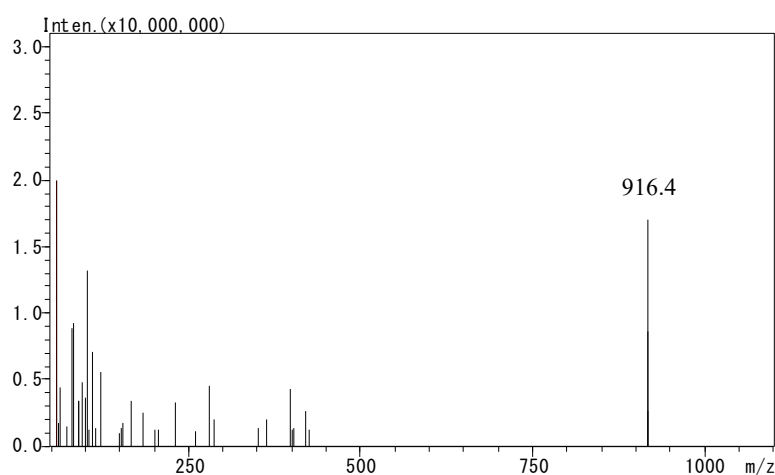


図1-1 タイロシンAのマススペクトル

スキャン範囲： 50～1100 amu、測定条件：ESI(+)
タイロシンA： 1 mg/L

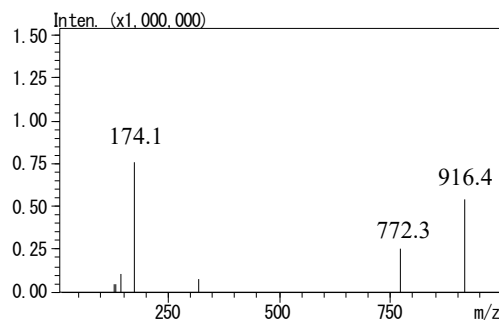
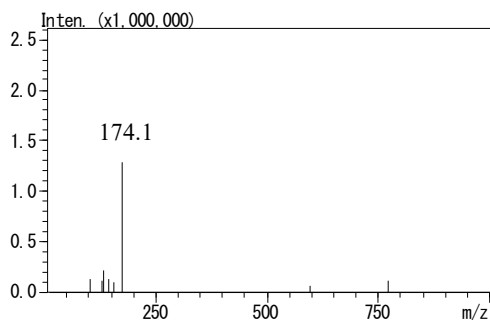


図1-2 プロダクトイオンスペクトル(定量)

プリカーサーイオン： m/z 916.4

測定条件：ESI(+)

CE=38 V (CE：collision energy)

タイロシンA： 0.2 mg/L

図1-3 プロダクトイオンスペクトル(定性)

プリカーサーイオン： m/z 916.4

測定条件：ESI(+)

CE=31 V (CE：collision energy)

タイロシンA： 0.2 mg/L

タイロシンBのスクラン測定におけるマススペクトルを図2-1に示した。モノアイソトピック質量が771.44であるタイロシンBのプロトン付加分子 (m/z 772.3 [M+H]⁺) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンに選択した。図2-2及び図2-3にタイロシンBのプロトン付加分子 (m/z 772.3 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオン

ンスペクトルを示した。プロダクトイオンには、強度の強かった m/z 174.1及び88.1を選択し、 m/z 772.3→174.1を定量イオン、 m/z 772.3→88.1を定性イオンとした。

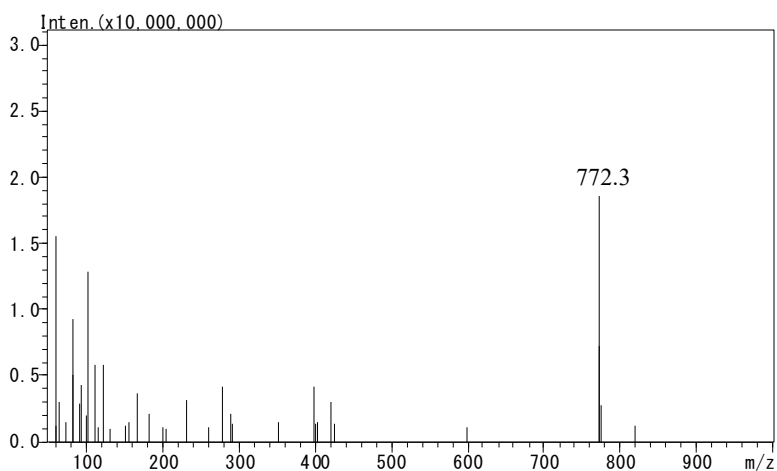


図2-1 タイロシンBのマススペクトル

スキャン範囲：50～1000 amu、測定条件：ESI(+)

タイロシンB：1 mg/L

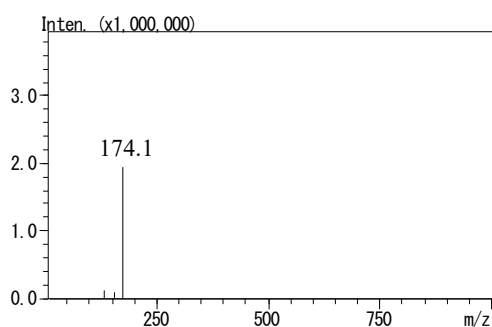


図2-2 プロダクトイオンスペクトル (定量)

プリカーサーイオン： m/z 772.3

測定条件：ESI(+)

CE=30 V (CE：collision energy)

タイロシンB：0.2 mg/L

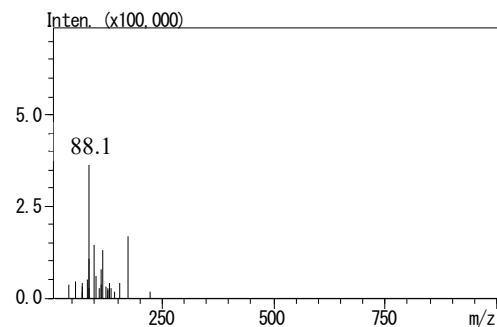


図2-3 プロダクトイオンスペクトル (定性)

プリカーサーイオン： m/z 772.3

測定条件：ESI(+)

CE=55 V (CE：collision energy)

タイロシンB：0.2 mg/L

また、フローインジェクション分析を用いて、インターフェース電圧、脱溶媒管 (DL) 温度及びヒートブロック温度を検討した。インターフェース電圧は 1～5 kV、DL 温度は 150～300℃、ヒートブロック温度は 100～500℃の範囲でパラメータを変化させたときのタイロシン A 及びタイロシン B のピーク強度を比較した結果、インターフェース電圧は 1 kV、DL 温度は 150℃、ヒートブロック温度は 500℃に設定することとした。

(2) LC 条件の検討

はじめに、フローインジェクション分析を用いて移動相の溶媒及び添加剤の種類について

て検討した。アセトニトリル及び水 (1:1) 混液または水及びメタノール (1:1) 混液を用いてタイロシン A 及びタイロシン B のピーク強度をそれぞれ比較したところ、アセトニトリル及び水 (1:1) 混液では、水及びメタノール (1:1) 混液に比べてタイロシン A は約 4 倍、タイロシン B は約 3 倍の強度のピークが得られた。そこで、アセトニトリル及び水 (1:1) 混液にギ酸 (0.02~0.2 vol%)、ギ酸アンモニウム (2.5~10 mmol/L)、酢酸 (0.02~0.2 vol%) または酢酸アンモニウム (2.5~10 mmol/L) を添加して、タイロシン A 及びタイロシン B のピーク強度を比較した。その結果、両化合物ともにギ酸アンモニウム、ギ酸、酢酸、酢酸アンモニウムの順にピーク強度が高かった。また、ギ酸アンモニウムの添加濃度の違いによるピーク強度差はほとんど認められなかった。以上の検討結果から、移動相として 5 mmol/L ギ酸アンモニウムを添加したアセトニトリル系溶媒を選択した。

次に、分析カラムを用いた検討を行った。移動相 A 液に 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液、B 液にアセトニトリル、分析カラムに ODS 化シリカゲルカラム (Inertsil ODS-4) を用いてタイロシン A 及びタイロシン B のピーク形状を確認したところ、顕著なリーディングが認められた。移動相にギ酸を添加することでピーク形状が改善したことから、ギ酸濃度 (0.02~0.2 vol%) を検討した。その結果、ピーク形状及び検出感度が良好であったギ酸濃度 0.1 vol% を選択し、移動相は、A 液を 0.1 vol% ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液、B 液を 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液とすることとした。

分析カラムは、汎用されている ODS 化シリカゲルカラムである Atrantis T3 (Waters 社製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m)、Inertsil ODS-4、Inertsustain AQ-C18 [ともにジーエルサイエンス (株) 製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m]、L-column2 ODS [(一財) 化学物質評価研究機構製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m]、Mightysil RP-18 PA、Mightysil RP-18 GP Aqua [ともに関東化学 (株) 製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m] を比較検討した。その結果、ピーク形状が最も良好であった Inertsil ODS-4 を選択した。

以上の検討結果から、HPLC 条件は、分析カラムに Inertsil ODS-4、A 液に 0.1 vol% ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液、B 液に 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液を用いることとし、濃度勾配については A 液及び B 液 (4:1) 混液で 5 分間保持した後、(4:1) から (1:19) までの濃度勾配を 10 分間で行うこととした。

(3) 検量線

タイロシン A 及びタイロシン B の検量線の例を図 3-1~3-4 に示した。各濃度範囲 (タイロシン A では 0.025 μ g/L~0.15 μ g/L 及び 3.5 μ g/L~21 μ g/L、タイロシン B では 0.02~0.12 μ g/L 及び 3.5 μ g/L~21 μ g/L) で作成した検量線の決定係数 R^2 は 0.998 以上であり、良好な直線性を示した。

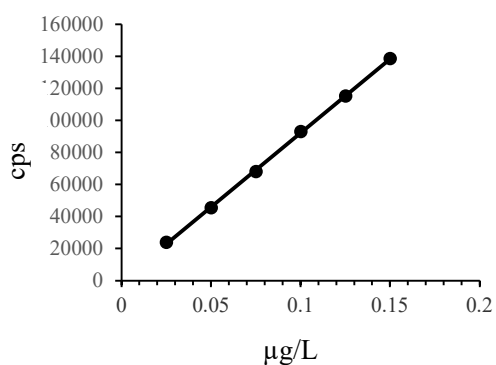


図 3-1 タイロシン A の検量線の例
濃度範囲：0.025～0.15 μg/L
 $y=923046.9x-73.6$
 $R^2=0.9997$

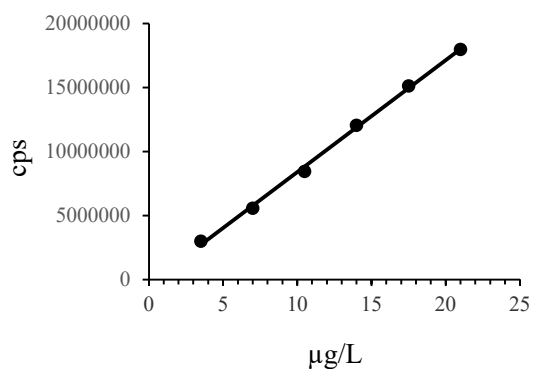


図 3-2 タイロシン A の検量線の例
濃度範囲：3.5～21 μg/L
 $y=874592.8x-334353$
 $R^2=0.9980$

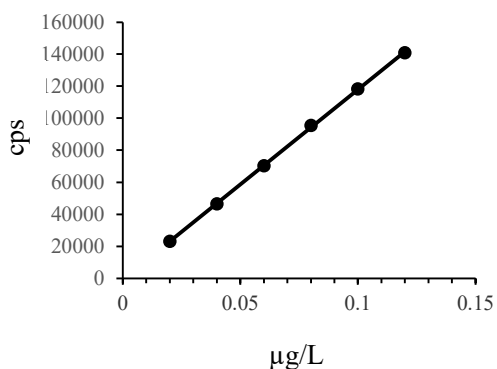


図 3-3 タイロシン B の検量線の例
濃度範囲：0.02～0.12 μg/L
 $y=1184543x-474$
 $R^2=0.9998$

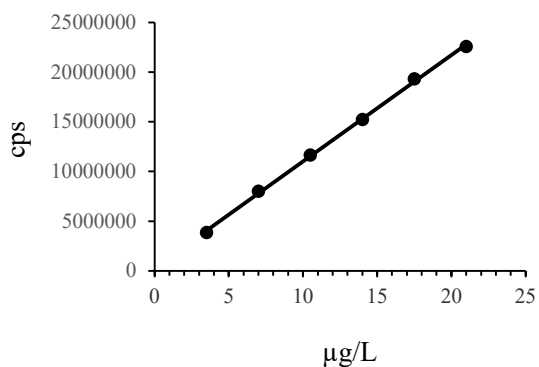


図 3-4 タイロシン B の検量線の例
濃度範囲：3.5～21 μg/L
 $y=1070262x-323957.2$
 $R^2=0.9990$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

