

内閣府食品安全委員会  
平成 15 年度食品安全確保総合調査

食品のリスク管理の実施状況等に関する調査報告書  
(食品中のパツリンの分析法の開発調査分)

平成 16 年 3 月

財団法人 日本食品分析センター

## 目 次

|    |           |    |
|----|-----------|----|
| 1  | 調査の目的     | 1  |
| 2  | 調査の実施場所   | 1  |
| 3  | 調査の内容     | 1  |
| 4  | 検討試料      | 1  |
| 5  | 分析法       | 4  |
| 6  | 検討試料の結果   | 9  |
| 7  | 添加回収試験の結果 | 9  |
| 8  | その他の検討事項  | 11 |
| 9  | まとめ       | 13 |
| 10 | 添付図表      | 17 |

# 食品のリスク管理の実施状況に関する調査報告書

## (食品中のパツリンの分析法の開発調査分)

### 1 調査の目的

形態が異なる種々の食品からパツリンを適切に抽出し、検出する方法を開発する。

### 2 調査実施場所

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所  
東京都多摩市永山6丁目11番10号

### 3 調査の内容

本調査では以下の食品について、パツリンの分析法の開発を行った。

- ① 果汁(ベリー類)及びその加工食品(ソース類, ゼリー類, ジャム類, シリアル類及び離乳食)
- ② リンゴ果汁を含む加工製品(ソース類, ゼリー類, ジャム類, シリアル類及び離乳食)
- ③ 穀物(米及び麦)及び野菜ジュース

### 4 検討試料

表-1に示すジュース類, ベリー類を原料に含む食品, リンゴを原料に含む食品及び穀物を購入し, これを開発用の試料とした。また, これら試料の原材料を表-2に示した。

表-1 検討試料の一覧

| 区分                   | 食品           | 試料番号 | 品名 | 製造者または販売者 |
|----------------------|--------------|------|----|-----------|
| ジュース類                | ベリー類<br>ジュース | 1    |    |           |
|                      |              | 2    |    |           |
|                      | 野菜<br>ジュース   | 3    |    |           |
|                      |              | 4    |    |           |
|                      | ミックス<br>ジュース | 5    |    |           |
|                      |              | 6    |    |           |
| ベリー類を<br>原料に含む<br>食品 | ソース類         | 7    |    |           |
|                      |              | 8    |    |           |
|                      | ゼリー類         | 9    |    |           |
|                      |              | 10   |    |           |
|                      | ジャム類         | 11   |    |           |
|                      |              | 12   |    |           |
|                      | シリアル類        | 13   |    |           |
|                      |              | 14   |    |           |
| リンゴを原<br>料に含む食<br>品  | ソース類         | 15   |    |           |
|                      |              | 16   |    |           |
|                      | ゼリー類         | 17   |    |           |
|                      |              | 18   |    |           |
|                      | ジャム類         | 19   |    |           |
|                      |              | 20   |    |           |
|                      | シリアル類        | 21   |    |           |
|                      |              | 22   |    |           |
|                      | 離乳食          | 23   |    |           |
|                      |              | 24   |    |           |
| 穀物                   | 麦            | 25   |    |           |
|                      |              | 26   |    |           |
|                      | 米            | 27   |    |           |
|                      |              | 28   |    |           |
|                      | シリアル類        | 29   |    |           |
|                      |              | 30   |    |           |

表-2-1 検討試料の原材料

| 試料番号 | 原材料  |
|------|--|
| 1    | ブルーベリー, 砂糖   |
| 2    | クランベリー, 砂糖   |
| 3    | 野菜(にんじん, ほうれん草, ピーマン, パセリ, レタス, キャベツ, クレソン, ビート), 果実(りんご, オレンジ, レモン), 香料 |
| 4    | にんじん, 果実(オレンジ, りんご, レモン, パインアップル), はちみつ, 水溶性食物繊維, 香料                     |

表-2-2 検討試料の原材料

| 試料番号 | 原材料   |
|------|---|
| 5    | 果実(オレンジ, ぶどう, いちご, もも), 香料  |
| 6    | 果実(ぶどう, ブルーベリー), 香料   |
| 7    | ブルーベリー, 砂糖, オリゴ糖, ゲル化剤(ペクチン), 洋酒, 酸味料, 香料   |
| 8    | ブルーベリー, 糖類(砂糖, フトウ糖), ゲル化剤(ペクチン), 酸味料, スターチ   |
| 9    | ブルーベリー, 砂糖, 甘味料(ソルビット), ゲル化剤(増粘多糖類), 酸味料, 洋酒, 香料, 乳酸カルシウム, 塩化カリウム   |
| 10   | 加糖フトウ糖液糖, 砂糖, 果汁, ゲル化剤(増粘多糖類), 酸味料, 香料, 食塩, 食紅色素, カルミン色素, 野菜色素, カロチン色素, クチン色素   |
| 11   | ブルーベリー, 砂糖, ゲル化剤(ペクチン), 酸味料, ケン酸ナトリウム   |
| 12   | ブルーベリー, 糖類(砂糖, フトウ糖(液状)), 酸味料, ゲル化剤(ペクチン), ケン酸ナトリウム   |
| 13   | コーン, 砂糖, 乾燥果実(ブルーベリー, クランベリー, いちご), 麦芽エキス, 食塩, ブルーベリー濃縮果汁, 植物油, グリセリン, 酸味料, 乳化剤(乳を含む), ビタミンC, ケン酸鉄Na, 酸化防止剤(ビタミンE, ローズマリー抽出物), ナイシン, パントテン酸Ca, ビタミンB <sub>6</sub> , ビタミンB <sub>1</sub> , 香料, ビタミンB <sub>2</sub> , ビタミンA, 葉酸, ビタミンD, ビタミンB <sub>12</sub> |
| 14   | フレーク(オート麦, スパルト小麦), 粗糖, クリスプ(とうもろこし, 米, 小麦, ライ麦, 大麦, 麦芽, ココアパウダー), ビーナッツオイル, 小麦粉, ココナッツフレーク, 小麦胚芽, ぶどう糖, ストベリー, ラズベリー, ハゼelnナッツ, 蜂蜜, 食塩   |
| 15   | りんご, 砂糖, コーンシラップ, 酸化防止剤(ビタミンC)  |
| 16   | りんご, 異性化液糖, ビタミンC   |
| 17   | りんご果汁, 糖類(砂糖, 異性化液糖, ぶどう糖), 酸味料, ゲル化剤(増粘多糖類)  |
| 18   | りんご, 砂糖, ゲル化剤(増粘多糖類), 酸味料, 香料   |
| 19   | りんご, ぶどう果汁, レモン果汁   |
| 20   | りんご, 糖類(砂糖, ぶどう糖(液状)), ゲル化剤(ペクチン), 酸味料, 酸化防止剤(ビタミンC)  |
| 21   | 米, 全粒小麦, 砂糖, 小麦外皮, レズン, チェリー(チェリー, 砂糖, 植物油), アフリコット(アフリコット, 洋ナシ, ぶどう糖), リンゴ(リンゴ, 洋ナシ, ぶどう糖, リンゴ繊維, 濃縮リンゴ果汁, シモン), 異性化液糖, 食塩, 麦芽エキス, グリセリン, 酸化防止剤(二酸化イタリ), ビタミンA, ビタミンB <sub>1</sub> , ビタミンB <sub>2</sub> , ナイシン, ビタミンC, ビタミンD, ビタミンE, 鉄(原材料の一部にゼラチンを含む) |
| 22   | 小麦, 玄米, てんさい糖, オーツ麦, 大麦, リンゴ濃縮果汁, トライフルーツ(バナナ, イチゴ, リンゴ, パーム油, ココナッツ油, 砂糖, 水飴), ナッツ(パンプキンシード, アーモンド, ココナッツ, 松の実), 炭酸カルシウム, ビタミンC, 鉄, ナイシン, ビタミンB <sub>2</sub> , ビタミンA, ビタミンB <sub>1</sub> , ビタミンD(大豆由来), 香料   |
| 23   | りんご, ビタミンC  |
| 24   | もも, りんご, 砂糖, りんご果汁, コーンスターチ, オレンジ果汁, レモン果汁, 寒天, 増粘剤(カラントシートガム), ビタミンC, ケン酸  |
| 25   | 大麦  |
| 26   | ライ麦(ドイツ産)   |
| 27   | 複数原料米 国内産あきたこまち(秋田県あきたこまち50%, 山形県あきたこまち50%)   |
| 28   | 複数原料米 国内産100%   |
| 29   | コーングリッツ, てんさい糖, 食塩, 麦芽エキス, 乳化剤, 炭酸カルシウム, ビタミンC, 鉄, ナイシン, ビタミンB <sub>2</sub> , ビタミンA, ビタミンB <sub>1</sub> , ビタミンD(大豆由来)   |
| 30   | 玄米, 白米, 砂糖, 小麦, 米糠, 食塩, 異性化液糖, リン酸カルシウム, 乳化剤, ビタミンA, ビタミンB <sub>1</sub> , ビタミンB <sub>2</sub> , ナイシン, ビタミンC, ビタミンD, ビタミンE, 鉄, 酸味料(原材料の一部に大豆・ゼラチンを含む)   |

## 5 分析法

開発した分析方法を以下に示した。

### 1) 穀物及びシリアル類以外の試料

#### ① 器具及び装置

遠心分離管 (50 ml又は250 ml容)  
分液漏斗  
ナス形フラスコ  
ホールピペット類  
メスフラスコ類  
ロータリーエバポレーター  
振とう機  
遠心分離機  
高速液体クロマトグラフ-質量分析計

#### ② 試薬等

パツリン：グレードなし(シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社)  
パツリン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 100 ppm：残留動物薬試験用試薬(林純薬工業株式会社)  
酢酸エチル：残留農薬・PCB試験用(和光純薬工業株式会社)  
メタノール：電子工業用(関東化学株式会社)  
アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用(和光純薬工業株式会社)  
残留農薬・PCB試験用(和光純薬工業株式会社)  
炭酸ナトリウム：特級(和光純薬工業株式会社)  
硫酸ナトリウム(無水)：特級(関東化学株式会社)  
酢酸：特級(小宗薬品株式会社)  
1.5 %(V/V)炭酸ナトリウム溶液：炭酸ナトリウム1.5 gを水に溶解して100 mlとしたもの  
酢酸水：水に酢酸を加えてpH4に調製したもの  
固相カートリッジカラム：Aquisis PLS-3 ルアーデバイス Jr.型 230 mg(ジーエルサイエンス株式会社)，使用直前にパックを開放し，あらかじめメタノール10 mlで洗浄後，水10 mlを2回通液したもの  
HPLC用ディスポーザブルフィルター：マイショリディスク 水系 孔径 0.45 μm(東ソー株式会社)

#### ③ 操作

(前処理液の調製)

試料10 gを採り，内標準溶液1 mlを添加し十分混合後，酢酸エチル20 mlを加えて1分間振とう抽出した<sup>註)</sup>。酢酸エチル層を分取し，水層には酢酸エチル20 mlを加え，同

様な操作をさらに2回繰り返した。酢酸エチル層を合わせ、1.5 % (V/V)炭酸ナトリウム溶液4 mlを加え、30秒間振とうして酢酸エチル層を分取した。水層に酢酸エチル5 mlを加え、30秒間振とうした後、酢酸エチル層を分取して先の酢酸エチル層と合わせた。この酢酸エチル溶液に無水硫酸ナトリウム約15 gを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムには酢酸エチルを加えて洗浄し、洗液を酢酸エチル層に合わせた。酢酸エチル溶液をロータリーエバポレーターを用いて約2 mlまで濃縮し、窒素気流下で乾固後、直ちに水5 mlに溶解して前処理液とした。

注)：ソース、ゼリー及びジャムについては、水50 mlを加えた後、酢酸エチルを加えた。この時、酢酸エチルの液量を50 mlとした。さらに1.5 % (V/V)炭酸ナトリウム溶液は10 mlとした。

#### (試料溶液の調製)

前処理液を固相カートリッジカラムに負荷し、新たに水5 mlで前処理液の入っていた容器を洗い、洗液も固相カートリッジに負荷した。流出液を捨て、次にメタノール5 mlを流しパツリンを溶出させた。得られた溶出液をロータリーエバポレーターを用いて約1 mlまで濃縮し、窒素気流下で乾固した。直ちに酢酸水(pH4)2 mlに溶解し、HPLC用ディスポーザブルフィルターで濾過して試料溶液とした。

#### ④ 内標準溶液の調製

パツリン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 100 ppm溶液をエタノールで希釈して内標準原液とした(10 µg/ml)。この内標準原液1 mlを分取し、酢酸水(pH4)で10 mlに定容した(1 µg/ml)。これを内標準溶液とした。

#### ⑤ 標準溶液の調製及び検量線の作成

パツリン標準品約5 mgを精密に量り、エタノールに溶解して25 mlとし、これを標準原液とした(200 µg/ml)。

この標準原液1 mlを分取し、エタノールを加えて20 mlに定容した(10 µg/ml)。

この溶液について、AOAC Official methods 2000.02に基づきパツリン校正標準液の吸光度(276 nm)を測定し、パツリンの吸光係数から標準溶液の濃度を求めた。

さらにパツリン標準溶液(10 µg/ml)を酢酸水(pH4)で適宜希釈し、0.5, 0.4, 0.25, 0.1, 0.05 µg/mlの標準溶液を調製(但し、パツリン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>を0.5 µg/ml含む)し、検量線作成用のパツリン標準溶液とした。

各標準溶液3 µlを高速液体クロマトグラフ-質量分析計(以下「LC/MS」と略す)に注入し、標準溶液のパツリンの濃度とパツリン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>のピーク高さに対するパツリンのピーク高さ比から検量線の作成を行った。

⑥ 濃度の算出

試料溶液3  $\mu\text{l}$ をLC/MSに注入し、得られたパツリンとパツリン- $^{13}\text{C}_3$ とのピーク高さ比と、⑤で作成した検量線から試料溶液中のパツリン濃度を求め、次式に従い試料中のパツリン濃度を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{試料中のパツリン濃度}(\mu\text{g/g}) \\ & = \text{試料溶液中のパツリン濃度}(\mu\text{g/ml}) \times 2 \text{ ml} / \text{試料採取量}(\text{g}) \end{aligned}$$

⑦ 検出限界

マスフラグメントグラム上におけるパツリン溶液の最小検出濃度を0.05  $\mu\text{g/ml}$ とすると、検出限界は次式により算出され、0.010  $\mu\text{g/g}$ となった。

(検出限界)

$$0.05 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} / 10 \text{ g} = 0.010 \mu\text{g/g}$$

⑧ 高速液体クロマトグラフ-質量分析計操作条件

機 種 : LC部 ; Waters2695[Waters Ltd.]

検 出 器 : MS部 ; ZQ[Waters Ltd.]

