

GC/MS-SIM法による酒精飲料中の カルバミン酸エチル定量法

GC/MS-SIM Method for Determination of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages

山本 優 早川 祥美 大内 格之 富澤 政
富所 謙吉 高杉 信男

Masaru Yamamoto, Yoshimi Hayakawa, Kakuyuki Oouchi,
Masashi Tomizawa, Kenkichi Tomidokoro
and Nobuo Takasugi

カルバミン酸エチル(EC)をメチル誘導体化した後、ガスクロマトグラフ・マススペクトロメトリー(GC/MS)を用いて Selected Ion Monitoring (SIM)法により定量したところ、EC類似物質による妨害のない微量定量が可能となった。

1 緒 言

発酵食品特に酒精飲料中に微量含まれている EC は変異原性とともに関験動物に対し、多種類の腫瘍を誘発する中等度の発癌性を有することが報告されている¹⁾。また、その生成メカニズムは、酒精飲料中の尿素とエチルアルコールが加熱により結合し生成するものとされている。

一方、カナダでは EC の許容基準が酒類別に設定されており 1986 年、日本から輸出された清酒が基準を超え、販売禁止となったことから、実態の把握と微量分析法の開発が急務となった。

酒精飲料中の EC 分析法としては水素炎イオン化検出器(FID)付きガスクロマトグラフィーによる方法^{2)~4)}等が報告されているが、これらの方法は酒精飲料中の EC 類似物質による妨害が多く、EC を定量するうえで問題がある。

今回、EC をメチル誘導体とした後、GC/MS を用いて、SIM 法により定量と確認が同時に可能な分析法を検討し、併せて市販酒精飲料について EC

含有量の実態調査を行ったので報告する。

2 方 法

2-1 試 料

日本酒、ワイン、焼酎、ビール、ウィスキーは昭和 62 年 8 月、札幌市内の小売店で購入した。

2-2 試 薬

EC 標準品：東京化成(株)、試薬特級
N, N-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール
(N, N-DMF-DMA)：ガスクロ工業(株)製
有機溶媒類：和光純薬(株)製、試薬特級

2-3 装 置

GC/MS 装置：(株)島津製作所製 GC-9AG
型ガスクロマトグラフに(株)島津製作所製 QP-
1000 型質量分析計を接続した装置を用いた。

2-4 試験溶液の調製

2-4-1 抽出精製

検体 20 ml を 3 N 水酸化ナトリウムにより中性としたのち、Extrelute 20 カラムに 15 分間保持し、

ジクロロメタン 60 ml により溶出した。

次に溶出液を無水硫酸ナトリウムにより脱水後アセトニトリルを3%になるように添加し、ジクロロメタン 10 ml で処理した Sep-pak-Florisil を通過させた。さらに3%アセトニトリル含有ジクロロメタン溶液 10 ml で洗浄し、先の溶出液とあわせて KD 濃縮器で約 5 ml とした後、窒素気流中で 0.5 ml に濃縮した。

2-4-2 誘導体化

濃縮液 150 μ l に誘導体化試薬 N, N-DMF-DMA 150 μ l 加え、密栓して、水浴上で 50 $^{\circ}$ C, 15 分間加熱した。さらに反応液のうち 200 μ l を Extrelute ミニカラムに保持し、n-ヘキサン 10 ml により溶出して過剰の試薬を除去した。さらに窒素気流中で濃縮乾固し、100 μ l のアセトニトリルに溶解して試料溶液とした。

2-5 測定条件 (GC/MS-SIM法)

カラム: SP 2340 (5%), 2 m \times 3 mm

Uniport HP (80/100)

カラム温度: 220 $^{\circ}$ C

注入口温度: 250 $^{\circ}$ C

キャリアーガス (He): 40 ml/min

イオン化法: EI法; イオン化電圧: 70 eV

セパレーター温度: 250 $^{\circ}$ C

イオン源温度: 250 $^{\circ}$ C

測定質量数: 144

注入量: 2 μ l

3 結果と考察

3-1 抽出精製法

溶媒抽出法は酒精飲料のような水性試料ではエマルジョンを形成するなど問題があることから、Dennis ら⁴⁾が報告しているように Extrelute 20 カラムを用い、ジクロロメタンを溶出液として抽出操作を行った。

またクリーンナップ法として小林らの方法⁴⁾に準じ、Sep-pak-Florisil を用い、Extrelute カラ

ム溶出液を通過させた。10 ml の 3%アセトニトリル含有ジクロロメタン溶液により EC を溶離した。

3-2 誘導体化操作

EC 単体のマススペクトル (図 1-1) は、フラグメントイオンが低質量域にあり、また分子イオンピーク強度も小さく、定量の際、類似物質による妨害が見られたことから、より選択性を高め、類似物質との分別定量を容易にするため、小林ら³⁾の方法に準じ、EC を N, N-DMF-DMA 反応試薬により、メチル誘導体として定量した。

