ビール中のニトロソアミンとその成因について^{*1}

(昭和 54 年 9 月 28 日受理)

真木 俊夫^{*2} 田村 行弘^{*2} 嶋村 保洋^{*2}
小関 正道^{*2} 西垣 進^{*2} 直井家 壽太^{*2}

Occurrence of Dimethylnitrosoamine in Commercial Beers and Its Formation in the Brewing Process

(Hygienic Studies on *N*-Nitroso Compound. IV)

Toshio MAKI, Yukihiro TAMURA, Yasuhiro SHIMAMURA, Masamichi KOSEKI,
Susumu NISHIGAKI and Yasuta NAOI

(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 24-1, Hyakunincho 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo)

During the period from February through April, 1979, commercial beers of different types obtained from retailers in Tokyo were examined for the presence of volatile *N*-nitrosamine (NNA).

Detection and determination of NNA were carried out by the use of a thermal energy analyzer coupled with gas chromatography.

It was found that 25 (93%) of 27 samples contained dimethylnitrosamine (DMNA), with a mean level of 1.7 ppb; no other NNA was detectable.

The source of the DMNA was investigated, and it was found that relatively high levels of DMNA contamination of malt occurred when the green malt was dried and/or kilned with fuel gas, while lower levels were found in green malt treated with an electric desiccator.

(Received September 28, 1979)

緒 言

発ガン性を有する *N*-ニトロソアミン (以下 NNA と略す) は現在、食品や環境中での所在の究明^{1)~3)}、生体内での NNA 生成^{4),5)}などに関する調査が行われ国際的にも公衆衛生上評価が急がれている。

著者ら^{6)~8)}は、熱エネルギー分析器による NNA の分析法を検討するとともに各種市販食品について NNA 含有量の実態調査を行ってきた。その一環として、市販ビール中の NNA 含有量の調査を行い、ジメチルニトロソアミン (以下 DMNA と略す) の存在を認めた。ほとんどのビールから DMNA が検出されたことは、ビールがヒトによって連続的に多量摂取されるため、そのレベル

は握と成因などの調査が必要と考えられた。

ビール中の NNA に関しては Spiegelhalder ら⁹⁾、河端ら^{*3}が市販ビール中の DMNA の存在を報告しているが、その成因について製造工程を順に追って詳細に究明した報告は見られない。

そこで、本報は市販ビール中の NNA 含有量調査とビール製造工程のいかなる段階で NNA が生成するかを明らかにする目的で工程別に NNA の検索を行い、また NNA の消長について検討を加えたので報告する。

実験材料と方法

1. 試 料

1) 1979 年 2 月から 4 月の間に都内で販売されていた国産ラガービール 11、ラガータイプの生ビール 6、黒ビール 5、輸入ラガービール 4、黒ビール 1、計 27 検体

2) 原料については大麦 (生)、1、乾燥麦芽 7 (a~g)、コーンスターチ 3 (A~C)、コーングリット 3 (A~

*1 *N*-ニトロソ化合物の衛生学的研究 (第 4 報)

*2 東京都立衛生研究所: 東京都新宿区百人町 3-24-1

*3 河端俊治ら: (社) 日本食品衛生学会第 37 回学術講演要旨集 (東京) p. 23, (1979)

Scheme 1. Brewing process of beer

C), ホップ 3 (A~C), 原水 3, 計 20 検体

3) ビール製造工程別に採取した試料: 麦芽汁 (煮沸前) 3, 麦芽汁 (煮沸後) 3, 若ビール 3, ビール粕 3, ラガービール 3, 同罐入り 3, 生ビール 3, 同罐入り 3, 計 24 検体, 以上合計 69 検体を分析に供した。

2. 試 薬

NNA 標準物質として次の 7 種類を用いた。ジメチルニトロソアミン (DMNA), ジエチルニトロソアミン (DENA), ジノルマルプロピルニトロソアミン (Dn・PNA), ジイソプロピルニトロソアミン (Diso・PNA), ジノルマルブチルニトロソアミン (Dn・BNA), ジイソブチルニトロソアミン (Diso・BNA), (イーストマン社製, 95%以上) をそれぞれ 0.1 ppm になるようにジクロルメタンで希釈して用いた。その他の試薬類はすべて市販特級品を使用した。