カ ラ ム : YMC Pro C18,  $\phi$  2.0 mm $\times$ 25 cm[株式会社ワイエムシィ]

カラム温度 : 25  $^{\circ}\text{C}$

移 動 相 : 1 %酢酸及びアセトニトリルの混液 (97:3)

流 量 : 0.2 ml/min

イオン源温度 : 100  $^{\circ}\text{C}$

コーン電圧 : 20 V

イオン化法 : エレクトロスプレー(負イオン検出モード)

設定イオン数 : パツリン 測定イオン m/z 153.0, 確認イオン m/z 109.0

パツリン- $^{13}\text{C}_3$  測定イオン m/z 156.1, 確認イオン m/z 111.0

注 入 量 : 3  $\mu\text{l}$

2) 穀物及びシリアル類

① 器具及び装置

遠心分離管(250 ml容)

分液漏斗

ナス形フラスコ

ホールピペット類

メスシリンダー類

ロータリーエバポレーター

振とう機

遠心分離機

高速液体クロマトグラフ-質量分析計

## ② 試薬等

パツリン：グレードなし(シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社)

パツリン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 100 ppm：残留動物薬試験用試薬(林純薬工業株式会社)

ヘキサソール：残留農薬・PCB試験用(和光純薬工業株式会社)

酢酸エチル：残留農薬・PCB試験用(和光純薬工業株式会社)

メタノール：電子工業用(関東化学株式会社)

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用(和光純薬工業株式会社)

残留農薬・PCB試験用(和光純薬工業株式会社)

炭酸ナトリウム：特級(和光純薬工業株式会社)

硫酸ナトリウム(無水)：特級(関東化学株式会社)

酢酸：特級(小宗薬品株式会社)

1.5 % (V/V) 炭酸ナトリウム溶液：炭酸ナトリウム1.5 gを水に溶解して100 mlとしたもの

酢酸水：水に酢酸を加えてpH4に調製したもの

固相カートリッジカラム：Aqusis PLS-3 ルアーデバイス Jr.型 230 mg(ジーエルサイエンス株式会社)，使用直前にパックを開放し，メタノール10 mlで洗浄後，水10 mlで2回通液したもの

HPLC用ディスパーサブルフィルター：マイシヨリディスク 水系 孔径 0.45 μm(東ソー株式会社)

## ③ 操作

(前処理液の調製)

試料10 gを採り，内標準溶液1 mlを添加し十分混合し，水20 mlを加えてなじませた後，アセトニトリル90 mlを加えて15分間振とう抽出した。遠心分離(2500 r/min, 5分間)後，ろ過(綿栓)し，アセトニトリル10 mlで器具を洗浄した。この液にアセトニトリル飽和ヘキサソール50 mlを加え，1分間振とうし，遠心分離(2500 r/min, 5分間)後，アセトニトリル飽和ヘキサソール層を除き，水30 mlを加えた。この液をアセトニトリルを除くために，ロータリーエバポレーターを用いて約40 mlまで濃縮した。濃縮液に酢酸エチル50 mlを加えて1分間振とうした。酢酸エチル層を分取し，水層には酢酸エチル50 mlを加え，同様な操作をさらに2回繰り返した。酢酸エチル層を合わせ，1.5 % (V/V) 炭酸ナトリウム溶液10 mlを加え，30秒間振とうして酢酸エチル層を分取した。水層に酢酸エチル5 mlを加え，30秒間振とうした後，酢酸エチル層を分取して先の酢酸エチル層と合わせた。この酢酸エチル溶液に無水硫酸ナトリウム約15 gを加えて脱水し，無水硫酸ナトリウムには酢酸エチルを加えて，洗液を酢酸エチル層に合わせた。酢酸エチル溶液をロータリーエバポレーターを用いて約2 mlまで濃縮し，窒素気流下で乾固後，直ちに水5 mlに溶解して前処理液とした。

(試料溶液の調製)

前処理液を2本連結した固相カートリッジカラムに負荷し，新たに水5 mlで前処理液

の入っていた容器を洗い、洗液も固相カートリッジに負荷した。流出液は捨て、次にメタノール5 mlを流し、パツリンを溶出させた。得られた溶出液をロータリーエボレーターを用いて約1 mlまで濃縮し、窒素気流下で乾固した。直ちに酢酸水(pH4)2 mlに溶解し、HPLC用ディスポーサブルフィルターで濾過して試料溶液とした。

#### ④ 内標準溶液の調製

パツリン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 100 ppm溶液をエタノールで希釈して内標準原液とした(10 µg/ml)。この内標準原液1 mlを分取し、酢酸水(pH4)で10 mlに定容した(1 µg/ml)。これを内標準溶液とした。

#### ⑤ 標準溶液の調製及び検量線の作成

パツリン標準品約5 mgを精密に量り、エタノールに溶解して25 mlとし、これを標準原液とした(200 µg/ml)。

この標準原液1 mlを分取し、エタノールを加えて20 mlに定容した(10 µg/ml)。

この溶液について、AOAC Official methods 2000.02に基づきパツリン校正標準液の吸光度(276 nm)を測定し、パツリンの吸光係数から標準溶液の濃度を求めた。

さらにパツリン標準溶液(10 µg/ml)を酢酸水(pH4)で適宜希釈し、0.5, 0.4, 0.25, 0.1, 0.05 µg/mlの標準溶液を調製(但し、パツリン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>を0.5 µg/ml含む)し、検量線作成用のパツリン標準溶液とした。

各標準溶液3 µlを高速液体クロマトグラフ-質量分析計(以下「LC/MS」と略す)に注入し、標準溶液のパツリンの濃度とパツリン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>のピーク高さに対するパツリンのピーク高さ比から検量線の作成を行った。

#### ⑥ 濃度の算出

試料溶液3 µlをLC/MSに注入し、得られたパツリンとパツリン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>とのピーク高さ比と、⑤で作成した検量線から試料溶液中のパツリン濃度を求め、次式に従い試料中のパツリン濃度を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{試料中のパツリン濃度}(\mu\text{g/g}) \\ & = \text{試料溶液中のパツリン濃度}(\mu\text{g/ml}) \times 2 \text{ ml} / \text{試料採取量}(\text{g}) \end{aligned}$$

#### ⑦ 検出限界

マスフラグメントグラム上におけるパツリン溶液の最小検出濃度を0.05 µg/mlとすると、検出限界は次式により算出され、0.010 µg/gとなった。

(検出限界)

$$0.05 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} / 10 \text{ g} = 0.010 \mu\text{g/g}$$

#### ⑧ 高速液体クロマトグラフ-質量分析計操作条件

機 種 : LC部 ; Waters2695[Waters Ltd.]  
 検 出 器 : MS部 ; ZQ[Waters Ltd.]  
 カ ラ ム : YMC Pro C18, φ 2.0 mm×25 cm[株式会社ワイエムシィ]  
 カラム温度 : 25 °C  
 移 動 相 : 1 %酢酸及びアセトニトリルの混液 (97:3)  
 流 量 : 0.2 ml/min  
 イオン源温度 : 100 °C  
 コーン電圧 : 20 V  
 イオン化法 : エレクトロスプレー(負イオン検出モード)  
 設定イオン数 : パツリン 測定イオン m/z 153.0, 確認イオン m/z 109.0  
                   パツリン-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 測定イオン m/z 156.1, 確認イオン m/z 111.0  
 注 入 量 : 3 μl

## 6 検討試料の結果

検討に使用したいずれの試料からもパツリンは検出されなかった(検出限界 0.010 μg/g)。ただし, 2, 4, 13, 14, 15, 21, 22, 23及び25においては, パツリンの測定イオンm/z 153.0では近接ピーク(保持時間のズレ約0.4~1.1分)が認められたものの, 確認イオンm/z109.0では検出されなかった。

## 7 添加回収試験の結果

検出限界相当濃度(0.010 μg/g[実際濃度0.0093 μg/g], 繰り返し1回)及び検出限界の10倍相当濃度(0.10 μg/g[実際濃度0.093 μg/g], 繰り返し3回)の添加回収試験を実施し, その結果を表-3~6に示した。

表-3 添加回収試験の結果①

| 区分    | 食品           | 試料<br>番号 | 添加<br>濃度<br>(μg/g) | 回収率 (%) |       |       |       | 相対標<br>準偏差<br>(%) |
|-------|--------------|----------|--------------------|---------|-------|-------|-------|-------------------|
|       |              |          |                    | 1回目     | 2回目   | 3回目   | 平均    |                   |
| ジュース類 | ベリー類<br>ジュース | 1        | 0.010              | 97.9    | —     | —     | —     | —                 |
|       |              |          | 0.10               | 99.7    | 98.7  | 98.5  | 99.0  | 0.6               |
|       |              | 2        | 0.010              | 84.8    | —     | —     | —     | —                 |
|       |              |          | 0.10               | 98.9    | 98.1  | 100.7 | 99.2  | 1.3               |
|       | 野菜<br>ジュース   | 3        | 0.010              | 97.3    | —     | —     | —     | —                 |
|       |              |          | 0.10               | 100.6   | 96.2  | 97.4  | 98.1  | 2.3               |
|       |              | 4        | 0.010              | 116.5   | —     | —     | —     | —                 |
|       |              |          | 0.10               | 100.1   | 104.3 | 100.1 | 101.5 | 2.4               |
|       | ミックス<br>ジュース | 5        | 0.010              | 101.5   | —     | —     | —     | —                 |
|       |              |          | 0.10               | 96.1    | 100.7 | 95.4  | 97.4  | 3.0               |
|       |              | 6        | 0.010              | 98.2    | —     | —     | —     | —                 |
|       |              |          | 0.10               | 98.1    | 95.7  | 100.5 | 98.1  | 2.4               |

表-4 添加回収試験の結果②

| 区分                   | 食品        | 試料<br>番号 | 添加<br>濃度<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | 回収率 (%) |       |       |       | 相対標<br>準偏差<br>(%) |
|----------------------|-----------|----------|---------------------------------|---------|-------|-------|-------|-------------------|
|                      |           |          |                                 | 1回目     | 2回目   | 3回目   | 平均    |                   |
| ベリー類を<br>原料に含む<br>食品 | ソース類      | 7        | 0.010                           | 94.3    | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 100.3   | 100.6 | 101.5 | 100.8 | 0.6               |
|                      |           | 8        | 0.010                           | 93.5    | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 100.9   | 97.7  | 100.6 | 99.7  | 1.8               |
|                      | ゼリー類      | 9        | 0.010                           | 99.8    | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 101.6   | 100.1 | 100.5 | 100.7 | 0.8               |
|                      |           | 10       | 0.010                           | 99.6    | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 100.9   | 104.3 | 102.0 | 102.4 | 1.7               |
|                      | ジャム類      | 11       | 0.010                           | 98.0    | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 97.9    | 100.2 | 100.7 | 99.6  | 1.5               |
|                      |           | 12       | 0.010                           | 96.2    | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 100.4   | 99.3  | 99.3  | 99.7  | 0.6               |
|                      | シリアル<br>類 | 13       | 0.010                           | 97.9    | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 101.0   | 104.7 | 106.3 | 104.0 | 2.6               |
|                      |           | 14       | 0.010                           | 89.1    | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 100.6   | 105.5 | 99.6  | 101.9 | 3.1               |

表-5 添加回収試験の結果③

| 区分                   | 食品        | 試料<br>番号 | 添加<br>濃度<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | 回収率 (%) |       |       |       | 相対標<br>準偏差<br>(%) |
|----------------------|-----------|----------|---------------------------------|---------|-------|-------|-------|-------------------|
|                      |           |          |                                 | 1回目     | 2回目   | 3回目   | 平均    |                   |
| リンゴ類を<br>原料に含む<br>食品 | ソース類      | 15       | 0.010                           | 96.7    | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 100.6   | 101.0 | 102.3 | 101.3 | 0.9               |
|                      |           | 16       | 0.010                           | 102.8   | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 99.6    | 98.8  | 101.7 | 100.0 | 1.5               |
|                      | ゼリー類      | 17       | 0.010                           | 103.5   | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 101.4   | 96.8  | 100.1 | 99.4  | 2.4               |
|                      |           | 18       | 0.010                           | 112.1   | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 101.0   | 100.4 | 100.1 | 100.5 | 0.5               |
|                      | ジャム類      | 19       | 0.010                           | 108.0   | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 97.6    | 99.8  | 101.3 | 99.6  | 1.9               |
|                      |           | 20       | 0.010                           | 95.3    | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 97.6    | 99.5  | 97.5  | 98.2  | 1.1               |
|                      | シリアル<br>類 | 21       | 0.010                           | 84.9    | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 102.0   | 98.3  | 97.6  | 99.3  | 2.4               |
|                      |           | 22       | 0.010                           | 109.0   | —     | —     | —     | —                 |
|                      |           |          | 0.10                            | 105.0   | 100.6 | 105.6 | 103.7 | 2.6               |
| 離乳食                  | 23        | 0.010    | 108.0                           | —       | —     | —     | —     |                   |
|                      |           | 0.10     | 101.5                           | 98.0    | 97.4  | 99.0  | 2.2   |                   |
|                      | 24        | 0.010    | 102.2                           | —       | —     | —     | —     |                   |
|                      |           | 0.10     | 98.4                            | 97.9    | 97.8  | 98.0  | 0.3   |                   |

表-6 添加回収試験の結果④

| 区分 | 食品        | 試料<br>番号 | 添加<br>濃度<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | 回収率 (%) |       |       |       | 相対標<br>準偏差<br>(%) |
|----|-----------|----------|---------------------------------|---------|-------|-------|-------|-------------------|
|    |           |          |                                 | 1回目     | 2回目   | 3回目   | 平均    |                   |
| 穀物 | 麦         | 25       | 0.010                           | 85.7    | —     | —     | —     | —                 |
|    |           |          | 0.10                            | 100.7   | 102.1 | 100.9 | 101.2 | —                 |
|    |           | 26       | 0.010                           | 102.8   | —     | —     | —     | —                 |
|    |           |          | 0.10                            | 104.1   | 99.5  | 101.3 | 101.6 | 2.3               |
|    | 米         | 27       | 0.010                           | 98.1    | —     | —     | —     | —                 |
|    |           |          | 0.10                            | 96.9    | 101.5 | 99.0  | 99.1  | 2.3               |
|    |           | 28       | 0.010                           | 96.6    | —     | —     | —     | —                 |
|    |           |          | 0.10                            | 102.7   | 100.1 | 103.3 | 102.0 | 1.7               |
|    | シリアル<br>類 | 29       | 0.010                           | 93.0    | —     | —     | —     | —                 |
|    |           |          | 0.10                            | 102.5   | 97.2  | 100.2 | 100.0 | 2.7               |
|    |           | 30       | 0.010                           | 90.3    | —     | —     | —     | —                 |
|    |           |          | 0.10                            | 99.7    | 101.2 | 96.1  | 99.0  | 2.6               |

- ① ジュース類においては、10倍相当濃度の平均回収率は97.4～101.5 %、相対標準偏差は3.0 %以下であった。
- ② ベリー類を原料に含む食品においては、10倍相当濃度の平均回収率は99.6～104.0 %、相対標準偏差は3.1 %以下であった。
- ③ リンゴを原料に含む食品においては、10倍相当濃度の平均回収率は98.0～103.7 %、相対標準偏差は2.6 %以下であった。
- ④ 穀物においては、10倍相当濃度の平均回収率は99.0～102.0 %、相対標準偏差は2.7 %以下であった。

## 8 その他の検討事項

### 1) 検量線

検量線作成用パツリン標準溶液(0.5, 0.4, 0.25, 0.1, 0.05  $\mu\text{g/ml}$ )をLC/MSに注入し、濃度と応答値から検量線の作成を行った。その結果、0.5～0.05  $\mu\text{g/ml}$ の範囲でm/z 153.0, 109.0のいずれも良好な直線性が認められた。

なお、標準溶液のマスペクトル、マスフラグメントグラム及び検量線の一例を図-1～3に示した。

### 2) 酢酸エチル転溶率

水50 mlにパツリン1  $\mu\text{g}$ を添加後、酢酸エチル50 mlを加え、1分間振とうした。酢酸エチル層を分取し、水層には酢酸エチル50 mlを加え、同様な操作をさらに2回繰り返した。酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、濃縮乾固後酢酸水(pH4)2 mlに溶解してLC/MSで測定した。

その結果、転溶率は95.8%と良好な結果が得られた。

### 3) カラムクロマトグラフィーの検討

試料中のパツリンを0.010 µg/gのレベルで測定するには、1.5 % (V/V)炭酸ナトリウム溶液での洗浄に加え、さらに有効な精製法が必要であった。精製法として固相カートリッジカラム (Aquisis PLS-3 ルアーデバイス Jr.型 230 mg)について検討した。

固相カートリッジカラムは使用直前にパックを開放して、あらかじめメタノール10 mlで洗浄後、水10 mlを2回通液したものをを用いた。パツリン1 µgを水5 mlに溶解してカラムに負荷し、新たに水5 mlを加え液を流下させた。続いてメタノールを流下させ、溶出率を調査した。

その結果(表-7参照)、メタノール5 mlでパツリンが溶出されることが判明した。

表-7 固相カートリッジカラムの溶出率(%)

| 溶出液量 | 水       |        | メタノール  |         |
|------|---------|--------|--------|---------|
|      | 0~10 ml | 0~5 ml | 0~5 ml | 5~10 ml |
| 溶出率  | 0       | 93.2   | 0      | 0       |

次に、試料の形態が異なる3種類の試料(試料番号3, 17及び29)10 gについて前処理を行い、酢酸エチル溶液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、窒素気流下で乾固し、直ちにパツリンを1 µg含有する水5 mlを加え、同様に溶出画分を調べた。

その結果(表-8参照)、試料番号29(シリアル)の水画分に19.6 %のパツリンが溶出された。

表-8 固相カートリッジカラムの溶出率(%)

| 試料番号 | 水       |        | メタノール  |         |
|------|---------|--------|--------|---------|
|      | 0~10 ml | 0~5 ml | 0~5 ml | 5~10 ml |
| 3    | 0       | 89.7   | 0      | 0       |
| 17   | 0       | 90.6   | 0      | 0       |
| 29   | 19.6    | 90.1   | 0      | 0       |

シリアル類については、水画分でパツリンが溶出されたため、カラムを2本連結して同様の操作を行った。

その結果(表-9参照)、カラムを2本連結すると水画分への溶出は認められなかった。

従って、穀物及びシリアル類の分析においては、2本連結させた固相カートリッジカラムを用いることとした。

表-9 固相カートリッジカラムの溶出率(%)

| 試料      | 水       |        | メタノール  |         |
|---------|---------|--------|--------|---------|
|         | 0~10 ml | 0~5 ml | 0~5 ml | 5~10 ml |
| 試料なし    | 0       | 98.8   | 0      | 0       |
| 試料番号 29 | 0       | 96.1   | 0      | 0       |

4) 特異性

パツリンを含有していない15種類の検討試料について分析を実施し、パツリンの溶出位置にピークがないことを確認した。マスフラグメントグラム例を図-4～18に示した。

5) 検出限界付近濃度における添加回収試験

3種類の試料(試料番号3, 17及び29) 10 gに, 検出限界の2倍相当濃度(0.019 µg/g)になるようにパツリンを添加し, 添加回収試験を実施した。マスフラグメントグラム例を図-19～21に示した。

表-10 添加回収試験の結果

| 試料番号 | 測定値(µg/g) |       |       |       |       |       |       | 標準偏差(Sx) |
|------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
|      | 1回目       | 2回目   | 3回目   | 4回目   | 5回目   | 6回目   | 平均    |          |
| 3    | 0.020     | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.00041  |
| 17   | 0.020     | 0.020 | 0.019 | 0.020 | 0.019 | 0.020 | 0.020 | 0.00052  |
| 29   | 0.019     | 0.018 | 0.017 | 0.018 | 0.017 | 0.017 | 0.018 | 0.00082  |

