

リンゴジュースおよびサイダー中の天然パツリンの GC/MS 分析

アプリケーションノート

食品試験・農業

著者

Pat Sasso
Agilent Technologies, Inc.

要約

リンゴの栽培期間が伸び、リンゴおよびリンゴ濃縮果汁の輸出が増えるにつれて、汚染された製品を消費する懸念が高まっています。パツリンは、リンゴの腐敗に伴い生成されるマイコトキシン (カビ毒) です。Agilent ウルトライナートカラムを用いて、誘導体化をおこなわずに、この物質をモニタリングしました。クロマトグラフィにより、5-ヒドロキシメチルフルフラール (HMF) を分離しました。この物質は、リンゴ製品を過度に加熱した場合に、糖から生成されます。サンプル前処理にあたっては、ポリスチレンジビニルベンゼン SPE カートリッジを用いた固相抽出に続いて、酢酸エチル中で液液抽出をおこなってから、GC/MS システムに注入しました。



Agilent Technologies

はじめに

リンゴサイダーおよびリンゴジュースは、世界で消費されている果実飲料のトップ 10 に数えられます。リンゴおよびリンゴ由来製品の生産量が多い上位 3 か国は、中国、米国、ポーランドです。いずれの国にも、さまざまなリンゴ品種の栽培に適した気候条件の地域があります。一般消費者向けのリンゴジュースは、高品質の香りや消費期限を得るために、ろ過、低温殺菌、真空パックにより処理されます。アオカビが生成するマイコトキシン的一种であるパツリンは、ほぼ完全に除去され、包装製品中の濃度が 10 ng/g 未満に規制されています [1]。ジュース製造中のパツリン測定には、HPLC/UV、GC、GC/MS などの多くのテクニックが用いられています。誘導體化がおこなわれる場合も、おこなわれない場合もあります [2,3]。いずれのテクニックも信頼性が高く、費用もそれほどかかりませんが、逆相 HPLC では、パツリンと HMF の分離が困難になることがあります。しかし、不安がある場合には、LC/MS/MS を用いた確認を実施することができます [4]。フレッシュサイダーの製造では、処理過程でフルーツペクチンが添加されることがあります。フルーツペクチンには血清コレステロールを下げる効果があるとされるため、健康上の効果を高めることができます。しかし、こうした処理を加えると、消費期限が大幅に短くなり、パツリンが発生する可能性が高くなります [5]。

材料とメソッド

この研究では、Agilent 7890A GC と、不活性 EI 350 °C ノンコーディングイオン源を搭載した Agilent 5975C 質量分析計を組み合わせて使用しました。Agilent J&W DB-35ms UI カラムをコールドスプリットレスモードのマルチモード注入口 (MMI) に設置し、最適なサンプル注入を実現しました。パツリンと HMF は、濃度 100 µg/mL (パツリン) および純形態 (HMF) として、Sigma-Aldrich Corp から入手しました。

分析条件

GC

カラム:	Agilent J&W DB-35ms UI, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm (p/n 122-3832UI)
サンプル前処理:	Agilent Bond Elut LMS, 1 g, 6 mL, 30/pk (p/n 12255022)
サンプル:	ジュースまたはサイダー 10 g
キャリア:	MSD ヘリウム, 1 mL/min 定流量
オープン:	50 °C (5 分維持), 40 °C/min で 50~300 °C (8.75 分維持)
注入:	コールドスプリットレス, 67 °C (0.1 分維持), 720 °C/min で 67~160 °C, 1 分でスプリットベント (30 mL/min), 3 分でガスセーバーオン (20 mL/min)
MSD トランスファーライン	
aux 温度:	300 °C
GC:	Agilent 7890A GC
サンブラ:	Agilent 7693 オートサンブラ, 注入量 1 µL

MS

MS:	Agilent 5975C シリーズ MSD, イナート EI 350 イオン源, トリプルアクシス検出器搭載
溶媒待ち時間:	6 分
MS 温度:	300 °C (イオン源), 150 °C (四重極)
SIM モード:	質量 55.00, 97.00*, 110.00*, 126.00, それぞれドウェル 100 ms (*定量イオン)

消耗品 (特に記載のない場合はアジレント製)

乾燥チューブ:	Pyrex 遠心分離管, 円錐形, スクリューキャップつき, 15 mL, 目盛りつき (Sigma-Aldrich Corp., カタログ番号 CLS808215-12EA)
バイアル:	茶色スクリューバイアル (p/n 5182-0716)
キャップ:	青色スクリューキャップ (p/n 5282-0723)
注入口ライナ:	ウルトライナートスプリットレスシングルテーパライナ (p/n 5190-3162)

