固相抽出法—HPLC, GC 及び GC/MS を用いたワイン中 メチルイソチオシアネートの定量法

(平成4年7月10日受理)

寺田久屋* 永井祐治* 宮部正樹*

Determination of Methyl Isothiocyanate in Wine by Using Solid Phase Extraction/HPLC, GC and GC/MS

Hisaya TERADA, Yuji NAGAI and Masaki MIYABE

(Nagoya City Public Health Research Institute: 1-11, Hagiya-cho,
Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan)

A rapid analytical method of methyl isothiocyanate (MITC) in wine by combining a simple pretreatment with the use of solid-phase extraction was developed.

The sample was directly poured into a BAKERBOND spe C₁₈ cartridge and eluted with 30% aqueous methanol. The eluate was subjected to HPLC and chromatographed on a Capcell Pak C₁₈-SG120 column with a mobile phase of acetonitrile-water-0.2 M phosphate buffer pH 4.0 (15:23:2). The detection was achieved with a UV monitor set at 200 nm. In addition, the remainder of the eluate was extracted with ethyl acetate and subjected to GC using a semiwide capillary column DB-WAX and a flame photometric detector equipped with an S-filter.

The recoveries from red and white wine fortified with MITC at levels of 0.05 µg/ml and 0.5 µg/ml were 88.4% and 94.2% by the HPLC method and 89.2% and 95.4% by the GC method, respectively. The detection limit was 0.02 µg/g by both methods.

Forty samples of commercial Italian wine were analyzed by the proposed methods. MITC was detected in one of the white wines at a level of 0.24 µg/g by both methods. The MITC peak was confirmed by GC/MS.

(Received July 10, 1992)

Key words: ワイン wine; メチルイソチオシアネート methyl isothiocyanate; 固相抽出法 solid phase extraction; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; ガスクロマトグラフィー gas chromatography

緒 言

近年、食生活のグルメ傾向に加えて貿易が自由化され、日常の食卓にも海外で製造、加工された輸入食品が並ぶ機会が多くなってきた。このような傾向に伴い、輸入食品に関わる食品衛生上のトラブルも増加している。

ところで、メチルイソチオシアネート (MITC) は、土壌くん蒸などに用いられる農薬であるが¹⁾、平成4年4月、厚生省より MITC を発酵調整の目的で添加したイタリア産ワインが輸入されているという通知があり、早急に残留調査をする必要に迫られた。

MITC の分析法としては、農産物を Dean-Stark 装置

を用いて蒸留抽出し、ガスクロマトグラフィー (GC) により定量する方法²⁾、湖水及び未処理下水を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で直接定量する方法³⁾が報告されているが、ワイン中からの定量法については報告されていない。厚生省は、ワインを酢酸エチルで直接抽出し、GC で定量する方法を急きょ示したが、抽出段階でエマルジョンを生じやすいうえ、精製過程が無いと GC の検出器が汚れ、迅速な分析が困難であった。そこで、著者らは固相抽出法により MITC を抽出精製し、溶出液を直接 HPLC で定量する方法を検討した。さらに、GC 及び GC/MS を利用した定量及び確認方法を検討したので報告する。

* 名古屋市衛生研究所: 〒467 名古屋市瑞穂区荻山町 1-11

実験方法

1. 試料

平成4年4月に名古屋市内で販売されていたイタリア産ワインを用いた。

2. 試薬

1) MITC 標準溶液: MITC (和光純薬工業(株)製) 100 mg をメタノールに溶解して 100 ml とし、これを標準原液とした (1,000 $\mu\text{g/ml}$)。

2) 0.2 M リン酸緩衝液: 0.2 M リン酸—カリウム溶液に 0.2 M リン酸を加えて pH 4.0 に調整した。

3) BAKERBOND spe C₁₈ (J. T. Baker 社製): カラム容量 3 ml、充てん剤量 500 mg のサイズのものを使用前に水 20 ml、メタノール 20 ml、水 20 ml の順で洗浄後使用した。

その他の試薬類は、すべて特級あるいは HPLC 用を用いた。

3. 装置

1) HPLC 装置: 日本分光工業(株)製 Twinkle 型ポンプ、日本分光工業(株)製 870UV 型紫外可視分光検出器、レオダイン社製 7125 型インジェクター (100 μl ループ装着)、(株)島津製作所製クロマトパック CR4A 型データ処理装置

