

りんごジュース中のパツリンの検査結果 —平成18～22年—

中山裕紀子*¹ 中辻直人*¹ 高取 聡*¹ 小阪田正和*¹ 福井直樹*¹
北川陽子*¹ 岡本-柿本葉*¹ 柿本幸子*¹ 田口修三*^{1,2} 尾花裕孝*¹

平成18年度から平成22年度までの5年間(年1度)に実施した、りんごジュース中のパツリンの検査結果をまとめた。総数75検体について分析した結果、2検体からパツリンが検出された。このうち、食品衛生法の規格基準値(0.050 ppm)を超えたものはなかった。

キーワード: パツリン、りんごジュース、LC-MS/MS

Keywords: Patulin, Apple juice, LC-MS/MS

パツリンは、ペニシリウム属またはアスペルギルス属等の真菌が産生するカビ毒であり、りんご果汁を汚染することが知られている¹⁾。これらの真菌は、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されており、不適切な貯蔵等によりパツリンが産生される。特に台風等により落下して傷がつくとともに、土壌に直接接触した果実は、パツリン汚染のリスクが高いと考えられている。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¹⁾。

平成15年11月26日に食品、添加物等の規格基準の一部が改正され、りんごジュース及び原料用りんご果汁について、パツリンの規格基準(0.050 ppm)が設定され、同時に告示法が示された²⁾。告示法の概要は以下の通りである。試料からパツリンを酢酸エチルで抽出した後、この酢酸エチル層を炭酸ナトリウム水溶液と震盪混和することによって精製する。これを減圧

濃縮後、紫外分光光度型検出器付高速液体クロマトグラフあるいは質量分析計付液体クロマトグラフ(LC-MS)を使用する場合は、酢酸水に再溶解して試験液とし、質量分析計付ガスクロマトグラフを使用する場合は、トリメチルシリル化による誘導体化をして試験液とする。本試験に際しては、告示法もしくは告示法と同等以上の性能を有する試験法の使用が指示されている²⁾。

当所では、同等以上の性能を有する試験法として、簡便な固相抽出法を開発し、試験法として活用している。今回、平成18～22年度までに実施した行政検査の結果を取りまとめて報告する。また、厚生労働省から示された「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⁾に準じて分析法の妥当性評価を行った。

試験方法

1. 試料

大阪府内の小売店より取去された、りんごジュース(100%果汁及び濃縮還元)75検体(各年度15検体)を対象とした。内訳は、以下の通りであった。(A)国産果汁のみ使用したこと明記した製品(8検体)(B)輸入果汁のみを使用したことを明記した製品(2検体)(C)特に記載のない製品(65検体)

*1 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

*2 大阪青山大学 健康科学部 健康栄養学科

Analysis of Patulin in Apple Juice (2006-2010)

by Yukiko NAKAYAMA, Naoto NAKATSUJI, Satoshi TAKATORI, Masakazu OSAKADA, Naoki FUKUI, Yoko KITAGAWA, You KAKIMOTO-OKAMOTO, Sachiko KAKIMOTO, Syuzo TAGUCHI and Hirotaka OBANA

2. 試薬類

パツリン標準品は、パツリン標準品またはマイコトキシン試験用パツリン溶液（100 µg/mL アセトニトリル溶液）を用いた。パツリン標準品はアセトニトリルで溶解し、パツリン標準原液とした。パツリン標準原液またはマイコトキシン試験用パツリン溶液を 3%酢酸水で希釈し、標準溶液とした。酢酸エチル及びメタノールは、残留農薬分析用を使用した。酢酸は、高速液体クロマトグラフ用を、アセトニトリルは、LC-MS 用を、酢酸アンモニウムは、試薬特級を用いた。上記試薬は、いずれも和光純薬社製を使用した。

