添加されたメチルイソチオシアネートのワイン中での化学変化

(平成5年5月26日受理)

安井陽子^{*1} 松下純雄^{*}

Chemical Change of Methyl Isothiocyanate Added to Wine

Yoko YASUI and Sumio MATSUSHITA

(The Hyogo Prefectural Institute of Public Health: 2-1-29, Arata-cho,
Hyogo-ku, Kobe 652, Japan)

Methyl isothiocyanate (MITC) added to wine was found to react with ethanol to produce methyl thiourethane. MITC and methyl thiourethane were extracted with ethyl acetate and the extract was analyzed by gas chromatography with a flame photometric detector (S-mode).

MITC in wine imported from Italy was detected in the range of 0.06 to 0.09 ppm and methyl thiourethane was detected at 0.10 to 0.17 ppm in three brands.

(Received May 26, 1993)

Key words: メチルイソチオシアネート methyl isothiocyanate; メチルチオウレタン methyl thiourethane; ワイン wine; ガスクロマトグラフィー (FPD) gas chromatography (FPD); 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography (HPLC)

緒 言

イタリア産ワインの一部に、土壌くん蒸剤のメチルイソチオシアネート (methyl isothiocyanate: 以下 MITC と略) が発酵調整剤として添加されていることが 1992 年アメリカ食品医薬品局 (FDA) の調査で判明した。

我が国でも厚生省の指示により¹⁾、都道府県の研究所などで輸入ワイン (1,857 検体) 中の MITC の分析が行われた。ところが MITC が検出されたワイン (20 検体) が検査実数²⁾の約 1% と非常に少なかったことと、MITC の反応性を考慮し、貯蔵中にワイン中の MITC が化学変化を起こし、他の化合物に変化したのではないかと考え、反応生成物について検討を行った結果を報告する。更に市販のイタリア産ワイン中の MITC 及び反応生成物の測定結果も併せて報告する。

実験方法

1. 試 料

イタリア産ワイン 34 検体を用いた。

2. 試 薬 等

1) MITC: 和光純薬工業(株)製 1 級品。

購入した 1 級品を減圧下で蒸留し、沸点 118~119°

の白色の留分 (直ちに白色の結晶となる) を分取したものを使用した。

2) メチルチオウレタン: MITC をエタノール (99.5%) に溶解し、還流冷却器を取り付け、沸騰水浴中で、8 時間加温する。冷後、減圧下 35 mm で蒸留し、沸点 102~103° の留分を分取したものを使用した。

3) 酢酸エチル、アセトニトリル、*n*-ヘキサン及びエタノール: 和光純薬工業(株)製、高速液体クロマトグラフ用

4) その他の試薬: 和光純薬工業(株)製、試薬特級及びガスクロマトグラフ用

5) 薄層クロマトグラフィー (TLC) 用プレート: メルク社製 Pre-Coated Silica gel 60 with fluorescent indicator (F 254)

購入品をあらかじめ酢酸エチルで展開し乾燥させたものを使用した。

3. 装 置

1) 高速液体クロマトグラフ: (株)島津製作所製 LD-6AD シリーズ

2) 炎光光度検出器付ガスクロマトグラフ (FPD-GC) (S-mode): (株)柳本製作所製 YANACO G 2800

3) ガスクロマトグラフ-マススペクトロメーター (GC/MS): Hewlett Packard 5890, 5970 Series Mass

* 兵庫県立衛生研究所: 〒652 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29

Selective Detector 付

4. 分析操作

4.1 標準溶液の調製

1) MITC 100 mg をアセトニトリル及び酢酸エチルに溶解し 100 ml としたものを標準原液とした (1 mg/ml). 標準原液をアセトニトリル及び酢酸エチルで適宜希釈して標準溶液を調製した.

2) メチルチオウレタン 100 mg をひょう取し, MITC 標準溶液と同様に操作して標準溶液を調製した.

4.2 試験溶液の調製

試料 (ワイン) 50 ml に食塩 18 g を加え, 酢酸エチル 10 ml で振とう抽出した後, 数分間放置するかあるいは遠心分離 (3,000 rpm, 2 分) し, 酢酸エチル層を分取する. 酢酸エチル層を硫酸ナトリウム (無水) で脱水し, FPD-GC 用試験溶液とした.

4.3 クロマトグラフィー条件

HPLC 及び FPD-GC (S-mode) の測定条件はそれぞれ Table 1 及び Table 2 に示した.

