

短報

果実加工品中のパツリン分析法の検討
及び汚染実態調査

福光徹¹, 井本真理子², 熊坂謙一¹

Survey of patulin contamination in
processed fruit products using a
high-sensitive analytical method

Toru FUKUMITSU, Mariko IMOTO
and Kenichi KUMASAKA

緒言

パツリンは *Penicillium* 属, *Aspergillus* 属等の真菌が産生する毒素であり, りんご果汁を汚染するカビ毒として国際的に規制の対象となっている. 国内では, 清涼飲料水の成分規格として, りんごの搾汁及び搾汁された果汁のみを原料とする清涼飲料水 (以下, りんご搾汁等) に対し, パツリンの含有量が 0.050 ppm を超えるものであってはならないとされている.

国内におけるパツリンの汚染実態調査については, ぶどうやブルーベリー加工品から検出されたとの報告¹⁾もあるが, りんご以外の果実加工品を対象とした報告は少ない. また, パツリンの通知試験法²⁾は清涼飲料水を対象としており, 他の加工品にも対応可能な分析法の報告も少ない. そこで, 様々な果実加工品に対応可能な簡便かつ高感度なパツリン分析法を検討したうえで, パツリンについて規格基準が定められていない果実加工品, すなわち, りんご搾汁等を除く果実加工品を対象にパツリンの汚染実態調査を行ったので報告する.

方法

1. 試薬

パツリン標準溶液は, 富士フイルム和光純薬 (株) 製のパツリン (マイコトキシン試験用) をアセトニトリルに溶かし, 調製した. 内部標準溶液は, 林純薬工業 (株) 製の安定同位体標識パツリン (パツリン

-¹³C₃) 酢酸エチル溶液をアセトニトリルで希釈し, 調製した. アセトニトリルは富士フイルム和光純薬 (株) 製の残留農薬・PCB 試験用 (濃縮 300) 又は LC/MS 用, 酢酸アンモニウムは Merck 社製の LC/MS 用を用いた. 多機能カラムは Romer 社製の MultiSep 228 AflaPat, ろ過用フィルターは Merck 社製のマイレクス-LG (孔径 0.20µm, 直径 13 mm, 親水性, PTFE) を用いた. 水は Merck 社製 Milli-Q Integral 5 で精製した超純水を使用した.

2. 装置及び測定条件

ホモジナイザーは日本精機 (株) 製バイオミキサー BM-2, 振とう機はタイテック (株) 製 SR-2s, 遠心分離機は (株) 久保田製作所製 6200 を用いた. LC-MS/MS 装置及び測定条件は表 1 及び表 2 に示した.

表 1 装置及び測定条件

LC	
装置	ACQUITY UPLC I-Class PLUS (Waters社)
カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters社) 2.1 mmI.D.×100 mm, 粒子径1.7 µm
ガードカラム	ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard Pre-column (Waters社) 2.1 mmI.D.×5 mm, 粒子径1.7 µm
カラム温度	40℃
移動相	2 mM酢酸アンモニウム水溶液 - アセトニトリル (95 : 5) 混液
流量	0.35 mL/min
注入量	5 µL
MS/MS	
装置	Xevo TQ-XS (Waters社)
キャピラリー電圧	1 kV
イオン源温度	150℃
脱溶媒ガス温度	500℃
コーンガス流量	150 L/hr
脱溶媒ガス流量	1,000 L/hr
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化, ネガティブモード (ESI-)
分析モード	選択反応モニタリング (SRM)

表 2 保持時間及び MS/MS 条件

分析対象	保持 時間 (分)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	
			定量	確認
パツリン	2.1	153.1	109.1	81.1
パツリン- ¹³ C ₃	2.1	156.1	111.1	82.1