タイロシン A：0.005 mg/kg [試験溶液量 10 (mL) / 試験溶液中の試料量 0.2 (g)]
× [タイロシン A の定量限界相当量 0.0005 (ng) / 注入量 5 (μL)]

タイロシン B：0.004 mg/kg [試験溶液量 10 (mL) / 試験溶液中の試料量 0.2 (g)]
× [タイロシン B の定量限界相当量 0.0004 (ng) / 注入量 5 (μL)]

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 前処理及び抽出の検討

①抽出溶媒の検討

抽出溶媒として、タイロシン開発企業の分析法で用いられているアセトニトリル及びメタノール (1:1) 混液のほか、アセトン、*n*-ヘキサン存在下アセトニトリル及びメタノールの適用性について検討した。本検討では、酵素による分解等の影響を避ける目的で、標準品を添加した後、すぐに抽出溶媒を加える方法で行った。牛の肝臓 10.0 g にタイロシン A (5.0 mg/L メタノール標準溶液を 1 mL) を添加、混合し、直後に各種溶媒 50 mL を加えて (*n*-ヘキサン存在下アセトニトリルの場合は *n*-ヘキサン 50 mL も加えた) ホモジナイズし、遠心分離後、上澄液 (*n*-ヘキサン存在下アセトニトリルの場合はアセトニトリル層) を採った。残留物に先と同じ溶媒 25 mL を加えてホモジナイズし、遠心分離後、上澄液 (またはアセトニトリル層) を採り、先の抽出液と合わせた後、抽出溶媒で 100 mL に定容し、マトリックス添加標準溶液を用いて回収率を求めた。その結果、表 1-1 に示したとおり、アセトンでは 91% と良好な回収率が得られたことから、アセトンを抽出溶媒に用いることとした。

表 1-1 各種溶媒による牛の肝臓からのタイロシン A の回収状況

溶媒	タイロシン A 回収率 (%)
アセトニトリル及びメタノール (1:1) 混液	15
アセトン	91
<i>n</i> -ヘキサン存在下アセトニトリル	40
メタノール	34

タイロシン A 添加量 : 5.0 µg

②牛の肝臓によるタイロシン A 損失の確認

試料にタイロシン A を添加して 30 分間放置した場合の回収率を確認した。牛の肝臓 10.0 g にタイロシン A (5.0 mg/L アセトン溶液を 1 mL) を添加、混合し、30 分間放置した。アセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、遠心分離後、上澄液を採った。残留物にアセトン 25 mL を加えてホモジナイズし、遠心分離後、上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、アセトンで 100 mL に定容し、マトリックス添加標準溶液を用いて回収率を求めた。その結果、タイロシン A の回収率は 14% と非常に低い値となり、タイロシン A の顕著な損失が確認された。

③牛の肝臓におけるタイロシン A の分解抑制方法の検討

上記検討においてタイロシン A の損失が認められた原因として、肝臓中の酵素などによる分解が考えられたことから、タイロシン A の分解抑制方法について検討した。

はじめに、分解抑制を目的として試料にエタノールと各種酸の混液を加えることを検討した。牛の肝臓 10.0 g に各種酸で調製した添加溶液 (表 1-2) 10.0 g を加えて均一化した後、タイロシン A (5.0 mg/L アセトン溶液を 1 mL) を添加、混合し、30 分間放置した。ここにアセトンを加えて抽出し、マトリックス添加標準溶液を用いてタイロシン A の回収率

を求めた。また、はちみつではタイロシン A がタイロシン B に分解することが知られていることから、タイロシン B についても測定した。タイロシン B が検出された場合、タイロシン B の含量を求め、それをタイロシン A 含量に換算してタイロシン A 添加量に対する比率（回収率）（%）を求めた。その結果を表 1-2 に示した。酸を加えていないエタノール及び水（1：1）混液ではタイロシン A の回収率は 52%であったが、分解抑制処理を行っていない場合（「②牛の肝臓によるタイロシン A 損失の確認」での回収率 14%）に比べて回収率が向上した。水の代わりに 10 vol%酢酸、10 vol%ギ酸及び 10 vol%リン酸を用いたところ、いずれも約 8 割の回収率が得られ、酸による分解抑制効果が認められた。しかし、酢酸以外ではタイロシン A からタイロシン B への変換が認められた。エタノール及び 10 vol%塩酸（1：1）混液では、タイロシン A の回収率も低く、大部分がタイロシン B に変換しているのが確認された。以上の結果から、タイロシン A の分解抑制のために、エタノール及び酢酸混液を試料に加えることとした。

表 1-2 各種添加溶液を用いた前処理による回収状況

添加溶液	回収率（%）	
	タイロシン A	タイロシン B
エタノール及び水（1：1）混液	52	0
エタノール及び 10 vol%酢酸（1：1）混液	78	0
エタノール及び 10 vol%ギ酸（1：1）混液	79	1
エタノール及び 10 vol%リン酸（1：1）混液	79	5
エタノール及び 10 vol%塩酸（1：1）混液	12	103

試料：牛の肝臓

タイロシン A 添加量：5.0 µg

タイロシン開発企業の分析法では、肝臓及び腎臓ではタイロシンが急速に分解することから、試料を凍った状態で抽出している。そこで次に、試料を氷冷することによる分解抑制効果について検討した。牛の肝臓 10.0 g を氷冷下で 15 分間放置したもの、あるいは牛の肝臓 10.0 g にエタノール及び 10 vol%酢酸（1：1）混液 10.0 g を加えて均一化し、氷冷下で 15 分間放置したものにタイロシン A（5.0 mg/L アセトン溶液を 1 mL）を添加、混合し、氷冷下で 30 分間放置した。それぞれの添加試料からタイロシン A をアセトンで抽出し、マトリックス添加標準溶液を用いて回収率を求めた。その結果、タイロシン A の回収率は、エタノール及び 10 vol%酢酸（1：1）混液を加えていない試料では 29%、エタノール及び 10 vol%酢酸（1：1）混液を加えた試料では 91%であり、いずれの試料でも氷冷による回収率向上が認められたが、エタノール及び酢酸混液を加えて均一化し、氷冷した試料において、タイロシン A の分解を効果的に抑制可能であることがわかった。

最後に、エタノール及び酢酸混液の酢酸濃度について検討した。牛の肝臓 10.0 g にエタノール及び 2、5、10、20 または 30 vol%酢酸（1：1）混液 10.0 g を加えて均一化し、氷冷した後、タイロシン A（5.0 mg/L アセトン溶液を 1 mL）を添加混合し、氷冷下で 30 分間放置した。ここにアセトンを加えて抽出し、マトリックス添加標準溶液を用いてタイロシン A の回収率を求めた。また、タイロシン A が分解して生成したタイロシン B についても測定し、タイロシン A に換算した回収率を算出した。その結果を表 1-3 に示した。酢酸

濃度が2～10 vol%と上がるに従ってタイロシン A の回収率は上昇し、10～30 vol%の範囲ではタイロシン A の回収率は91%で一定となった。また、すべての混液においてタイロシン B への変換も認められなかった。以上の検討結果から、分解抑制手法として、冷凍した牛の肝臓を氷冷下で半解凍状態として細切した後、氷冷したエタノール及び20 vol%酢酸(1:1)混液を重量比で等量加えて均一化し、抽出操作まで氷冷することとした。

表 1-3 各種添加溶液を用いた前処理による回収状況

添加溶液	回収率 (%)	
	タイロシン A	タイロシン B
エタノール及び2 vol%酢酸(1:1)混液	86	0
エタノール及び5 vol%酢酸(1:1)混液	88	0
エタノール及び10 vol%酢酸(1:1)混液	91	0
エタノール及び20 vol%酢酸(1:1)混液	91	0
エタノール及び30 vol%酢酸(1:1)混液	91	0

試料：牛の肝臓

タイロシン A 添加量：5.0 µg

添加後氷冷下で30分間放置

④牛の肝臓以外における分解抑制操作の必要性の検証

肝臓以外の試料における分解抑制操作の必要性について判断するために、牛の筋肉及びはちみつを用いて検討を行った。

はじめに、牛の筋肉を用いて以下の検討を行った。

- a. 牛の筋肉10.0 gにタイロシンA (5.0 mg/Lアセトン溶液を1 mL) を添加、混合し、30分間放置した。
- b. 牛の筋肉10.0 gにエタノール及び20 vol%酢酸(1:1)混液10.0 gを加えて均一化して氷冷し、タイロシンA (5.0 mg/Lアセトン溶液を1 mL) を添加、混合した後、氷冷下で30分間放置した。

それぞれの添加試料からタイロシンAをアセトンで抽出し、マトリックス添加標準溶液を用いて回収率を求めた。その結果、タイロシンAの回収率は、分解抑制操作無しの牛の筋肉では85%であったが、分解抑制操作を行った牛の筋肉では97%であった。

次に、はちみつを用いて以下の検討を行った。

- a. はちみつ10.0 gにタイロシンAまたはタイロシンB (5.0 mg/Lアセトン溶液を1 mL) を添加、混合し、30分間放置した後、水10 mLを加えた。
- b. はちみつ10.0 gにエタノール及び20 vol%酢酸(1:1)混液10.0 gを加えて均一化した後、氷冷し、タイロシンAまたはタイロシンB (5.0 mg/Lアセトン溶液を1 mL) を添加、混合した後、氷冷下で30分間放置した。

それぞれの添加試料からタイロシンをアセトンで抽出し、マトリックス添加標準溶液を用いて回収率を求めた。その結果、タイロシンA及びタイロシンBの回収率は、分解抑制操作無しのはちみつではそれぞれ89%及び90%であったが、分解抑制操作を行ったはちみつではそれぞれ100%及び103%であった。肝臓以外の試料においても、肝臓と同様の前処理を行うことにより、回収率の向上が認められたことから、全ての試料に対して分解抑制操作を行

うこととした。

(2) 脱脂の検討

はちみつ以外の試料については、アセトン抽出液中に脂肪も抽出されていることから脱脂操作を行うこととし、*n*-ヘキサン及び水を用いた液-液分配により、脂質を除去する方法を検討した。

はじめに、液-液分配におけるアセトンの影響を確認するため、以下の実験を行った。水5.0gとエタノール及び20 vol%酢酸(1:1)混液10.0gを混和し、タイロシンA(200 mg/Lアセトン溶液を0.25 mL)を添加した後、アセトンで100 mLに定容し、アセトン溶液とした。アセトン溶液2 mL(a)、アセトン溶液2 mLを窒素気流下で約1 mLまで濃縮したもの(b)、またはアセトン溶液2 mLを窒素気流下で約0.5 mLまで濃縮したもの(c)に水10 mL及び*n*-ヘキサン10 mLを加えて振とうし、遠心分離した後、*n*-ヘキサン層を採った。残った水層に*n*-ヘキサン10 mLを加えて振とうし、遠心分離した後、*n*-ヘキサン層を採り、残った水層及び各*n*-ヘキサン層におけるタイロシンAの回収率を求めた。その結果、表2に示したとおり、いずれの条件でも*n*-ヘキサン層にタイロシンAは認められず、また、水層におけるタイロシンAの回収率も良好であった。