Table 1. HPLC Conditions for Determination of MITC and Methyl Thiourethane

Column	: Wakogel 5C18, 4.6×250 mm
Mobile phase	: Acetonitrile-water (6:4)
Flow rate	: 1 ml/min
Detector	: UV244 nm
Sample size	: 10 μ l

Table 2. FPD-GC Conditions for Determination of MITC and Methyl Thiourethane in Wine

Column	: 25% PEG-20 M 60~80 mesh 2 m
Column temp.	: 140°C (7 min)-Flush-210°C (15 min)
Detector temp.	: 250°C
Injection temp.	: 250°C
Sample size	: 5 μ l

結果及び考察

1. MITC とエタノールの反応

MITC をワインとほぼ同様のアルコール濃度 (10%) のエタノールに 10 μ g/ml になるように添加し, 還流冷却器を付けて水浴中で加熱した後, 高速液体クロマトグラフを用いて変化を追跡した. また同様に MITC 添加エタノール溶液を室温及び 5° で保存し, その変化を追跡した結果, Fig. 1 に示したように MITC (R_t 5.3 min) のピークは時間の経過とともに減少し, 逆に R_t 4.6 min のピークが増大することが判明した.

2. TLC による反応生成物の分離

蛍光指示薬添加シリカゲル薄層プレートに, MITC とエタノールを反応させた液を塗布し, 酢酸エチルで展開

Fig. 1. The decrease of MITC and the increase of methyl thiourethane in 10% ethanol solution by high performance liquid chromatography

Chromatographic conditions: see Table 1; (1): initial (MITC, 10.2 μ g/ml); (2): after 15 days (MITC, 7.0 μ g/ml, methyl thiourethane 0.3 μ g/ml); (3): after 75 days (MITC 1.7 μ g/ml, methyl thiourethane 0.9 μ g/ml) at room temperature

Fig. 2. Mass spectrum and chromatogram of methyl thiourethane

したところ, R_f 値 0.8 に反応生成物の黒色のスポットが検出された.

そこで蛍光指示薬無添加のシリカゲル薄層プレートを用いて, 上記 R_f 0.8 相当のスポット部分を集め, アセト

ニトリルで溶出させたものを HPLC で測定したところ、 R_t 4.6 分にピークが検出された。

3. GC/MS による反応生成物の同定

シリカゲル薄層プレート R_f 0.8 相当のスポット部分を、 n -ヘキサンで溶出させ、ヘキサン層を GC/MS (測定用カラムは DB-17 0.25 mmA×30 m を使用) により解析したところ、Fig. 2 に示したように反応生成物はメチルチオウレタンであることが判明した。MITC とエタノールとの反応式は Fig. 3 に示した。

Fig. 3. Reaction mechanism of MITC and ethanol

4. 定量法の検討

MITC の分析法について、我が国の農業登録保留基準記載のディーンスターク型蒸留装置を用いる方法³⁾や、有機溶媒で抽出後窒素ガスを噴霧し濃縮する方法を検討した結果、濃縮の過程で MITC が気散して、MITC の回収率が非常に悪いことが判明した。またメチルチオウレ

タンの場合にも、濃縮方法に加え抽出溶媒の種類によって抽出率が大きく影響を受けることが分かった。そこでワイン中の MITC 及びメチルチオウレタンを酢酸エチルで抽出し、硫酸ナトリウム (無水) で脱水後、濃縮せずに直接 FPD-GC (S-mode) で測定することとした。またメチルチオウレタンの測定温度は 210° (検出時間は約 7 分) と高いことと、MITC の含有が認められた場合には、同時にメチルチオウレタンの検出があったことを記録するために、同時測定を考慮して昇温で測定することとした。この測定条件での MITC の検出限界は 0.2 ng、メチルチオウレタンの検出限界は 0.5 ng であった。

5. 添加回収実験の結果

ワインに MITC 及びメチルチオウレタンを 0.1 及び 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、回収実験を行った結果は Table 3, 4 に示したが、非常に良い結果が得られた。

6. メチルチオウレタンの生成量

ワイン及び 10% エタノール溶液に MITC が 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、室温及び 5° で 40 日間保存した場合、メチルチオウレタンが生成されることが判明した。

Table 5 に示したように、各溶液中に測定されたメチルチオウレタン量は反応に使用され、消失した MITC 量

Table 3. Recoveries of MITC Added to Wine by FPD-GC

Added ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Recovery (%)	Average $\pm$ S.D. (%)
0.1	80.2	73.8 $\pm$ 4.6
0.1	71.1	
0.1	70.0	
0.5	100.2	104.9 $\pm$ 3.4
0.5	107.9	
0.5	106.6	