6) 再現性

3種類の試料(試料番号3, 17及び29) 10 gに, 検出限界の10倍相当濃度(0.093 µg/g)になるようにパツリンを添加し, 6回の繰り返し分析を実施した。マスフラグメントグラム例を図-22～24に示した。

その結果(表-11参照), 平均回収率は98.7～100.8 %, 相対標準偏差は2.6 %以下と良好であった。

表-11 再現性試験の結果

| 試料番号 | 回収率(%) |      |       |       |       |       |       | 相対標準偏差(%) |
|------|--------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
|      | 1回目    | 2回目  | 3回目   | 4回目   | 5回目   | 6回目   | 平均    |           |
| 3    | 100.6  | 96.2 | 97.4  | 101.7 | 101.0 | 102.7 | 99.9  | 2.6       |
| 17   | 101.4  | 96.8 | 100.1 | 100.4 | 102.4 | 103.8 | 100.8 | 2.4       |
| 29   | 102.5  | 97.2 | 100.2 | 96.3  | 96.4  | 99.8  | 98.7  | 2.5       |

9 まとめ

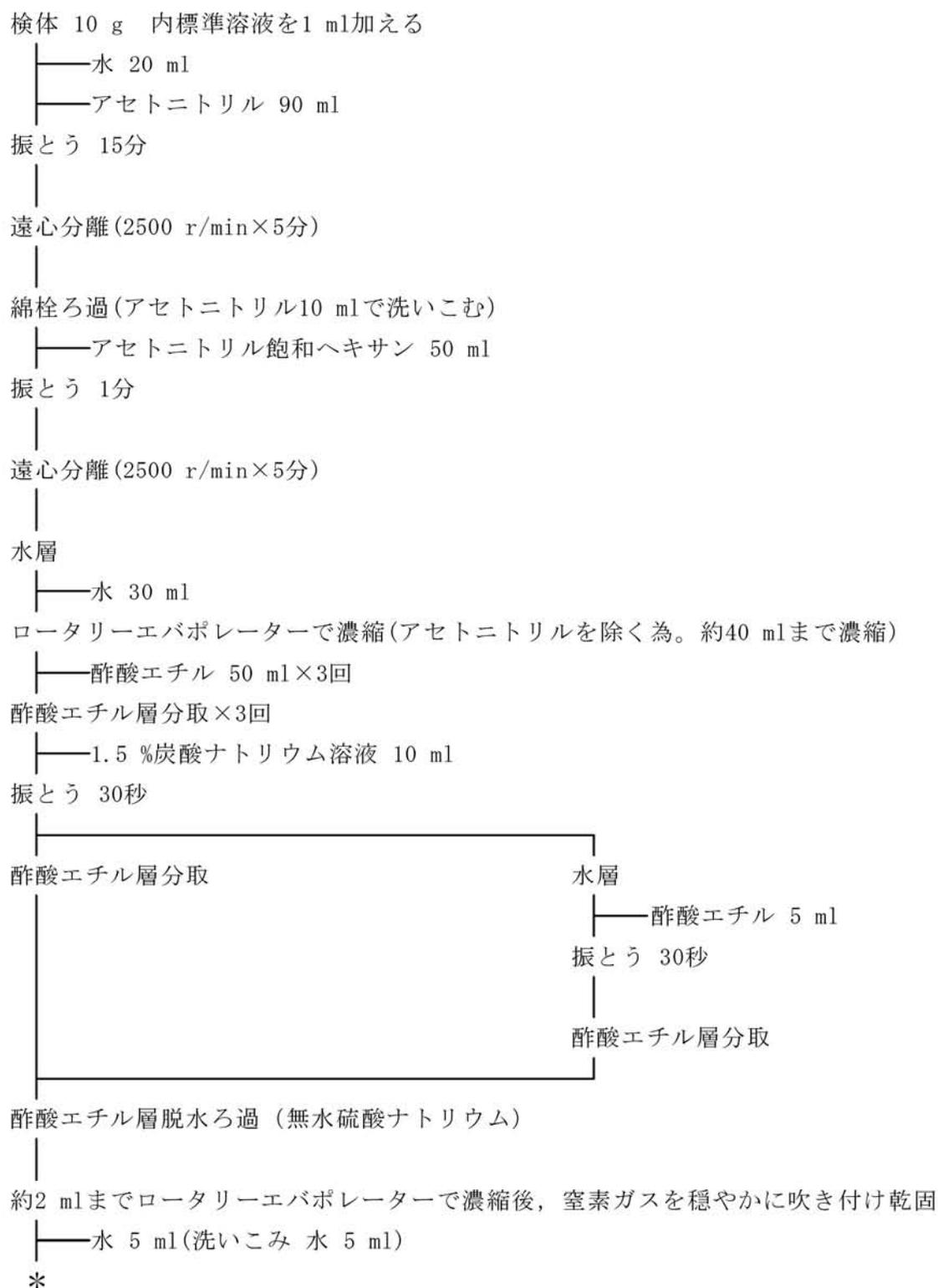
果汁(ベリー類)及びその加工品, リンゴ果汁を含む加工製品及び穀類計30食品についてパツリンの分析法の開発を行った。

穀類及びシリアル類については, アセトニトリルで抽出した後, 酢酸エチルに転溶し, 固相カートリッジカラムを用いて精製後, 高速液体クロマトグラフ-質量分析計を用いて測定する方法(フローシート-1参照)とした。また, それ以外の食品については, 酢酸エチルで抽出した後, 炭酸ナトリウム溶液で洗浄し, 固相カートリッジカラムを用いて精製後, 高速液体クロマトグラフ-質量分析計を用いて測定する方法(フローシート-2及び3参照)とした。

30試料について検出限界濃度の10倍量を添加し, 本法に従って添加回収試験を実施した結果, それぞれの食品の繰り返し3回の平均回収率は97.4～104.0 %と良好で, バラツキも

少なかった。また、同様に検出限界濃度付近の添加回収試験も実施したが、いずれの試料についてもマスフラグメント上で十分にピークの確認が可能であり、代表的な3試料について検出限界の2倍濃度における繰り返し試験においても十分な回収率と精度が得られた。なお、本法における検出限界は0.010  $\mu\text{g/g}$ であった。

#### フローシート-1 穀物及びシリアル類の分析法フローシート



＊

カラムクロマトグラフィー(Aqusis PLS-3 jr 230 mgを2本連結)

溶出 メタノール 5 ml

約1 mlまでロータリーエバポレーターで濃縮後、窒素ガスを穏やかに吹き付け乾固

酢酸水(pH4.0) 2 ml

HPLC用ディスポーザブルフィルター濾過

液体クロマトグラフ-質量分析計(3 µl)

### フローシート-2 ジュース類の分析法フローシート

検体 10 g 内標準溶液を1 ml加える

酢酸エチル 20 ml × 3回

振とう 1分×3回

酢酸エチル層分取×3回

1.5 %炭酸ナトリウム溶液 4 ml

振とう 30秒

酢酸エチル層分取

水層

酢酸エチル 5 ml

振とう 30秒

酢酸エチル層分取

酢酸エチル層脱水ろ過(無水硫酸ナトリウム)

約2 mlまでロータリーエバポレーターで濃縮後、窒素ガスを穏やかに吹き付け乾固

水 5 ml(洗いこみ 水 5 ml)

カラムクロマトグラフィー(Aqusis PLS-3 jr 230 mg)

溶出 メタノール 5 ml

約1 mlまでエバポレーターで濃縮後、窒素ガスを穏やかに吹き付け乾固

酢酸水(pH4.0) 2 ml

＊

\*

HPLC用ディスポーザブルフィルター濾過

液体クロマトグラフ-質量分析計(3  $\mu$ l)

フローシート-3 ソース類の分析法フローシート

検体 10 g 内標準溶液を1 ml加える

—水 50 ml  
—酢酸エチル 50 ml×3回

振とう 1分×3回

酢酸エチル層分取×3回

—1.5 %炭酸ナトリウム溶液 10 ml

振とう 30秒

酢酸エチル層分取

水層

—酢酸エチル 5 ml

振とう 30秒

酢酸エチル層分取

酢酸エチル層脱水ろ過(無水硫酸ナトリウム)

約2 mlまでロータリーエバポレーターで濃縮後、窒素ガスを穏やかに吹き付け乾固

—水 5 ml(洗いこみ 水 5 ml)

カラムクロマトグラフィー(Aquisis PLS-3 jr 230 mg)

溶出 メタノール 5 ml

約1 mlまでロータリーエバポレーターで濃縮後、窒素ガスを穏やかに吹き付け乾固

—酢酸水(pH4.0) 2 ml

HPLC用ディスポーザブルフィルター濾過

液体クロマトグラフ-質量分析計(3  $\mu$ l)

## 10 添付図表

- 図-1 パツリン及びパツリン<sup>13</sup>C<sub>3</sub>のマススペクトル例
- 図-2 標準溶液のマスフラグメントグラム例
- 図-3 検量線の一例
- 図-4 ベリー類ジュースのマスフラグメントグラム例
- 図-5 野菜ジュースのマスフラグメントグラム例
- 図-6 ミックスジュースのマスフラグメントグラム例
- 図-7 ベリー類を原料に含む食品，ソース類のマスフラグメントグラム例
- 図-8 ベリー類を原料に含む食品，ゼリー類のマスフラグメントグラム例
- 図-9 ベリー類を原料に含む食品，ジャム類のマスフラグメントグラム例
- 図-10 ベリー類を原料に含む食品，シリアル類のマスフラグメントグラム例
- 図-11 リンゴを原料に含む食品，ソース類のマスフラグメントグラム例
- 図-12 リンゴを原料に含む食品，ゼリー類のマスフラグメントグラム例
- 図-13 リンゴを原料に含む食品，ジャム類のマスフラグメントグラム例
- 図-14 リンゴを原料に含む食品，シリアル類のマスフラグメントグラム例
- 図-15 リンゴを原料に含む食品，離乳食のマスフラグメントグラム例
- 図-16 麦のマスフラグメントグラム例
- 図-17 米のマスフラグメントグラム例
- 図-18 シリアル類のマスフラグメントグラム例
- 図-19 添加回収試験(試料3:添加濃度0.019 µg/g)のマスフラグメントグラム例
- 図-20 添加回収試験(試料17:添加濃度0.019 µg/g)のマスフラグメントグラム例
- 図-21 添加回収試験(試料29:添加濃度0.019 µg/g)のマスフラグメントグラム例
- 図-22 添加回収試験(試料3:添加濃度0.093 µg/g)のマスフラグメントグラム例
- 図-23 添加回収試験(試料17:添加濃度0.093 µg/g)のマスフラグメントグラム例
- 図-24 添加回収試験(試料29:添加濃度0.093 µg/g)のマスフラグメントグラム例

以 上

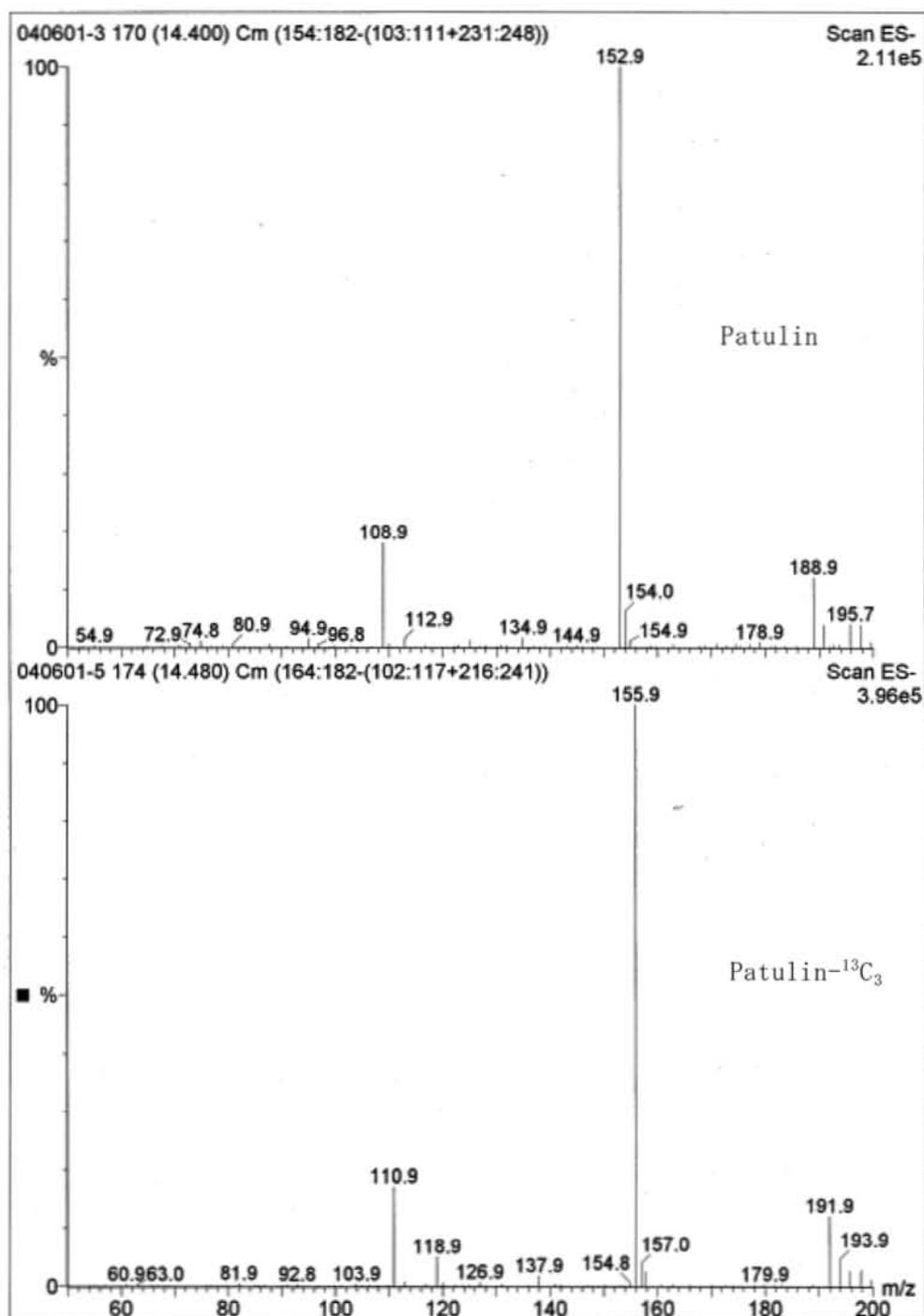
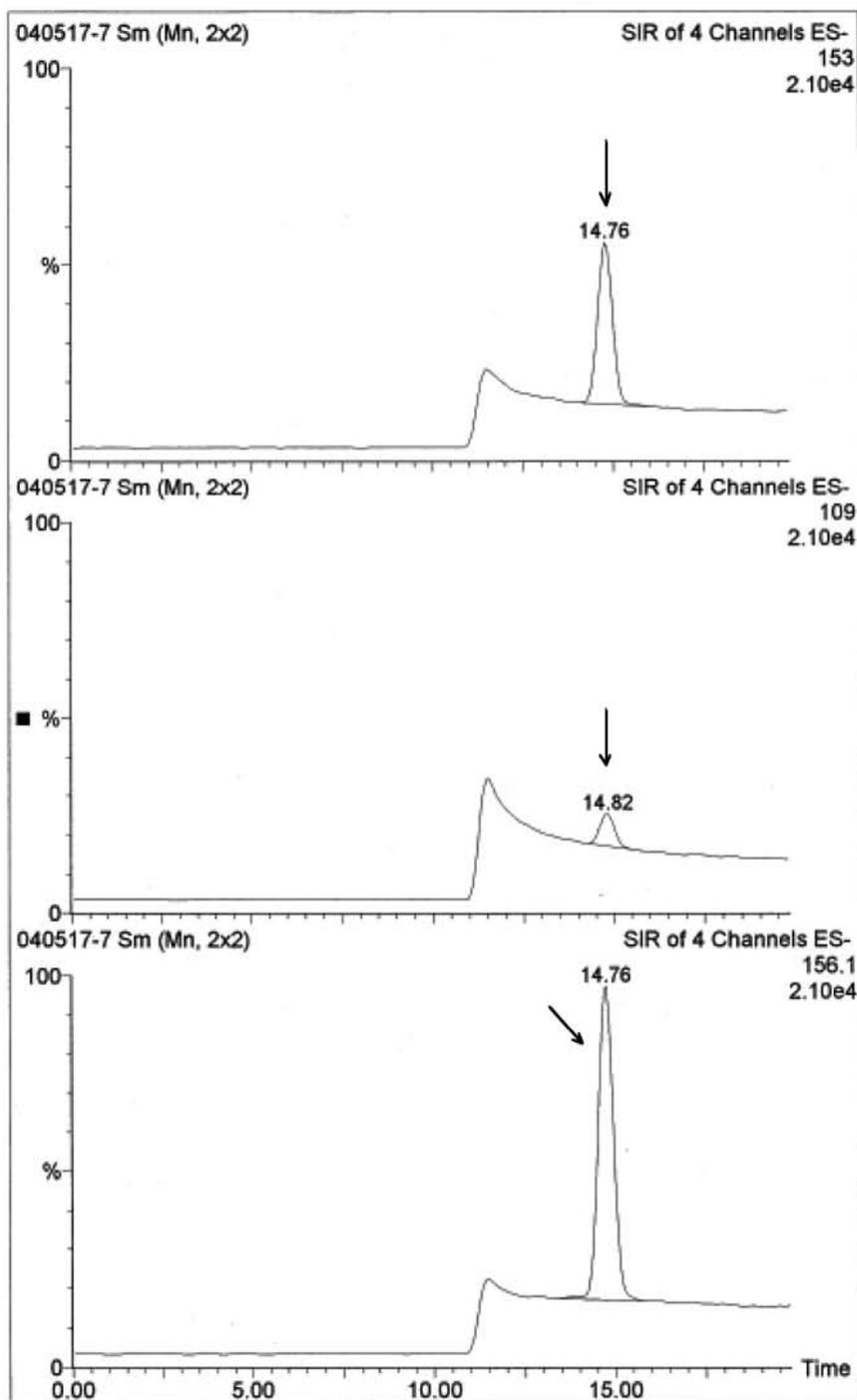