2) GC 装置: (株)島津製作所製 GC14A 型 GC (FPD 検出器 (S フィルター付))、同クロマトパック CR4A 型データ処理装置

3) GC/MS 装置: 日本電子(株)製 JMS-DX300 型 GC/MS、同 JMS-DA5000 型データシステム

4) その他: (株)島津製作所製 UV-2200 型自記分光光度計

4. HPLC 条件

カラム: Capcell Pak C₁₈-SG120 (5 μm) ((株)資生堂製) 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm、移動相: アセトニトリル—水—0.2 M リン酸緩衝液 pH 4.0 (15:23:2)、カラム温度: 30°, 流速: 0.8 ml/min、検出波長: 200 nm、試験溶液注入量: 100 μl

5. GC 条件

カラム: DB-WAX (J & W Scientific Inc.) 0.32 mm i.d. $\times$ 30 m 膜厚 0.25 μm 、キャリアーガス: ヘリウム 3 ml/min、メイクアップガス: ヘリウム 40 ml/min、フレイムガス: 水素 50 ml/min、空気 50 ml/min、カラム温度: 60° (1 min) — 5°/min — 80° — 10°/min — 200° (8 min)、注入口温度: 250°, 検出器温度: 250°, 試験溶液注入量: 2 μl (スプリットレス)

6. GC/MS 条件

カラム: DB-WAX (J & W Scientific, Inc.) 0.25 mm i.d. $\times$ 30 m 膜厚 0.25 μm 、キャリアーガス: ヘリウム 3 ml/min、メイクアップガス: ヘリウム 40 ml/min、カラム温度: 35° (1 min) — 8°/min — 70° — 5°/min — 150° (8 min)、注入口温度: 200°, セパレータ温度:

180°, イオン化電圧: 70 eV、加速電圧: 3 kV、イオン化モード: EI

7. 試験溶液の調整

1) HPLC 用試験溶液: ワイン 4 ml をひょう量し、BAKERBOND spe C₁₈ に負荷し、毎分 1 ml の速度で通過させた。続いて、30% メタノール 6.0 ml を正確に加え、溶出液を捕集した。この溶液を試験溶液とし HPLC 分析に供した。

2) GC 用試験溶液: HPLC 用試験溶液 5.0 ml を塩化ナトリウム 1 g を加えた試験管に取り、酢酸エチル 1.0 ml を加え激しく振り混ぜた。上層に分離した酢酸エチルをスクリュウキャップ付きの試験管に取り、これを試験溶液とし GC 分析に供した。

3) GC/MS 用試験溶液: HPLC 用試験溶液を調製し (試験溶液中の MITC の濃度が低く GC/MS に対して十分な感度が得られない場合は、複数の HPLC 用試験溶液を調製して混合した)、5 ml あたり塩化ナトリウム 1 g を加え、1~2 ml のジクロロメタンを加え激しく振り混ぜた。水層をビペットで取り除き、ジクロロメタン層を試験溶液とした。

8. 検量線の作成

1) HPLC 用検量線: MITC の標準原液を 0.01~1.0 $\mu\text{g/ml}$ の範囲に 30% メタノールで希釈し、その 100 μl を高速液体クロマトグラフに注入しピーク高さによる絶対検量線法により検量線を作成した。

2) GC 用検量線: HPLC 用検量線用の試験溶液 5 ml を塩化ナトリウム 1 g を加えた試験管に取り、GC 用試験溶液の調製と同様に操作し、その 2 μl をガスクロマトグラフに注入しピーク高さによる絶対検量線法により検量線を作成した。

9. 定量計算

検量線から求められた濃度から次の計算式によりワイン中の定量値を算出した。

ワイン中 MITC 濃度 ($\mu\text{g/g}$) = 検量線から求められた濃度 ($\mu\text{g/ml}$) $\times$ 6 $\div$ 試料の重量 (g)