標準試料

直線性および検出下限を検証するために、酢酸エチル中で濃度 10~1,000 ng/g のパツリンおよび HMF 混合標準試料を作成しました。リンゴジュースおよびサイダーを購入し、常時冷蔵庫で保管しました。初期検査後、希釈溶媒としてブランク抽出液を用いて、マトリックス適合させたキャリブレーション溶液群を作成することも可能です。

サンプル前処理

1. ジュースまたはサイダー 10 g (10 mL) を計量し、きれいな容器に移します。
2. サンプルを濃度 10 ng/g (10 ppb) で添加し、ジュースから適切な回収率が得られることを確認します。
3. MeOH 4 mL、次いで脱イオン HPLC グレード水 4 mL で SPE チューブをコンディショニングします。
4. コンディショニング済みの SPE カートリッジに、サンプル 10 mL を重力によりロードします (サイダーの場合、透明度によっては若干の吸引が必要)。
5. 1% 重炭酸ナトリウム水 8 mL により、重力を利用して洗浄します。
6. 1% 酢酸水 8 mL により、重力を利用して洗浄します。
7. 排液チューブをコレクションチューブに置き換えます。
8. HPLC グレードメタノール 8 mL により、重力を利用して溶出します。
9. 温かい水槽中で溶出液を乾燥させてメタノールを除去します。これにより、およそ 4 mL の水溶液が得られます。
10. 3 ポーションの酢酸エチル 3 mL により、溶出液の液液抽出をおこない、抽出液を円錐形チューブにまとめ、乾燥させます。
11. 酢酸エチル抽出液を乾燥させて体積を 1 mL とし、オートサンブラバイアルに移して注入します。

結果と考察

図1は、HMFおよびパツリンの10 ng/g 混合物のスクアンモード分析結果を示しています。ピーク形状とマトリックスの分離は満足いくレベルでした。

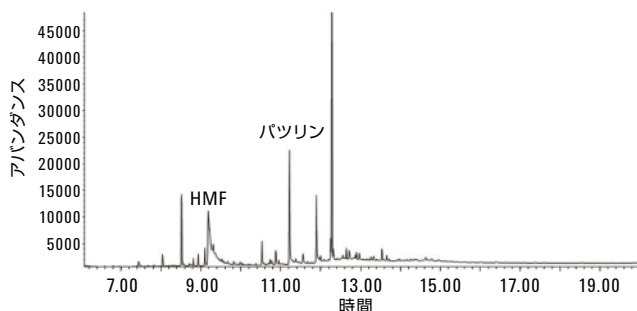


図1. HMF およびパツリンの10 ng/g 混合物のスクアンモード分析。良好なピーク形状が得られ、マトリックス成分から十分に分離されています。

添加サンプルの回収率は90%以上でした。このことから、Bond Elut LMS SPEは、低濃度分離に使用できることが実証されています。抽出手順により、ジュース中に濃度10%で存在する糖を除去しました。糖が存在すると、短期間でのインジェクタの故障につながり、注入口メンテナンスの頻度が高くなります。また、高濃度のビタミンCも除去しました。ビタミンCはHMFの近くで共溶出するため、ピーク積分が困難になります。ポリフェノールなどの多数の高沸点物質も、同時に抽出しました。こうした成分は注入口に蓄積しますが、許容可能な範囲内の最高温度で定期的にベイクアウトを実施すれば、除去することができます。このテクニックでは、ベンズアルデヒドの分離が可能です。ベンズアルデヒドは、リンゴの劣化の目印となる化合物です。ある程度のテーリングは見られましたが、MMIにより、クールオンカラムに匹敵する左右対称のピークが得られました。

結論

Agilent J&W DB-35ms ウルトライナートカラムを用いて、パツリンと5-ヒドロキシメチルフルフラールを良好に分離することができました。分析に先立ち、Bond Elut LMS カートリッジと液液抽出によるサンプル前処理をおこないました。サンプル量が多くなる場合は、さらなる精製をおこない、抽出手順を自動化すれば、時間的効率が向上するものと見込まれます。

参考文献

1. M. Llovera. *J. Food Prot.* **62**, 202 (1999).
2. M. W. Trucksess. *J. AOAC Int.* **82**, 1109 (1999).
3. A. Moukasa. *J. Food Chem.* **109**, 860 (2008).
4. H. B. Christensen. *Food Addit. Contam. A.* **26**, 1013 (2009).
5. K. Harris. *J. Food Prot.* **72**, 1255 (2009).

詳細

本書に記載されたデータは典型的な結果です。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Printed in Japan

July 12, 2013

5991-2799JAJP



Agilent Technologies