

GC/MS によるパツリンの分析法の検討と実態調査

月岡 忠¹・宮澤衣鶴²・白石 崇¹

GC/MS による微量パツリンの分析法を開発し、長野県内に流通しているリンゴジュースとグレープジュースの実態調査を行った。その結果、公定法では検出されなかったリンゴジュースから低濃度ではあるが、36 検体中 8 検体から ppb オーダーでパツリンが検出された。しかし、グレープジュースからは検出されなかった。検出されたパツリンは極低濃度で人の健康に影響する濃度とは考えられなかった。また、今回開発した GC/MS による分析法は、必要試料量が少量で、選択性、検出感度及び迅速性に優れており、実態調査に有用な方法と言える。

キーワード：パツリン，リンゴジュース，グレープジュース，カビ毒，GC/MS

1. はじめに

パツリンはリンゴ果実に付着した *Penicillium expansum* 等が産生するマイコトキシンで、わが国ではカビの生えたビール麦芽根による乳牛の斃死事件が発生し、この原因がパツリンであったと報告されている¹⁾。動物実験では消化管の充血、出血、潰瘍等の症状が認められている。わが国では平成 15 年 11 月 26 日にリンゴ果汁及び原料用リンゴ果汁に食品衛生法の規格基準値 (0.05ppm) が設定され、平成 16 年 6 月 1 日から適用された。長野県は青森県に次ぐリンゴ生産県であり、地元産のリンゴジュースが道の駅等で多数販売されている関係上、リンゴジュースを収去し実態調査をおこなっている。しかし、厚生労働省が定めた HPLC によるパツリンの分析法²⁾は、選択性及び感度面 (検出限界 0.01ppm) で劣るため、低濃度の試料の実態調査に応用することは困難である。

パツリンの微量分析法は、HPLC^{2), 3)}、GC/MS^{4) ~ 6)}、LC/MS^{6) ~ 11)} による方法が多く報告されている。田端ら⁵⁾はリンゴジュースからパツリンを酢酸エチルで抽出後、ヘキサンを加えて不溶性沈殿物をろ過し、シリカゲルとフロリジルカラムでクリンアップ後、TMS 化して GC/MS で定量している。Roach JA ら⁶⁾は HPLC と GC/MS を併用して測定している。Ito R ら⁷⁾はパツリン-¹³C₃ をサロゲートに用い、パツリンを固相抽出後、LC/MS で測定する方法を報告

している。また最近では LC/MS/MS¹¹⁾ や LC-TOF/MS⁸⁾ の方法も報告されている。

本報告では、GC/MS による迅速分析法を検討し、少量の試料を用いて、高感度で選択性の高い方法を構築した。この方法を長野県内に流通している、リンゴジュースとグレープジュースに応用した。その結果、低濃度ではあるが、厚生労働省の方法では検出されなかったリンゴジュースからパツリンが検出された。

2. 実験方法

2.1 試薬

パツリン：林純薬工業(株)製をアセトンで溶解し 200 μg/mL 溶液を作成した。

パツリン-¹³C₃：林純薬工業(株)製、100 μg/mL 酢酸エチル溶液をアセトンで希釈し 2 μg/mL 溶液を作成した。

N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide [BSTFA]：GL サイエンス(株)製を用いた。

5 % BSTFA：BSTFA を酢酸エチルに溶解し 5v/v % 溶液を作成した。

珪藻土カラム：MERCK 製、Extrelut NT3 を用いた。

フロリジルカートリッジ：パリアン製、BOND ELUT LRC-FL (500mg) を n-ヘキサン 5mL で洗浄して用いた。

酢酸エチル、アセトン、n-ヘキサンは残留農薬

1 長野県環境保全研究所 保健衛生部 〒380-0944 長野市安茂里米村 1978

2 長野保健所 〒380-0936 長野市岡田 98-1

用を用いた。

2.2 装置及び測定条件

GC 条件

GC：アジレント製，6890N 型
 カラム：DB-5MS 内径 0.25mm × 長さ 30m ×
 膜厚 0.25 μ m
 カラム温度：60 $^{\circ}$ C (2min)—15 $^{\circ}$ C /min—150 $^{\circ}$ C—
 5 $^{\circ}$ C /min—200 $^{\circ}$ C—20 $^{\circ}$ C /min—300 $^{\circ}$ C (5min)
 注入口温度：250 $^{\circ}$ C
 キャリアーガス：He 流速 1mL/min