精製の固相カラムは、Waters 社製 OASIS HLB カラム（60 mg）及び Sep-Pak Light NH₂ を使用した。

3. 試験液調製法

田口らの方法を活用した⁴⁾。その概要は、以下の通りである。試料 5.0 g を予めメタノール 3 mL、水 5 mL でコンディショニングした OASIS HLB カラム（60 mg）に負荷・吸引し、その溶出液は廃棄した。続けてリザーバ及びカラムを水 2 mL で洗浄し、その洗液を捨てた。カラムを更に吸引して水分を排出させた。次に酢酸エチル 3 mL でコンディショニングした Sep-Pak Light NH₂ を OASIS HLB カラムの後に接続し、酢酸エチル 1 mL で溶出した。溶出液を窒素気流下で濃縮乾固した。この残留物に 3%酢酸水 1 mL を加えて溶解し、必要に応じて 0.45 µm の PTFE メンブランフィルターでろ過して試験液とした（スキーム 1）。なお、分析には、タンデム型質量分析計付液体クロマトグラフ（LC-MS/MS）を使用した。

4. 分析条件

【LC】 機器：1100 series（Agilent Technologies）
カラム：Cadenza CD-C18（2.0×50 mm, 3 µm：Imtakt）
移動相：4%アセトニトリル含有 2 mM 酢酸アンモニウム水溶液（イソクラティック）
流速：0.2 mL/min
カラム温度：50°C
注入量：5.0 µL
【MS/MS】 機器：API 3000（AB Sciex）
イオン化法：エレクトロスプレー法（ネガティブ）
キャピラリー電圧/温度：-3500 V / 500°C

コリジョンエネルギー：-12 eV

MRM（プレカーサー/プロダクト）：-153 / -109（定量イオン）：-153 / -81（定性イオン）



スキーム 1. 分析法のフローチャート

5. 添加回収試験

パツリンを含まない試料に対して、終濃度が 0.050 ppm になるようパツリンを添加し、添加回収試験を実施した。なお、試行数は、各年度 5 であった。更に、その 5 年間の結果を用いて併行精度及び室内精度を算出した。

結果

1. 分析法評価

(1) 定量下限と選択性

標準品のクロマトグラムにおいて、0.005 ppm では、シグナル/ノイズ比 (S/N 比) は 11 であり、0.010 ppm では 22 であった。本法を使用する本府の検査では、定量下限を基準値の 1/10（試験液：0.025 ppm 未満/試料換算：0.005 ppm）に設定しており、その標準品のクロマトグラムの S/N 比は 50 を超え、クロマトグラムにおいて定量性が十分に確保されていた。検量線も 0.005～0.5 ppm の範囲で、相関係数 0.999～1.000 と良好な直線性が得られた。

また、大半のりんごジュースでは、痕跡レベル（試験液：0.005 ppm 未満/試料換算：0.001 ppm 未満）のピークが認められた。しかし、りんごジュースを精製水に置き換えたブランク試験ではピークは認められなかった。よって、当該ピークは、りんごジュース由来

の極微量のパツリンまたは妨害成分と推察された。この痕跡レベルのピークの高さは、基準値(試験液:0.250 ppm/試料換算:0.050 ppm)のピークの高さの約50分の1であった。すなわち、本分析法の定量下限は、基準値の1/10であり、また妨害成分の可能性もあるピークも基準値に相当するピークの1/10未満であるので選択性が保証されていると判断された。

(2) 真度と精度

各年度の検査において、基準値相当となる0.050 ppmのパツリンをりんごジュースに添加し、添加回収試験を実施した。各年度、試行数5で実施し、各年度の平均回収率及び相対標準偏差(RSD)は、表1の通りであった。

表1. 各年度の添加回収試験結果

年度	回収率範囲 (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)
18	71~81	79.5	2.0
19	74~78	75.8	2.2
20	75~80	76.8	2.5
21	82~88	86.0	2.8
22	84~92	88.4	3.4

各年度：N=5

また、これらの5年間のデータを取りまとめて、平均回収率、併行精度と室内精度を算出したところ、それぞれ、81.8、2.6及び8.1%であった。

2. 検査結果

本法を用いて平成18~22年度に検査した検体の総数は75であり、このうち2検体からパツリンが検出された(0.005及び0.006 ppm)。基準値を超過する検体は認められなかった。図1に標準品及び検体から得た試験液のクロマトグラムの一例を示した。