図-1 パツリン及びパツリン<sup>13</sup>-C<sub>3</sub>のマススペクトル



m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-2 標準溶液 (0.25 µg/ml) のマスフラグメントグラム例

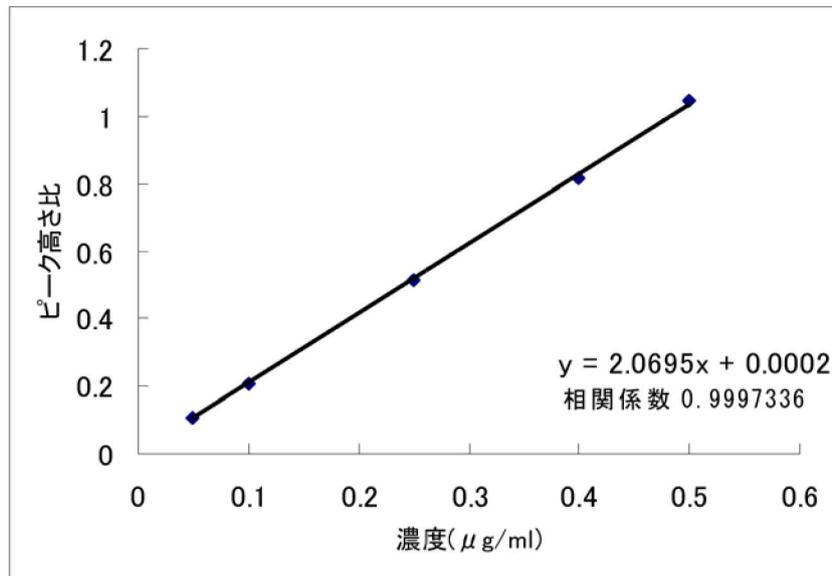


図-3-1 検量線の一例 (m/z 153.0)

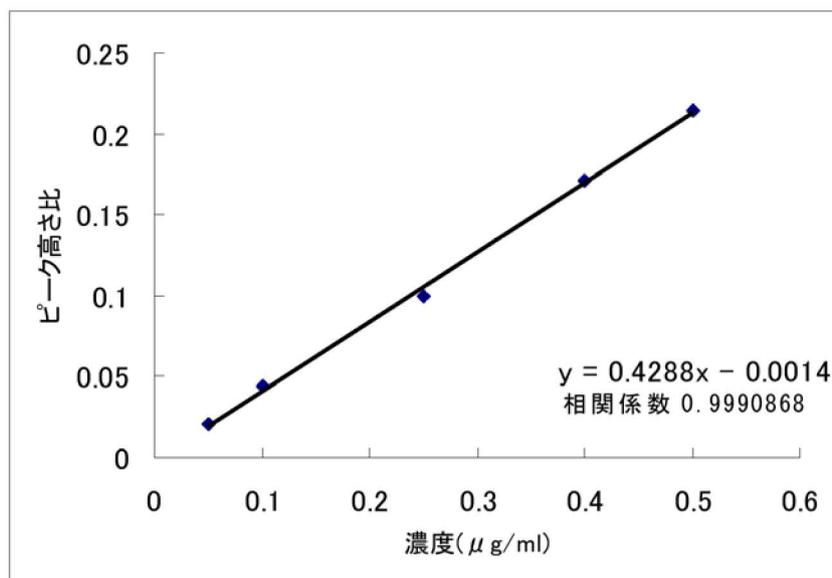
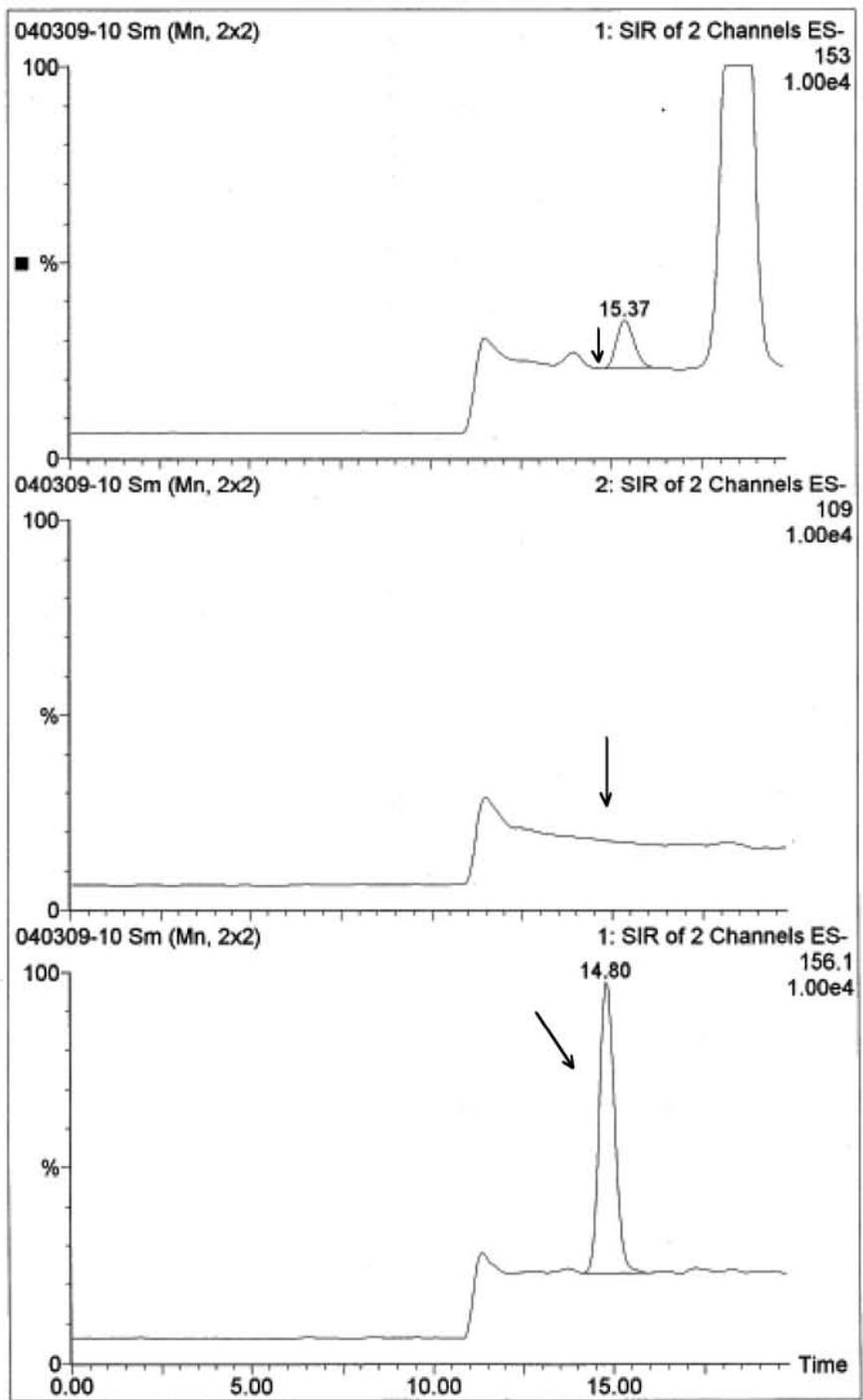


図-3-2 検量線の一例 (m/z 109.0)