MS 条件

MS：日本電子(株) JMS-Q1000GC K9
 イオン化電圧：70V
 イオン化電流：200 μ A
 イオン源温度：200 $^{\circ}$ C
 モニターイオン (m/z)：パツリン-TMS 226, 183
 サロゲート-TMS 229

2.3 試料

長野県内で市販されているリンゴジュース 36 検体，グレープジュース 13 検体をスーパーマーケット，道の駅等で購入した。

2.4 分析操作

試料 2.5mL にパツリン- $^{13}\text{C}_3$ (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 50 μL 添加し，Extrelut NT3 に負荷した。15 分程度放置後，ヘキサン 10mL で洗浄し，酢酸エチル：ヘキサン (4:1) 10mL で溶出した。これをナス型フラスコにとり，エバポレータで濃縮乾固し，酢酸エチル：ヘキサン (1:9) 2mL に溶解した。予め活性化したフロリジルカートリッジに溶解液を負荷し，酢酸エチル：ヘキサン (1:9) 10mL で洗浄した。酢酸エチル：ヘキサン (1:1) 10mL を流してパツリンを溶出させ，濃縮乾固し，5% BSTFA 1mL を加えて溶解後，これを GC/MS で測定し，検量線から定量する。

2.5 検量線の作成

パツリンを 0 ~ 0.2 μg を段階的にとり，これにパツリン- $^{13}\text{C}_3$ (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 50 μL ，5% BSTFA 1mL を加えて TMS 化後，GC/MS で測定し，m/z=229 と m/z=226 の面積比から検量線を作成する。

3. 結果と考察

3.1 珪藻土カラムによるパツリンの抽出

パツリンは水溶性が高く，無極性溶媒では抽出されにくいいため，田端らや厚生労働省の方法では酢酸エチルを用いてパツリンを抽出している。粘性の高いリンゴジュースからの溶媒抽出はエマルジョンを作りやすいため，本法では，エマルジョンを作りやすい珪藻土カラム (Extrelut NT3) を用いて検討した。その結果，カラムに負荷したパツリンは n-ヘキサンでは溶出せずに酢酸エチルで溶出した。また，酢酸エチルのみで溶出させると，水も同時に溶出したため，酢酸エチルに n-ヘキサンを含有させて水の溶出をできるだけおさえた。Fig. 1 に酢酸エチル：ヘキサン (4:1) でのパツリンの溶出状況を示した。パツリンは酢酸エチル：ヘキサン (4:1) 8mL でほぼ 100% 回収された。従って，本法ではヘキサン

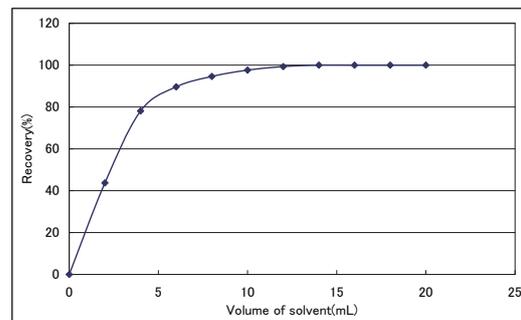


Fig.1 Relationship between recovery and volume of elution solvent from Extrelut NT-3 column.