次に、脱脂効果について牛の脂肪を用いて検討した。牛の脂肪のアセトン抽出液2 mLに水10 mLを加えた後、*n*-ヘキサン10 mL×2回で脱脂した後の水層(I)と同抽出液2 mLを約1 mLに濃縮して水10 mLを加えた後、*n*-ヘキサン10 mL×2回で脱脂操作を行った後の水層(II)の外観を比較した。その結果、いずれの場合でも、アセトン抽出液に水を加えた直後に分離・浮上した脂質は脱脂操作により除去されていた。一方、アセトン抽出液2 mLを濃縮せずに脱脂を行う(I)よりも約1 mLに濃縮した後に脱脂を行った(II)方が水層の白色の濁りが少なくなっていたことから、夾雑成分の除去効果は高いと考えた。以上の検討結果から、脱脂操作は、アセトン抽出液2 mLを約1 mLまで濃縮し、水10 mLを加えた後、*n*-ヘキサン10 mLで2回洗浄する方法を採用した。なお、アセトン抽出液の濃縮は、エバポレータでは突沸が頻発して操作性が悪かったことから、窒素気流下で行った。

表2 水層及び*n*-ヘキサン層における回収状況

	回収率 (%)		
	ヘキサン層 (1回目)	ヘキサン層 (2回目)	水層
a	0	0	98
b	0	0	99
c	0	0	97

タイロシンA添加量：50 µg

a：牛の脂肪のアセトン溶液2 mL、b：同アセトン溶液2 mLを約1 mLまで濃縮したもの、c：同アセトン溶液2 mLを約0.5 mLまで濃縮したもの

(3) C18ミニカラムによる精製の検討

脱脂操作を行った後の抽出液は、食品由来の色素により着色や不溶物による濁り等も認められたことから、ミニカラムによる精製を検討した。タイロシンA及びタイロシンBは3級

アミノ基を有することから、はじめに、イオン交換カラムであるスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (500 mg、6 mL、Waters社製)] 及びベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep SCX (500 mg、6 mL、ジーエルサイエンス (株) 製)] について検討した。しかし、各ミニカラムに保持されたタイロシンAをアンモニア水及びアセトニトリル混液やアンモニア水及びメタノール混液で溶出させることができなかつたことから、イオン交換による精製は困難であると判断した。そこで、ODS化シリカゲルミニカラムであるBond Elut C18 (500 mg、6 mL) を用いた精製について検討した。

①C18ミニカラムに対する負荷液及び洗浄液の検討

はじめに、負荷液をC18ミニカラムに注入したときのタイロシンA及びタイロシンBの保持について検討した。負荷液はアセトン抽出液2 mLを約1 mLに濃縮し、水10 mLを加えた溶液であることから、負荷液中のアセトン含量は約10%、エタノール及び20 vol%酢酸 (1:1) 混液含量は約2%と計算できる。そこで、メタノール及び水各5 mLで予備洗浄したC18ミニカラムにタイロシンA及びタイロシンB各0.5 µgを水0.1 mLで負荷した後、アセトン、エタノール及び20 vol%酢酸 (1:1) 混液及び水 (2:1:17)、(4:1:15)、(6:1:13) 及び(8:1:11) 混液各10 mLを順次注入したときの溶出状況を確認した。結果は表3-1に示したとおり、アセトンが20%、エタノール及び20 vol%酢酸 (1:1) 混液が5%含まれる水混液でも両化合物は溶出しないことが確認され、負荷液注入時にタイロシンA及びタイロシンBがC18ミニカラムから溶出することはないと考えた。

表3-1 アセトン、エタノール及び20 vol%酢酸 (1:1) 混液、水の混液による溶出状況

化合物名	回収率 (%)			
	アセトン、エタノール及び20 vol%酢酸 (1:1) 混液、水の混液各10 mL			
	2:1:17	4:1:15	6:1:13	8:1:11
タイロシンA	0	0	0	78
タイロシンB	0	0	36	67

Bond Elut C18 (500 mg、6 mL、Agilent technologies社製)

タイロシンA及びタイロシンBの添加量: 0.5 µg

次に、負荷液を注入した後のC18ミニカラム洗浄条件について検討した。メタノール及び水各5 mLで予備洗浄したC18ミニカラムにタイロシンA及びタイロシンB各0.5 µgを水0.1 mLで負荷した後、水及びメタノール (1:1)、(2:3)、(3:7)、(1:4) 及び(1:9) 混液各10 mL、メタノール10 mLを順次注入したときの溶出状況を表3-2に示した。両化合物は水及びメタノール (2:3) 混液まで溶出しなかつたことから、本試験法では余裕を持たせ、水及びメタノール (1:1) 混液5 mLを洗浄操作に用いることとした。

表3-2 水及びメタノール（1：1）混液による溶出状況

化合物名	回収率（%）						
	水及びメタノール混液各10 mL					メタノール 10 mL	計
	1：1	2：3	3：7	1：4	1：9		
タイロシンA	0	0	1	40	56	1	98
タイロシンB	0	0	17	59	23	0	99

Bond Elut C18（500 mg、6 mL、Agilent technologies社製）

タイロシンA及びタイロシンBの添加量：0.5 µg

以上の検討結果をもとに、アセトン抽出液の負荷から洗浄操作までを行った場合の溶出状況を確認した。水5.0 gにエタノール及び20 vol%酢酸（1：1）混液10.0 gを加えて、アセトンで100 mLに定容した溶液2 mLを採取し、窒素気流下で約1 mLに濃縮した後、タイロシンA及びタイロシンB各0.5 µg（5.0 mg/Lアセトン溶液0.1 mL）を添加し、水10 mLを加えた。本溶液の全量をメタノール及び水各5 mLで予備洗浄したC18ミニカラムに負荷した後、容器を水5 mLで洗い、その洗液を注入した。水及びメタノール（1：1）混液5 mL×2回を注入し、各流出液におけるタイロシンA及びタイロシンBの溶出状況を表3-3に示した。この結果から、負荷から洗浄までの操作においてタイロシンA及びタイロシンBは溶出しないことが確認された。

表3-3 アセトン抽出液の負荷から洗浄操作までの溶出状況

化合物名	回収率（%）			
	負荷液 約11 mL	洗液 約5 mL	水及びメタノール（1：1）混液	
			0～5 mL	5～10 mL
タイロシンA	0	0	0	0
タイロシンB	0	0	0	0

Bond Elut C18（500 mg、6 mL、Agilent technologies社製）

負荷液：水5.0 gにエタノール及び20 vol%酢酸（1：1）混液10.0 gを加えて、アセトンで100 mLに定容した溶液2 mLを採取し、約1 mLに濃縮した後、タイロシンA及びタイロシンB各0.5 µgを添加し、水10 mLを加えた溶液

洗液：負荷液採取後の容器に水5 mLを加えて洗った後の溶液

②C18ミニカラムの溶出溶媒の検討

C18ミニカラムからタイロシンA及びタイロシンBを溶出させる溶媒について検討した。表3-2での検討結果から、水及びメタノール（1：9）混液、またはメタノールでタイロシンA及びタイロシンBを完全に溶出可能な溶媒量を確認したところ、各々30 mL及び20 mLであった。そこで、さらに溶出溶媒について検討した。その結果、水及びメタノール混液に酢酸を添加することにより、より少ない溶媒量で両化合物を溶出させることが可能であった。そこで、酢酸、水及びメタノール混液の各溶媒比率について検討した。

はじめにメタノールの比率について検討した。メタノール及び水各5 mLで予備洗浄したC18ミニカラムにタイロシンA及びタイロシンB各0.5 µgを水0.1 mLで負荷し、水及びメタノール（1：1）混液5 mLを注入した後、酢酸、水及びメタノール（1：49：50）、（1：39：60）

または (1 : 29 : 70) 混液各10mLをそれぞれ注入したときの溶出状況を表3-4に示した。混液のメタノール比率は、60%以上でほぼ定量的に両化合物を回収可能であったが、本試験法では余裕を持たせて70%とした。

表3-4 酢酸、水及びメタノール混液による溶出状況 (酢酸比率1%)

化合物名	回収率 (%)		
	酢酸、水及びメタノール混液各10 mL		
	1 : 49 : 50	1 : 39 : 60	1 : 29 : 70
タイロシンA	7	99	101
タイロシンB	88	101	101

Bond Elut C18 (500 mg、6 mL、Agilent technologies社製)

タイロシンA及びタイロシンBの添加量 : 0.5 µg

次に、酢酸の比率について検討した。メタノール及び水各5 mLで予備洗浄したC18ミニカラムにタイロシンA及びタイロシンB各0.5 µgを水0.1 mLで負荷し、水及びメタノール (1 : 1) 混液5 mLを注入した後、酢酸、水及びメタノール (0.1 : 29.9 : 70)、(0.5 : 29.5 : 70)、(1 : 29 : 70) または (2 : 28 : 70) 混液各5 mLをそれぞれ注入したときの溶出状況を表3-5に示した。混液の酢酸比率は、0.5%以上で両化合物をほぼ定量的に回収可能であったが、本試験法では余裕を持たせて1%とした。

表3-5 酢酸、水及びメタノール混液による溶出状況 (メタノール比率70%)

化合物名	回収率 (%)			
	酢酸、水及びメタノール混液各5 mL			
	0.1 : 29.9 : 70	0.5 : 29.5 : 70	1 : 29 : 70	2 : 28 : 70
タイロシンA	61	97	99	99
タイロシンB	95	101	100	101

Bond Elut C18 (500 mg、6 mL、Agilent technologies社製)

タイロシンA及びタイロシンBの添加量 : 0.5 µg

最後に、酢酸、水及びメタノール (1 : 29 : 70) 混液の注入量について検討した。メタノール及び水各5 mLで予備洗浄したC18ミニカラムにタイロシンA及びタイロシンB各0.5 µgを水0.1 mLで負荷し、水及びメタノール (1 : 1) 混液5 mLを注入した後、酢酸、水及びメタノール (1 : 29 : 70) 混液10 mLを注入したときの溶出状況を表3-6に示した。6-8 mL画分までにタイロシンA及びタイロシンBは全量溶出していることが確認されたことから、本試験法では余裕を持たせ、酢酸、水及びメタノール (1 : 29 : 70) 混液10 mLを用いてタイロシンA及びタイロシンBを溶出させることとした。

表3-6 酢酸、水及びメタノール（1：29：70）混液による溶出状況

化合物名	回収率（%）						
	水及びメタノール（1：1）混液 5 mL	酢酸、水及びメタノール（1：29：70）混液					
		0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	8-10 mL	計
タイロシンA	0	21	75	3	1	0	100
タイロシンB	0	60	40	1	0	0	101

Bond Elut C18（500 mg、6 mL、Agilent technologies社製）

タイロシンA及びタイロシンBの添加量：0.5 µg

以上の検討結果から、C18ミニカラムを用いた精製方法として、アセトン抽出液2 mLを約1 mLに濃縮して水10 mLを加えた溶液（はちみつ以外の試料では、*n*-ヘキサン脱脂を行った後の水層）をC18ミニカラムに負荷した後、容器を水5 mLで洗浄し、その洗液を注入し、水及びメタノール（1：1）混液5 mLで洗浄した後、酢酸、水及びメタノール（1：29：70）混液10 mLでタイロシンA及びタイロシンBを溶出させる方法を採用した。本条件により牛の筋肉及びはちみつのアセトン抽出液を精製し、得られたブランク試験溶液を用いて調製したマトリックス添加標準溶液（タイロシンA：0.001 mg/L、タイロシンB：0.0008 mg/L）の溶出溶媒で調製した標準溶液に対するピーク面積比を確認したところ、タイロシンAでは、牛の筋肉において0.99、はちみつにおいて1.01、タイロシンBでは、はちみつにおいて1.02であり、測定に対するマトリックスの影響はほとんど認められなかった。また、C18ミニカラム精製により色素等も除去され、ほぼ無色透明な試験溶液となった。

4. 添加回収試験

実験方法の7. 試験溶液の調製に従ってタイロシンA及びタイロシンBの添加回収試験を実施した。検討対象食品は、タイロシンAでは牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及びはちみつ、タイロシンBでははちみつとした。添加濃度は定量限界濃度及び基準値濃度の2濃度とした。定量限界濃度の場合はタイロシンAを0.005 mg/kg、タイロシンBを0.004 mg/kg（タイロシンA換算で0.0047 mg/kg）、残留基準値濃度の場合は両化合物を各々基準値濃度で添加した。添加回収試験における各ブランク試料、添加試料及び回収率100%相当の溶媒標準溶液のクロマトグラムを図4-1～図4-14に示した。また、各ブランク試料のスクリーン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図5-1及び図5-2に示した。