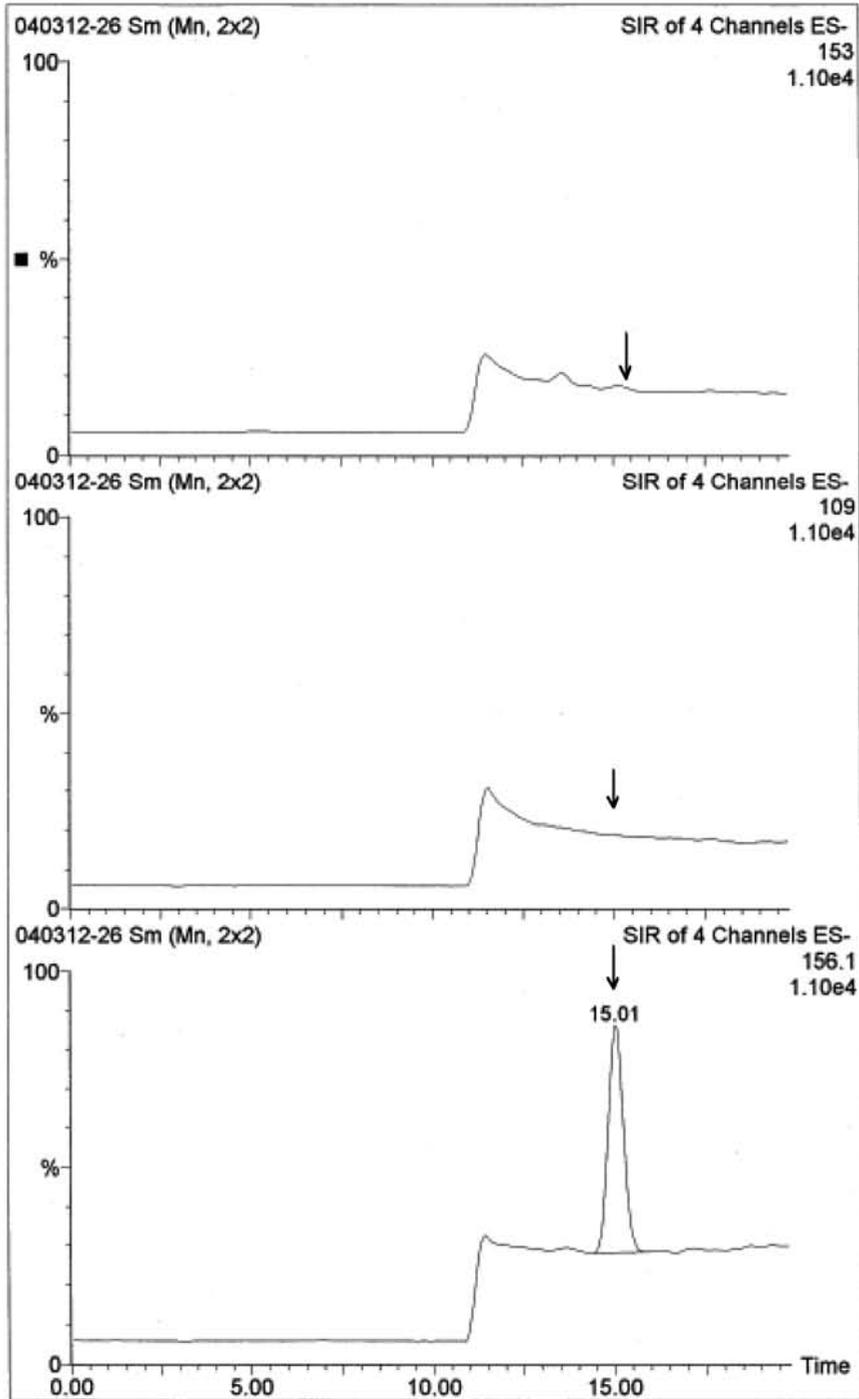


m/z 153.00

m/z 109.00

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-4 ベリー類ジュースのマスフラグメントグラム例

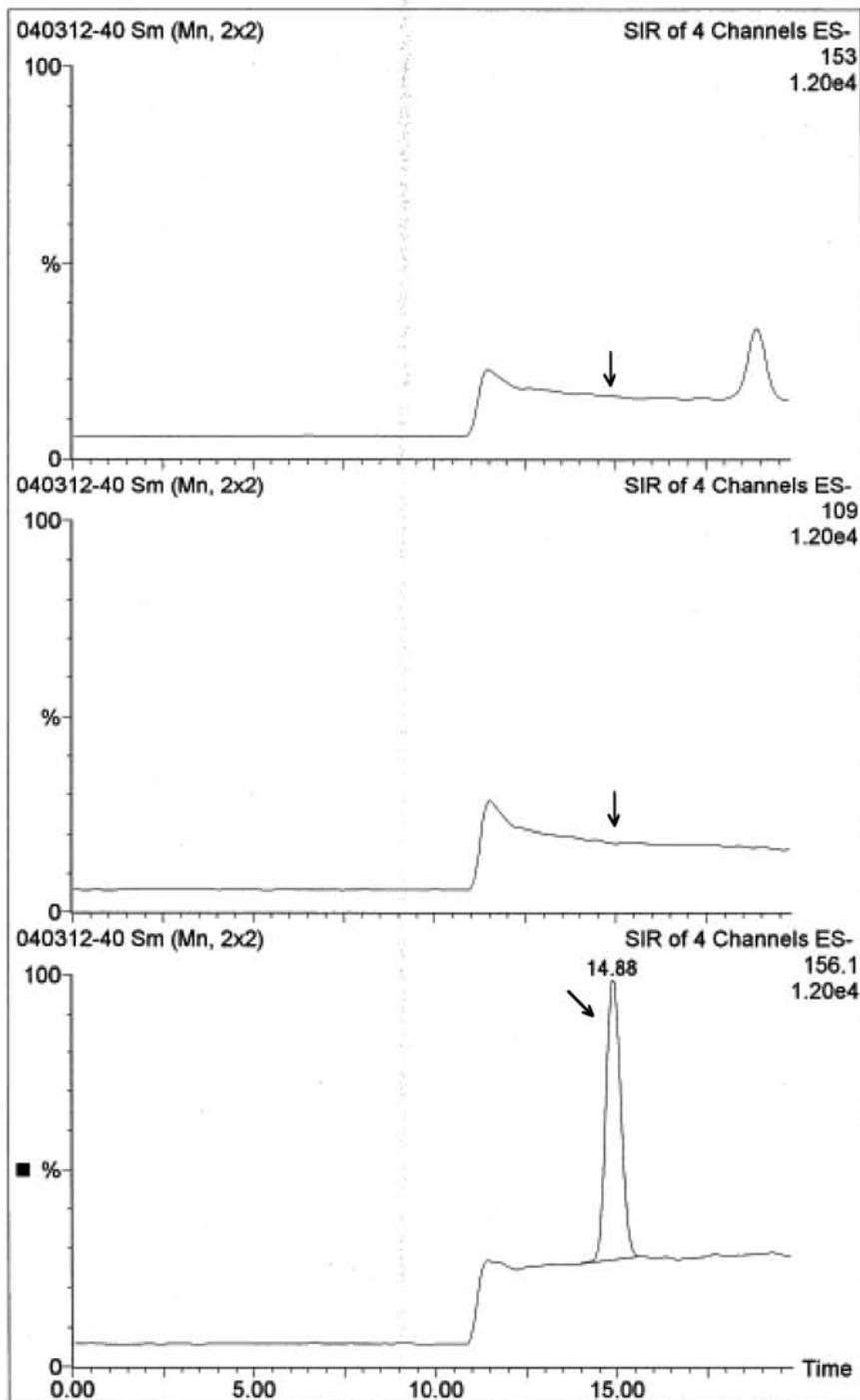


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-5 野菜ジュースのマスフラグメントグラム例

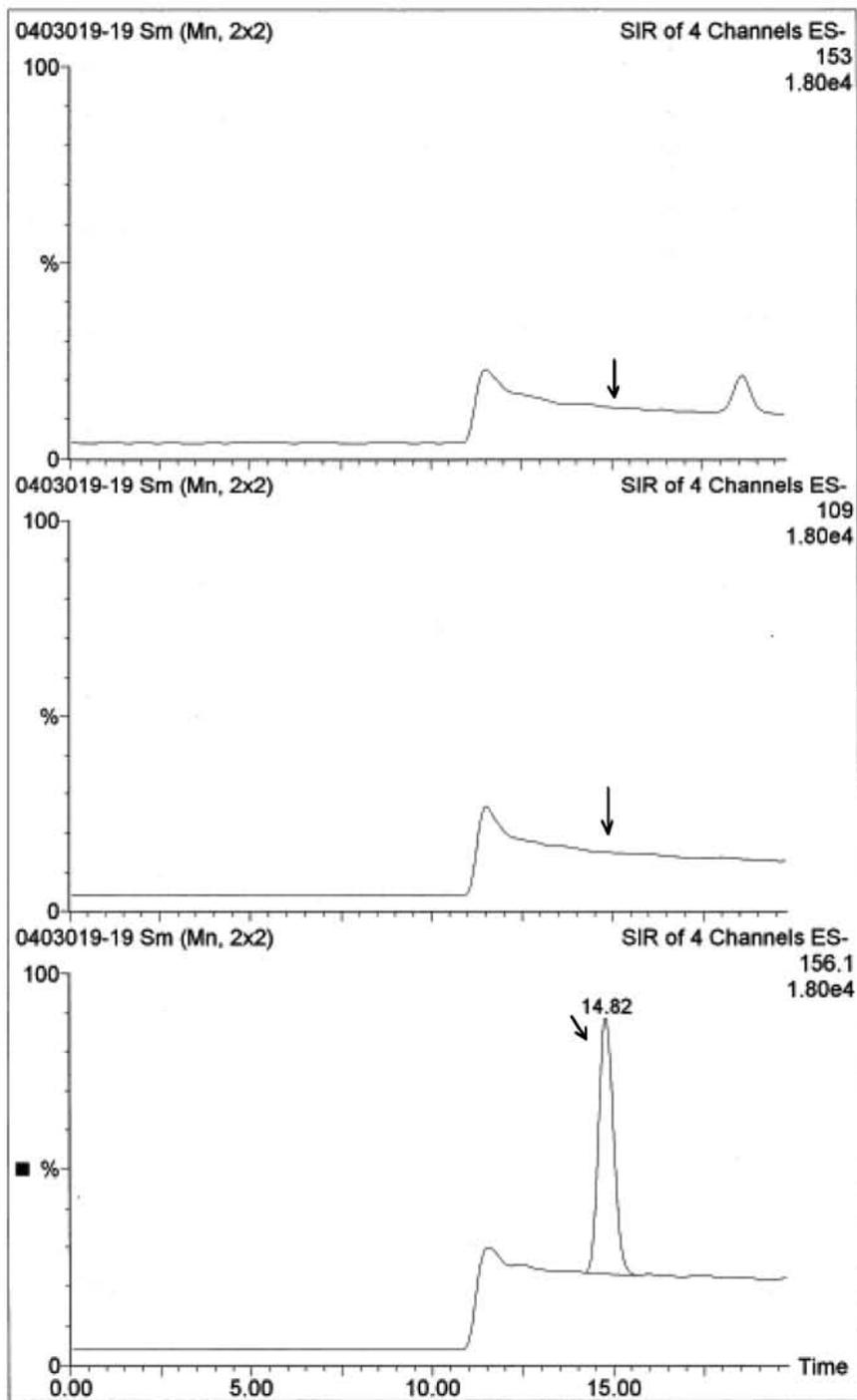


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-6 ミックスジュースのマスフラグメントグラム例



m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-7 ベリー類を原料に含む食品，ソース類のマスフラグメントグラム例

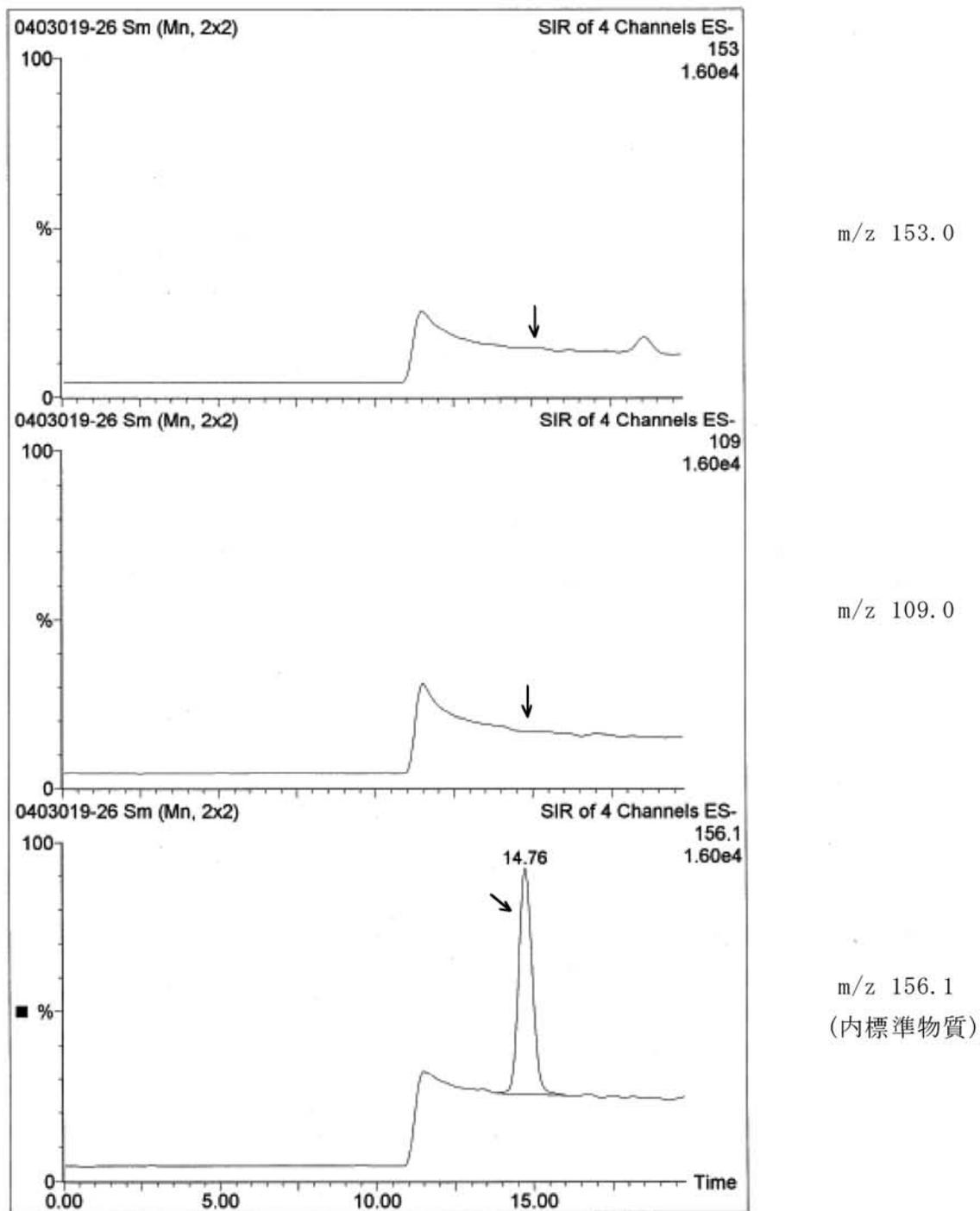
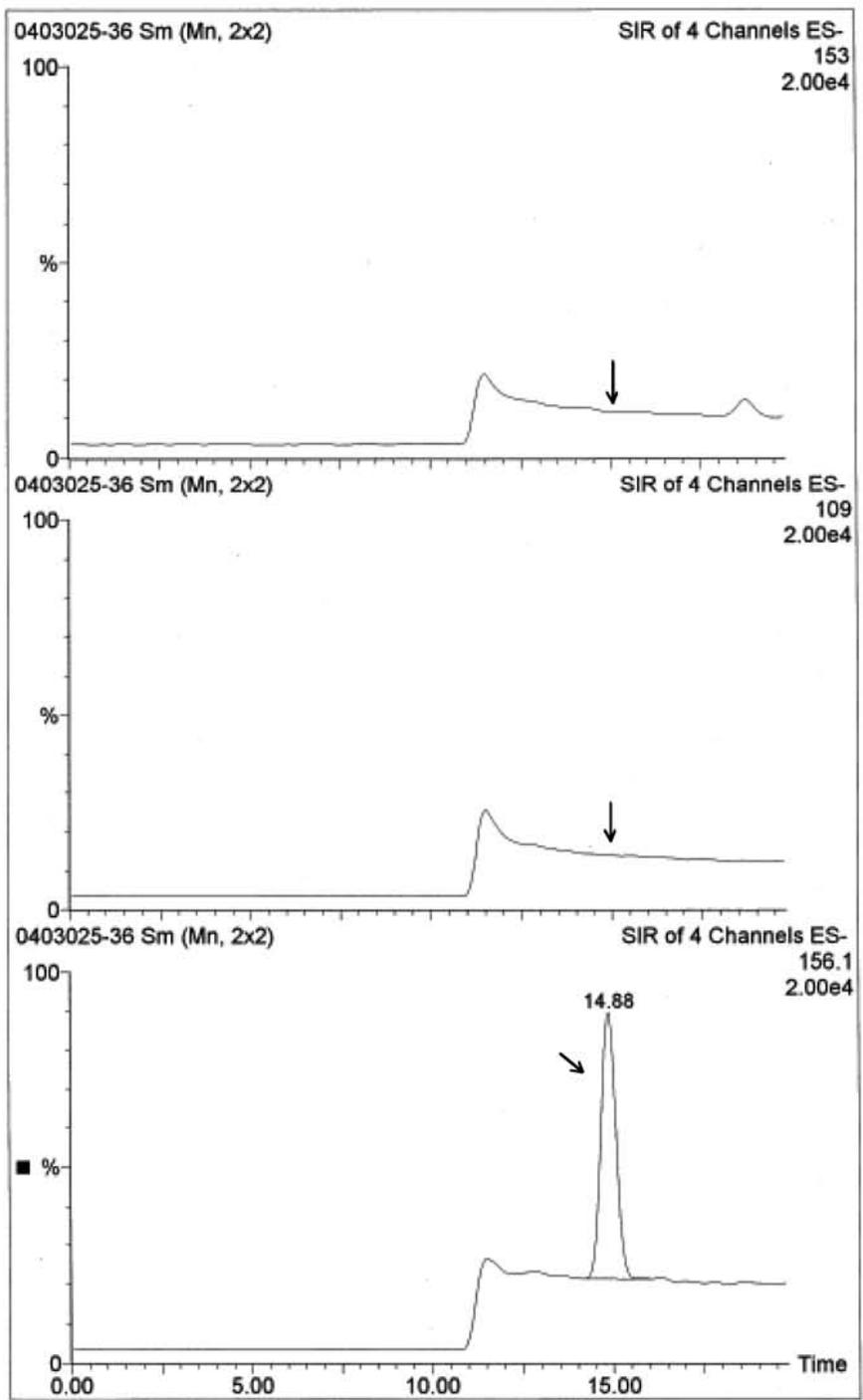


図-8 ベリー類を原料に含む食品，ゼリー類のマスフラグメントグラム例

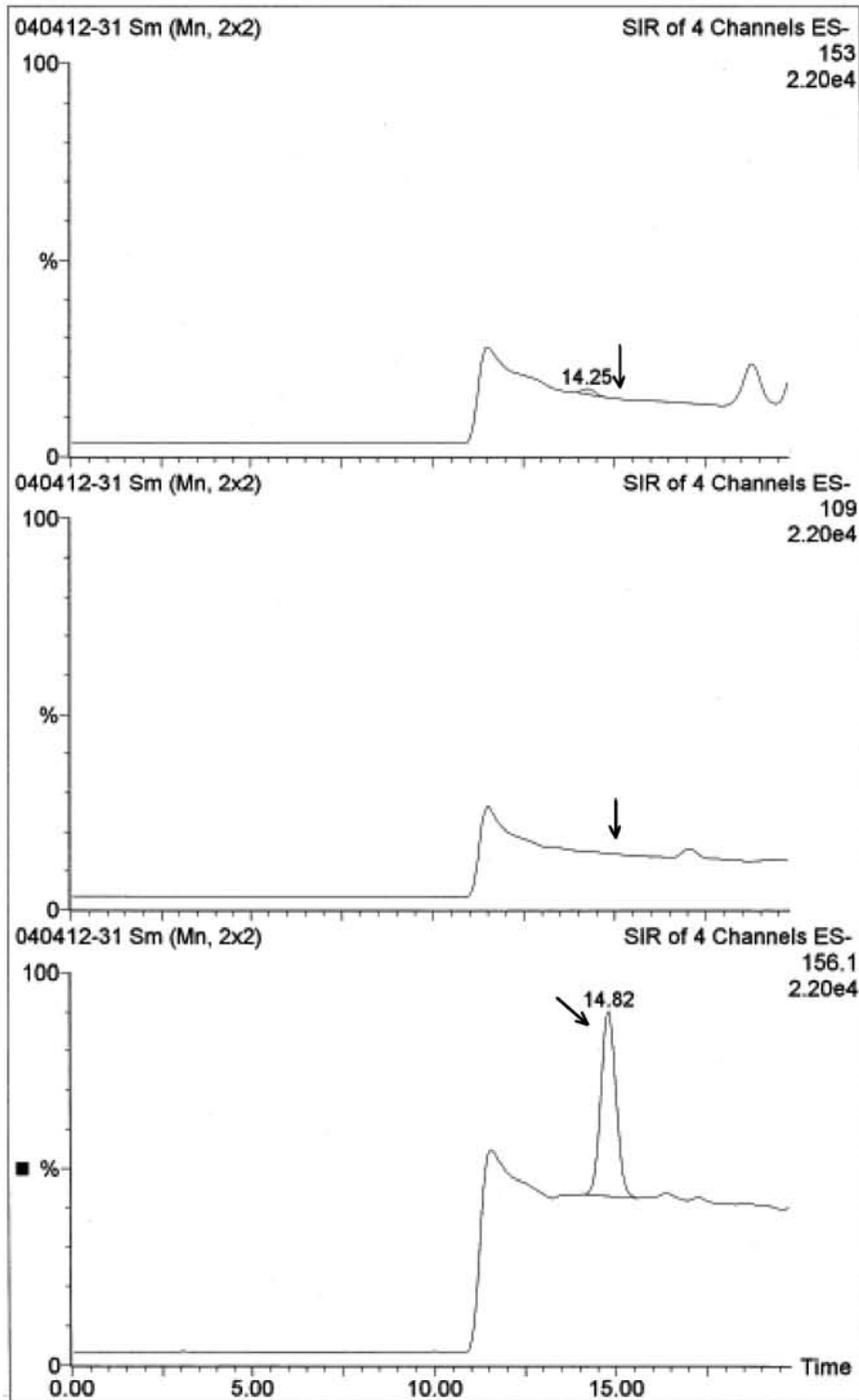


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-9 ベリー類を原料に含む食品，ジャム類のマスフラグメントグラム例

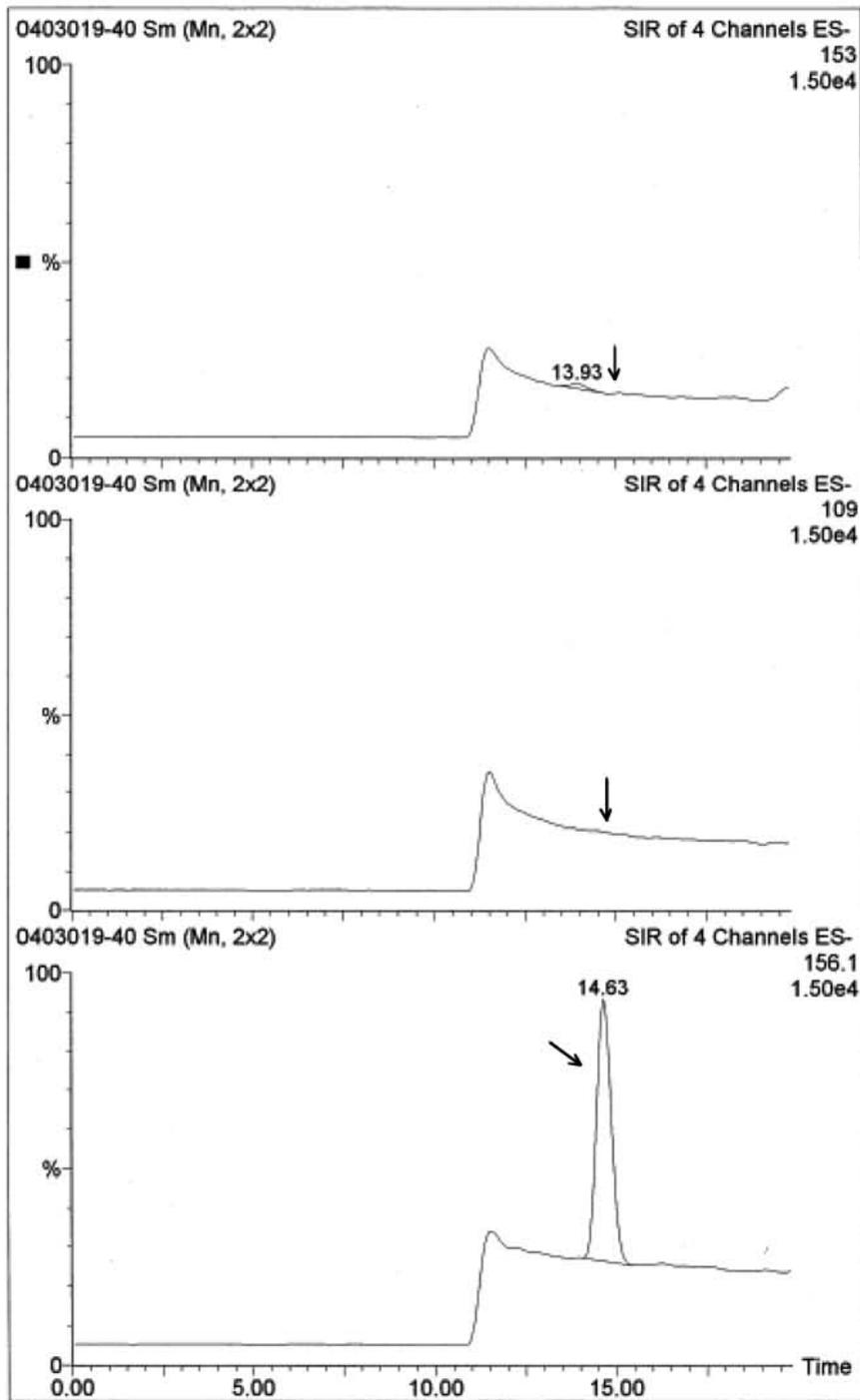


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-10 ベリー類を原料に含む食品，シリアル類のマスフラグメントグラム例