10mL で洗浄した後に，酢酸エチル：ヘキサン含有 (4:1) 10mL で溶出させることにした。

3.2 フロリジルカートリッジによる精製

GC/MS で定量する際，パツリンの TMS 化物の近くに妨害ピークが見られたため，シリカゲル (Bond ELUT LRC-SI 500mg) とフロリジル (Bond ELUT LRC-FL 500mg) によるクリンアップ条件を検討した。その結果，フロリジルが，シリカゲルに比べ精製効果が大きかったため，フロリジルを用いることにした。フロリジルカラムからの溶出状況を Fig.2 に示した。

パツリンはフロリジルカートリッジから酢酸エチル：ヘキサン (9:1) 10mL では溶出しなかったが，酢酸エチル：ヘキサン (1:1) 10mL でほぼ 100% 溶出した。

3.3 GC/MS による定量

パツリンは誘導体化し，揮発性を高めないと GC/

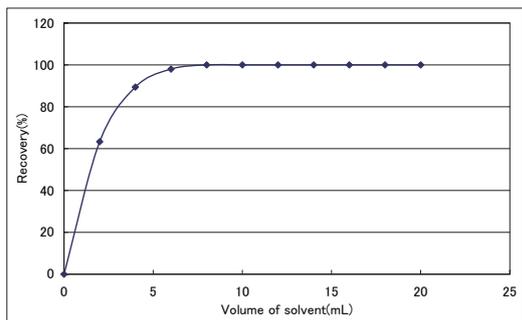


Fig.2 Relationship between recovery and volume of elution solvent from florisil column.

MSでは測定できないため、BSTFAを用いてTMS化した。Fig.3にパツリンのTMS化物のマススペクトルを示した。定量には分子イオンの $m/z = 226$ 、確認には $m/z=183$ を用いた。また、分析全体の精度を高めるため、サロゲートとして、パツリン- $^{13}C_3$ を試料液に添加し、 $m/z=229$ をモニターした。本法の検出限界は 0.001ppm で、0.025ppm 濃度での添加回収実験の標準偏差は 5.5%、サロゲートの回収率は 68%であった (n=5)。

3.4 実試料への応用

長野県内で流通しているリンゴジュース 36 検体、グレープジュース 13 検体を購入し測定した。その

Scan: 293
Base: m/z 73; 49.4%FS TIC: 2203927

R.T.: 10:57.7

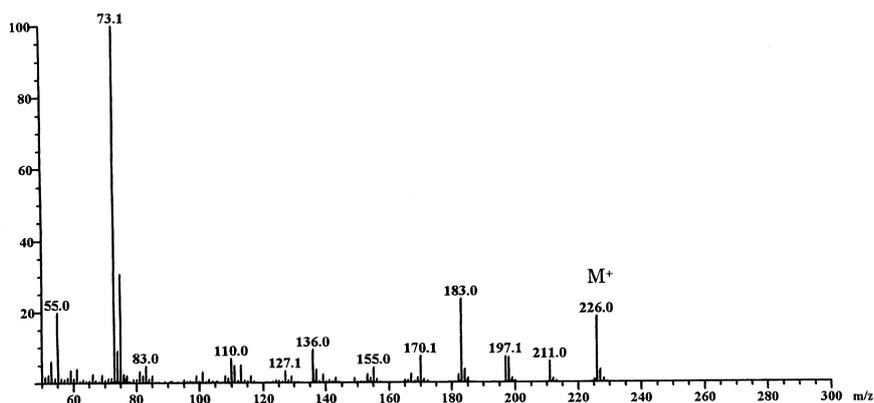


Fig.3 EI mass spectrum of patulin TMS derivative.

