GC 及び GC/MS によるワイン中のメチル イソチオシアネートの分析法

(平成 4 年 7 月 16 日受理)

内山 貞夫 ^{*1,*2}	武田 寿 ^{*2}	小林 昭彦 ^{*2}
伊藤 澄夫 ^{*2}	桜井 裕之 ^{*2}	多田 善彦 ^{*2}
青木 岳 ^{*2}	細貝 猛 ^{*2}	山中 崇彰 ^{*2}
前川 吉明 ^{*3}	吉川 礼次 ^{*4}	伊藤 一夫 ^{*4}
斎藤 行生 ^{*1}		

Determination of Methyl Isothiocyanate in Wine by GC and GC/MS

Sadao UCHIYAMA^{*1,*2}, Hisashi TAKEDA^{*2}, Akihiko KOBAYASHI^{*2}, Sumio ITO^{*2},
Hiroyuki SAKURAI^{*2}, Yoshihiko TADA^{*2}, Gaku AOKI^{*2}, Takashi HOSOGAI^{*2},
Takaaki YAMANAKA^{*2}, Yoshiaki MAEKAWA^{*3}, Reiji YOSHIKAWA^{*4},
Kazuo ITO^{*4} and Yukio SAITO^{*1}

(*¹National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan;

*²Center for Inspection of Imported Foods and Infectious Diseases, Yokohama Quarantine
Station: 107-8, Nagahama, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236, Japan; *³Japan
Food Research Laboratories: 6-11-10, Nagayama, Tama, Tokyo 206, Japan;

*⁴The Japan Canned Food Inspection Association: 2-15,
Kitanakamichi, Naka-ku, Yokohama 231, Japan)

A simple and rapid determination method of methyl isothiocyanate (MITC) in wine was developed. MITC in wine was extracted with ethyl acetate and the extract was subjected to NPD-GC and GC/MS. The determination limits were 0.02 ppm with NPD-GC, 0.22 ppm with FPD-GC (S-mode) and 0.05 ppm with GC/MS. Recoveries from wine spiked with 0.044 and 0.088 ppm of MITC were 89.4% and 83.5%, respectively, from white wine and 81.6% and 75.1%, respectively, from red wine.

MITC in wine imported from Italy was detected in the range of 0.087 to 0.349 ppm in three brands out of 30 examined.

(Received July 16, 1992)

Key words: メチルイソチオシアネート methyl isothiocyanate; ワイン wine; ガスクロマトグラフィー gas chromatography

緒 言

イタリアから輸出されたワインの一部にメチルイソチオシアネート (Methyl isothiocyanate: MITC) の含まれていることが米国食品医薬品局 (FDA) の調査で判明し、

厚生省は平成 4 年 4 月 16 日 (1992 年)、都道府県に対しこの MITC が混入している疑いがあるワインの販売を当面中止し、検査を実施するよう通知するとともに、検疫所に対し輸入時の検査強化を指示した¹⁾。

MITC は一般に殺虫・殺菌を目的とした土壌くん蒸剤として使用される農薬であり、我が国の農薬登録保留基準²⁾では、果実 0.05 ppm、野菜 0.2 ppm、いも類 0.5 ppm、茶 0.1 ppm と規定された農薬である。その毒性は雄ラットへの経口投与で LD₅₀ 175 mg/kg であり³⁾、皮

*¹ 国立衛生試験所: 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

*² 横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター: 〒236 神奈川県横浜市金沢区長浜 107-8

*³ 日本食品分析センター: 〒206 東京都多摩市永山 6-11-10

*⁴ 日本缶詰検査協会: 〒231 神奈川県横浜市中区北仲道 2-15

膚、粘液質膜の侵食及び炎症などがあるといわれている。イタリア国内では1963年に使用が禁止されるまで発酵を調節するための添加物として、主として安価なワインに使用されることも珍しくなかったという。

MITCの分析法は、ディーンスターク型蒸留装置を用いる我が国の農薬登録保留基準の方法²⁾や、有機溶媒で抽出する方法^{4), 5)}が報告されている。本法ではそれらを比較検討した結果として、酢酸エチルで直接抽出し、この抽出液を高周波加熱型フレイムサーミオニック検出器付ガスクロマトグラフ(NPD-GC)で主に定量し、蛍光光度検出器付ガスクロマトグラフ(FPD-GC)及びガスクロマトグラフ-マススペクトロメーター(GC/MS)で確認する方法を報告する^{*5)}。

Fig. 1. NPD-Gas chromatogram of MITC in wine extract using a packed column

(a): wine extract (not spiked)

(b): wine extract (spiked with 2.2 µg/50 g of MITC)

Arrow shows MITC peak.