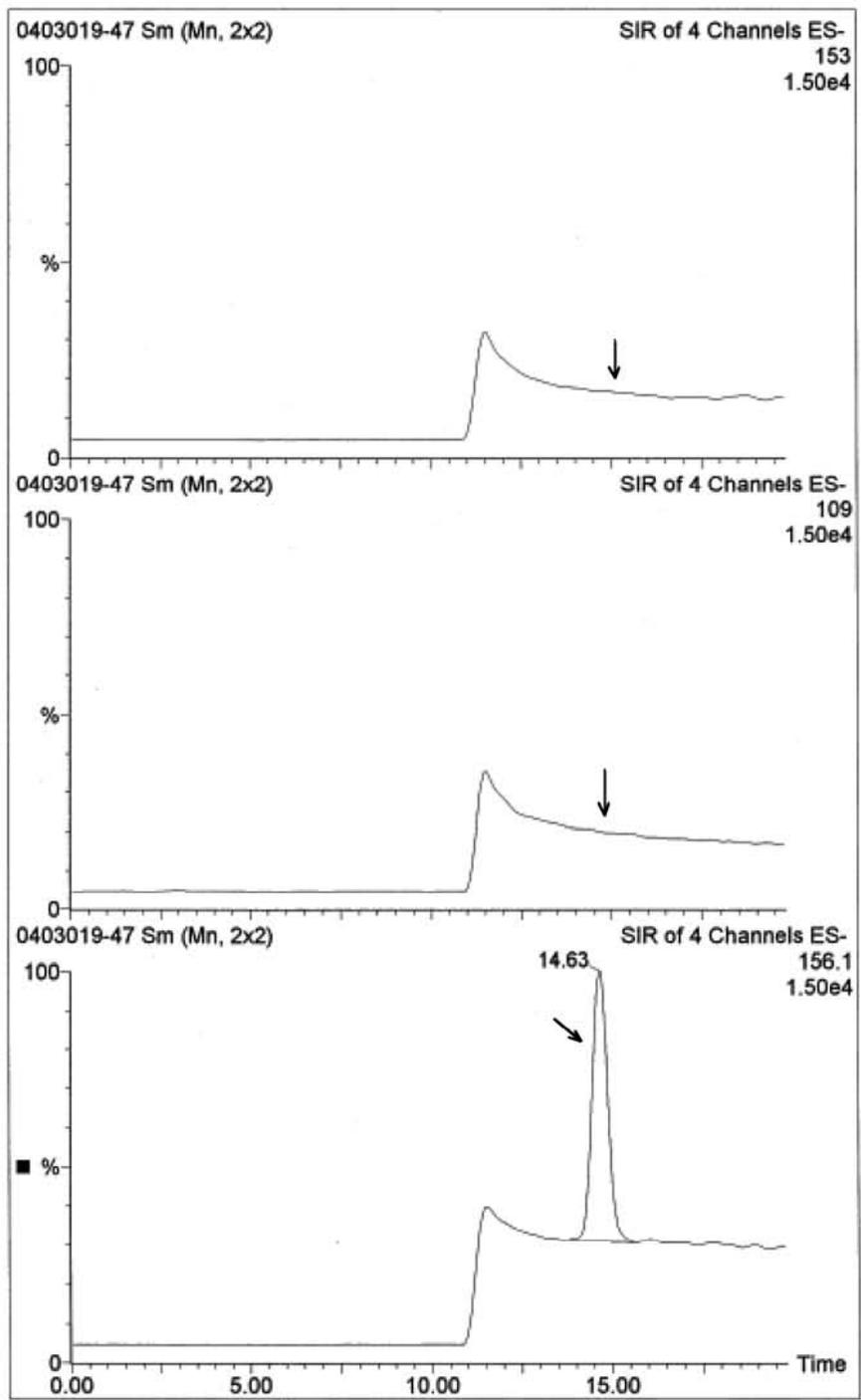


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-11 リンゴを原料に含む食品，ソース類のマスフラグメントグラム例

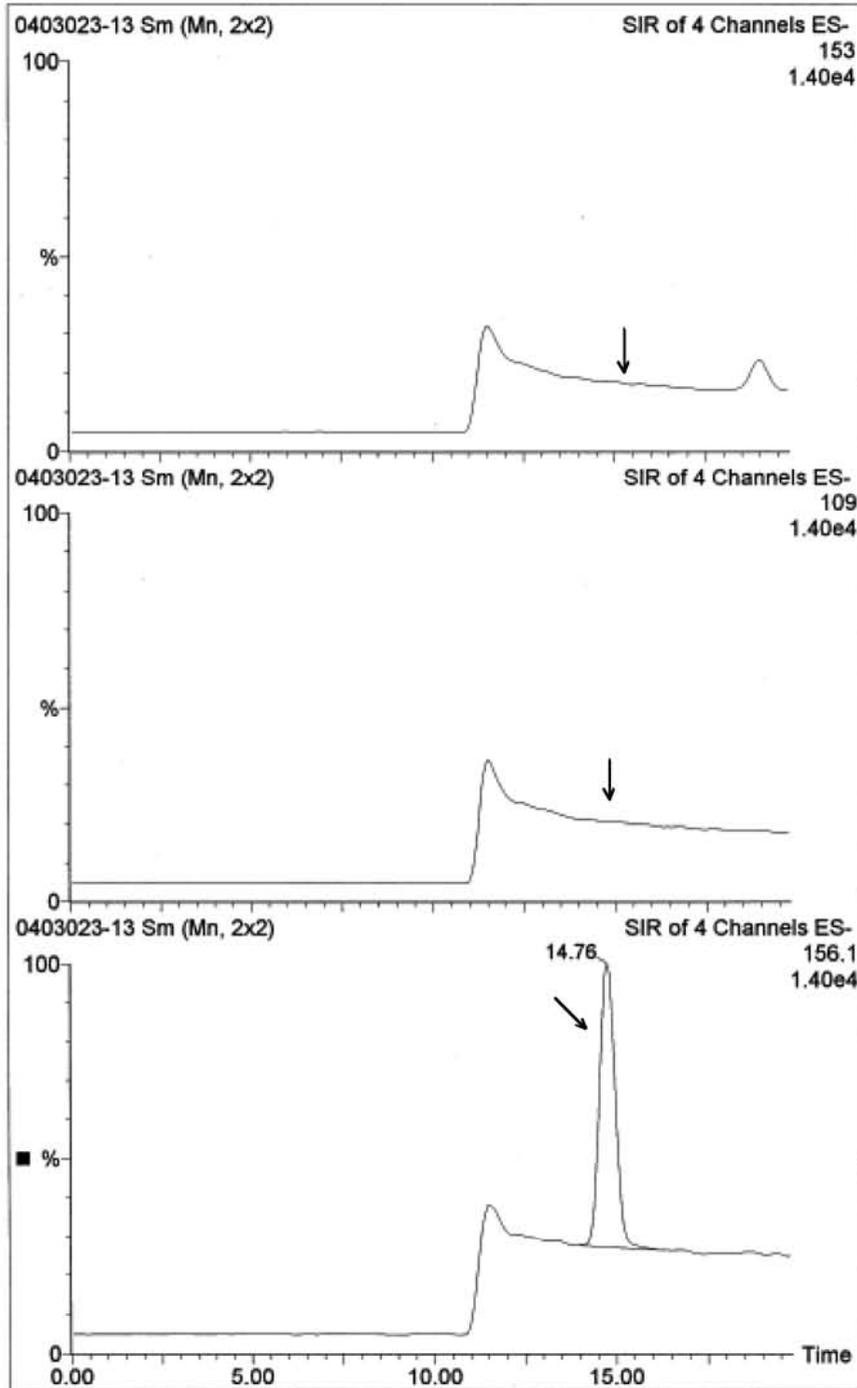


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-12 リンゴを原料に含む食品，ゼリー類のマスフラグメントグラム例

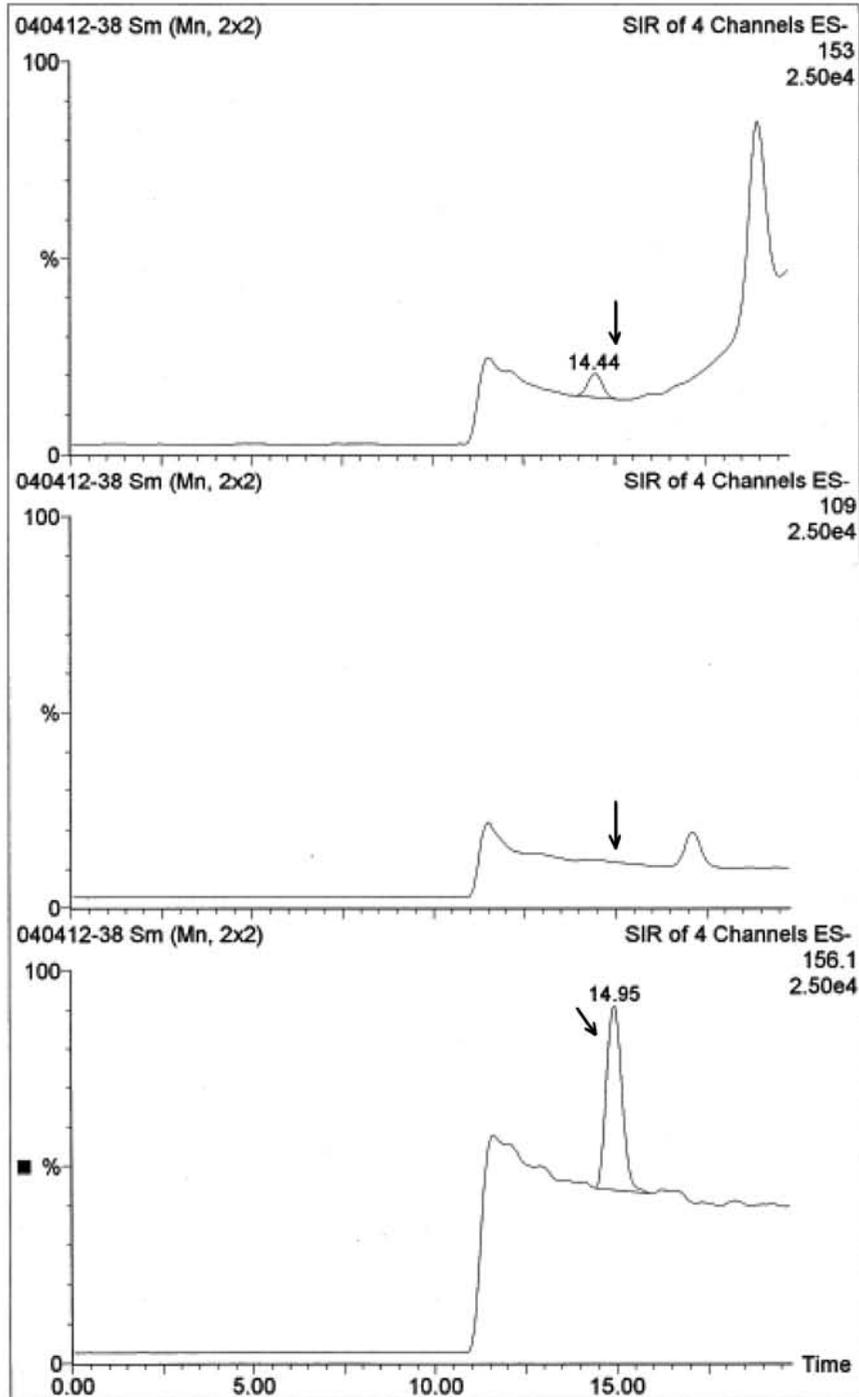


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-13 リンゴを原料を含む食品，ジャム類のマスフラグメントグラム例

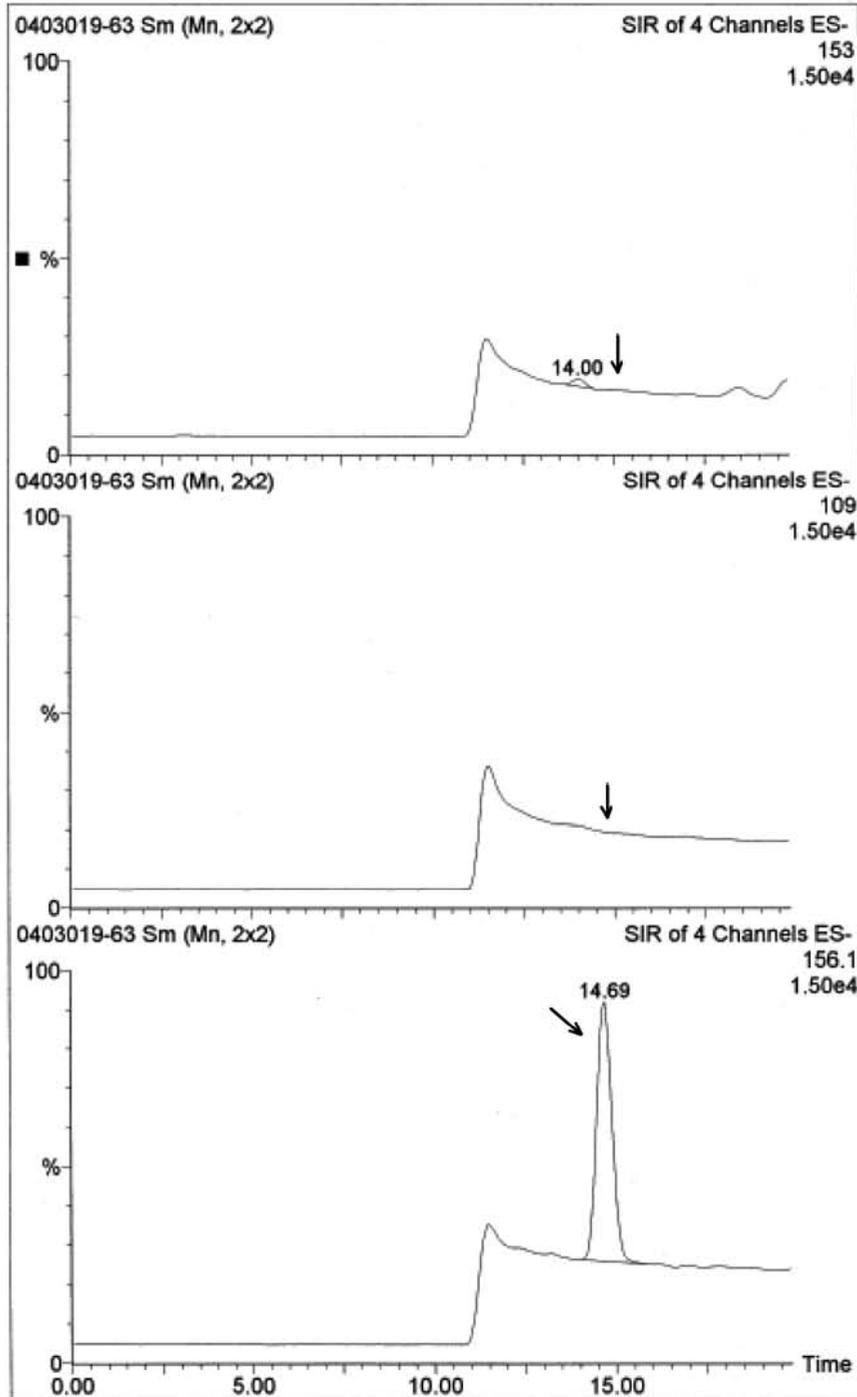


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-14 リンゴを原料に含む食品，シリアル類のマスフラグメントグラム例