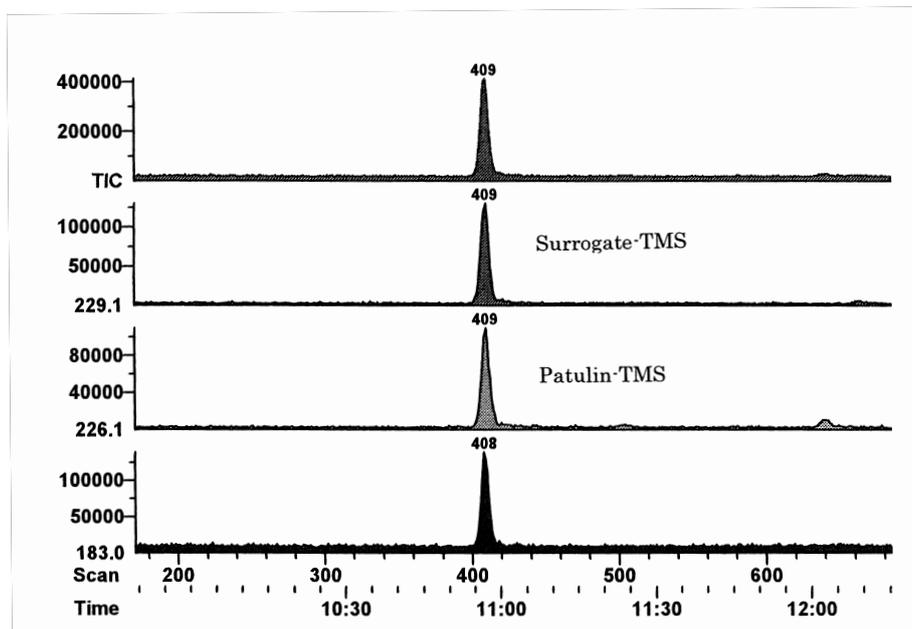


Fig.4 SIM chromatogram of patulin TMS derivative.

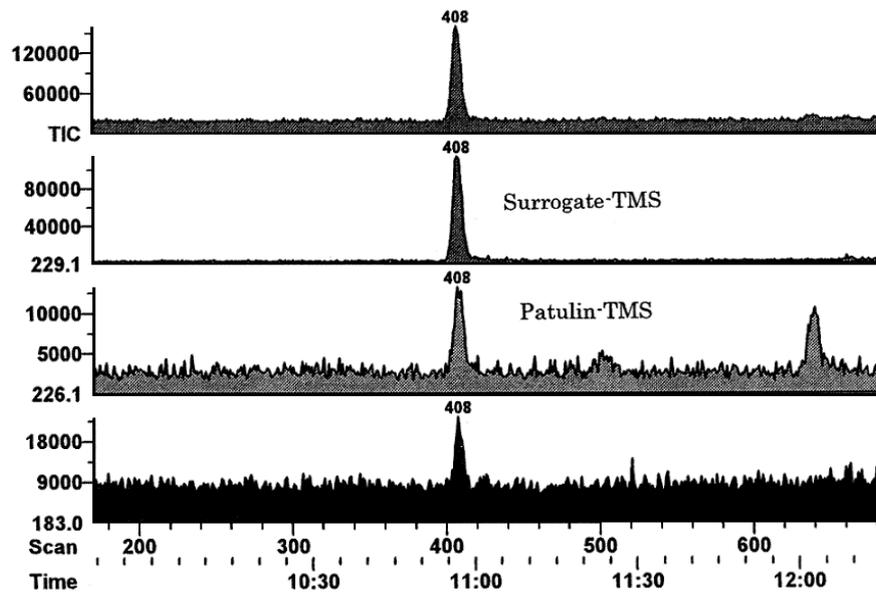


Fig.5 SIM chromatogram of apple juice sample.

結果、リンゴジュース 8 検体からパツリンが 0.002 ~ 0.005ppm の範囲で検出された。しかし、グレープジュースからは検出されなかった。Fig.4 及び Fig.5 に標準物質と検出された実試料の SIM クロマトグラムを示した。

東京都の田端ら¹⁾の過去の報告によると、1996 ~ 2001 年度のリンゴ果汁、市販リンゴ加工品など 234 検体について実態調査を行った結果、52 検体から 0.005 ~ 0.67ppm の範囲でパツリンが検出されたと報告している。今回の結果は、リンゴジュースの製造技術や保存技術の向上、更に高品質の材料を使用しているためと考えられた。