1 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
2 神奈川県健康医療局生活衛生部生活衛生課

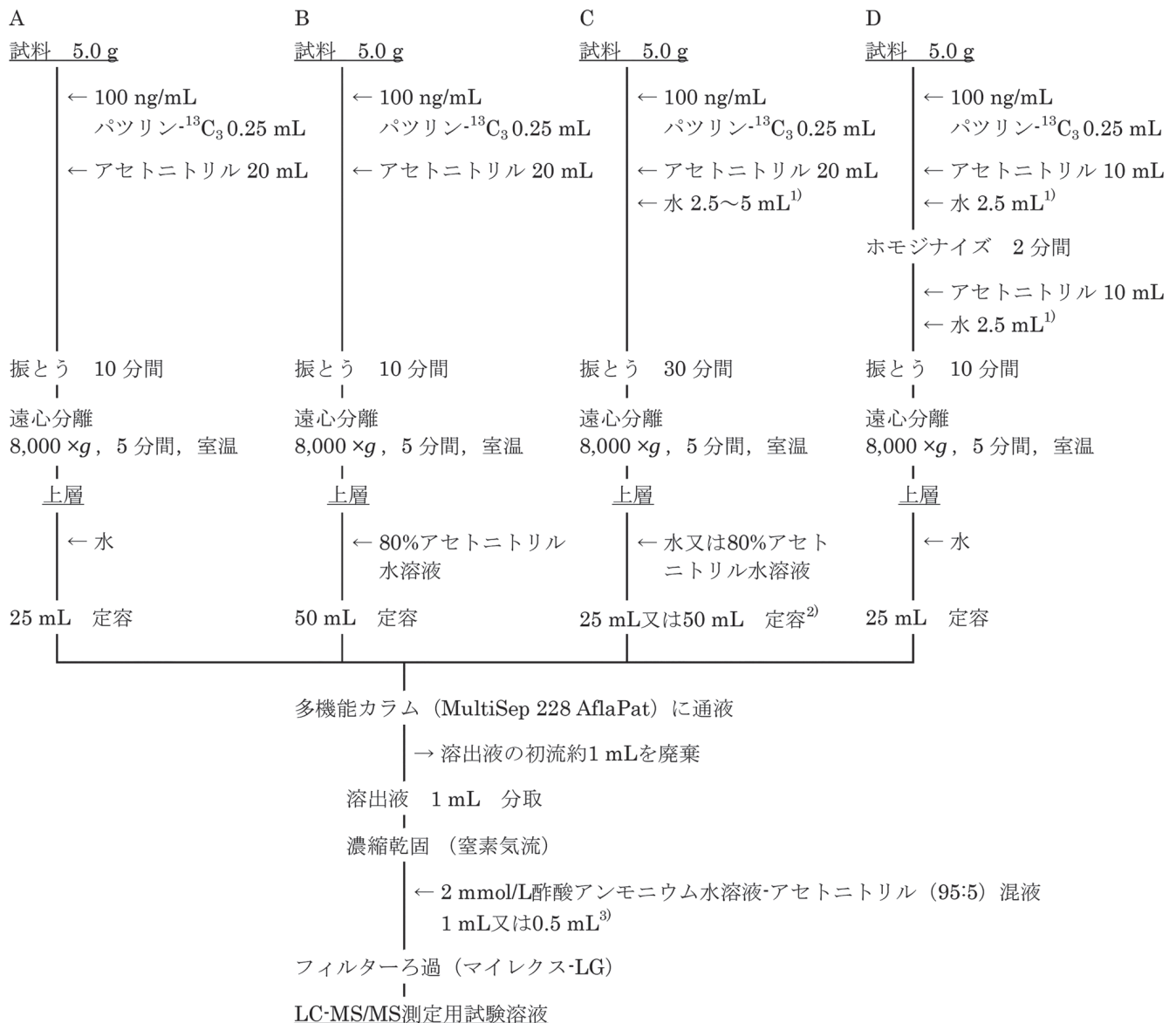


図1 試験溶液の調製方法

A: 清涼飲料水

B: 食酢

C: ペースト等 (果肉を含有する清涼飲料水の一部を含む)

D: ジャム等

1) アセトニトリルのみでは抽出溶媒中での試料の分散が不十分な場合に水を添加

2) 上層が 25 mL 未満の場合は水で 25 mL に定容, 25 mL を超える場合は 80%アセトニトリル水溶液で 50 mL に定容

3) 多機能カラム精製前に 25 mL に定容した場合は 1 mL, 50 mL に定容した場合は 0.5 mL を添加

3. 試験溶液の調製

試料の形態及び性質を考慮し, 図1のA~Dに示す4種類の試験溶液調製方法を用いた.

4. 定量

各標準溶液を 2 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル (95:5) 混液で希釈し, パツリン-¹³C₃ を各 1 ng/mL 含む 8 濃度の検量線用パツリン標準溶液 (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 及び 20

ng/mL) を調製し, 内部標準法によりパツリンを定量した.

5. 妥当性評価及び添加回収試験

りんごジュースを対象試料とし, 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³⁾に従い本分析法の妥当性評価を実施した. 試料への添加濃度は基準値に相当する 50 ng/g とし, 2 併行, 5 日間の添加回収試験により併行精度 (RSD, 目標値:

15% 以下)、室内精度 (RSD, 目標値: 20% 以下) 及び真度 (回収率, 目標値: 70 ~ 120%) を評価した。また、添加濃度に相当する標準溶液 10 ng/mL と比較し、選択性 (目標値: 試料の妨害ピーク面積が標準溶液のピーク面積の 1/10 以下) を評価した。りんごジュース以外の試料については、本分析法の定量限界値に相当する 1 ng/g を添加濃度とし、回収率のみを確認した。なお、各試料に添加したパツリン- $^{13}\text{C}_3$ の回収率は、検量線用パツリン標準溶液におけるパツリン- $^{13}\text{C}_3$ のピーク面積値との比較により算出し、目標値を 40% 以上³⁾とした。