（1）選択性

選択性の評価結果を表4-1に示した。検討したいずれの試料においてもタイロシンA及びタイロシンBの定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。

表4-1 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積 (高さ) ¹⁾									選択性の評価 ³⁾	備考
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ²⁾			面積 (高さ) 比 (a)/(b)			
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2	平均 (b)				
1	タイロシンA	牛の筋肉	0.005	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1787326	1789836	1788581	0.000	○	
		牛の脂肪	0.005	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1809391	1774242	1791817	0.000	○	
		牛の肝臓	0.005	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1761865	1755767	1758816	0.000	○	
		牛乳	0.005	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1761053	1769023	1765038	0.000	○	
		鶏卵	0.005	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	5221032	5382093	5301563	0.000	○	
		はちみつ	0.005	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0	0	0	11837008	11872625	11854817	0.000	○	
2	タイロシンB	はちみつ	0.004	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0	0	0	15623031	15645945	15634488	0.000	○	

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて超燃注入を行う。)

*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくてもよい。

*3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

(2) 真度、精度及び定量限界

真度、精度及び定量限界の評価結果を表 4-2 に示した。タイロシン A では、定量限界濃度で真度 84.3~93.3%及び併行精度 0.8~3.8%、基準値濃度で真度 83.1~92.1%及び併行精度 0.7~4.3%が得られた。また、はちみつにおけるタイロシン B では、定量限界濃度で真度 87.2%及び併行精度 7.1%、基準値濃度で真度 95.4%及び併行精度 2.6%が得られた。これらの真度及び精度は妥当性評価ガイドライン²⁾の目標値を満たしており、良好な結果であった。また、定量限界濃度の添加試料から得られたピークの S/N は、タイロシン A は 646~1279、タイロシン B は 607~1199 であり、いずれも S/N ≥ 10 が得られた。

表 4-2 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ¹⁾	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²⁾			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
1	タイロシンA	牛の筋肉	0.005	0.1	0.005	S/N	932876000	-1448	0.9998	84.9	90.3	87.9	91.1	85.9	88.0	3.0	673.8	822.2	748.0	
		牛の脂肪	0.005	0.1	0.005	S/N	677236229	18909	0.9989	87.6	85.8	78.7	81.0	82.6	83.1	4.3	1115.2	892.2	1003.7	
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.005	S/N	915104000	519	0.9996	89.1	93.5	93.6	92.9	90.8	92.0	2.1	1115.2	892.2	1003.7	
		牛乳	0.005	0.1	0.1	—	886165829	-1837	1.0000	88.6	91.7	92.1	92.1	93.5	94.6	2.1	1115.2	892.2	1003.7	
		鶏卵	0.005	0.3	0.005	S/N	913288000	-4730	1.0000	83.2	85.1	84.3	84.7	84.3	84.3	0.8	695.0	736.1	715.6	
		はちみつ	0.005	0.7	0.1	—	876396229	-5632	0.9997	88.4	88.4	86.9	88.0	87.8	87.9	0.7	1115.2	892.2	1003.7	
2	タイロシンB	はちみつ	0.004	0.7	0.005	S/N	943607442	-8246	0.9972	88.1	86.4	89.1	91.2	89.7	88.9	2.0	1067.9	646.3	857.1	
		はちみつ	0.005	0.7	0.1	—	889432629	-25003	0.9933	91.0	90.1	89.8	93.1	92.8	91.4	1.7	1067.9	646.3	857.1	
		鶏卵	0.005	0.3	0.005	S/N	867916000	-1196	0.9972	94.7	96.8	91.6	92.8	90.7	93.3	2.6	1278.5	1217.9	1248.2	
		はちみつ	0.005	0.3	0.3	—	908797714	-55857	0.9998	86.9	87.7	87.4	86.1	87.0	0.7	1067.9	646.3	857.1		
		はちみつ	0.005	0.7	0.005	S/N	954117714	-1806	0.9976	84.0	84.8	92.2	89.4	88.0	87.7	3.8	1248.8	1046.0	1147.4	
		はちみつ	0.005	0.7	0.7	—	874592784	-334353	0.9980	86.8	89.3	92.0	89.3	88.4	89.2	2.1	1067.9	646.3	857.1	
2	タイロシンB	はちみつ	0.004	0.7	0.004	S/N	118454287	-474	0.9998	79.3	86.5	91.5	83.6	95.0	87.2	7.1	1199.4	606.9	903.1	
		はちみつ	0.004	0.7	0.7	—	1070261780	323957	0.9991	99.4	93.2	95.0	93.6	95.9	95.4	2.6	1199.4	606.9	903.1	

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Mn.)のそれぞれのS/Nを求める。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について評価した結果を表 4-3 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めたところ、タイロシン A では 0.97~1.01、タイロシン B では 1.01~1.02 であり、測定に対する試料マトリックスの顕著な影響は認められなかった。添加回収試験により得られた真度を上記に示すピーク面積比で除して補正した真度を表 4-4 に示した。補正後の真度は、タイロシン A では、定量限界濃度で 85~94%、基準値濃度で 83~94%、タイロシン B では定量限界濃度で 85%、基準値濃度で 94%と良好な結果が得られた。

表 4-3 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ^{*1} (mg/L)	面積又は 高さの別	ブランク ^{*3}	ピーク面積(高さ) ^{*2}						備考			
									マトリックス添加標準溶液 ^{*4}			溶媒標準溶液						
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均				
1	タイロシンA	牛の筋肉	0.005	0.1	0.005	0.0001	面積	0	89076	87742	88409	87426	91156	89291	0.99			
		牛の筋肉	0.005	0.1	0.1	0.002	面積	0	1787326	1789836	1788581	1770442	1791662	1781052	1.00			
		牛の脂肪	0.005	0.1	0.005	0.0001	面積	0	90335	90827	90581	93055	93038	93047	0.97			
		牛の脂肪	0.005	0.1	0.1	0.002	面積	0	1809391	1774242	1791817	1774384	1758924	1766654	1.01			
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.005	0.0001	面積	0	91059	91036	91048	90995	91531	91263	1.00			
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.1	0.002	面積	0	1761865	1755767	1758816	1763690	1745525	1754608	1.00			
		牛乳	0.005	0.1	0.005	0.0001	面積	0	86521	87819	87170	87628	88353	87991	0.99			
		牛乳	0.005	0.1	0.1	0.002	面積	0	1761053	1769023	1765038	1802694	1811974	1807334	0.98			
		鶏卵	0.005	0.3	0.005	0.0001	面積	0	85475	87058	86267	86671	87058	86865	0.99			
		鶏卵	0.005	0.3	0.3	0.006	面積	0	5221032	5382093	5301563	5311912	5329953	5320933	1.00			
		はちみつ	0.005	0.7	0.005	0.0001	面積	0	90715	92157	91436	89304	91536	90420	1.01			
		はちみつ	0.005	0.7	0.7	0.014	面積	0	11837008	11872625	11854817	11971939	11829964	11900952	1.00			
		2	タイロシンB	はちみつ	0.004	0.7	0.004	0.00008	面積	0	98187	99008	98598	96991	96202	96597	1.02	
				はちみつ	0.004	0.7	0.7	0.014	面積	0	15623031	15645945	15634488	15372383	15573444	15472914	1.01	

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表 4-4 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度(%)	ピーク面積比	補正真度(%) ^{*1}	備考
1	タイロシンA	牛の筋肉	0.005	0.1	0.005	88	0.99	89	
		牛の筋肉	0.005	0.1	0.1	83	1.00	83	
		牛の脂肪	0.005	0.1	0.005	92	0.97	94	
		牛の脂肪	0.005	0.1	0.1	92	1.01	91	
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.005	84	1.00	85	
		牛の肝臓	0.005	0.1	0.1	88	1.00	88	
		牛乳	0.005	0.1	0.005	89	0.99	90	
		牛乳	0.005	0.1	0.1	91	0.98	94	
		鶏卵	0.005	0.3	0.005	93	0.99	94	
		鶏卵	0.005	0.3	0.3	87	1.00	87	
		はちみつ	0.005	0.7	0.005	88	1.01	87	
		はちみつ	0.005	0.7	0.7	89	1.00	90	
2	タイロシンB	はちみつ	0.004	0.7	0.004	87	1.02	85	
		はちみつ	0.004	0.7	0.7	95	1.01	94	

*1 真度をピーク面積比で除した値

5. その他の試験法検討に関連する事項

アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂

脱脂方法として、アセトニトリル/ヘキサン分配についても検討した。タイロシン A の 5 mg/L アセトニトリル標準溶液 0.1 mL を *n*-ヘキサン 10 mL に加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL×3 回で振とう抽出し、遠心分離後の各アセトニトリル層を採取したところ、タイロシン A の回収率は 100% (1 回目: 98%、2 回目: 2%、3 回目: 0%) であった。また、アセトン抽出液を濃縮した後に脱脂操作を行うことを想定して、タイロシン A の 5 mg/L アセトニトリル標準溶液 100 μL をアセトン 0.5 mL、水 0.25 mL 及びエタノール及び 20 vol% 酢酸 (1:1) 混液 0.25 mL の混液に加えた後、*n*-ヘキサン 10 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL×3 回で振とう抽出し、遠心分離後の各アセトニトリル層を採取した。その結果、タイロシン A の回収率は 103% (1 回目: 102%、2 回目: 1%、3 回目: 0%) であり、タイロシン A のアセトニトリル層への回収については良

好であった。一方、鶏卵においては、*n*-ヘキサン及び水による液-液分配では除去可能であった黄褐色の着色成分が、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作ではアセトニトリル層に残留しており、夾雑成分の除去効果について *n*-ヘキサン及び水による液-液分配の方が優れていることが示唆された。

脱脂操作後の C18 ミニカラム精製において、タイロシン A 及びタイロシン B を C18 ミニカラムに保持させるためには、アセトニトリル/ヘキサン分配後に採取したアセトニトリル層を減圧濃縮する操作が必要であった。一方、*n*-ヘキサン及び水による液-液分配では、水層をそのまま C18 ミニカラムに注入することが可能であり、この点において操作性が優れていた。そのため、本試験法においては、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂方法は採用しなかった。

まとめ

試料中におけるタイロシン A の分解を抑制するために種々検討した結果、低温状態の試料に等量のエタノール及び 20 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液を加えて均一化し、抽出操作まで氷冷することとした。抽出溶媒については、アセトニトリル及びメタノール (1 : 1) 混液、アセトン、ヘキサン存在下アセトニトリルまたはメタノールの適用性を比較検討した結果、アセトンを選択した。はちみつ以外の試料ではアセトン抽出液の脱脂を行うこととし、脱脂方法として *n*-ヘキサン及び水を用いた液-液分配を採用した。精製については、C18 ミニカラムを用いた方法を検討したところ、試料由来マトリックスによる測定値への影響はほとんど認められず、回収率は良好であった。

タイロシン A は牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及びはちみつ、タイロシン B ははちみつに基準値濃度及び定量限界濃度 (タイロシン A : 0.005 mg/kg、タイロシン B : 0.004 mg/kg) で添加し、開発した方法を用いて回収試験を行なったところ、いずれの試料においても選択性は問題なく、真度は 83~95%、併行精度は 1~7% の良好な結果が得られた。また、各試料におけるマトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は 0.97~1.02 であり、LC-MS/MS 測定において顕著なマトリックスの影響は認められなかった。定量限界については、タイロシン A は 0.005 mg/kg、タイロシン B は 0.004 mg/kg (タイロシン A 換算で 0.005 mg/kg) を設定することが可能であった。

[結論]

畜産物を対象としたタイロシン試験法として、「タイロシン A 及びタイロシン B を重量比で等量のエタノール及び 20 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液を加えて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」を開発した。開発した試験法を用いて牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及びはちみつの 6 試料で添加回収試験を行ったところ、良好な結果が得られたため、本法は畜産物の残留試験法として適用可能であると考えられた。

[参考文献]