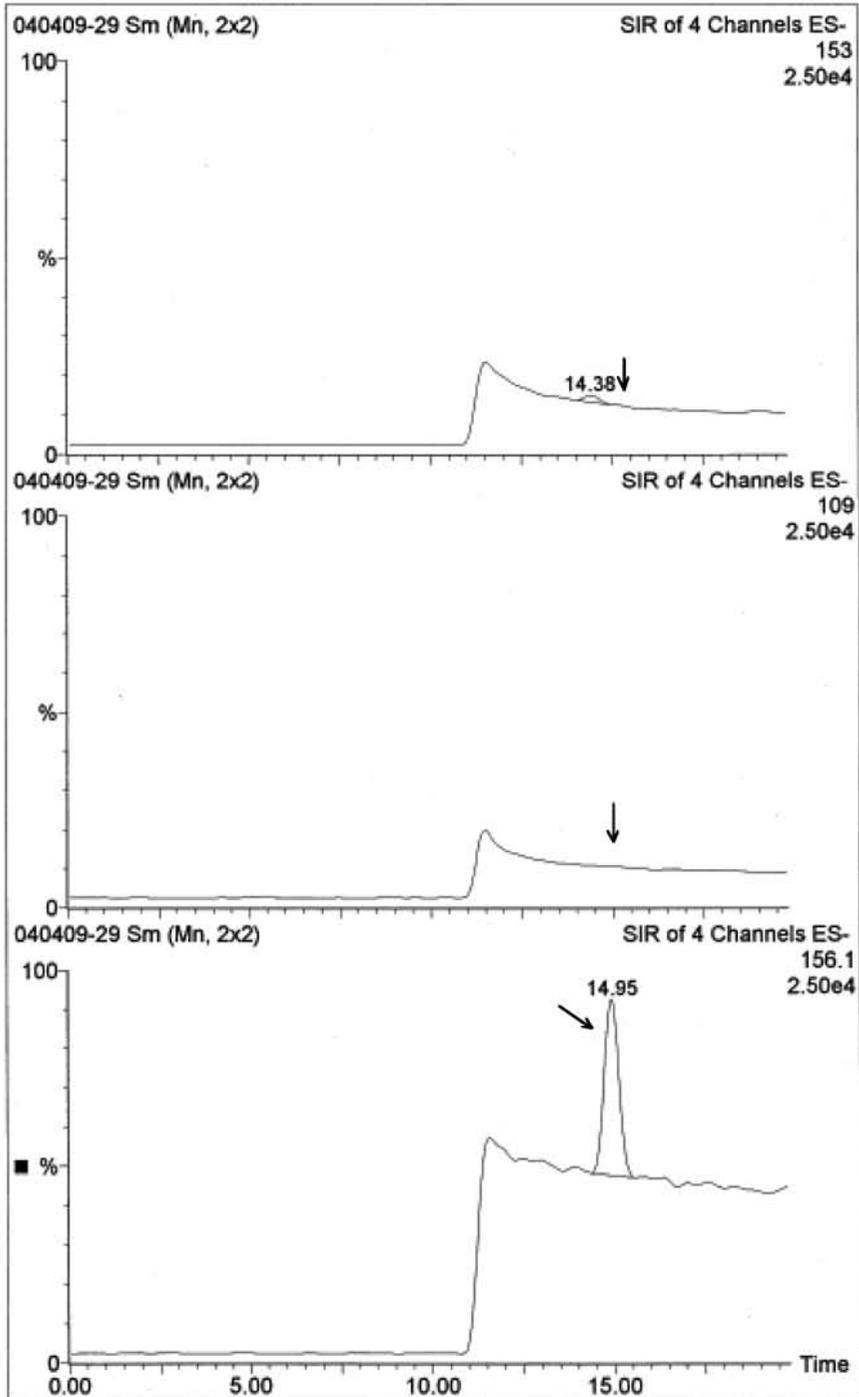


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-15 リンゴを原料に含む食品，離乳食のマスフラグメントグラム例

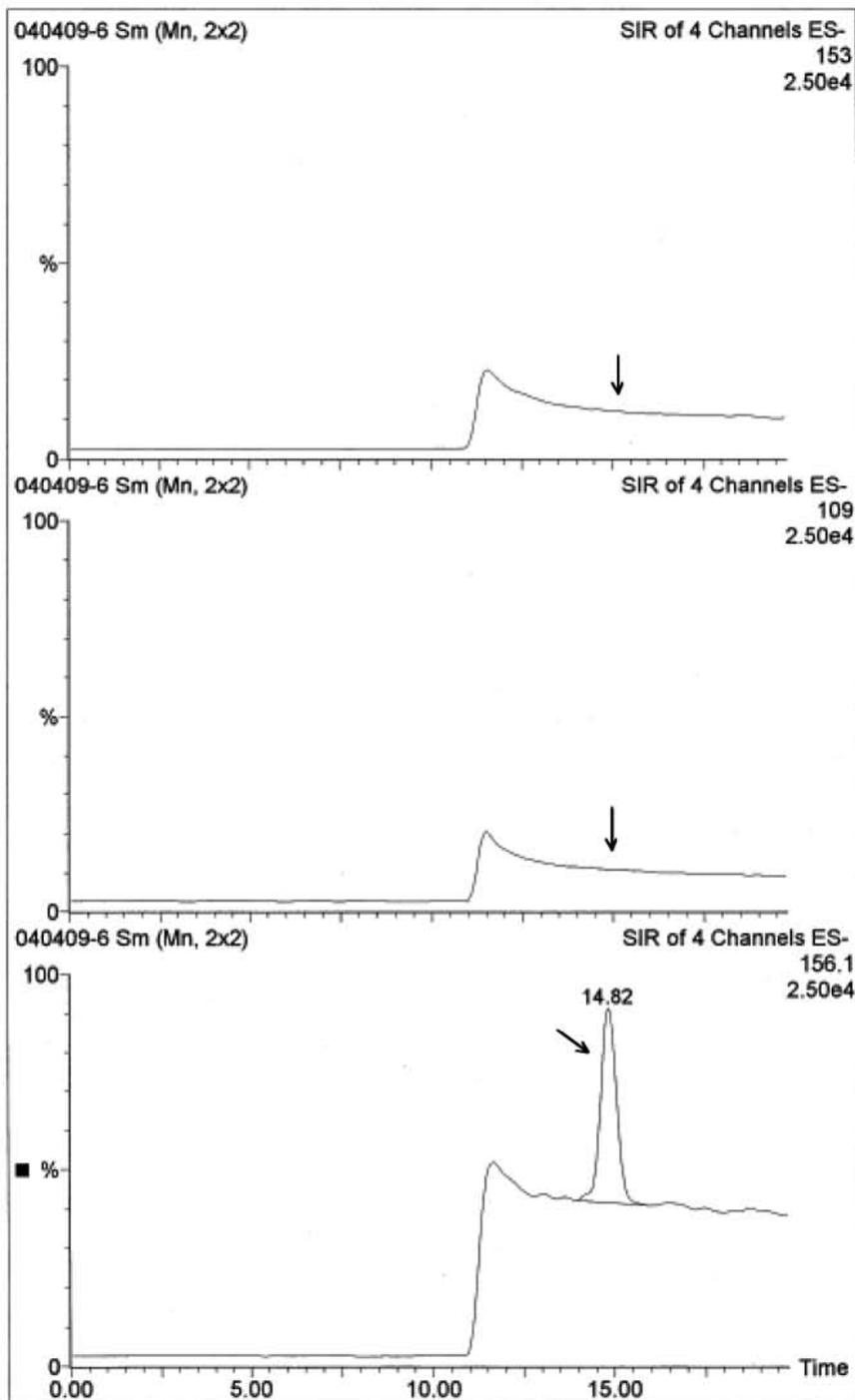


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-16 麦のマスフラグメントグラム例



m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-17 米のマスフラグメントグラム例

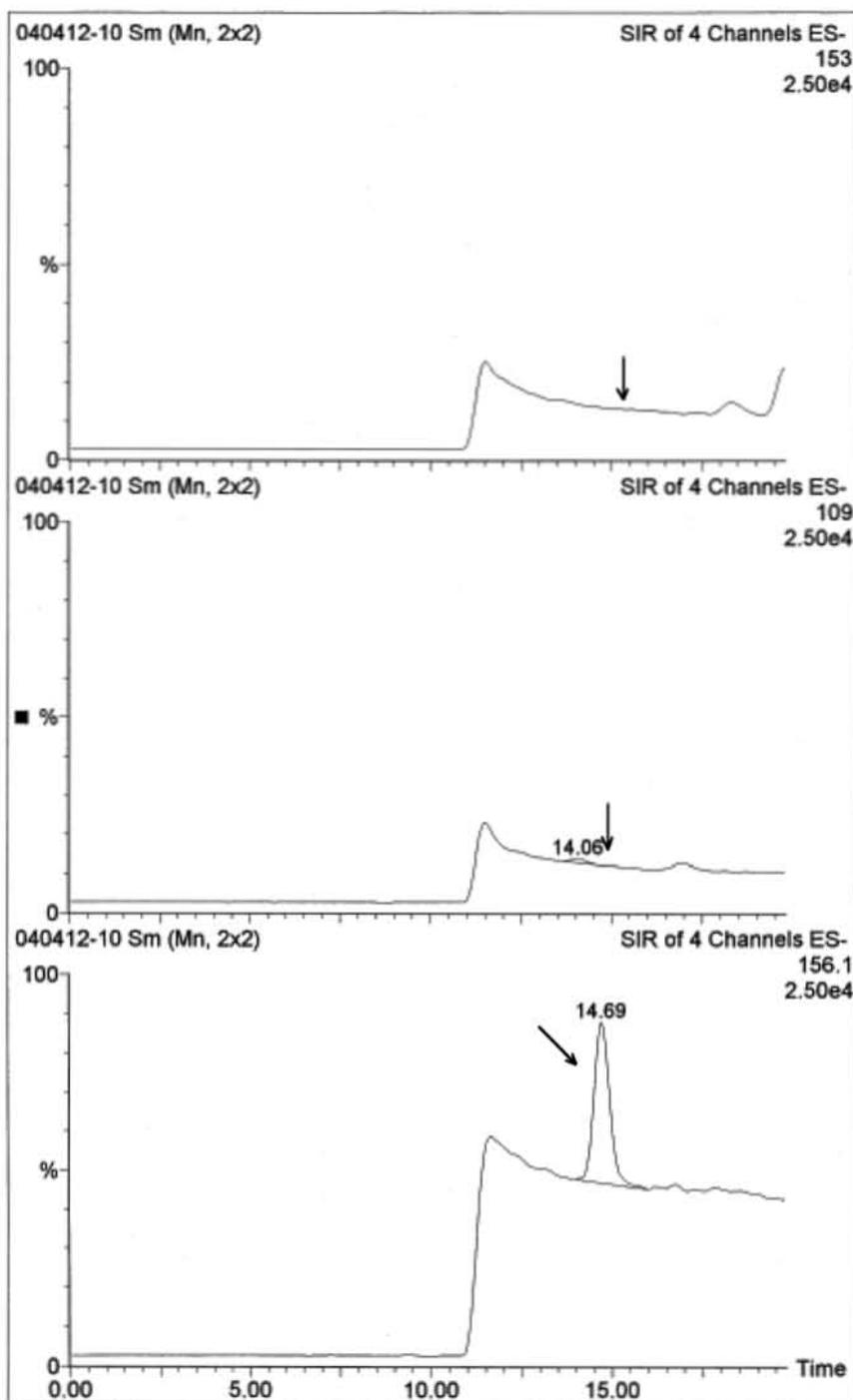
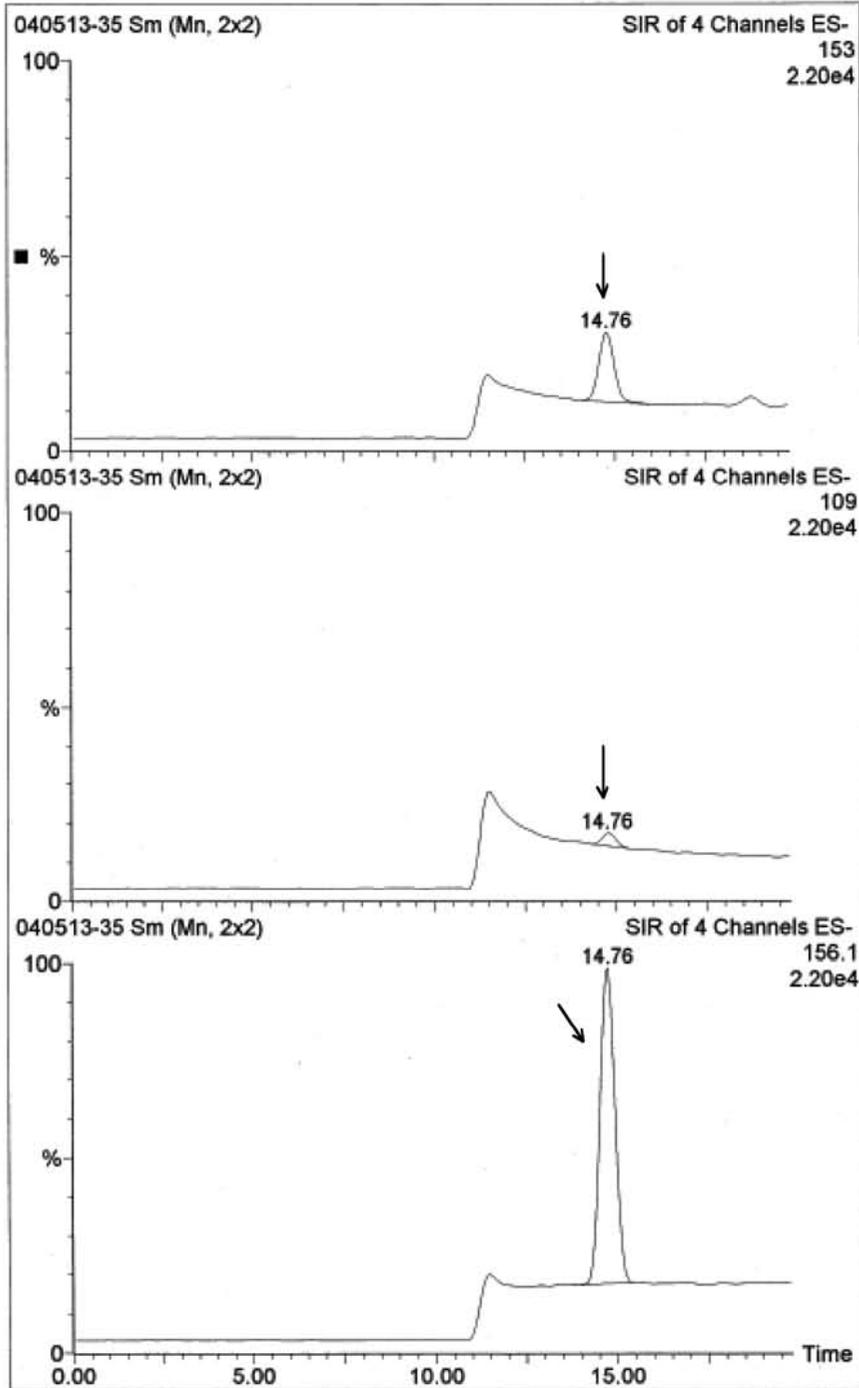


図-18 シリアル類のマスフラグメントグラム例

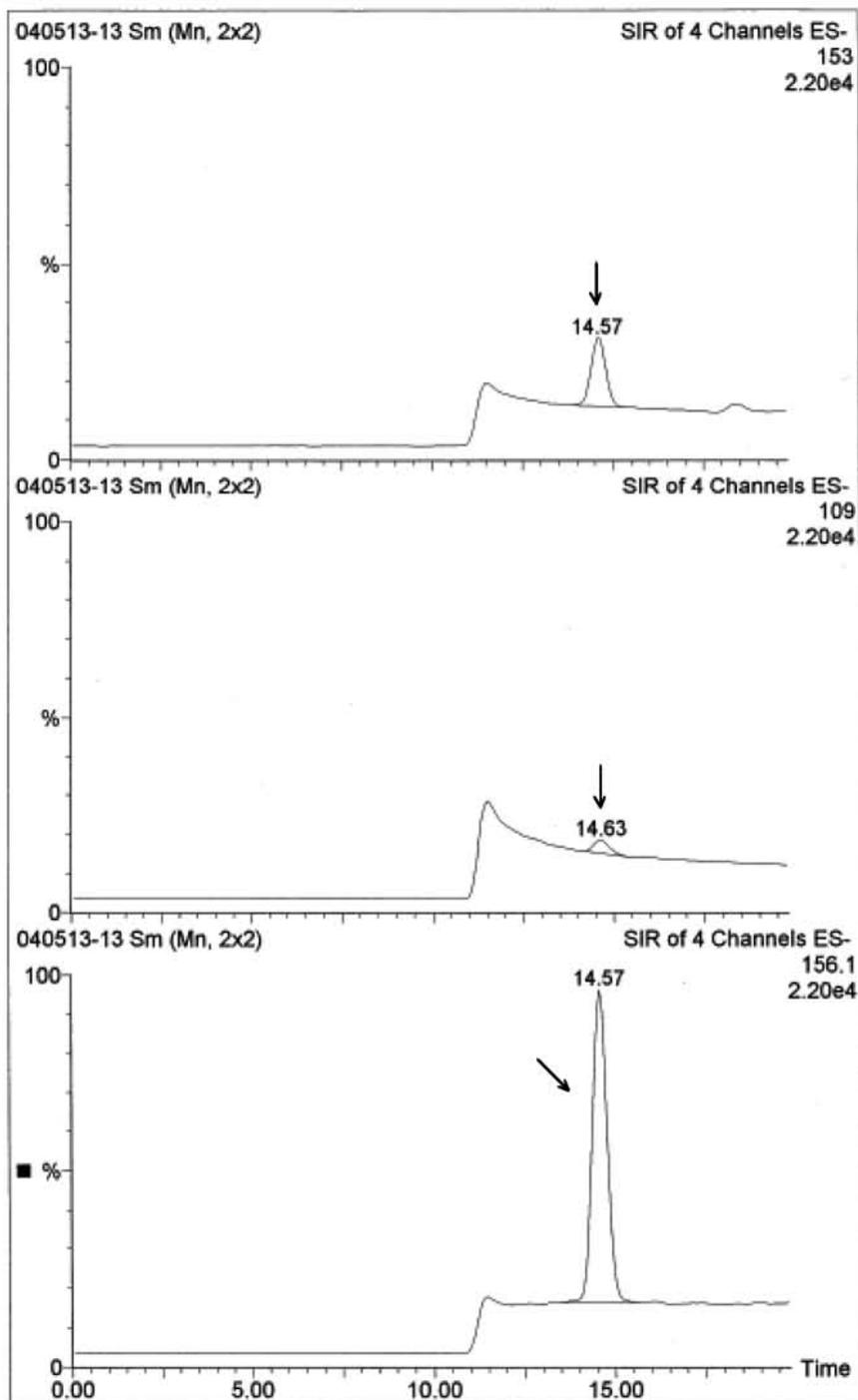


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-19 添加回収試験(試料3:添加濃度0.019  $\mu\text{g/g}$ )の  
マスフラグメントグラム例