6. 汚染実態調査試料

神奈川県内に流通する果実加工品 (清涼飲料水を含む) 47 検体を対象とした。りんご搾汁等を除くりんご加工品に加え、国内外で検出事例のある果実の加工品^{1,4)}を中心に調査対象を選定した。液体及びペースト状の検体については均一化後、ジャム及び果肉の塊を含む検体についてはフードプロセッサーで細切均一化後、分析に用いた。

結果及び考察

1. 分析法の検討

1.1 測定方法の検討

通知試験法²⁾では定性及び定量に HPLC (UV 検出器) を用いるが、選択性及び感度の向上のため、本検討では LC-MS/MS により測定することとした。LC-MS/MS 測定においては、試料由来成分によりイオン化効率が影響を受ける可能性があることから、パツリン- $^{13}\text{C}_3$ を用いた内部標準法により定量することとした。

1.2 抽出溶媒の検討

通知試験法²⁾は試料に対し酢酸エチルで液液抽出を行うが、ジャムのような糖分の多い固体試料の場合、酢酸エチル中に十分に分散させることは難しいと想定された。そこで、水と混和性のあるアセトニトリルを抽出液として検討した。アセトニトリルに抽出液量として 20% 以上となるように水を加えてホモジナイズすると、ジャムを良好に分散させることができたことから、ジャム以外の試料も含め、抽出にアセトニトリルを用いることとした。

1.3 多機能カラムによる精製方法の検討

多機能カラムを用いることで、アセトニトリル抽出液を簡便に精製可能と報告されている⁵⁾。そこで、本検討においても多機能カラムを採用することとした。このカラムは総アフラトキシンの通知試験法⁶⁾でも用いられており、カラムに試料抽出液を通液すると、夾

雑物はカラムに保持されることで遅れて溶出し、目的物質はカラムに保持されず常に一定の濃度で溶出することから、初期の溶出液の精製度が高い⁶⁾。

カラムの使用条件の検討のため、通液時のアセトニトリル濃度がパツリン- $^{13}\text{C}_3$ の回収率に与える影響を確認した。メーカー推奨の通液時の組成がアセトニトリル及び清涼飲料水 (75:25) の混液であることから、アセトニトリル-水混液におけるアセトニトリル濃度を 75% 以上として検討を行った。その結果、アセトニトリル濃度 75 ~ 85% の場合、90 ~ 95% 程度と良好な回収率が得られたが、アセトニトリル 100% の場合、回収率は 1% 未満であった。以上のことから、通液時のアセトニトリル-水混液におけるアセトニトリル濃度を約 80% に調整することとした。

なお、初期の溶出液の精製度が高いことを考慮し、溶出液の初流 1 mL を採り、窒素乾固後、2 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル (95:5) 混液に溶かしたところ、溶解液が白濁することがあった。初流に多機能カラム由来成分が溶出した可能性を考え、初流約 1 mL を廃棄し、続く 1 mL を採り、先と同様に操作したところ、白濁は認められなかった。以上のことから、初流約 1 mL を廃棄することとした。

1.4 試料の種類に応じた試験溶液調製方法の検討

試料が清涼飲料水の場合、アセトニトリルを添加し、振とうにより抽出する方法を検討した。果汁濃度が高い場合、試料とアセトニトリルが完全には混和せず 2 層に分離したため、遠心分離後に上層を採り、水で定容することとした。アセトニトリル添加から上層を採るまでの操作は、繰り返し実施した方がパツリンの回収率は高くなると考えられるが、本分析法ではパツリン- $^{13}\text{C}_3$ により定量値を補正するため、簡便性を考慮して本操作は 1 回限りとした。(図 1 の方法 A)

試料が食酢の場合、図 1 の方法 A に従い実施したところ、パツリン- $^{13}\text{C}_3$ の回収率が 40% 未満となることがあった。多機能カラム通液時の食酢の濃度が影響している可能性を考え、遠心分離後の上層を 80% アセトニトリル水溶液で 50 mL に定容し、通液時の試料濃度を 1/2 とした。その結果、回収率の改善が認められた。(図 1 の方法 B)

試料がペースト状の場合、図 1 の方法 A に従い実施したところ、試料によってはアセトニトリル中の分散が不十分であった。果肉を含む一部の清涼飲料水も同様であった。これら試料については抽出時にアセトニトリルだけでなく水も添加することで、分散性が向上した。しかし、水を添加することにより遠心分離後の上清が 25 mL を超える試料もあった。その場合は、