NPD-Gas chromatographic condition - 1: column; 2 mm i.d.×2 m (glass), column packing; 25% PEG 6000, column temp.; 140°C, injection temp.; 250°C, detector temp.; 250°C, carrier gas; He (30 ml/min)

実験方法

1. 実験試料

平成4年1～6月に東京港及び横浜港にて輸入されたイタリア産ワインを用いた。

2. 試薬、試液、器具

MITC: 東京化成工業(株)一級品

酢酸エチル: 和光純薬工業(株)残留農薬分析用

3. 装置

NPD, FPD-GC: (株)横河電機製 HP 5890 シリーズ II; GC/MS: (株)島津製作所製 QP-2000 型

4. 分析操作法

4.1 試験溶液の調製法

試料(ワイン) 50 g に、水 50 ml, 塩化ナトリウム 30 g を加えた後、酢酸エチル 40 ml で3分間振とう抽出した。

放置し分液後、上層(酢酸エチル層)を液相分離ろ紙(Whatman IPS)でろ過し、少量の酢酸エチルで洗い込み 50 ml に定容し、試験溶液とした。

4.2 NPD-GC 測定条件

(1) カラム: 25% PEG 6000/セライト 545 (AW) 80

Fig. 2. NPD-Gas chromatogram of MITC in wine extract using a capillary column

(a): wine extract (not spiked)

(b): wine extract (spiked with 2.2 µg/50 g of MITC)

Arrow shows MITC peak.

NPD-Gas chromatographic condition - 2: column; DB-17 (J & W) 0.25 mm i.d.×30 m, df=0.25 µm, column temp.; 50～130°C (rate 5°C/min), injection temp.; 250°C, detector temp.; 150°C, carrier gas; He (60 ml/min)

*5) “ワイン中のメチルイソチオシアネート (MITC) の分析法について” 平成4年4月17日, 事務連絡(1992).

Fig. 3. FPD(S-mode) gas chromatogram of MITC in wine extract

(a): wine extract (not spiked)

(b): wine extract (spiked with $2.2 \mu\text{g}/50 \text{ g}$ of MITC)

Arrow shows MITC peak.

Gas chromatographic condition: column; DB-210 (J & W) $0.25 \text{ mm i.d.} \times 30 \text{ m}$, $\text{df} = 0.25 \mu\text{m}$, column temp.; $50 \sim 130^\circ\text{C}$ (rate $5^\circ\text{C}/\text{min}$), injection temp.; 235°C , detector temp.; 235°C , carrier gas; He ($60 \text{ ml}/\text{min}$)

~ 100 メッシュ, $2 \text{ mm} \times 2 \text{ m}$; カラム温度: 140° ; 注入口温度: 250° ; 検出器温度: 250° ; キャリヤーガス: ヘリウム $30 \text{ ml}/\text{min}$

(2) カラム: DB-17 (J & W 社製) $0.25 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$, 膜厚 $0.25 \mu\text{m}$; カラム温度: $50 \sim 130^\circ$ ($5^\circ/\text{min}$); 注入口温度: 250° ; 検出器温度: 150° ; キャリヤーガス: ヘリウム $60 \text{ ml}/\text{min}$

4.3 FPD-GC 測定条件 (S モード)

カラム: DB-210 (J & W 社製) $0.25 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$, 膜厚 $0.25 \mu\text{m}$; カラム温度: $50 \sim 130^\circ$ ($5^\circ/\text{min}$); 注入口温度: 235° ; 検出器温度: 235° ; キャリヤーガス: ヘリウム $60 \text{ ml}/\text{min}$

4.4 GC/MS 測定条件

カラム: NPD-GC (2) と同じ; カラム温度: $50 \sim 130^\circ$ ($5^\circ/\text{min}$); 注入口温度: 200° ; イオン源温度: 250° ; セパレーター温度: 250° ; キャリヤーガス: 高純度ヘリウム $1 \text{ kg}/\text{cm}^2$; 注入法: スプリットレス

実験結果

1. MITC の GC 及び GC/MS 測定条件

NPD-GC, FPD-GC (S モード) 及び GC/MS の各 GC 測定条件での MITC のクロマトグラムは Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, 及び Fig. 4 に示したとおり, すべてピーク形状の良好なクロマトグラムとして測定できた。

NPD-GC 測定条件 (2) では, ワイン由来の小さな三つ

Fig. 4. GC/MS (SIM) Chromatogram of MITC detected in wine extract

(a): mass chromatogram

(b): mass spectrum

Gas chromatographic condition: column; DB-17 (J & W) $0.25 \text{ mm i.d.} \times 30 \text{ m}$, $\text{df} = 0.25 \mu\text{m}$, column temp.; $50 \sim 130^\circ\text{C}$ (rate $5^\circ\text{C}/\text{min}$), injection temp.; 200°C , detector temp.; 250°C , ion source temp.; 250°C , separator, carrier gas; He ($60 \text{ ml}/\text{min}$)