結果及び考察

1. 固相抽出カラムによる前処理条件の検討

MITC は Fig. 1 に示す構造の物質で、蒸気圧が 35° で 41.4 mmHg と高く、有機溶媒で抽出し、減圧濃縮する方法を採ることができない。そのため、環境庁告示の残留農薬分析法では Dean-Stark 装置を使った蒸留抽出法を採用している²⁾。しかしながら、この方法は装置が複雑で抽出に長時間を要するうえ、ワインに適用した場合、エタノールによる影響のためか 60% 程度の回収率しか

mw = 73. 12

Fig. 1. Structural formula of MITC

得られなかった。

一方、固相抽出法は有機溶媒抽出に代わる手段として HPLC や GC を用いた定量法の前処理に利用されており、逆相、順相あるいはイオン交換用など多種類の固相抽出用カラムが市販されている。この抽出方法は、ミニカラムにより目的物質を吸着抽出するため、操作が簡便であり、溶出溶媒を選択することでクリーンアップ効果も得られる。そこで、固相抽出法を利用した抽出及びクリーンアップ法を試みた。オクタデシルシラン系 6 種類 (Sep Pak C₁₈, Sep Pak C₁₈ plus, Sep Pak C₁₈ ENV, Bond Elute C₁₈, ACCUBOND ODS, BAKERBOND spe C₁₈) とオクチルシラン系 1 種類 (Bond Elute C₈) 及びフェニルシラン系 1 種類 (BAKERBOND spe phenyl) のいずれも逆相用固相抽出カラムに、1 µg/ml の MITC を添加した白ワインを加え、1 ml ずつ分画し、HPLC により漏出した MITC を測定した。この結果、Fig. 2 に示したように BAKERBOND spe C₁₈ が 5 ml まで、Sep Pak C₁₈ ENV が 6 ml まで、MITC の固相抽出カラムから漏出がなく試料を負荷できることが判明した。

使用する固相抽出カラムには、負荷できる試料量が大きく、少量の溶出溶媒で MITC が回収率良く溶出するものが望ましい。Fig. 3 は、試料の負荷容量が大きかった BAKERBOND spe C₁₈ と Sep Pak C₁₈ ENV に、上記の MITC 添加ワイン 4 ml を負荷し、0~50% メタノール 6 ml で溶出した場合の MITC 回収率を比較したものである。BAKERBOND spe C₁₈ は Sep Pak C₁₈ ENV に比べ、いずれの濃度においても高い回収率を示し、30% メ

Fig. 2. Relationship between the sample volume and the concentration of leaked MITC on 8 kinds of solid phase extraction column

Sample: 1.0 µg/ml of MITC in white wine

●: Sep Pak C₁₈; ○: Sep Pak C₁₈ plus; ◎: BAKERBOND spe phenyl (3 ml, 500 mg); △: Bond Elute C₈ (3 ml, 500 mg); ▲: Bond Elute C₁₈ (3 ml, 500 mg); □: ACCUBOND ODS (3 ml, 500 mg); ●: BAKERBOND spe C₁₈ (3 ml, 500 mg); ○: Sep Pak C₁₈ ENV

タノールで 90% 以上の回収率が得られた。一方、メタノール濃度が 40% 以上では、いずれのカラムとも夾雑成分の溶出が急増した。これらの結果より、固相抽出カラムには BAKERBOND spe C₁₈ を採用し、溶出溶媒は 30% メタノールに決定した。

BAKERBOND spe C₁₈ は、あらかじめ水、メタノール及び水の順で各 20 ml を流し、洗浄を行った後使用した。MITC は水だけでも一部分が溶出されるため (Fig. 3), 試料を負荷した後の固相抽出カラムの洗浄操作は行わなかった。試料の負荷量は、Fig. 2 に示した結果から 5 ml まで可能であったが、MITC の保持がより完全な 4 ml とした。

MITC 添加ワインの溶出挙動を Fig. 4 に示した。MITC は、6 ml までに溶出し、それ以上のフラクションには検出されなかった。そこで、溶出量を 6 ml とした。

2. HPLC 条件の検討

MITC が逆相系の固相抽出カラムに保持されることに

Fig. 3. Relationship between the concentration of methanol in eluting solution and the recovery of MITC from BAKERBOND spe C₁₈ or Sep Pak C₁₈ ENV

