

短報

高速液体クロマトグラフィー /
タンデム質量分析法を用いた
リンゴ果汁中のパツリンの分析

甲斐茂美, 赤星 猛*, 脇ますみ, 藤巻照久

Analysis of patulin in apple juice using liquid
chromatography / tandem mass spectrometry

Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI,

Masumi WAKI and Teruhisa FUJIMAKI

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カビ毒であり、その毒性は急性毒性として、消化管の充血、出血、潰瘍等である。パツリンの構造式を図1に示した。原因菌としては、リンゴの腐敗菌の *Penicillium expansum* 等が知られている。

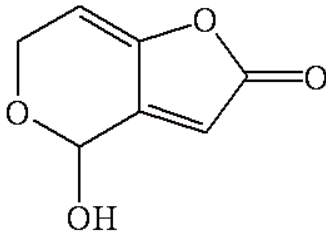


図1 パツリンの構造式 (分子量 154.03)

これらのカビは、りんごの収穫、包装、輸送時等に受けた損傷部から侵入すると考えられている。特に、台風等により落下して傷が付くとともに、土壌に直接触れた果実は、パツリン汚染のリスクが高いといわれている。また、湿度が高ければ、低温でもパツリンを作ることが知られており、日本の気候条件でも十分に作られる可能性があることから、不適切な貯蔵等によりパツリンを産生する恐れがある^{1,2)}。このため、わが国では平成16年より、りんごジュース及び原料用りんご果汁について「パツリンの含有量が0.050ppm

を超えるものであってはならない」との規格基準を設定した^{3,4)}。パツリンの試験法は、定性及び定量試験として紫外分光光度型検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法が、確認試験として液体クロマトグラフィー / 質量分析法 (LC/MS) またはガスクロマトグラフィー / 質量分析法 (GC/MS) が厚生労働省告示^{3,4)} に示されている。当所では、平成17年度より HPLC 及び LC/MS を用いてリンゴジュース中のパツリン検査を実施してきた。しかし、パツリンの HPLC での測定では、パツリンの溶出時間付近にリンゴジュースに含まれる糖分等に由来するピークが検出されるため、定量の際にはこれらの妨害物質による影響を受けないよう、サンプルの状況に合わせて分析条件を変更する必要がある。また GC/MS 法ではパツリンを誘導体化して測定するため、抽出、精製等の前処理操作が煩雑である。

一方、近年普及してきた高速液体クロマトグラフ / タンデム質量分析装置 (LC/MS/MS) は、食品由来の夾雑成分中から多数の目的物質を精度よく検出することが可能であり、LC/MS 以上の性能を有することから、パツリンの分析において非常に有効であると思われる⁵⁾。著者らは、従来からイオントラップ機能を有する LC/MS/MS が、マルチブルリアクションモニタリング (MRM) による定量に加え、エンハンスドプロダクトイオンスキャン (EPI) の機能により、高感度測定と構造解析能を合わせ持ち、高い選択性を有することに着目し、検査の確認に活用してきた。

そこで今回、パツリンの分析法としてイオントラップ LC/MS/MS による確認法及び定量法を確立し、日常検査への適用について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料及び試薬

試料は神奈川県内で販売されていたリンゴジュースを分析対象とした。

パツリン標準品は和光純薬工業 (株) 製を用いた。標準品 5mg を精秤し、酢酸エチル 25ml に溶解して 200 µg/ml としたものを標準原液とした。標準原液を正確に 1ml 採り、窒素気流下で乾固した後、酢酸溶液 (pH4.0) で段階的に希釈し各濃度の標準溶液とした。

酢酸エチルは和光純薬工業 (株) 製残留農薬分析用、アセトニトリルは和光純薬工業 (株) 製 LC-MS 用を用い、他は特級を用いた。液層分離紙は Whatman 社製 1PS を用いた。

2. 装置及び分析条件

LC/MS/MS は エービー・サイエックス社製

神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1
* 前 理化学部

3200Qtrap™ LC/MS/MS を用い、イオン源は ESI、イオン化モードはネガティブで測定した。イオンスプレー電圧 -4.0kV、イオン源温度 600℃、ネプライザーガス圧 50psi、ターボガス圧 80psi で測定した。MRM モードではプレカーサイオンは m/z 153、プロダクトイオンは定量イオン m/z 109 (コリジョンエネルギー (CE) -12V)、参照イオン m/z 81 (CE -16V) で測定した。分析カラムは関東化学社製 MightysilRP-18GP (2.1mm i.d. × 150mm, 3 μm) を用い、カラム温度 40℃、移動相はアセトニトリル-2mM 酢酸アンモニウムを用い、0-15min ; (5 : 95) から (90 : 10) までの直線グラジエント、流速 0.2ml /min で送液し、注入量 5 μl で分析した。