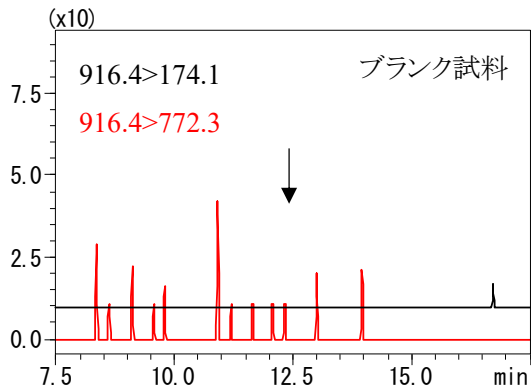
- 1) 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会報告“薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 農

薬・動物用医薬品部会報告について”平成 29 年 2 月 26 日, <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000150589.pdf>

- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について”平成 22 年 12 月 24 日, 食安発 1224 第 1 号 (2010)

①添加回収試験における代表的なクロマトグラム

【タイロシン A】



【タイロシン A】

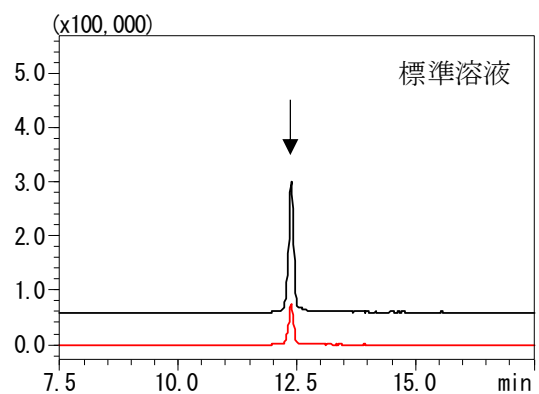
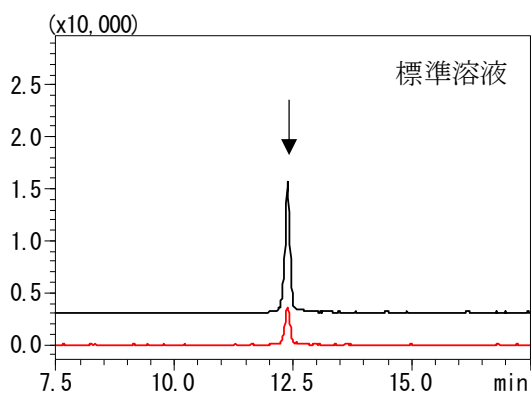
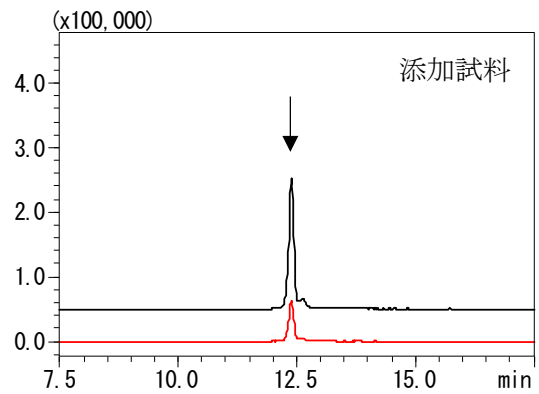
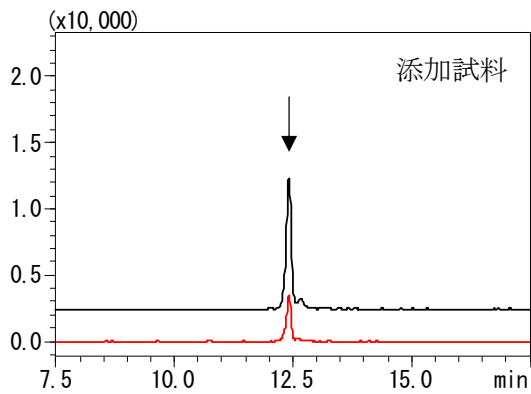
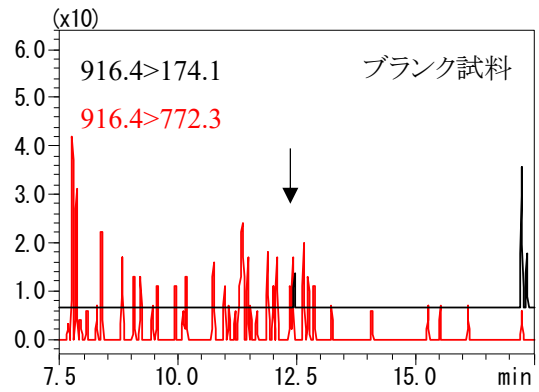
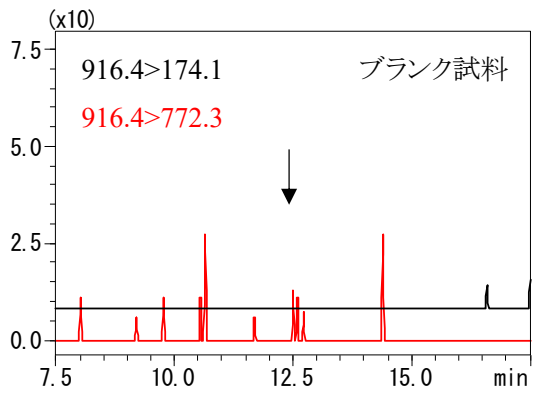


図 4-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-2 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.1 mg/kg)

【タイロシン A】



【タイロシン A】

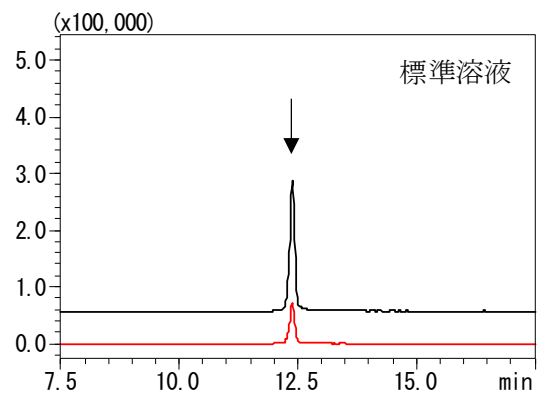
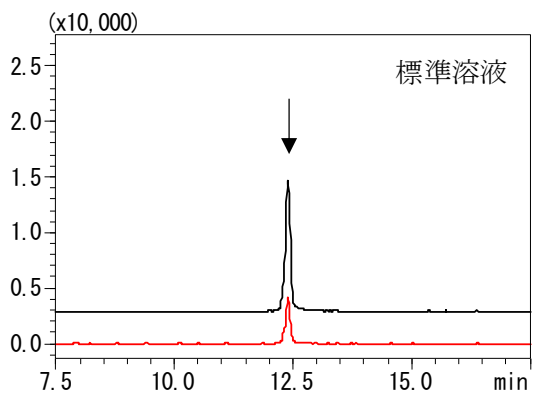
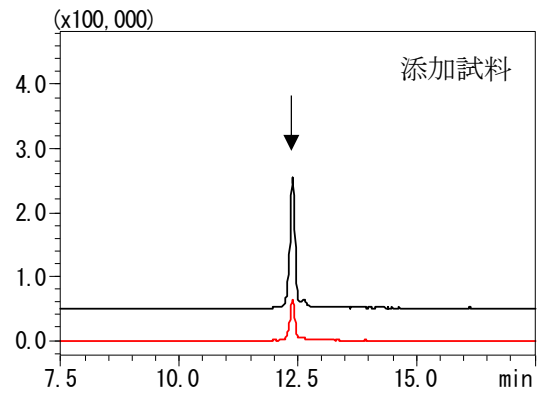
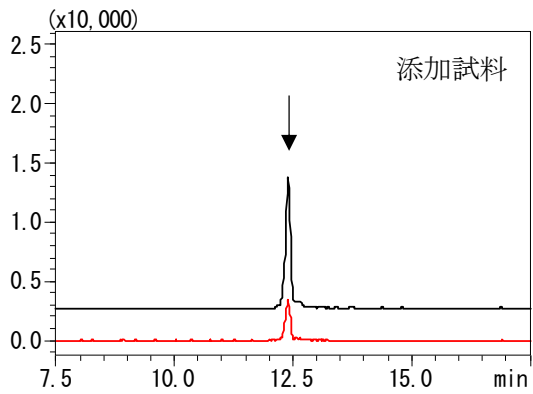
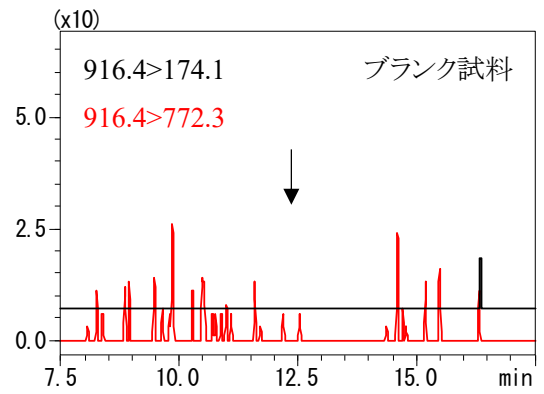
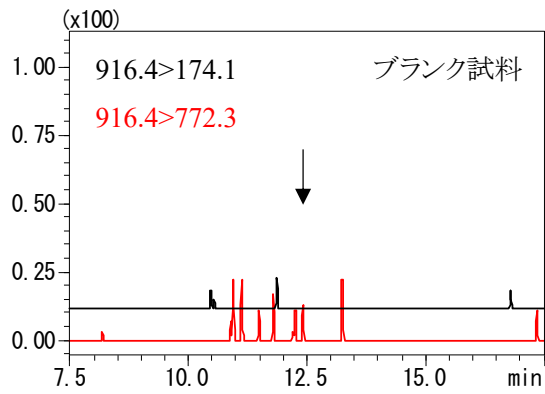


図 4-3 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-4 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.1 mg/kg)

【タイロシン A】



【タイロシン A】

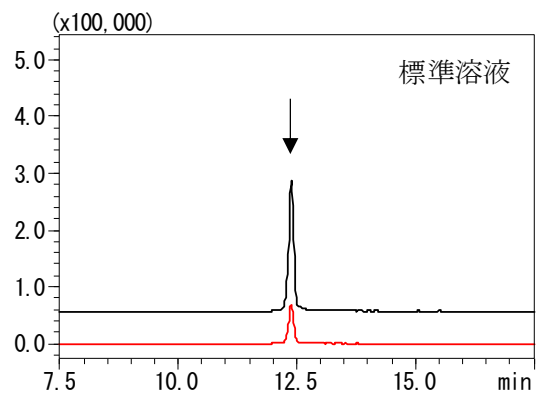
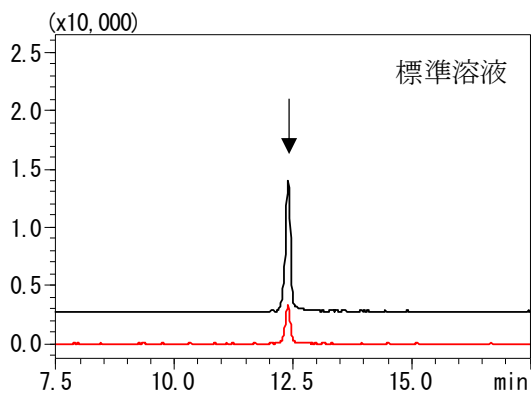
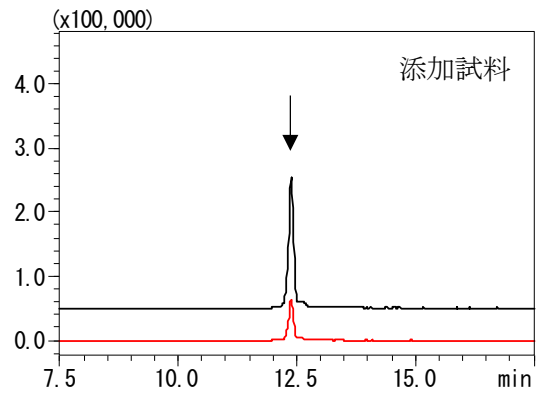
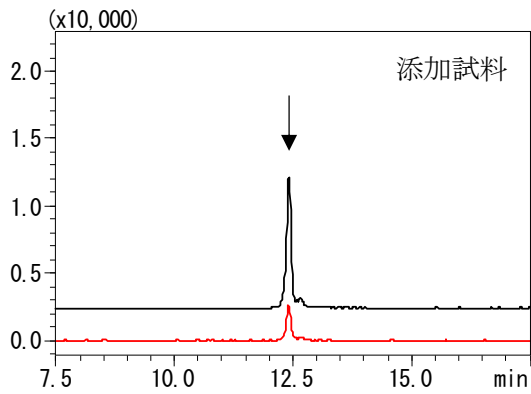
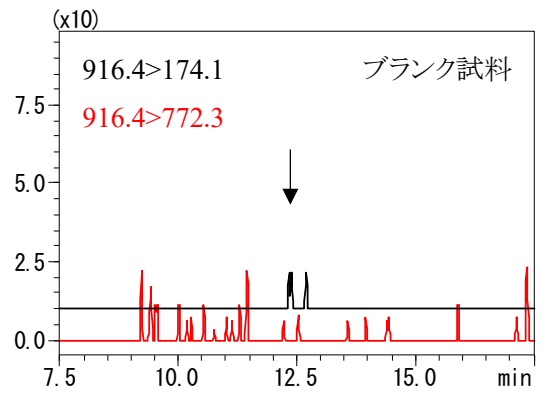
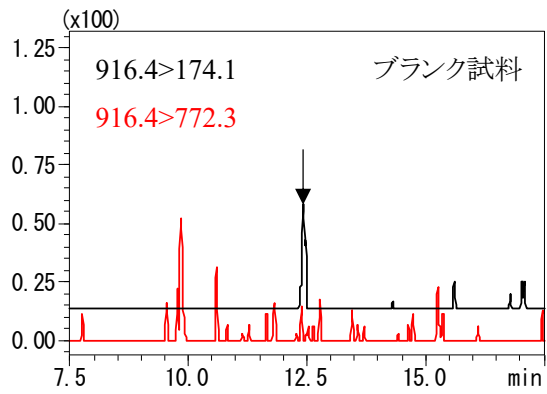