Sample: 1.0 µg/ml of MITC in white wine 4 ml

●: BAKERBOND spe C₁₈ (3 ml, 500 mg); ○: Sep Pak C₁₈ ENV

Fig. 4. Elution pattern of MITC from BAKERBOND spe C₁₈

Sample: 1.0 µg/ml of MITC in white wine 4 ml

Eluting solvent: 30% aq. methanol; ●: integrated value of recovery

Fig. 5. UV absorption spectrum of MITC in the mobile phase of HPLC

Sample: 5.0 $\mu\text{g/ml}$ of MITC in mixture of acetonitrile–water–0.2 M phosphate buffer pH 4.0 (15 : 23 : 2)

Fig. 6. Typical high performance liquid chromatogram of MITC

Sample: 0.05 $\mu\text{g/ml}$ of MITC in 30% aq. methanol

Operating conditions: column; Capcell Pak C₁₈ SG120 (5 μm) 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, mobile phase; acetonitrile–water–0.2 M phosphate buffer pH 4.0 (15 : 23 : 2), column temperature; 30°C, flow rate; 0.8 ml/min, detector; UV photometer (200 nm), injection volume; 100 μl

Fig. 7. Typical gas chromatogram of MITC

Sample: ethyl acetate extract of 30% aq. methanol containing 0.05 $\mu\text{g/ml}$ of MITC

Operating conditions: column; DB-WAX 0.32 mm $\times$ 30 m, column temperature; 60°C (1 min) -5°C/min -80°C -10°C/min -200°C (8 min), inject temperature; 250°C, detector temperature; 250°C, detector; FPD (S), carrier gas; He 3 ml/min, makeup gas; He 40 ml/min, flame gas; H₂ 50 ml/min and air 50 ml/min, injection method; splitless, injection volume; 2 μl

Table 1. Recoveries of MITC from Wine

Sample	Added ($\mu\text{g/ml}$)	HPLC		GC	
		Rv. (%)*	C.V. (%)	Rv. (%)*	C.V. (%)
White wine	0.5	94.2	3.4	94.5	2.1
Red wine	0.05	88.4	2.5	89.2	3.4

* Average recovery of 5 determinations

Fig. 8. High performance liquid chromatograms obtained from red and white wine extract
 Sample: (A) red wine blank; (B) red wine spiked with 0.05 $\mu\text{g/ml}$ of MITC; (C) white wine blank; (D) white wine spiked with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of MITC
 Operating conditions: see Fig. 6.

注目して、HPLCの分析カラムには、逆相系の Capcell Pak C_{18} -SG120を用いた。移動相溶媒には、ワイン中の夾雑成分との分離が良好なアセトニトリル-水-0.2 M リン酸緩衝液 pH 4.0 (15:23:2) の混合溶媒を選定した。検出には、MITCが紫外部に吸収を有することから UV 検出器を用いた。移動相溶媒中における極大吸収波長は、Fig. 5 に示すように 193 nm 及び 236 nm に認められたが、236 nm の吸光度は 193 nm の約 1/18 と低く、この波長を測定波長とした場合、厚生省法に示された定量限界の 0.02 $\mu\text{g/g}$ を達成することが困難であった。そこで、今回用いた UV 検出器で使用することができた最低波長である 200 nm を測定波長とした。200 nm 付近の波長は、試料注入時のショックによるゴーストピークを生じやすいうえ、選択性の点でも不利な波長であるが、236 nm に比べて約 8 倍の感度が得られ、定量限界の 0.02 $\mu\text{g/g}$ を十分満足することができた。以上の検討の結果得られた条件における標準品のクロマトグラムを Fig. 6 に示した。

3. GC による定量法の検討

本法の固相抽出カラムによる前処理法は、GC による定量法の前処理法としても活用できる方法であると考え、GC を利用した定量法についても併せて検討した。

固相抽出カラムによって得られた試験溶液は、30% メタノール溶液であるため直接 GC に供することはできない。試験溶液に食塩を加えた後、ヘキサン、酢酸エチル及びジクロロメタンを用いて抽出性及び操作性を比較したところ、酢酸エチルが少量で定量的に MITC を抽出し、抽出液が上層になり水相との分離も容易であった。そこで、HPLC 用の試験溶液 5 ml に、食塩 1 g を加え酢酸エチル 1 ml で抽出したものを GC 用試験溶液とした。

GC の分析カラムには、MITC が極性物質であることから強極性の DB-WAX を採用した。検出は、MITC のイオウ (S) に注目し、FPD の S モードを用いた。

定量は、抽出溶媒である酢酸エチルの一部が水相に溶解するため、検量線の作成についても HPLC の検量線用試験溶液を同様に抽出したのを用いた。Fig. 7 に検

Fig. 9. Gas chromatograms obtained from red and white wine extract
 Sample: (A) red wine blank; (B) red wine spiked with 0.05 $\mu\text{g/ml}$ of MITC; (C) white wine blank; (D) white wine spiked with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of MITC
 Operating conditions: see Fig. 7.