3. 装 置

1) Thermal Energy Analyzer-Gas Chromatograph (以下 TEA-GC と略す): TEA 502 型 ((株) 島津製作所製), GC カラム用充てん剤: 20% Versamide 900, 60~80 mesh (Chromosorb W, AW), 5% OV-17, 60~80 mesh (Chromosorb W, AW), ガラス管 (3 m, 内径 3 mm), カラム温度 180°, 注入口温度 220°, TEA 分解炉 450°, 検出器: TEA デテクター, キャリヤーガス: Ar 60 ml/min., NNA の検出限界は 0.05 ng である。

2) 電気乾燥器および都市ガス焙燥器

電気乾燥器: 温度調節器付 100 V, (30×30×30 cm) 焙燥器: 乾燥器型箱の内部にガスバーナーを組み込ませた。焙燥する麦芽をのせる金網の棚はガスバーナーから 15 cm 離して設置した。焙燥器の下からファンで送風し, 上方に放出し, 内部の加熱温度を一定にした。

4. NNA の分離抽出法

1) 坂田ら⁴⁾の方法に準じて実施した。細切した試料 50 g (液状試料はそのまま) を 300 ml の分液漏斗にとり 20% 水酸化ナトリウム溶液 50 ml, ジクロルメタン 150

ml を加え, 振とう器で 5 分間振とう抽出する。これを 2 回繰り返す (必要あれば遠心分離 2000 rpm, 3分) 有機層は分取して合わせ, 無水硫酸ナトリウムで脱水後, ガラス繊維ろ紙 (No. GB-100R) でろ過し, ろ液をクデルナ・ダニシュ濃縮管により 37° の水浴中で 2~5 ml まで濃縮を行い, これを定量用の試験溶液とし, TEA-GC を用いて定量分析を行った。

市販ビール 50 g に各ニトロソアミン 0.5 μg を添加したときの本定量法の回収率は DMNA で 79%, DENA, Dn・PNA, Diso・PNA, Dn・BNA および Diso・BNA でそれぞれ 90% であった。

2) 水分測定: 衛生試験法に準じた。

5. ビール製造工程におけるサンプリング

ビール製造工程を Scheme 1 に示した。□内は分析に供した試料を示した。

ビール製造工程上, NNA 生成量の推移を比較するために乾燥麦芽, コーンスターチ, コーングリット, ホップ, 原水を A, B, C の 3 ロットに分け, 実際の工程に準じて, ビール A, B, C を作り, NNA 生成に関する調査を行った。

乾燥麦芽は a から g まで (a, b のみ国内産, 他は輸入品) の 7 種類を用い, A ロットは a, b, c, f の乾燥麦芽をそれぞれ 16.4, 6.6, 38.5, 38.5% の割合で混合した。B ロットは a, c, d, e, g をそれぞれ 13.1, 20.1, 38.5, 18.5, 9.8% の割合で, また C ロットは a, b, c, d, e をそれぞれ 9.8, 13, 30, 17.2% の割合で混合した。

6. 製 麦 法

ビールの標準的な製麦法に従い実験的規模で行った。

粒の長さ 2.5 mm 以下の国内産大麦 (二条) を約 2 倍量程度の水道水に浸し, 浮いた大麦を取り除き室温で約 1 日水張りを行った。ついで水切りをした後, 再び水を加え同様の操作を 3 日間繰り返す。水切り後, 水分を吸収した大麦をガーゼを敷いたカゴにのせ, 水でぬらしたガーゼをかぶせ, 室温 15~18° で 10 日間かけて発芽させ緑麦芽を得た。この緑麦芽を電気乾燥用試料と都市ガ

⁴⁾ 坂田 衛, 籠谷昭一ら: (社) 日本食品衛生学会第33 回学術講演要旨集 (東京), p. 58, (1977)

ス焙燥用試料に分けた。

温度条件は電気乾燥器中で初期温度 40° で約 1 時間保ち、50° に温度を上げ 1 日保温した。2 日目から 50°, 70°, 85° と 3 時間ごとに段階的に温度を上昇させた。

一方、都市ガス焙燥は緑麦芽を温度、加熱時間とも電気乾燥と同一条件で行った。実際のラガービールの製造に使用する緑麦芽の焙燥温度は 85° にとどめられていること、その乾燥麦芽の水分含量は 3% 程度であることから、著者らもこれを目安にした。緑麦芽および各温度条件で得られた試料の一部を採取し、芽、根を取り除き、NNA の分析および水分の測定を行った。

