

LC/MS/MS によるりんごジュース中のパツリンの残留分析

赤木浩一・畑野和広

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Residue Analysis of Patulin in Apple Juice Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

Kouichi AKAKI and Kazuhiro HATANO

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

Summary

A simple and rapid method was developed for the analysis of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). ^{13}C -patulin was added as an internal standard before extraction. Patulin was extracted with ethyl acetate. The LC separation was performed on a C18 column (50 mm \times 2 mm i.d.) using 2mmol/L ammonium acetate acetonitrile (94:6) as the mobile phase at a flow rate of 0.2 mL/min. The mass spectral acquisition was done in the negative ion mode by applying selected reaction monitoring (SRM). The recovery of patulin from apple juice was 99.2%. The lower limit of quantification was 0.001 ppm. Sixteen apple juice were analyzed by this method. Patulin was detected in 10 apple juice at the level of 0.003 - 0.011 ppm.

Key Words : パツリン Patulin , 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC/MS/MS ,
りんごジュース Apple juice

はじめに

パツリンは、ペニシリウム属やアスペルギルス属等の真菌によって産生されるかび毒で、真菌が付着した果実等から検出され、汚染の可能性が高い主要食品としてりんご果汁が知られている。パツリンの毒性については、動物実験において、消化管の充血、出血、潰瘍等の症状が認められている。国際がん研究機関(IARC)では、パツリンをグループ3 (人に対する発がん性について分類できないもの)としている¹⁾。

食品、添加物等の規格基準の一部が改正され、食品衛生法第7条第1項の規定に基づき、新たにりんごジュースおよび原料用りんご果汁にかかわるパツリンに関する規格基準が設定された²⁾。

パツリンの分析方法には、食品衛生法で定められた分析法(以下「告示法」)があり、定量定性試験に紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフを用い、確

認試験に高速液体クロマトグラフ・質量分析装置を用いることとなっている²⁾。

高速液体クロマトグラフィー/質量分析法は、定性能力が高いがイオン化の促進や抑制により定量に問題があることが報告されている³⁾。

そこで、りんごジュース中のパツリンを ^{13}C でラベル化した内部標準物質を使用し、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置を用いて、高感度に測定する方法について検討した。

また、本法を用いてりんごジュース中のパツリン汚染の実態を調査した。

実験方法

1. 試料

市販の100%りんごジュースを用いた。

2. 試薬等

標準品：パツリン標準品は林純薬工業（株）製を使用した。

標準原液：パツリン標準品 2.5mg を精秤し、100mg/L となるよう酢酸エチルで溶解し調製した。

標準溶液：標準原液を窒素で吹き付け乾固させ酢酸水で適宜溶解して使用した。

内部標準原液：¹³C パツリン標準溶液(100mg/L)は林純薬工業（株）製を使用した。

内部標準溶液：内部標準原液 0.1mL を窒素で吹き付け乾固させ酢酸水 20mL で溶解して使用した。

酢酸水：蒸留水 100mL に酢酸を加え pH3.6 ~ 4.0 に調製し使用した。

ろ紙：アドバンテック東洋(株)製 5A を使用した。

0.45μm フィルター：関東化学（株）製を使用した。

その他の試薬：すべて特級品あるいは HPLC 用を使用した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズを使用した。

質量分析装置(MS/MS)：Applied Biosystems 社製 API4000 を使用した。

4. 測定条件

LC/MS/MS の測定条件は Table 1 に示した。

Table 1. LC/MS/MS Conditions for Analysis of Patulin

Column	YMC-Pack Pro C18 2mm × 50mm	
Column temp.	30	
Mobile phase	2mmol/L ammonium acetate + acetonitrile(96:4)	
Injection volume	5μL	
Ionization	ESI(-)	
Ionspray voltage	-4.5 kV	
Turbo gas temp.	750	
Declustering potential	-45V	
Dwell time	150ms	
	Quantity	Quality
Precursor ion	<i>m/z</i> 153(156)*	<i>m/z</i> 153(156)*
Product ion	<i>m/z</i> 109(111)*	<i>m/z</i> 81(82)*
Collision energy	-12V	-16V

(*)*: ¹³C-Patulin

5. 試験溶液の調製

試料 20g（果肉を含む場合は、予め遠心機を用い上澄みを使用）を 100mL 分液ロートにとり、内部標準溶液 0.2mL、酢酸エチル 80mL を加えて 10 分間振とうした。静置後酢酸エチル層を約 10g の無水硫酸ナトリウムを載せたロートを用いて 200mL ナシ型フラスコにろ過し、40

以下で減圧濃縮し、窒素を吹き付け完全に乾燥させ酢酸水 2mL を加え溶解させ、0.45μm フィルターでろ過し試験溶液とした。

なお、酢酸エチル層が混濁した場合は遠心機を用い分離して使用した。

6. 定量

標準溶液のクロマトグラムのピーク面積と内部標準溶液のクロマトグラムのピーク面積の比から作成した検量線を用いて、試験溶液中のパツリン濃度を求め試料中の含量を算出した。