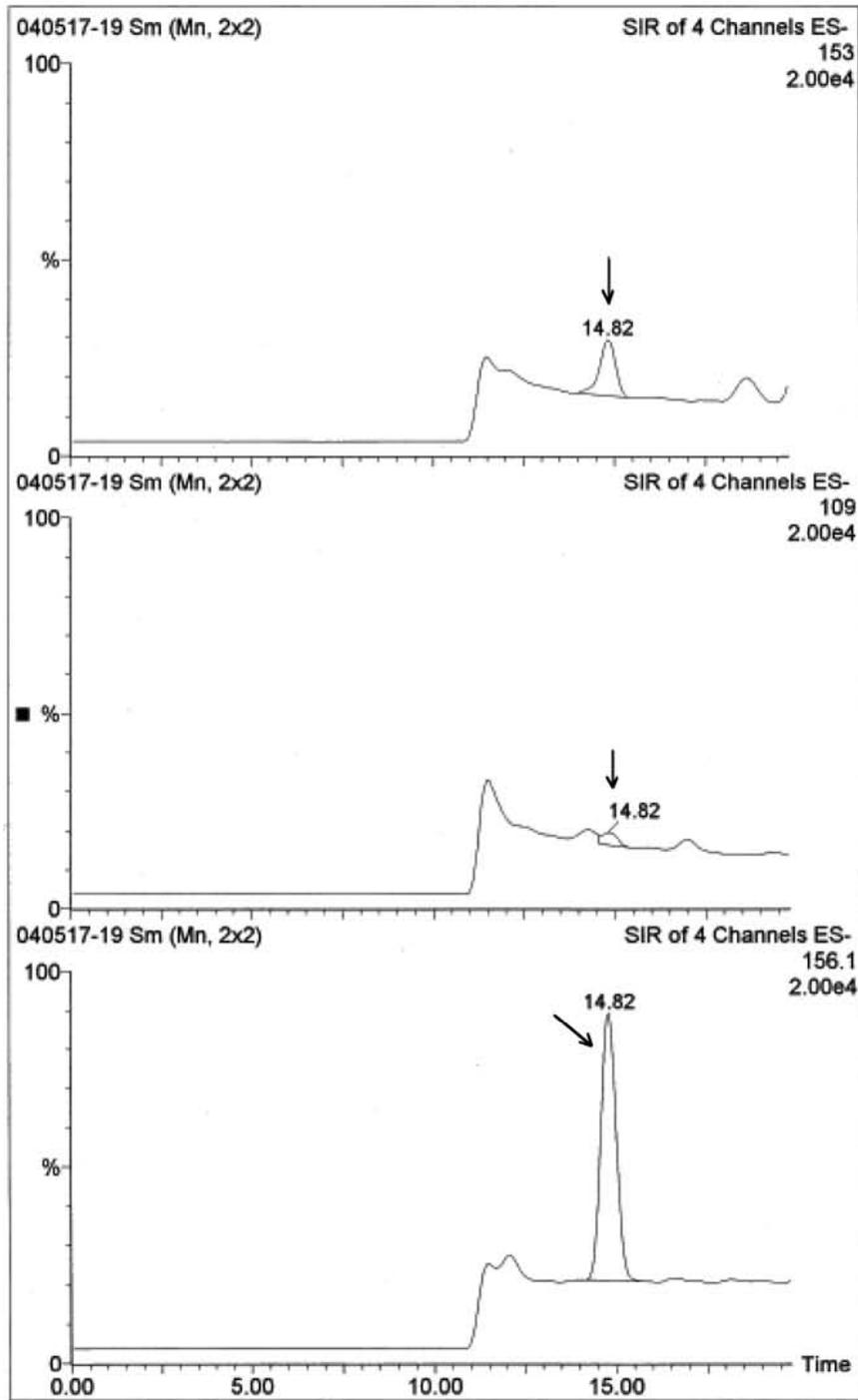


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-20 添加回収試験(試料17添加濃度0.019  $\mu\text{g/g}$ )の  
マスフラグメントグラム例

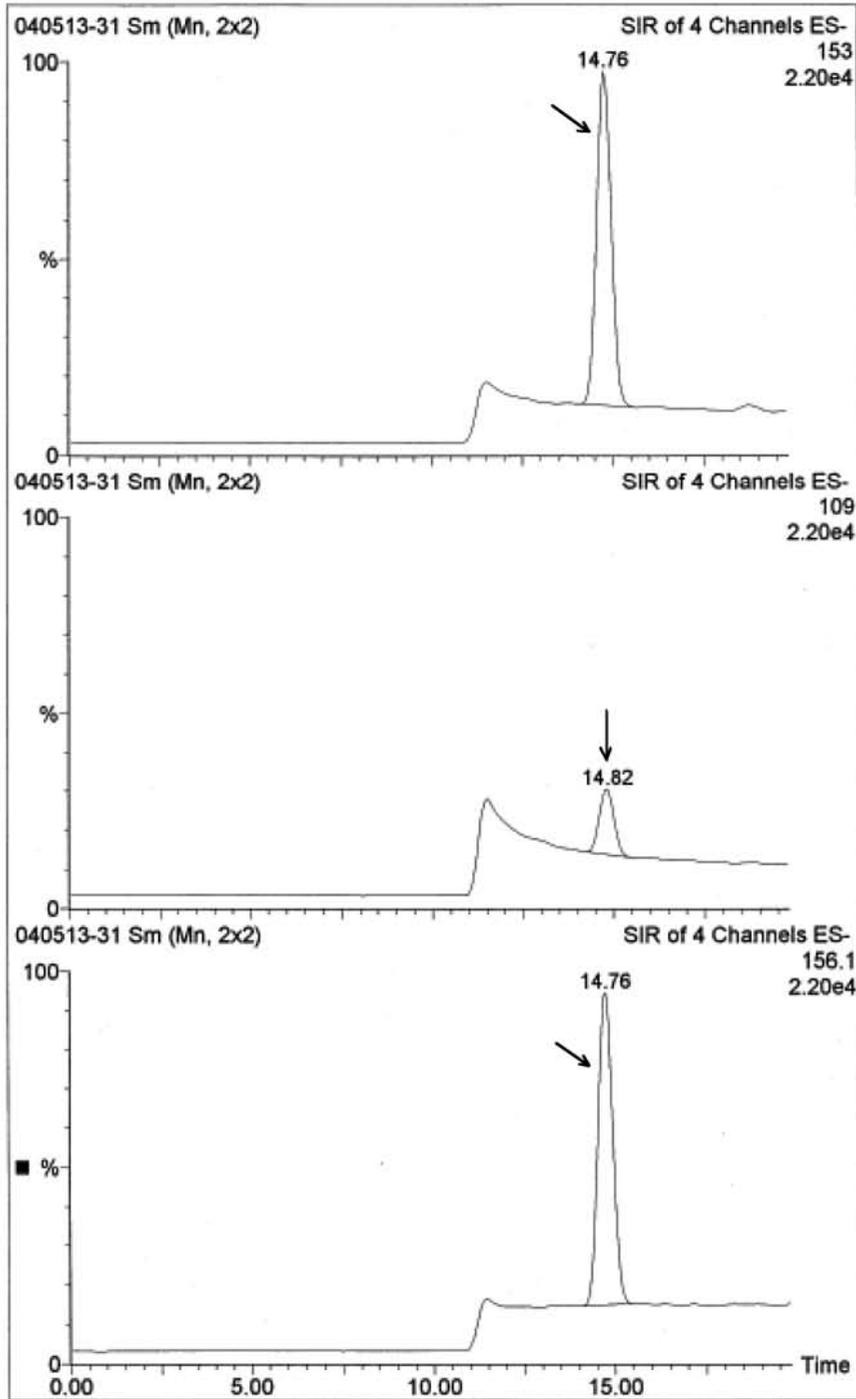


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-21 添加回収試験 (試料29 : 添加濃度 0.019  $\mu\text{g/g}$ ) の  
マスフラグメントグラム例

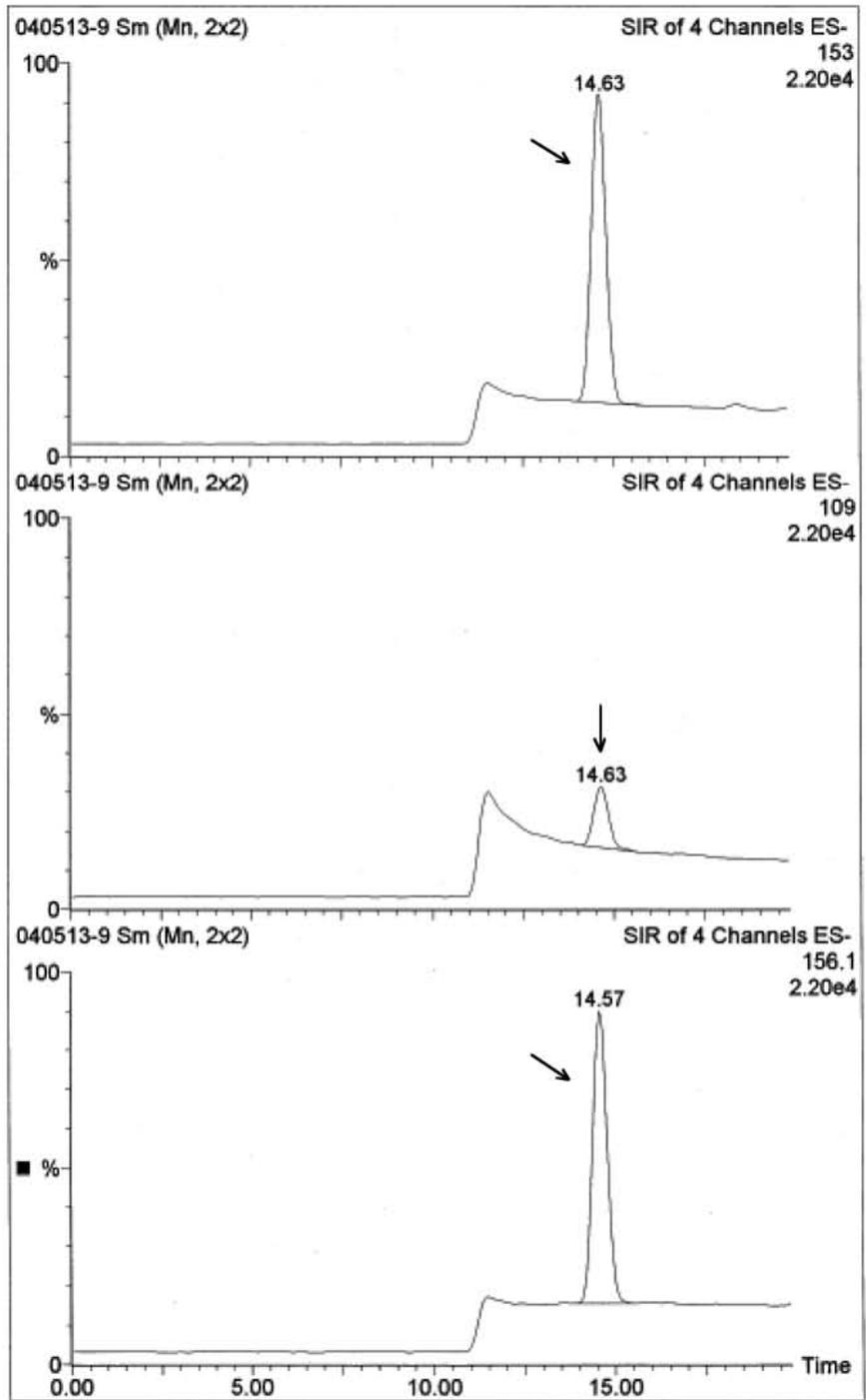


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-22 添加回収試験(試料3: 添加濃度0.093 μg/g)の  
マスフラグメントグラム例

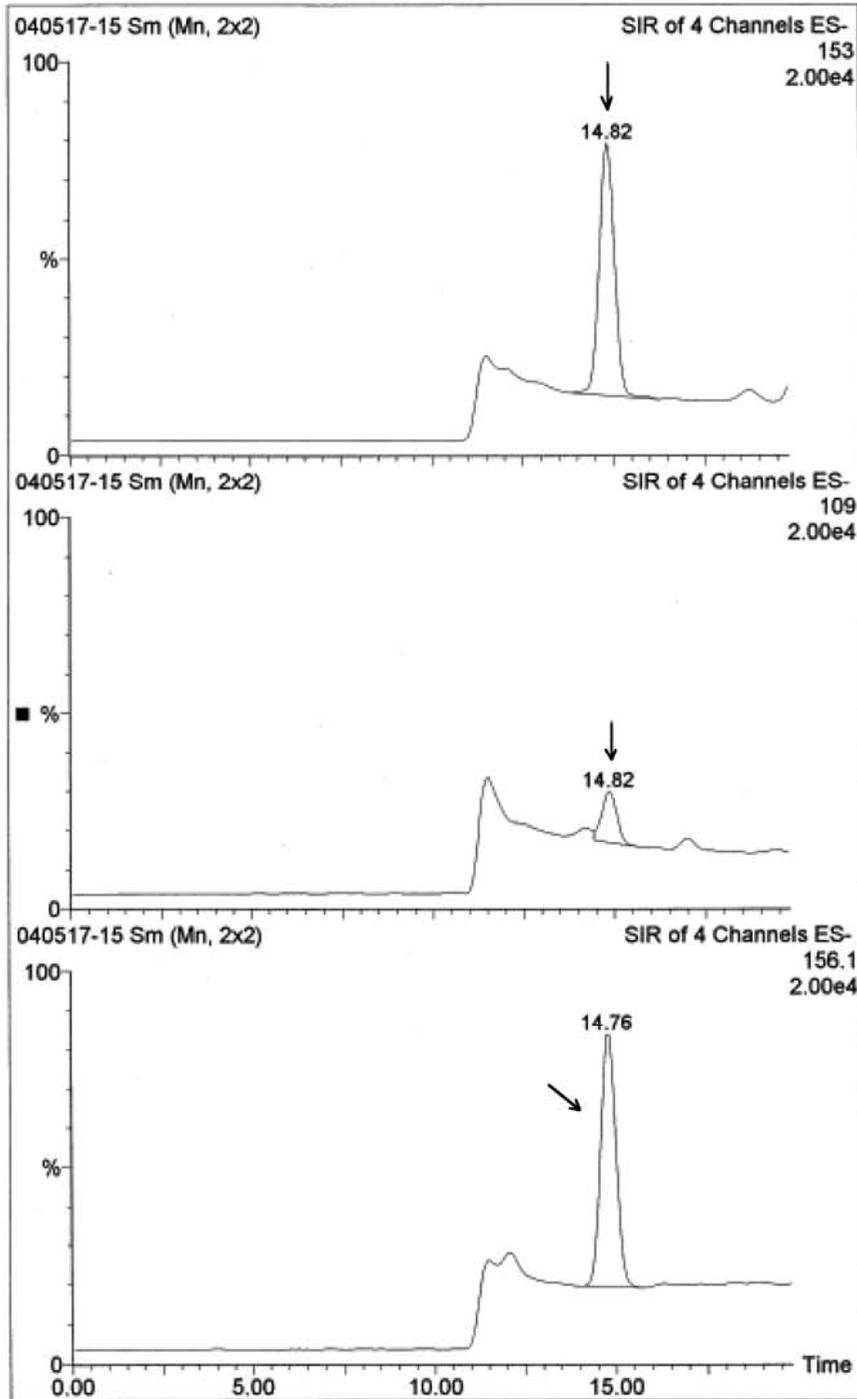


m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-23 添加回収試験(試料17: 添加濃度0.093 μg/g)の  
マスフラグメントグラム例



m/z 153.0

m/z 109.0

m/z 156.1  
(内標準物質)

図-24添加回収試験(試料17: 添加濃度0.093 μg/g)の  
マスフラグメントグラム例

以 上