表3 パツリン添加回収試験結果

試料	試験溶液の 調製方法 ^{*1}	回収率 ^{*2} (%)	
		パツリン	パツリン- ¹³ C ₃
洋なしジュース	A	102.6	52.5
ぶどうジュース	A	105.0	70.5
ぶどうジャム	D	108.3	59.3
ブルーベリーペースト	C	97.6	67.4
りんごコンポート	C	103.2	60.7
りんご酢	B	108.6	74.3

*1 図1 参照

*2 試料への添加濃度 パツリン：1 ng/g, パツリン-¹³C₃：5 ng/g
 定量 パツリン：内部標準法
 パツリン-¹³C₃：標準溶液のピーク面積値と比較

表4 果実加工品のパツリン汚染実態調査結果

果実	分類	検体数		検出量 ^{*2} (ppm)
		調査数	検出数 ^{*1}	
ぶどう	清涼飲料水	7	(2)	
	食酢	3		
	ジャム	2		
りんご	食酢	3		
	ソース類	3		
	ジャム	1		
	コンポート	1		
ブルーベリー	ペースト	3		
	清涼飲料水	2	(1)	
	ジャム	1		
ブルーベリー	清涼飲料水	3	(1)	
	ジャム	2	(1)	
ざくろ	清涼飲料水	5	2 (1)	0.001
洋なし	清涼飲料水	3		
もも	清涼飲料水	3		
パイナップル	清涼飲料水	3		
クランベリー	清涼飲料水	2		

定量限界値：0.001 ppm

*1 定量限界値未満は()内に示した

*2 定量限界値以上検出例のみ示した

図1の方法Bと同様に、80%アセトニトリル水溶液で50 mLに定容した。(図1の方法C)

ジャム等、振とうだけでは十分な抽出が困難な試料の場合は、ホモジナイズにより抽出した。ジャムについては「1.2 抽出溶媒の検討」で示した試料の分散性を考慮し、抽出液量として水が20%となるようにアセトニトリル及び水を添加した。(図1の方法D)

2. 妥当性評価及び添加回収試験

りんごジュースを用いた妥当性評価の結果は、真度102.8% (パツリン-¹³C₃回収率71.4%)、併行精度0.61%、室内精度1.7%であり、選択性を含めてガイドライン³⁾の目標値を満たした。このことから、本分析法は通知試験法²⁾と同等の性能を有すると考えられ

た。りんごジュース以外の添加回収試験の結果は表3に示した。定量限界値に相当する添加濃度(1 ng/g)において、表3に示す6試料すべてが回収率の目標値を満たした。また、本濃度においてS/N比は10以上を満たし、検量線は $r^2 \geq 0.999$ を満たす良好な直線性を示した。以上のことから、本分析法は本調査に適用可能と判断した。

なお、本調査対象の47検体について、パツリン-¹³C₃の回収率は51.9%～86.5%であり、すべて目標値を満たしたことから、本分析法の採用は妥当であったと考えた。

3. 汚染実態調査

汚染実態調査結果を表4に示した。定量限界値以上のパツリンが検出されたのは47検体のうち、ざくろジュース2検体のみであった。りんご搾汁等以外についてパツリン汚染が確認されたが、検出量は2検体ともに0.001 ppmであり、りんご搾汁等における基準値の1/50とごく微量であった。本調査結果を考慮すると、通常の摂取であれば健康に影響を与える懸念はないと考えられるが、汚染された果実の長期保存や果実の損傷部位の利用など、取扱いによってはカビ毒の汚染を拡大させる可能性も否定できない。今後も引き続き、汚染実態を調査、把握していく必要があると考えられる。

謝辞

本調査は令和4年度神奈川県健康医療局生活衛生部生活衛生課先行調査事業にて実施した。

本調査の企画調整、試料の選定等にご尽力くださいました神奈川県健康医療局生活衛生部生活衛生課の田中陽子氏、餅田智行氏、沢登涼子氏、石原美登里氏及び川口拓郎氏並びに神奈川県食肉衛生検査所の岡垣夏美氏に深謝いたします。また、試料の分析等にご協力くださいました神奈川県衛生研究所の萩尾真人氏及び北出杏子氏に深謝いたします。

(令和5年9月1日受理)

文献

- 1) 田端節子：東京都におけるカビ毒に関する調査研究，東京都健康安全研究センター研究年報，65，13-24 (2014)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：清涼飲料水等の規格基準の一部改正に係る試験法について，食安発1222第4号，平成26年12月22日
- 3) 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，食安発 1224 第 1 号，平成 22 年 12 月 24 日

- 4) Nan, M., Xue, H., and Bi, Y.: Contamination, detection and control of mycotoxins in fruits and vegetables, *Toxins*, **14**, 309 (2022)
- 5) 広島市衛生研究所生活科学部：りんごジュース中のパツリン分析法の検討, 広島市衛生研究所年報, **27**, 56-57 (2008)
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：総アフラトキシンの試験法について，食安発 0816 第 1 号，平成 23 年 8 月 16 日