図 4-5 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-6 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.1 mg/kg)

【タイロシン A】



【タイロシン A】

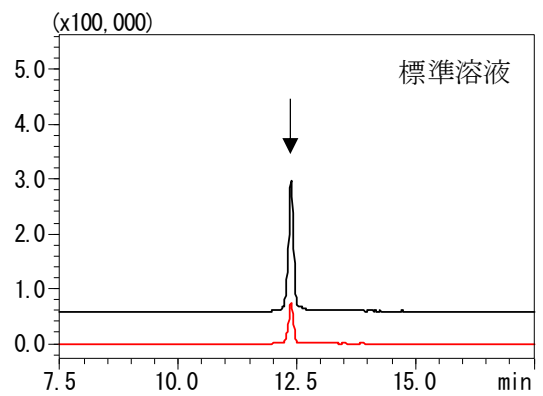
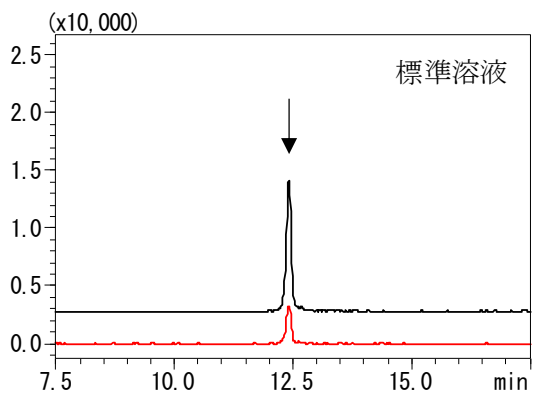
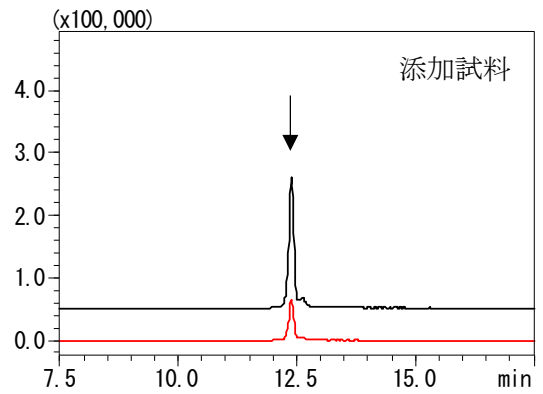
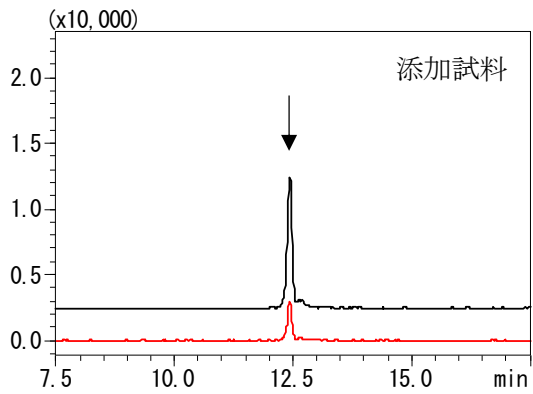
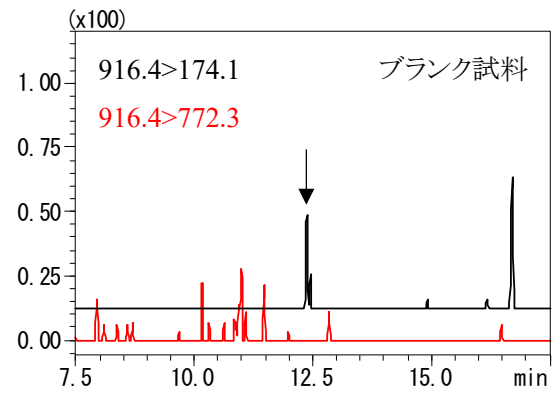
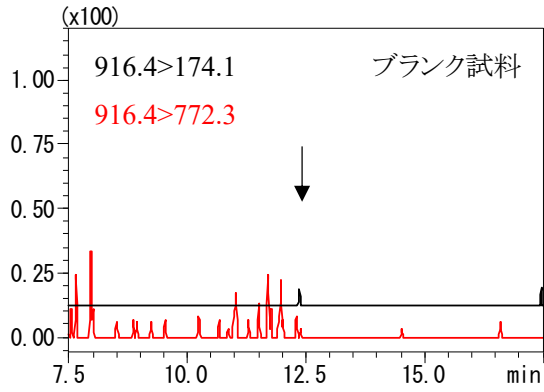


図 4-7 牛乳の SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-8 牛乳の SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.1 mg/kg)

【タイロシン A】



【タイロシン A】

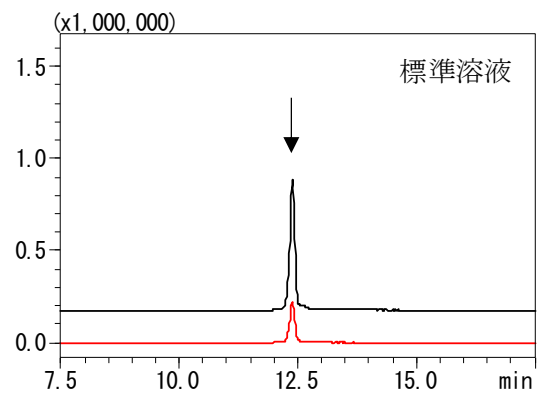
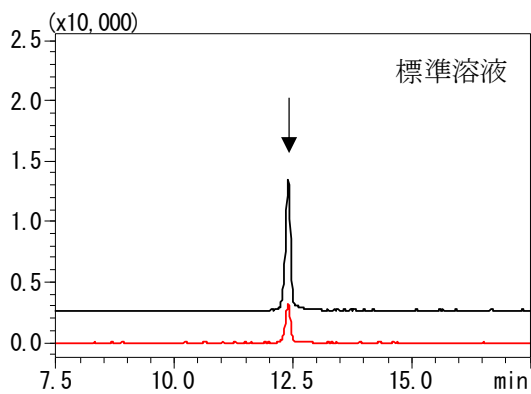
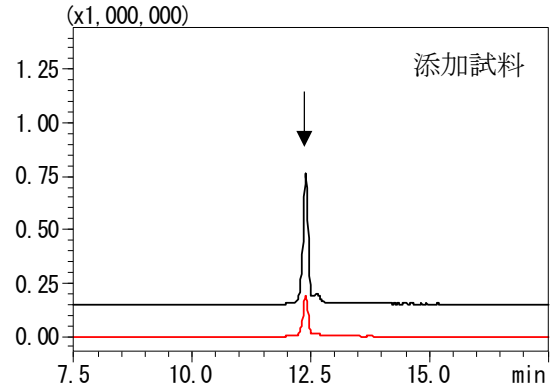
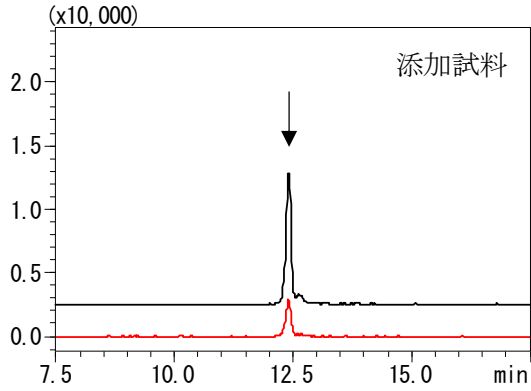
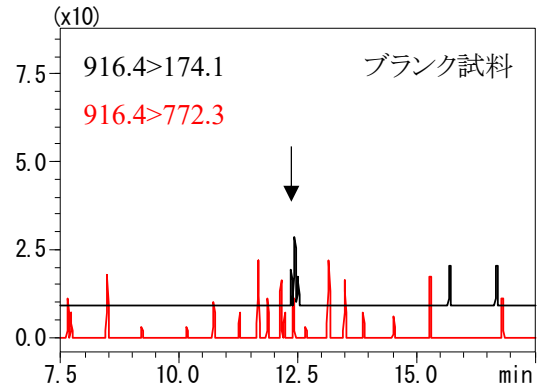
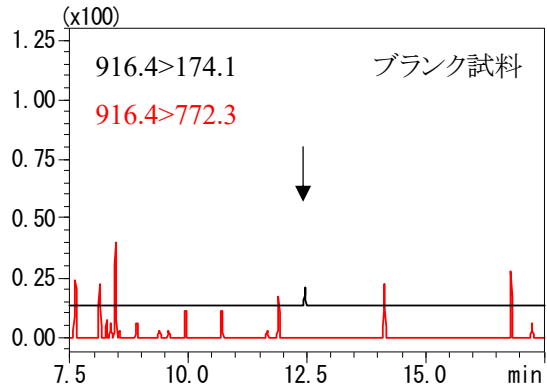


図 4-9 鶏卵の SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.005 mg/kg)

図 4-10 鶏卵の SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.3 mg/kg)

