

りんごジュース中のパツリン分析法の検討

生活科学部

はじめに

パツリンは, Penicillium属および Aspergillus属等の真菌によって産出されるかび毒である。現在, りんご果汁から高濃度のパツリンが検出されたことによって, 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について, パツリンの規格基準(0.050ppm以下)が定められている。

このため, 高速液体クロマトグラフ(LC)および高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析装置(LC/MS/MS)を用いて, 迅速分析法を検討したので報告する。

方法

1 試料

市販のりんごジュースを試料とした。

2 試薬

標準品: 和光純薬工業(株)製を用いた。

標準原液: 標準品 5mg をアセトニトリルおよび蒸留水(4:96)で溶かし 50ml とした(100 µg/ml)。

標準液: 標準原液をアセトニトリルおよび蒸留水(4:96)で 0.05 ~ 1 µg/ml となるように調製した。

ミニカラム: MultiSep228AflaPat カラム(Romer Labs 製)

その他の試薬: 高速液体クロマトグラフ用, 残留農薬試験用または特級品を用いた。

3 装置

(1) 定量試験

高速液体クロマトグラフ: 島津製作所製 LC-10A

(2) 確認試験

高速液体クロマトグラフ: 島津製作所製 Prominence

質量分析装置: Applied Biosystems 製 API4000

4 測定条件

定量試験の HPLC 条件を表 1 に示した。

確認試験の HPLC 条件および MS/MS 条件を表 2, 表 3 に示した。

5 試験溶液の調製

試料 5g にアセトニトリルを加え, 20ml に定容した。混和後, 1 分間激しく振とうした。静置後, 上層 12ml をミニカラムに負荷し, 溶出液を 10ml 分取した。溶出液を 40 で減圧濃縮し, 乾固させた。残留物をアセトニトリルおよび蒸留水(4:96)

表 1 定量試験の HPLC 条件

Column	Mightysil RP-18 GP (4.6 × 250mm, 5.0 µm) (関東化学製)
Mobile phase	Acetonitrile + Distilled Water(4:96)
Flow	1.0 ml/min
Column temp.	40
Injection volume	20 µl

表 2 確認試験の HPLC 条件

Column	Xterra MS C18 (2.1 × 150mm, 3.5 µm) (Waters 製)
Mobile phase	5mmol/l Ammonium Acetate + Methanol (95:5)
Flow	0.2 ml/min
Column temp.	40
Injection volume	10 µl

表 3 確認試験の MS/MS 条件

Scan Type	MRM
Ion Source	ESI
Polarity	Negative
Curtain Gas	20psi
Ion Source Gas1	80psi
Ion Source Gas2	30psi
IonSpray Voltage	-4500V
Temperature	600
Collision Gas	3
Declustering Potential	-45V
Entrance Potential	-10V
Resolution Q1	153 m/z
Resolution Q3	109 m/z 81 m/z
Dwell Time	500ms

で 1ml に溶解したものを試験溶液とした。
分析方法のフローチャートを図 1 に示した。

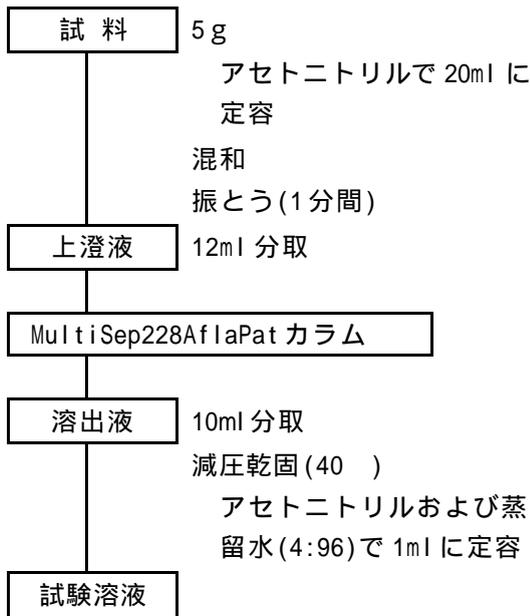


図 1 分析方法のフローチャート

6 検量線の作成

標準液をアセトニトリルおよび蒸留水(4:96)で希釈して 0.05~1.00 μg/ml の検量線用標準液を調製した。それぞれ LC および LC/MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。

結果と考察

1 定量試験

(1) 前処理の検討

ミニカラムを使用することにより、短時間で前処理を行うことができた。

(2) LC 条件の検討

カラムは Mightysil RP-18 GP を使い、移動相としてアセトニトリル・蒸留水(4:96)で分析を行ったところ、ピーク形状は良好であった。

(3) 定量限界および検量線の直線性

定量限界(S/N 10)は 0.02 μg/g であった。

検量線は、0.05~1.00 μg/ml の範囲で良好な直線性(r=0.999 以上)が得られた。

(4) 添加回収試験

りんごジュースにパツリンを 0.05 μg/g および 0.10 μg/g 添加して回収試験を行った。

添加回収試験結果を表 4 に示した。

表 4 添加回収試験結果

添加濃度	0.05 μg/g	0.10 μg/g
回収率(%)	96.0~102.4	87.2~98.4
平均(%)	100.2	93.8
標準偏差	0.00125	0.00411
変動係数	2.487	4.384
Zスコア	-1.67~0.90	-1.61~1.11
n=5		

それぞれの平均回収率が 90%~110% Zスコアが ±2 以内、変動係数が 5%以内であった。また、定量を妨害するようなピークはなく、選択的に定量をすることができた。

2 確認試験

(1) LC 条件の検討

カラムは Xterra MS C18 を使い、5mmol/L 酢酸アンモニウムを添加した水-メタノール系で分析を行ったところ、ピーク形状は良好であった。

(2) MS/MS 条件の検討

イオン化はエレクトロスプレー(ESI)によるネガティブモードで行い、MRM法で測定した。

インフュージョンポンプを用い、アナライザー部の各種パラメータの最適化を行った。

また、イオンソースの各種パラメータの最適化は FIA(Flow Injection Analysis)によって行った。

定量用モニターイオンとして、Q1(153m/z)および Q3(109m/z)を選択し、確認試験を行った。

(3) 検量線の直線性および添加回収試験

検量線は、0.05~0.50 μg/ml の範囲で良好な直線性(r=0.997 以上)が得られた。

りんごジュースにパツリンを 0.05 μg/g および 0.10 μg/g 添加して回収試験(n=2)を行った。

回収率は、0.05 μg/g を添加した試料は 97.6~100.8%、0.10 μg/g を添加した試料は 94.8~98.8%であり、良好な結果が得られた。

まとめ

LC による定量試験および LC/MS/MS による確認試験について検討したところ、ほぼ良好な結果が得られた。本法はりんごジュース中のパツリン分析法として有用であると考えられる。