3. 試験溶液の調製

試験溶液の調製法は告示法³⁾に準じて行った。試料 5.0 g (濃縮した原料用果汁では、濃縮した倍数の水で希釈したもの) を正確に採り、酢酸エチル 10ml で 3 回抽出した。得られた酢酸エチル層を 1.5% 炭酸ナトリウム溶液 2ml で速やかに洗浄し、液層分離紙を用いて脱水しながら、減圧濃縮器中にろ過した。40℃ 以下で濃縮した後、窒素気流下で酢酸エチルを除去した。残留物に酢酸水溶液 (pH4.0) 1.0ml を正確に加えて溶解し、13000rpm で 5 分間遠心分離し、上澄液を試験溶液とした。

結果と考察

1. LC/MS/MS 測定条件について

1) EPI 分析条件

分析の選択性を高めるために、構造情報の得られる、イオントラップ LC/MS/MS 特有の機能の EPI モードの測定条件について検討した。パツリンはイオン源を ESI とし、ネガティブモードでイオン化が可能であった。パツリン標準溶液について、 $[M-H]^-$ の m/z 153 プレカーサイオンと、それぞれ複数のプロダクトイオンが測定できる条件を求めた。CE = -10V のとき $[M-H-CO]^-$ の m/z 125, $[M-H-CO_2]^-$ の m/z 109, $[M-H-C_2O_3]^-$ の m/z 81 の各フラグメントイオンが得られた (図 2A)。EPI による分析では 0.25ng までの範囲で同様のスペクトルが得られた。これらのスペクトルは化合物の構造情報を反映しており、定性分析の指標として有効であると考えられた。

2) MRM 分析条件

EPI モードよりさらに高感度な測定による定量、確認のため MRM モードによる分析条件について検討した。イオン源をエレクトロスプレーイオン化法と

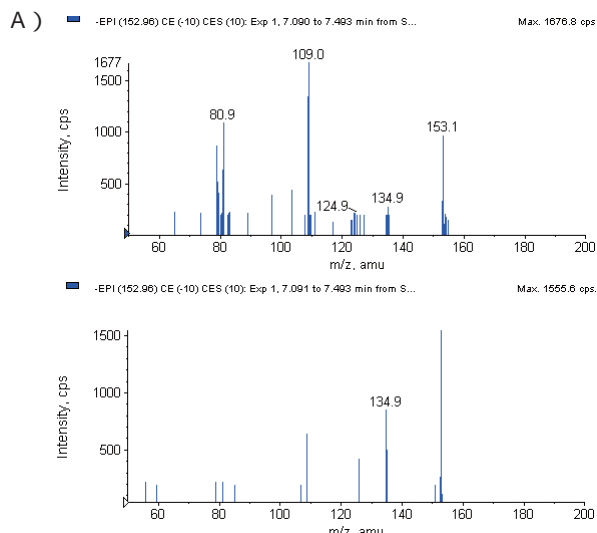


図 2 EPI 分析によるスペクトル

- A) パツリンの標準溶液 (50ppb)
 B) パツリンの検出が疑われた検体の抽出液

し、ネガティブモードでイオンソースの最適化を行った。 $[M-H]^-$ である m/z 153 をプレカーサイオンとし、 $[M-H]^-$ から派生するプロダクトイオンのうち、最も感度が強く得られた m/z 109 を定量イオン、次に感度が強く得られた m/z 81 を参照イオンとした。定量イオンで検量線を作成したところ、0.025 ~ 2.5ng の範囲で良好な直線性を示し、検量線の相関係数 (r) は 0.999 であった。MRM モードにおいて、S/N が 10 を与える定量限界値を、エービー・サイエックス社の解析ソフト Analyst を用いて求めたところ、試料中濃度で 0.001 μg/g であった。これは、告示法に示された定量限界値 (0.01 μg/g) に対し、十分に満足する値であった。

3) マトリックスの測定値への影響

LC/MS/MS における分析では、試料中のマトリックスが目的成分のイオン化に影響を与えることが懸念される。そこで、リンゴジュースの抽出溶液で標準原液を希釈して調製したマトリックス添加標準溶液と、酢酸溶液で調製した標準溶液 (以下溶媒標準溶液) の測定値を比較し、マトリックスの測定値への影響を検討した。溶媒標準溶液のピーク面積 (b) に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積 (a) の比 (a/b) は、0.7 ~ 1.2 の範囲を超え、目的物質のイオン化にマトリックスによる影響が認められた。そこで、定量にはマトリックス添加標準溶液による検量線の作成が有効であることがわかった。

4) 添加回収試験及び確認試験

LC/MS/MS の MRM 分析を用いて、リンゴジュースにパツリンを告示法の定量限界値の 2 倍である 0.02 μg/g になるよう添加して回収試験 (n=5) を