【タイロシン A】



【タイロシン B】

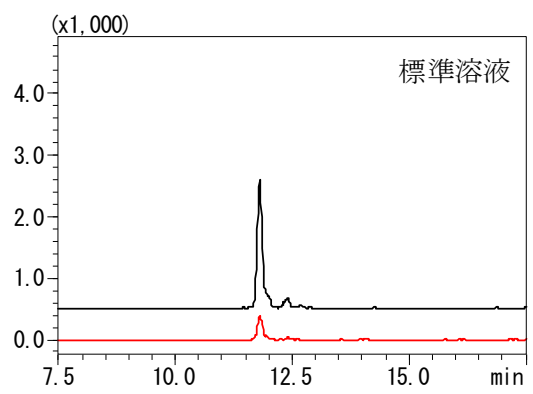
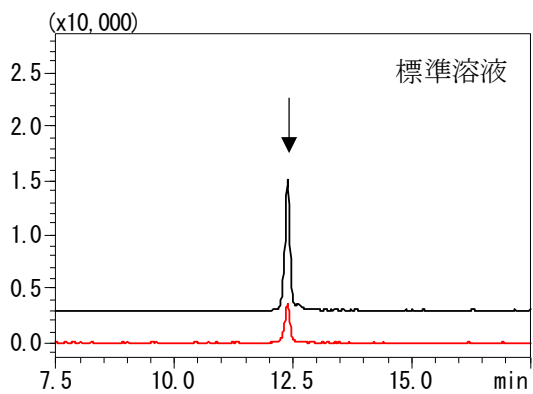
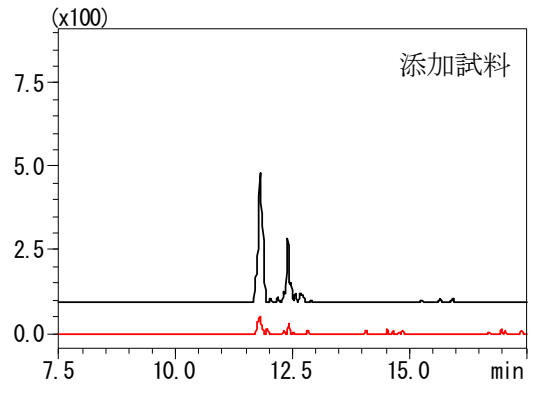
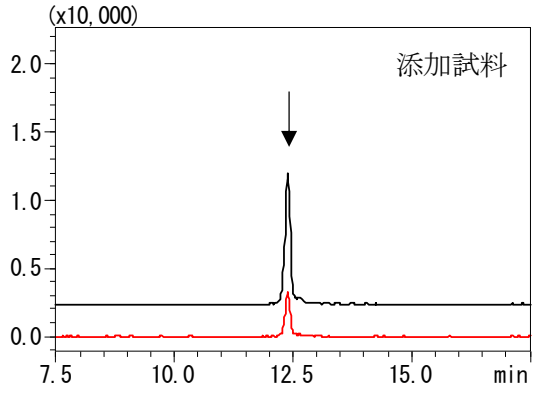
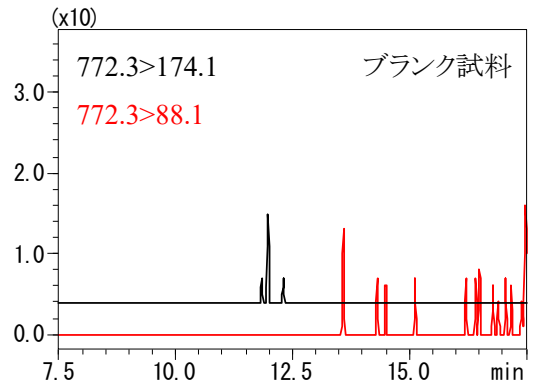
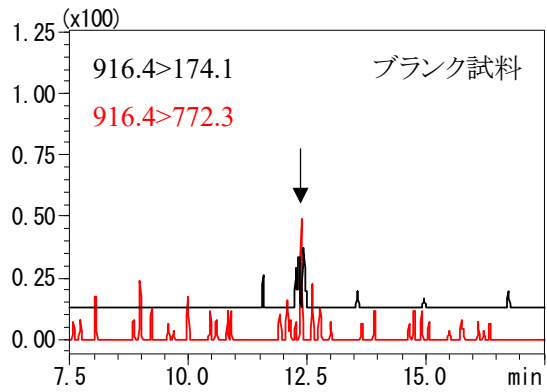


図 4-11 はちみつの SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.005 mg/kg)

【タイロシン A】



【タイロシン B】

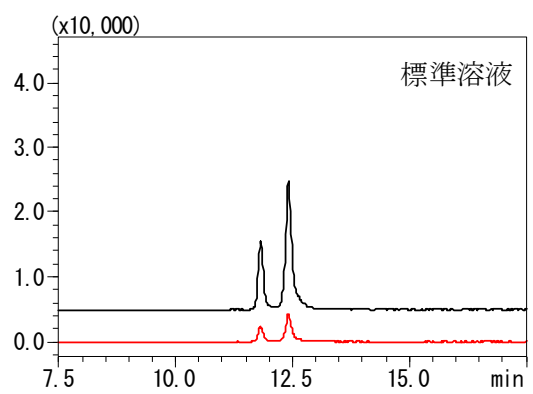
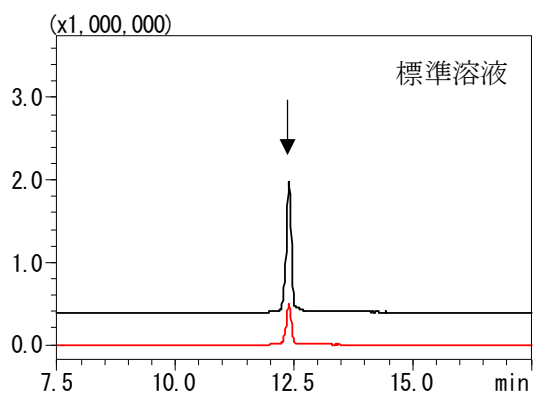
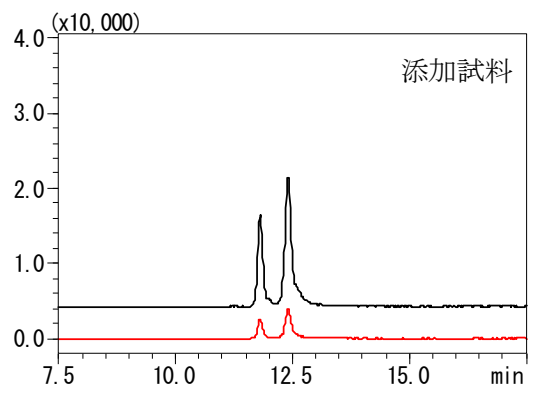
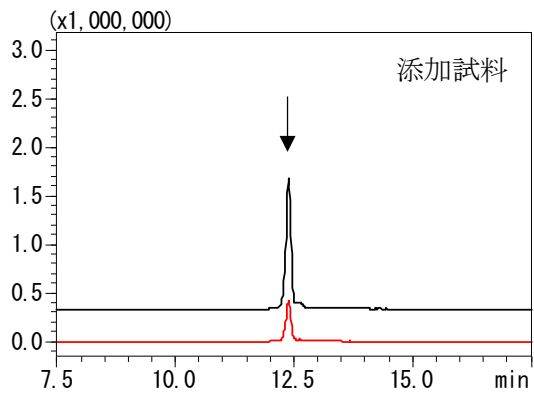
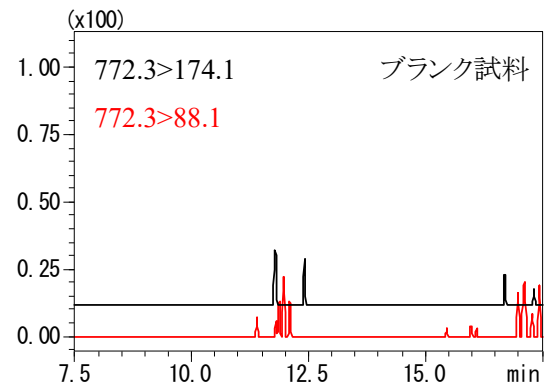
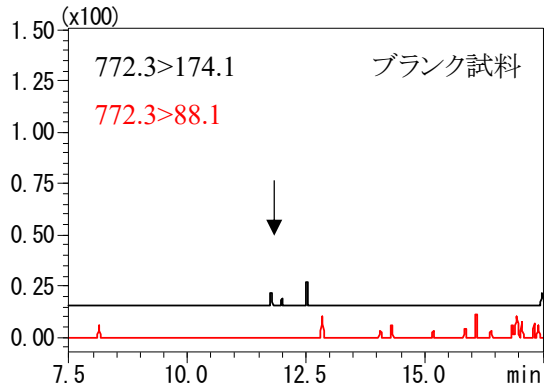


図 4-12 はちみつの SRM クロマトグラム
(タイロシン A 添加濃度 0.7 mg/kg)

【タイロシン B】



【タイロシン A】

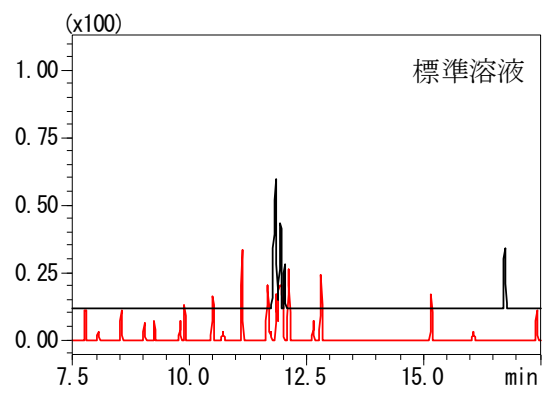
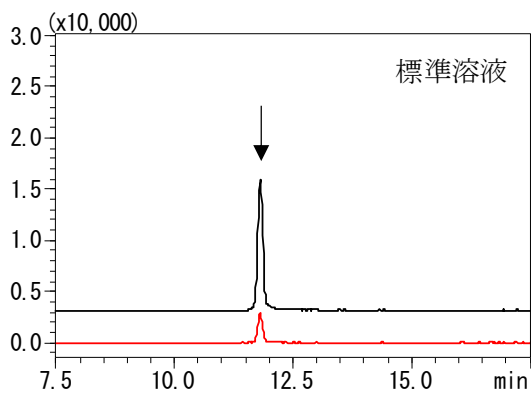
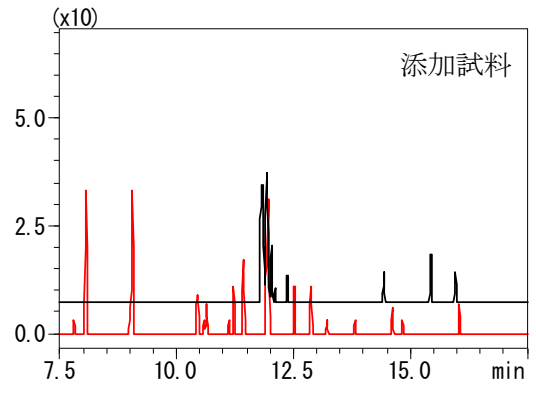
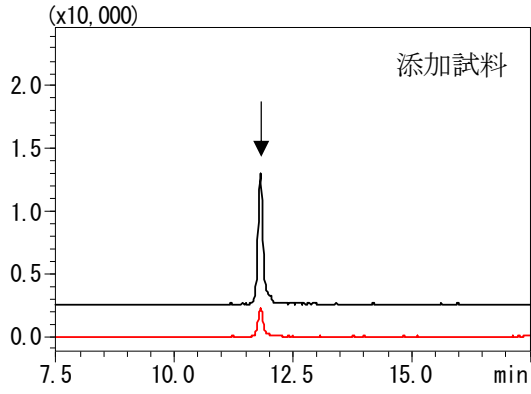
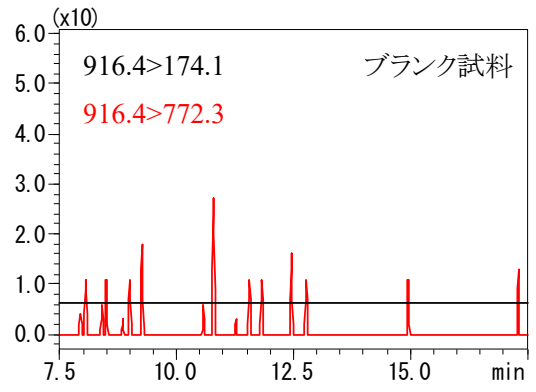
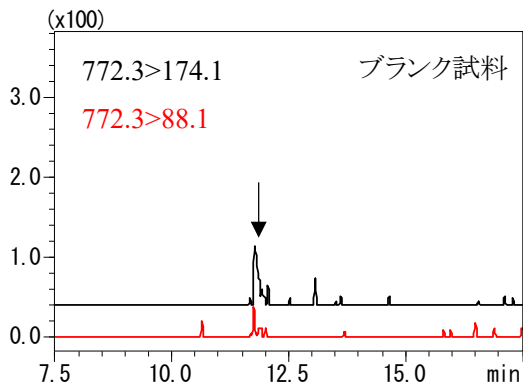


図 4-13 はちみつの SRM クロマトグラム
(タイロシン B 添加濃度 0.004 mg/kg)