考察

本法の特長は、告示法と比較して簡便かつ迅速であることである。告示法では、試料を酢酸エチルで2回抽出した後、炭酸ナトリウム水溶液との液-液分配による精製を2回経て試験液を得る。本法では、精秤した試料をOASIS HLBに直接負荷し、水洗及び脱水して酢酸エチルで溶出する。この際、同時に溶出される

妨害成分をSep-Pak Light NH₂で除去し、濃縮乾固後、3%酢酸水に再溶解してLC-MS/MSで分析する。この工程は、バキュームマニホールドの使用により、6試料程度の併行操作が可能であり、その試験液の調製に要する時間は、1時間以内である。また、LC-MS/MSでの分析時間は、イソクラティックで5分間であり、短時間である。

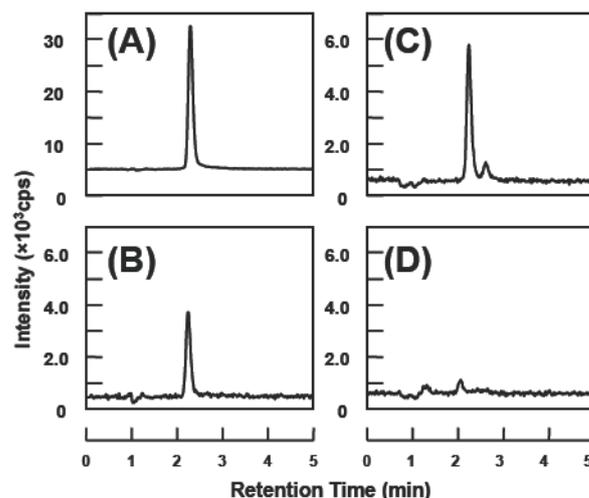


図1. クロマトグラムの一例

(A) 標準品 0.2 ppm; (B) 標準品 0.02 ppm; (C) 試験品-1 (0.006 ppm 検出; ピークは、0.03 ppm 相当); (D) 試験品-2 (定量下限未満)

今回、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を拡大適用して、当該分析法の評価を行ったところ、その基準(平均回収率、70~120%; 併行精度、15%未満; 室内精度、20%未満)を満たしており、改めて告示法と同等以上の性能を有すると考えられた。

農林水産省の平成17年度国産原料りんご果汁のパツリン含有実態調査の結果⁵⁾によると、調査した249検体のうち、3検体が定量下限(0.001 ppm)以上であり、その平均値は、0.004 ppm(最高値、0.021 ppm)であった。また、赤木らは、16検体のうち国産ストレート飲料(6検体)からパツリンは検出されなかったが、濃縮還元(9検体)及び炭酸飲料(1検体)から0.003~0.011 ppmで検出されたと報告している⁶⁾。さらに、月岡らは、りんごジュース36検体中8検体からパツリンが0.002~0.005 ppmで検出されたと報告して

いる⁷⁾。これらの検出値のほとんどが食品衛生法で定められた基準（0.050 ppm）の 10%程度であり、我々の結果と同様であると考えられた。

謝辞

検体採取にご尽力いただいた大阪府各保健所の担当者の方々に深謝します。

文献

- 1) 日本食品衛生学会編：食品安全の辞典，p.248-9，朝倉書店，東京（2009）
- 2) 平成 15 年 11 月 26 日，厚生労働省告示第 369 号：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
- 3) 平成 22 年 12 月 24 日，厚生労働省告示第 417 号：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
- 4) 田口修三，田中之雄：りんごジュース中パツリンのタンデム固相抽出法と HPLC-DAD による迅速分析法の検討，平成 19 年度地研全国協議会近畿支部理化学部会研修会，滋賀，（2008）
- 5) 平成 18 年 6 月 5 日，農林水産省プレリリース：平成 17 年度国産原料用りんご果汁のパツリン含有実態調査の結果について
- 6) 赤木浩一，畑野和弘：LC/MS/MS によるりんごジュース中のパツリンの残留分析，平成 15 年度福岡市保健環境研究所報，**29**，145-147 (2003)
- 7) 月岡忠，宮澤衣鶴，白石崇：GC/MS によるパツリンの分析法の検討と実態調査，長野県環境保全研究所研究報告，**5**，33-37 (2009)