のピークが MITC のピークのすぐ後にみられるが, カラムの初期温度 50° から毎分 5° ずつ昇温する条件で十分な分離が得られた。その他の条件では特に妨害となるピークは見られなかった。MITC を検出した実際のワインのクロマトグラムを Fig. 5 に示した。

2. MITC の検量線

検量線は NPD-GC 測定条件ではいずれも $0.02 \sim 2.2 \text{ ppm}$ の範囲で良好な直線性が得られた。又 FPD-GC 測定条件 (S モード) では $0.22 \sim 2.2 \text{ ppm}$ の範囲で良好な直線性が得られた。

更に GC/MS 測定条件 (Selected ion monitoring: SIM) では $m/z = 73$ で測定した時, $0.05 \sim 2.2 \text{ ppm}$ の範囲で良好な直線性が得られた。

Fig. 5. NPD-Gas chromatogram of MITC detected in wine extract using a capillary column
Arrow shows MITC peak.

Gas chromatographic condition: column; DB-17 (J & W) 0.25 mm i.d.×30 m, df=0.25 μ m, column temp.; 50~130°C (rate 5°C/min), injection temp.; 250°C, detector temp.; 150°C, carrier gas; He (60 ml/min)

Table 1. Recovery of MITC from Wine of Italy

Kind	Added (ppm)	Recovery (%)	Mean $\pm$ S.D. (%)	C. V. (%)
White	0.044	91.7	89.4 $\pm$ 6.0	6.7
		94.0		
		82.6		
	0.088	84.5	83.5 $\pm$ 1.7	2.0
		81.5		
Red	0.044	84.5	81.6 $\pm$ 2.7	3.3
		78.7		
		82.2		
	0.088	84.0	75.1 $\pm$ 5.3	7.1
		75.3		
		69.8		
		80.3		

3. 添加回収実験

ワインに MITC を 0.044 ppm, 0.088 ppm 添加した時の本法で測定した回収率を Table 1 に示した (NPD-GC 測定条件 (2) で測定)。低濃度における添加回収実験でも 89.4%, 81.6% と良好な結果を示した。また、白ワイン、赤ワインの間に明確な回収率の差はなかった。ワイン中の定量下限は NPD-GC ではいずれも 0.02 ppm, FPD-GC (S モード) では 0.22 ppm, GC/MS (SIM, m/z

$z=73$ で測定) では 0.05 ppm であり、明確に分離定量することができた。

4. 輸入イタリア産ワインの分析結果

平成 4 年 1~6 月に東京港及び横浜港にて輸入されたイタリア産ワイン 30 種について、本法により分析を行った。Table 2 に結果を示したように 3 銘柄のワインから MITC を 0.087~0.349 ppm 検出した。

検出した MITC はすべて GC/MS で確認した。

考 察

実際のワインでは、NPD-ガスクロマトグラフィー (Fig. 5) に見られるようにワイン由来の小さな三つのピークが MITC のピークのすぐ後にみられた。これらのピークはカラムの昇温時間が早いと MITC のピークと重なるが、本法の条件で十分な分離が得られた。カラムの昇温温度を 1~4° と小さくしても分離度は変わらなかった。

検量線は NPD-GC 測定条件では 0.02~2.2 ppm と MITC の実用分析として十分な幅を示した。

また FPD-GC (S モード) に比べて感度は 10 倍ほど良く、実際の分析は NPD-ガスクロマトグラフィーでピークが見られた場合、確認法として濃縮して FPD-ガスクロマトグラフィー (S モード) 及びガスクロマトグラフィー/質量分析法の方法を用いて確認を行うことが望まれた。

Table 2. Contents of MITC in Wine of Italy

Sample number	Kind	Result (ppm)
1	White	N.D*
2	"	N.D
3	"	N.D
4	"	N.D
5	"	N.D
6	"	N.D
7	"	N.D
8	"	N.D
9	"	N.D
10	"	N.D
11	Red	0.087
12	White	0.206
13	Rose	0.349
14	Red	N.D
15	White	N.D
16	"	N.D
17	"	N.D
18	"	N.D
19	"	N.D
20	"	N.D
21	Rose	N.D
22	White	N.D
23	Red	N.D
24	"	N.D
25	White	N.D
26	"	N.D
27	"	N.D
28	Red	N.D
29	Rose	N.D
30	White	N.D

* N.D: not detected

Determination limit of MITC was 0.02 ppm.