4. まとめ

GC/MS による微量パツリンの分析法を開発し、長野県内に流通しているリンゴジュースとグレープジュースの実態調査を行った。その結果、公定法では検出されなかったリンゴジュースから低濃度ではあるが、8 検体から ppb オーダーでパツリンが検出された。しかし、グレープジュースからは検出されなかった。検出されたパツリンは極低濃度で人の健康に影響する濃度とは考えられなかった。このことは、製造技術や保存技術の向上、更には高品質の材料を使用しているためと考えられた。

また、今回開発した GC/MS による分析法は、試

料が少量で、選択性、検出感度及び迅速性に優れており、実態調査に有用な方法と言える。

文 献

- 1) 宇田川俊一 (2004) 食品のカビ I 基礎編 食品のカビ汚染と危害. pp87-88 幸書房, 東京.
- 2) 「パツリンの試験法について」(平成 15 年 12 月 15 日. 食安基発第 1215001 号 厚生労働省 医薬食品局通知).
- 3) Li, F., Zhao, S., Chin, L., Li, Y., Wu, D., Zhao, X., Han, C., Zhang, H., Ji, R., (2007) Determination of patulin in apple juice and hawthorn beverage by solid-phase filtration column and liquid chromatography. J. AOAC int., 90, 167-72.
- 4) Marks, H.S., (2007) Rapid gas chromatography/mass spectrometry determination and confirmation of patulin in apple juice. J.AOAC int., 90(3), 879-83.
- 5) Tabata, S., Iida, K., Suzuki, J., Kimura, K., Ibe, A., Saito, K., (2004) A quantification and confirmation method of patulin in apple juice by GC/MS. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 45(5), 245-9.
- 6) Roach, J.A., Brause, A.R., Eisele, T.A., Rupp, H.S., (2002) HPLC determination of patulin in apple juice with GC/MS confirmation of patulin identity. Adv. Exp. Med. Biol., 504, 35-40.

- 7) Ito, R., Yamazaki, H., Inoue, K., Yoshimura, Y., Kawaguchi, M., Nakazawa, H., (2004) Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: investigation of its concentration levels in Japan, *J. agric. Food Chem.*, 52(25), 7464-8.
- 8) Senyuva, H.Z., Gilbert, J., (2008) Identification of fumonisin B2, HT-2 toxin, patulin, and zearalenone in dried figs liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. food Prot.*, 71(7), 1500-4.
- 9) Rychlik, M., Asam, S., (2008) Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390(2), 617-28.
- 10) Watanabe, M., (2008) Production of mycotoxins by *Penicillium expansum* inoculated into apples. *Food Prot.*, 71(8), 1714-9.
- 11) Spanjer, M.C., Rensen, P.M., Scholten, J.M., (2008) LC-MS/MS multimethod for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs, *Food Addit. Contam.*, 25(4), 472-89.

Examination of analytical method for Patulin by GC/MS and survey of juice samples

Tadashi TSUKIOKA ¹, Izuru MIYAZAWA ² and Takashi SHIRAIISHI ¹

*1 Nagano Environmental Conservation Research Institute, Public Health Division,
1978 Komemura Amori, Nagano 380-0944, Japan*

2 Nagano Health Center, 98-1 Okada, Nagano 380-0936, Japan

Abstract

An analytical method for a very small quantity of patulin by GC/MS has been developed, and an investigation has been made into the actual samples of the apple juice and grape juice which are on the market in Nagano prefecture. Patulin was detected in 8 of 36th apple juice samples in the order of ppb, and it was not detected in the grape juice samples. However, patulin was not found in any of the apple juice samples by the official method. The patulin detected was as such a low concentration as not to be considered to affect human health. The analytical method based on GC/MS developed in this study requires a small sample, is excellent in sensitivity, detection limit, rapidity. Therefore this method is regarded as a useful for investigation into actual samples.

Key Words : Patulin, apple juice, grape juice, mycotoxin, GC/MS