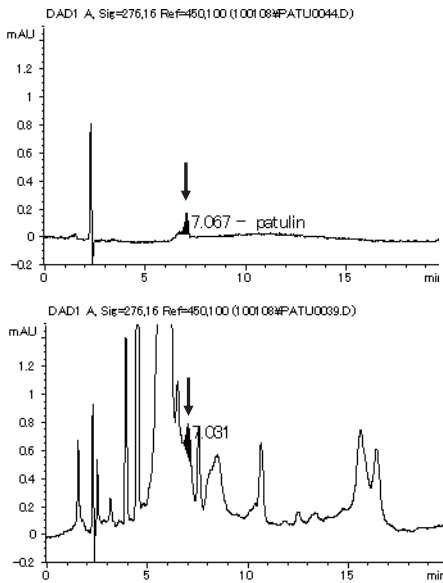


図3 HPLC分析によるクロマトグラフ

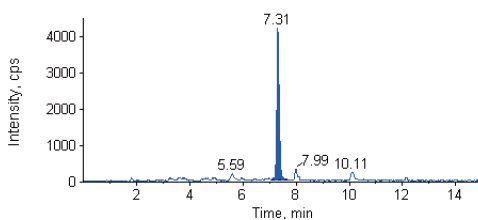
A) パツリンの標準溶液 (50ppb)

B) パツリンの検出が疑われた検体の抽出液

装置; Agilent社製 1100シリーズ, カラム; Mightysil RP-18 GP (4.6mm i. d. x 150mm, 5 μ m), カラム温度 40, 検出器; UV276nm, 移動相; アセトニトリル・水 (4:96), 流速; 1.0ml/min, 注入量; 20 μ l

A) sp50_3 - 153.0 / 108.9 (Standard) 153.0/108.9 amu - sample 6 of 23 from 100510.wiff

Area: 2.62e+004 counts Height: 4.18e+003 cps RT: 7.31 min



B) A2 - 153.0 / 108.9 (Unknown) 153.0/108.9 amu - sample 22 of 23 from 100510.wiff

Area: 8.34e+002 counts Height: 1.18e+002 cps RT: 7.41 min

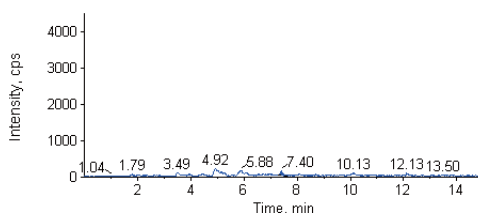


図4 MRM分析によるクロマトグラフ

A) パツリンの標準溶液 (50ppb)

B) パツリンの検出が疑われた検体の抽出液

行った。定量にはマトリックス添加標準溶液による検量線を用いた。回収率は $80.1 \pm 3.4\%$ 、変動係数は 4.3% と良好な結果が得られた。

また、平成21年度の検査において、HPLCによる分析でパツリンの検出が疑われた検体について、確認のためLC/MS/MSを用いて分析を行った。HPLCの分析で得られたクロマトグラムを図3に、LC/MS/MSのMRM分析の定量イオンによるクロマトグラム

を図4に示した。HPLCの分析では、試験溶液のクロマトグラムには、パツリンのピークの保持時間付近にリンゴジュース由来の妨害物質のピークが検出され、定量結果に影響を与えていることが懸念された(図3B)。この試験溶液をLC/MS/MSのMRMモードで分析したところ、試験溶液のピーク(図4B)は、告示法の定量限界値に相当する標準溶液のピーク(図4A)をはるかに下回ることが確認された。さらに、LC/MS/MSのEPIモードで測定し、標準溶液のスペクトル(図2A)と比較したところ、試験溶液からは特異的なプロダクトイオンが観察されず、パツリンの検出は確認できなかった(図2B)。

まとめ

リンゴの腐敗菌の *Penicillium expansum* 等により産生されるカビ毒のパツリンについて、LC/MS/MSによる定量・確認法を確立し、日常検査への適用を検討した。LC/MS/MSによる測定では、誘導体化等の複雑な前処理を行うことなく、簡便な抽出法で得られたサンプルでの測定が可能であった。また、イオントラップLC/MS/MSのEPIやMRMによる分析は、高感度であると共に、妨害物質の影響を排除することが可能であり、分析精度を飛躍的に向上させることができることが明らかになった。カビ毒の食品汚染に対する対策は、海外では規制があるものの、我が国ではまだ残留基準値が定められておらず、食品への汚染が懸念されるカビ毒が数多く存在している。今後はこのようなカビ毒に対しても、LC/MS/MS等を用いた分析法を導入し、流通食品のモニタリング調査を進めていきたいと考える。

(平成22年8月20日受理)

文献

- 1) 横田栄一：りんごジュースおよび原料用りんご果汁に含まれるパツリンに関する規格基準の設定，食品衛生研究，54(3)，pp7-10(2004)
- 2) 田端節子：食品分析インフォメーション Vol.12，食品衛生研究，55(11)，pp29-35(2005)
- 3) 厚生労働省告示第369号(平成15年11月26日)
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：乳及び乳製品の成分規格等に関する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について(食安発第126001号，平成15年11月26日)
- 5) 赤木浩一，畑野和広：LC/MS/MSによるリンゴジュース中のパツリンの残留分析，福岡市保健環境研究所報，29，pp145-147(2004)