結 果 及 び 考 察

1. MS条件の検討

パツリン標準溶液（0.1mg/L）をシリンジポンプを用いて直接 MS 装置に注入し MS 測定条件を検討した。オリフィスプレートの電圧(DP)を変化させ最適化した結果、パツリンの分子からプロトンが外れた *m/z* 153[M-H]⁺ の信号が大きく観測されたのでプレカーサーイオンとした。次にコリジョンエネルギー（CE）を変化させ最適化したところ、*m/z* 109 と *m/z* 81 が強く生成し、それぞれ定量モニターイオン、定性モニターイオンとした。

内部標準溶液については、標準溶液と同じ条件により観測された *m/z* 156[M-H]⁺ をプレカーサーイオンとした。プロダクトイオンについても同様に *m/z* 111 を定量モニターイオン、*m/z* 82 を定性モニターイオンとした。

2. LC条件の検討

カラムは、LC/MS に一般に汎用されている C18 カラムを用いた。移動相は、告示法では水 + アセトニトリル(96:4)を用いることとなっているが、安定したイオン化を得るために LC/MS 法で一般的に使用されている 2mmol/L 酢酸アンモニウム + アセトニトリル(96:4)を用いた。

なお、アセトニトリルの比率が少ないためカラム内に脂溶性物質等が残らないよう測定終了後に 2mmol/L 酢酸アンモニウム + アセトニトリル(10:90)で 10 分間洗浄し、ついで 2mmol/L 酢酸アンモニウム + アセトニトリル(96:4)で 15 分間保持し機器を安定化させた。

3. 検量線

検量線は 0.01 ~ 1.0mg/L の範囲で相関係数 0.9999 であった。

4. 前処理方法

試料からのパツリンの抽出は、告示法のとおり酢酸エチルによる方法で行った。告示法では 2 回抽出しているが、今回は内部標準物質を使用しており、測定値が補正されることから迅速化のために酢酸エチル量を増やし 1 回抽出することとした。

精製方法については、告示法では炭酸ナトリウムによる洗浄が明記されているが、パツリンはアルカリにより分解するために操作は速やかに行う必要がある。LC/MS/MS による分析法では紫外部検出器による方法のような夾雑ピークの影響はないため、この操作は省略した。

5. 添加回収試験

本法を用いて、パツリンを含まないことを確認したりんごジュースにパツリンを 0.1ppm 添加して回収試験 (n=3) を行った。回収率は 99.2 %、相対標準偏差は 1.4 % と良好であった。また、内部標準物質の回収率は 63.5 ~ 87.0 % (n=19) であった。

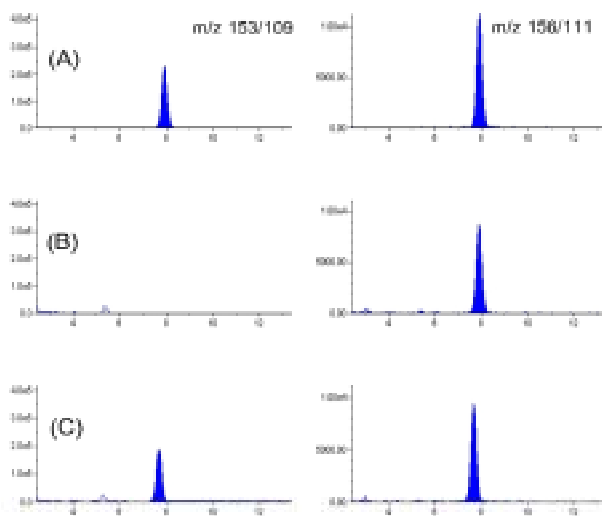


Fig.1. SRM chromatograms of patulin(1.0mg/L) in standard solution (A), blank apple juice (B) and apple juice fortified with 0.1mg/kg (C).

Fig.1 に標準溶液(1mg/L)、パツリンを含まないりんごジュースおよびパツリンを 0.1ppm 添加したりんごジュースから得られたクロマトグラムを示した。定量に支障のある試料由来の夾雑ピークは見られなかった。

なお、本法による定量下限値(S/N=10)は 0.001ppm であった。

6. 残留実態調査

本法を用いて市販の 100%りんごジュース 16 検体について残留実態調査を行った。国産のストレート飲料(6 検体)ではいずれもパツリンは検出されなかったが、濃縮還元(9 検体)および炭酸飲料(1 検体)では、それぞれ 0.003 ~ 0.011ppm, 0.008ppm といずれの検体からも検出された。

なお、告示法で示されている定量下限値 0.010ppm を超えたものは 1 検体で、すべて基準値の 0.050ppm 以下であった。

ま と め

LC/MS/MS によるりんごジュース中のパツリンの迅速分析法について検討した。

試料に内部標準物質を加え、酢酸エチルで抽出し、減圧乾固後、酢酸水で溶解して試験溶液とした。内部標準物質による補正により回収率および再現性とも良好な結果が得られた。また、定量に支障を与える試料由来の夾雑ピークも見られなかった。

本法は高速液体クロマトグラフによる告示法に比べ、操作が簡便で迅速に分析できることから、日常の残留分析法として非常に有用な手法と考えられた。

文 献

- 1)平成 14 年 12 月 25 日農林水産省生産局プレリリース
- 2)厚生労働省告示第 369 号：食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件, 平成 15 年 11 月 26 日
- 3)Riediker, S., Stadler, R. H. : Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, Anal. Chem., 73, 1614 ~ 1621, 2001