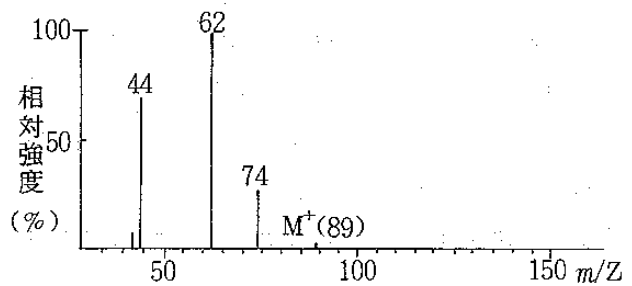


図 1-1 EC のマススペクトル

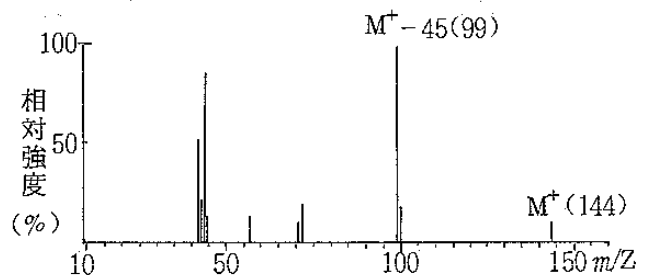


図 1-2 EC-DMF-DMA 誘導体のマススペクトル

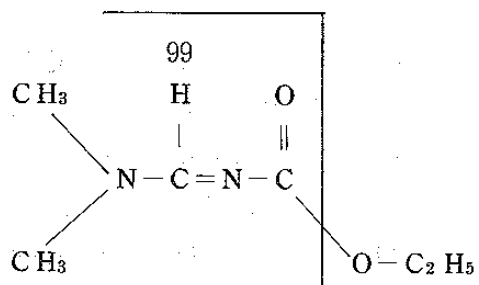


図 2 EC-DMF-DMA 誘導体の構造式

次に、誘導体反応生成物について質量分析を行ったところ図1-2に示すマススペクトルが得られ、質量数144のピークが分子イオンであり、基準ピークである質量数99のピークは質量数45のエチルエステルが脱離したフラグメントイオンピークと推定された。

このスペクトル解析の結果及びN, N-DMF-DMA試薬の反応特性から、反応生成物は図2に示すようにECの窒素原子にN, Nジメチルフォルミル基が結合した構造式を持つものと推定された。

3-3 GC/MS-SIM法の測定条件

測定質量数として通常は相対強度の強い基準ピークを用いるところであるが、質量数99のピークでは妨害が多いことから、分子イオンピークである144の質量数によりSIM法を行ったところ、図3に示すように妨害の少ない良好なクロマトグラムが得られた。

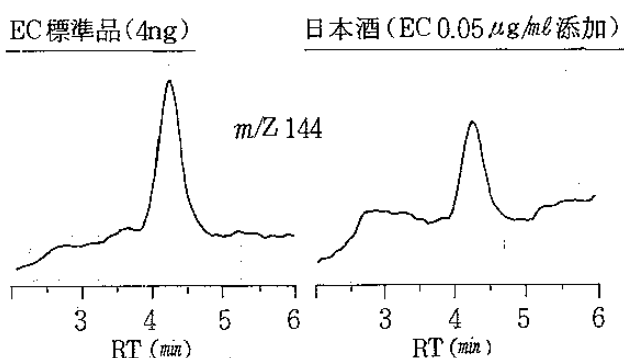


図3 EC-DMF-DMA誘導体のSIM-MSクロマトグラム

3-4 検量線

反応が定量的に進行していることを確認するために標準液について誘導体化以降の操作をおこない、検量線を作成したところ標準液濃度1 µg/mlから20 µg/ml (GC/MSへの注入絶対量に換算して2 ngから40 ngのECに相当)の範囲で直線性が得られた。

3-5 添加回収試験

日本酒にECを0.5 µg/ml及び0.1 µg/mlになるように加え本法により添加回収試験を行ったところい

ずれも70から80%の回収率(n=4)が得られた。

なお、本法の検出限界は0.03 µg/mlであった。

3-6 市販酒精飲料中のEC含有量

本法により市販の各種酒精飲料18検体についてEC含有量の調査を行ったところ、表1に示すように、日本酒10検体のうち、5検体から0.03から0.06 µg/mlの範囲で検出されたが、WHOの規制値である0.5 µg/ml及びカナダで新しく設定された日本酒の規制値0.1 µg/mlを越えることはなかった。

表1 市販酒精飲料中のEC含有量

種類	No	含有量	種類	No	含有量
日本酒	1	ND	ワイン	1	ND
	2	0.04		2	ND
	3	0.06	ビール	1	ND
	4	0.03		2	ND
	5	0.06		焼酎	1
6	0.05	ウィスキー	2	ND	
7	ND		1	ND	
8	ND		2	ND	
9	ND				
10	ND				

(単位: µg/ml)

4 結 語

ECの微量分析法としてメチル誘導体化した後、GC/MSを用いてSIM法により定量したところ、ECの類似物質による妨害のない定量と確認が同時に可能な微量分析法を確立することができた。

また実態調査の結果から一部の日本酒からのみECが検出されたが、いずれもWHO及びカナダの規制値を下回っていた。

今後ECの生成機構及び生成の条件を解明しEC生成の抑制及び除去方法の開発が急務であると考えられる。

5 文 献

- 1) James W. Allen, Yousuf Sarief and Robert. J. Langenbach : Environ. Sci Res. 25 443 - 460 (1982)
- 2) M. J. Dennis, N. Howarth, R. C. Massey and I. Parker : Journal of Chromatography, 369, 193 - 198 (1986)
- 3) Kayoko Kobayashi, Masatake Toyoda and Yukio Saito : J. Food Hyg. 28, 330 - 335 (1987)
- 4) 小林加代子, 豊田正武, 斉藤行生 : 食衛誌. 28, 492 - 497 (1987)