ワイン中の MITC の抽出法について、農薬登録保留基準²⁾では、ディーンスターク型蒸留装置を用い果実、野菜、いも類、抹茶の場合ヘキサンで、茶(抹茶を除く)の場合、酢酸エチルで抽出した後、塩化ナトリウムを加え振とうし、放置し上層を分液後、液相分離ろ紙でろ過し GC で測定している。著者らはディーンスターク型蒸留装置を用いず、MITC は揮散性が高く濃縮などの操作は不適当であるので、直接ワインに酢酸エチル、水、塩化ナトリウムを加え振とうする簡易な試験溶液の調製法を設定した。このような直接抽出法でもワイン中の成分から MITC を分離定量できた。酢酸エチル層の分離操作は、遠心分離 (3,000 rpm, 5 分間) でも可能であった。クロマトグラムを見ても妨害物の影響は見られなかった。分析 1 サイクル約 30 分の繰り返し注入を 100 回以上行っているが、ベースラインのみだれや異常ピークの出現は見られなかった。また、検量線や MITC のピーク

のリテンションタイムの再現性も保持されている。なお、WHO/FDA⁴⁾では試料からの MITC の抽出溶媒としてジクロロメタンを用いているが、一般に塩素系有機溶媒の注入は GC の検出器に悪影響を与えと言われているので好ましくないとと思われる。また、ジェチルエーテル⁵⁾では振とう抽出した際にエマルジョンを生じるので好ましくなかった。

ワインに MITC を 0.044 ppm, 0.088 ppm 添加した時の本法で測定した回収率は、白ワインで 89.4%, 83.5%, 赤ワインで 81.6%, 75.1% であった (NPD-GC 測定条件 (2) で測定)。白ワインの方が赤ワインより回収率が良かったのは、赤ワインでは白ワインよりエマルジョンができやすく分離が困難になるためと思われる。

NPD がなく FPD (S モード) のみで測定する場合、試料を濃縮する必要があるが、濃縮方法としてエバポレータを用いると、MITC はすべて溶媒とともに揮散してしまい測定できない。N₂ 気流下で穏やかに濃縮する方法で、2~20 倍に濃縮した場合、揮散による減少はおおよそ 20% 程度であった。

検出した MITC のレベルは米国で検出された 0.03~1.35 ppm⁶⁾と同じレベルの残留を認めた。

MITC は催奇形性能があり、米国環境保護局 (EPA) からのデータに基づくと、ワイン 1,000 ml/日の消費を想定した場合、妊婦への許容値は 2 ppm、その他の成人への許容値は 8 ppm と推断している⁶⁾ので、今回検出された量では直ちに人体に影響はないと思われるが、日本でこの MITC が検出されたワインは食品衛生法第 6 条違反 (指定外添加物の使用) として措置された。

ま と め

1) ワイン中のメチルイソチオシアネート (MITC) の簡易かつ迅速な分析法を確立した。

2) MITC は試料から酢酸エチルで抽出、直接 NPD-GC で定量した。また、FPD-GC (S モード) 及び GC/MS でも確認した。

3) 試料に 0.044 ppm, 0.088 ppm 添加した時の回収率は、白ワインで 89.4%, 83.5%, 赤ワインで 81.6%, 75.1% であった。

4) 本法の定量限界は NPD-ガスクロマトグラフィーでは 0.02 ppm, FPD-ガスクロマトグラフィー (S モード) では 0.22 ppm, ガスクロマトグラフィー/質量分析法では 0.05 ppm であった。

5) イタリア産ワイン 30 銘柄について分析を行った。

このうち 3 銘柄から MITC を 0.087~0.349 ppm 検出した。

謝 辞

本研究を行うに当たり、MITC に関する情報の提供をいただいた厚生省生活衛生局食品保健課、高谷幸氏及び加地祥文氏、同検疫業務管理室、中嶋健介氏並びに分析

法の設定に関するご協力をいただいた東京都立衛生研究所田村行弘氏、愛知県衛生研究所早川順子氏はじめ各衛生研究所の諸先生、及び MITC の試薬の提供をいただいた国立衛生試験所食品添加物部武田明治氏、並びに試料の送付についてご協力いただいた東京検疫所食品監視課諸氏及び横浜検疫所食品監視課諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 生活衛生局食品保健課検疫業務管理室長通知：“イタリア産ワインの取り扱いについて”平成4年4月16日、衛検

第115号(1992).

- 2) 農薬環境保全対策研究会編：“農薬登録保留基準ハンドブック” p.454～456 (1990), 化学工業日報社.
- 3) 富沢長次郎, 上路雅子, 腰岡政二編：“最新農薬データブック” p.244～245 (1989), ソフトサイエンス社.
- 4) Carbone, D.: Riv. Vitio. Enol., **40**(10), 478～485 (1987).
- 5) Glnenko, D. B., Klisenko, N. A.: Gig. Sanit. (3), 48～49 (1987).
- 6) Rothsdrild, L.: Food Chemical News, **34**, 3～4 (1992).