【タイロシン B】



【タイロシン A】

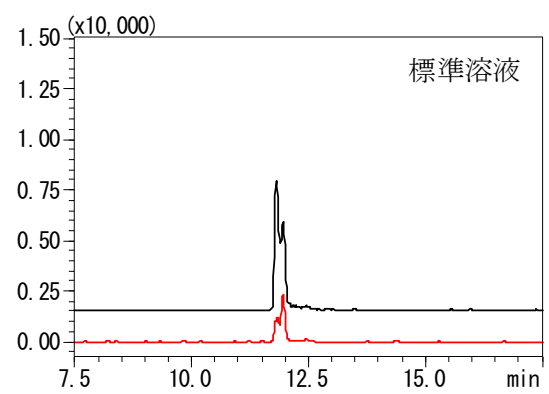
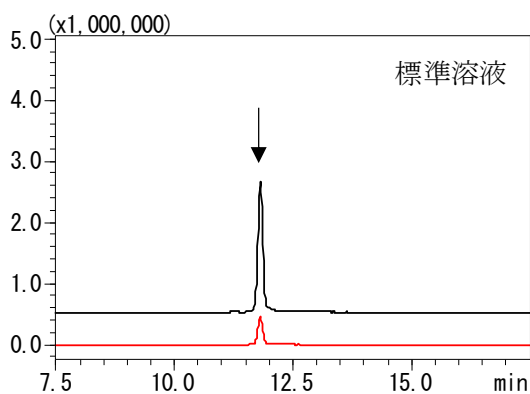
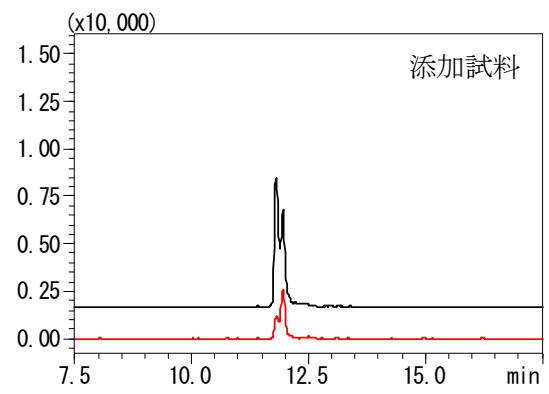
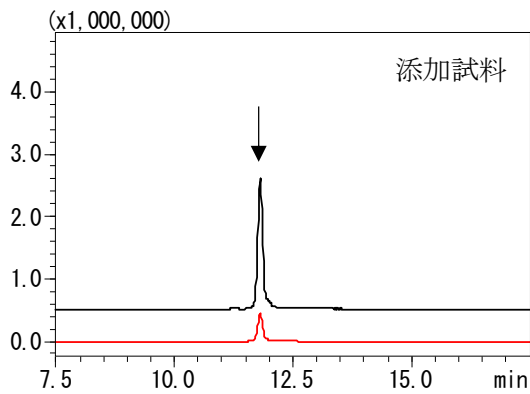
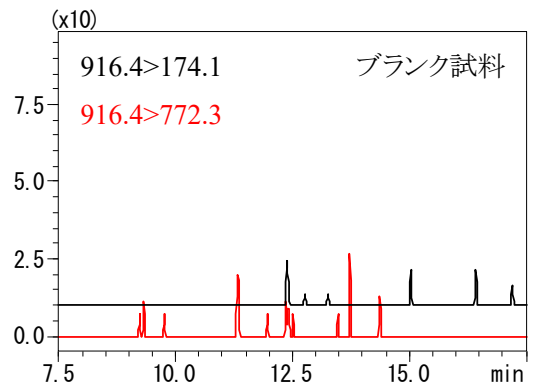
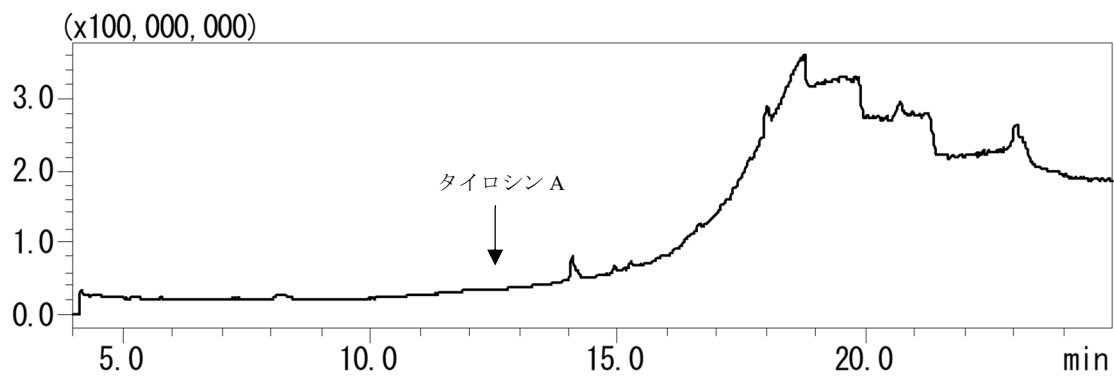


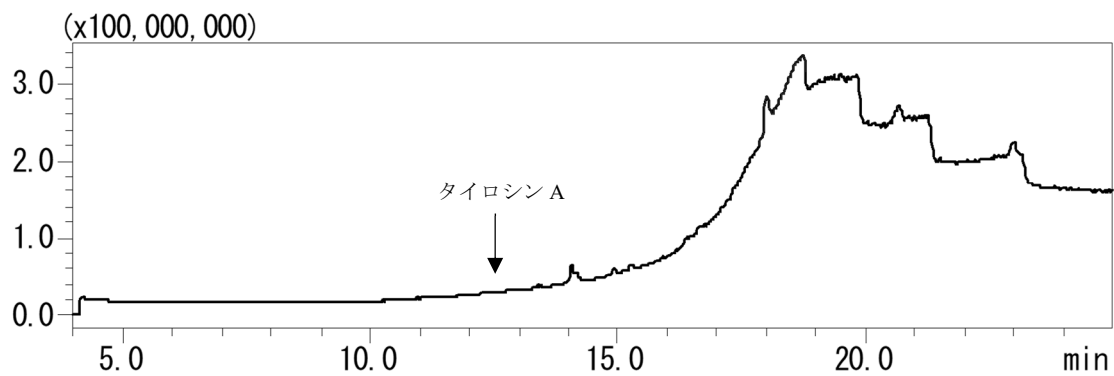
図 4-14 はちみつの SRM クロマトグラム
(タイロシン B 添加濃度 0.7 mg/kg)

②各blank試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

牛の筋肉



牛の脂肪



牛の肝臓

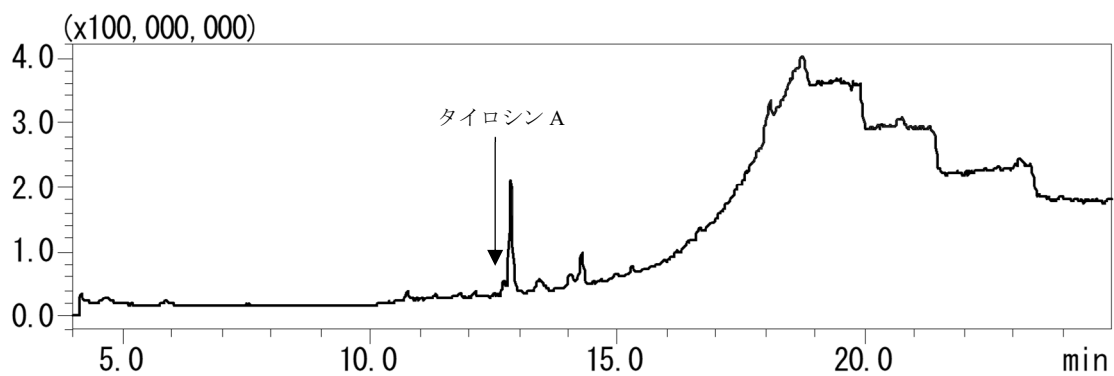
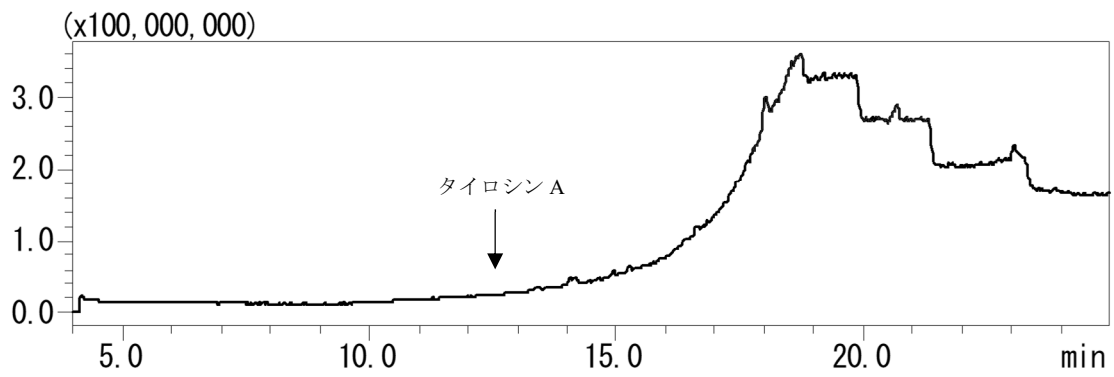
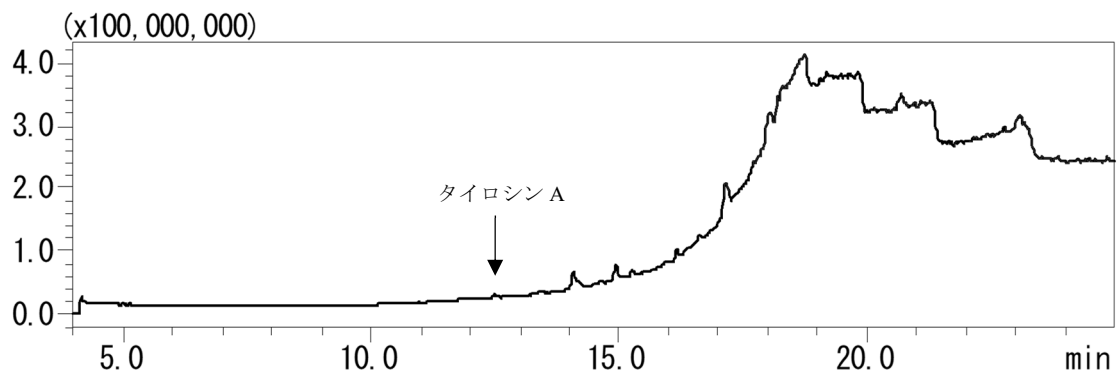


図 5-1 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲: 50~1000 amu)

牛乳



鶏卵



はちみつ

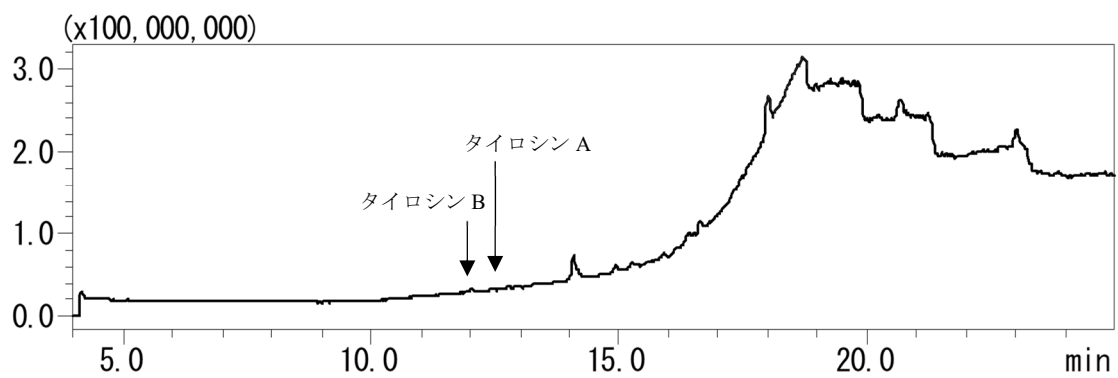


図 5-2 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲: 50~1000 amu)