Fig. 10. Chromatograms obtained by HPLC and GC from the MITC contaminated white wine

Operating conditions: see Figs. 6 and 7

量線で 0.05 $\mu\text{g/ml}$ に相当する標準品のクロマトグラムを示した。

4. 検量線

実験方法で示した方法に従い作成した検量線は、HPLC 用検量線については 0.01~1.0 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で原点を通る直線性を示し、GC 用検量線については 0.01~1.0 $\mu\text{g/ml}$ の範囲でピーク高の対数との間に直線関係が認められた。

5. 添加回収実験

MITC を含有しない赤ワインに 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、白ワインに 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 標準品を添加し、HPLC 及び GC によって定量した添加回収実験の結果を Table 1 に示した。この実験に使用した赤ワインは、HPLC において夾雑物質のピークが最も多く認められた試料であったが、GC と同様に良好な回収率及び変動係数が得られた。Fig. 8 及び Fig. 9 に、赤ワイン及び白ワイン抽出物の HPLC 及び GC のクロマトグラムを示した。

6. 定量限界

本法の定量限界は、HPLC、GC のいずれについても 0.02 $\mu\text{g/g}$ であった。

7. 輸入ワインの測定結果

名古屋市内で販売されていたイタリア産ワイン 40 検体 (白: 37 検体, 赤: 2 検体, ロゼ: 1 検体) について本法を用いて定量を行った。結果は、白ワイン 1 検体より MITC を検出し、HPLC 及び GC のいずれの方法とも

Fig. 11. Mass spectrum obtained from the MITC contaminated white wine

Operating conditions: column; DB-WAX 0.25 mm×30 m, column temperature; 35°C (1 min) -8°C/min -70°C -5°C/min -150°C (8 min), inject temperature; 200°C, carrier gas; He 3 ml/min, makeup gas; He 40 ml/min, separator temperature; 180°C, accelerating voltage; 3 kV, electron energy; 70 eV, ionization method; EI

定量値は0.24 µg/gであった。MITCを検出したワインのHPLC及びGCによるクロマトグラムをFig. 10に示した。

8. GC/MSによる確認

HPLC及びGCでMITCを検出した白ワインについてGC/MSによる確認を行った。GC測定で抽出溶媒に用いた酢酸エチルは、メチル基が脱落した m/z 73のフラグメントイオンがMITCの分子イオンピークと重なり妨害となるためジクロロメタンを抽出溶媒に用いた。GC/MSにおけるMITCの感度が低いため、スペクトルの測定には10 µg/ml以上の濃度の検液が必要であった。そこで、10回分のHPLC用試験溶液を調製して混合したものを、少量の溶媒で抽出し検液とした。測定の結果得られたスペクトルをFig. 11に示した。分子イオンピークの m/z 73及びイオウ化合物に特徴的な $M+2$ の75のピークが認められ、その他のフラグメントイオンのピークも標準品のスペクトルと一致したことから

MITCと確認した。

まとめ

前処理法に固相抽出法を利用したワイン中のMITCのHPLC及びGCによる定量及びGC/MSによる確認法を検討し、イタリア産輸入ワインの調査に応用した。その結果、40検体中白ワイン1検体より0.24 µg/gのMITCを検出し、GC/MSで確認した。

本分析法は、簡便で迅速性に優れており日常分析に十分活用できる定量法である。

文献

- 1) Giesselmann, G., Huthmacher, K., Klenk H., Romanowski, F.: *Chemiker-Zeitung* **114**, 215~224 (1990).
- 2) 農業環境保全対策研究会編: "農業登録保留基準ハンドブック—作物残留の分析法—" p.454~456 (1990), 化学工業日報社.
- 3) Mullins, F. G. P., Kirkbright, G. F.: *Analyst* **112**, 701~703 (1987).