Table 4. Recoveries of Methyl Thiourethane Added to Wine by FPD-GC

Added ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Recovery (%)	Average $\pm$ S.D. (%)
0.1	93.9	100.6 $\pm$ 4.7
0.1	103.8	
0.1	104.2	
0.5	99.2	98.2 $\pm$ 0.7
0.5	97.6	
0.5	97.8	

Table 5. Residual MITC and Methyl Thiourethane Produced after 40 Days Standing

Solution	Residual MITC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Methyl thiourethane ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		(A)/(B) $\times$ 100 (%)
		Detected (A)	Theoretical (B)	
In 10% ethanol ¹⁾	5°C	7.90	0.20	3.42
	Room temp.	4.54	0.54	8.89
In wine ²⁾	5°C	7.10	0.18	4.72
	Room temp.	3.80	0.96	10.10

¹⁾ Each value was measured by HPLC.

²⁾ Each value was measured by FPD-GC.

MITC was added to 10 μg per ml in each solution.

Fig. 4. Gas chromatograms of Italian wine that MITC and methyl thiourethane were detected (1) and no MITC was detected (2)
Chromatographic conditions: see Table 2

Table 6. Contents of MITC and Methyl Thiourethane in Italian Wine

Sample number	Kind	MITC ($\mu\text{g/ml}$)	Methyl thiourethane ($\mu\text{g/ml}$)
1	White	0.07	0.17
2	Red	0.09	0.17
3	Red	0.06	0.10

Determination limits of MITC and methyl thiourethane were 0.2 ng and 0.5 ng, respectively.

から計算される理論値の数パーセントにすぎなかった。つまりワインの場合は、メチルチオウレタンの測定量は室温保存の場合は理論値の9.5% (理論生成量 10.10

$\mu\text{g/ml}$, 測定量 0.96 $\mu\text{g/ml}$), 5°保存の場合には3.8% (理論生成量 4.72 $\mu\text{g/ml}$, 測定量 0.18 $\mu\text{g/ml}$) であった。

7. 輸入イタリア産ワイン中の MITC 及びメチルチオウレタンの定量

Fig. 4 に MITC が検出された輸入イタリア産ワイン (白ワイン) のクロマトグラム (1) を示したが, MITC が検出されたワイン 3 検体では, すべてメチルチオウレタンが検出された。測定結果は Table 6 に示したが, 3 検体中のそれぞれの値は MITC 0.06~0.09 $\mu\text{g/ml}$, 及びメチルチオウレタン 0.10~0.17 $\mu\text{g/ml}$ であった。しかし MITC を検出しなかったワイン 31 検体ではメチルチオウレタンは検出されなかった。

ま と め

1. ワインに添加された MITC の一部はワイン中でエタノールと反応し, メチルチオウレタンを生成することが判明した。

2. ワイン中の MITC 及びメチルチオウレタンは酢酸エチルで抽出し, 硫酸ナトリウム (無水) で脱水後 FPD-GC (S-mode) で測定することができた。またそれぞれを 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 添加した場合の添加回収率は MITC 73.8%, メチルチオウレタン 100.6%, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 添加の場合は MITC 104.9%, メチルチオウレタン 98.2% であった。

3. MITC が検出された 3 検体のイタリア産ワイン中の MITC 及びメチルチオウレタン量は 0.07 $\mu\text{g/ml}$, 0.17 $\mu\text{g/ml}$ (白ワイン), 0.09 $\mu\text{g/ml}$, 0.17 $\mu\text{g/ml}$ (赤ワイン) 及び 0.06 $\mu\text{g/ml}$, 0.10 $\mu\text{g/ml}$ (赤ワイン) であった。

4. 生成されたメチルチオウレタン量が, MITC の減少量から推定される理論値の数パーセントと非常に少なかったこと, 及び反応液のクロマトグラム中にその他のピークが測定されたことから, メチルチオウレタン以外の化合物が生成されている可能性も大であり, 他の生成物について現在検索中である。

文 献

- 1) 生活衛生局食品保健課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) 厚生省生活衛生局食品保健課事務連絡: "イタリア産ワインのメチルイソチオシアネート (MITC) 検査結果 (都道府県市区分) について" 平成 4 年 6 月 25 日 (1992)。
- 3) 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" p. 454~456 (1990), 化学工業日報社。