結果と考察

1. 市販ビール中の NNA 含有量

市販ビール計 27 検体について NNA の分析結果を Table 1 に示した。

国産ラガービール 11 検体の DMNA 含有量の範囲は 0.5~4.2 ppb, 平均 1.6 ppb であった。生ビール 6 検体の DMNA 含有量は痕跡~2.9 ppb, 平均 1.3 ppb であった。また黒ビール 5 検体の DMNA 含有量は 0.7~1.2 ppb, 平均 1.0 ppb でそれぞれの平均含有量に大差はなかった。次に輸入ラガービール 4 検体の DMNA 含有量の範囲は 1.3~6.2 ppb, 平均 3.0 ppb であった。また黒ビール 1 検体から 1.2 ppb の DMNA を検出した。DMNA 以外の NNA はいずれのビールからも検出されなかった。

著者らの分析結果は Spiegelhalder ら⁹⁾が報告しているラガービールの分析値と同じ範囲のものであった。

2. ビール原料中の NNA 含有量分布状況

A, B, C の 3 ロットに使用した乾燥麦芽 a から g, コーンスターチ, コーングリット, ホップおよび原水中の分析結果を Table 2 に示した。

乾燥麦芽は全試料から DMNA が検出され、その範囲は 1.7~76.7 ppb でかなりの差が見られた。平均含有量は 16.4 ppb であり、市販ビール中の DMNA 含有量の平均値より約 10 倍高い値であることがわかった。しかし、その他の原料からはビールの DMNA 含量に関与す

Table 2. Occurrence of DMNA in Five Materials of Beer

Samples		DMNA (ppb)
Malt	a	10.5
	b	9.1
	c	10.4
	d	76.7
	e	2.9
	f	1.7
	g	3.7
Corn starch	A	0.3
	B	0.3
	C	0.3
Corn grit	A	n.d.
	B	n.d.
	C	n.d.
Hop	A	n.d.
	B	n.d.
	C	n.d.
Water	A	n.d.
	B	n.d.
	C	n.d.

n.d., not detected

るほどの DMNA は検出されなかった。

3. ビール製造工程別 NNA 含有量分布状況

Scheme 1 に示した製造工程を追ってサンプリングした試料中の NNA 分析を行った。

各原料の混合物を 70°, 1 時間糖化を行った後の A, B, C 各ロットの麦汁(煮沸前)の DMNA はそれぞれ 1.1, 1.5, 0.8 ppb であった。一方、ビール粕からは全く検出されなかった。このことから麦芽中の DMNA はほとんど全部麦汁に移行するものと思われる。

次に、この麦汁にホップを添加し、煮沸を行うと約

Table 1. Dimethylnitrosoamine (DMNA) in Beers of Different Types

Type of beer			No. of samples with DMNA concn. (ppb) of DMNA concn. (ppb)				
			<0.5 (negative)	0.5~1.0	1.1~2.9	3.0 or more	Mean Maximum
Domestic	Lager beer	11	—	7	2	2	1.6 4.2
	Draft beer	6	2	—	4	—	1.3 2.9
	Black beer	5	—	3	2	—	1.0 1.2
Imported	Lager beer	4	—	—	2	2	3.0 6.2
	Black beer	1	—	—	1	—	
	All	27	2	10	11	4	1.7 6.2

10% の水分が蒸発するが、このようにして得られた麦汁の DMNA は A, B, C それぞれ 0.9, 0.6, 0.7 ppb であった。煮沸濃縮による増加は見られず、むしろ減少が見られた。

さらにこれに酵母を添加し、主発酵で得られる若ビール中の DMNA はそれぞれ 0.7, 0.6, 0.7 ppb で、前段階工程の DMNA 値とほとんど差が見られなかった。この若ビールを 2 か月間熟成 (後発酵) させた後 60°, 30 分の加熱殺菌したラガービール大ビン、同缶入、加熱しない生ビール大ビン、同缶入に分け分析した。DMNA は A, B, C それぞれ 0.9, 0.7, 0.9 ppb, 1.0, 0.9, 0.8 ppb, 0.8, 0.7, 0.8 ppb, 0.8, 0.8, 0.7 ppb と 12 種の間には差がなくほぼ同じレベルにあった。

これらの結果から、ビール製造工程上、糖化の段階、麦汁から主発酵、最終製品に至る間に DMNA が生成増加する要因はないと考えられる。

4. 製麦による NNA 生成量

国産ビールに使用される乾燥麦芽は通常、輸入品が 75~80% (昭和 53 年度 87%) を占め、諸外国では麦芽の焙燥にガスバーナーを用いる直火方式でも行われている。そこで、著者らは実験方法 6 の製麦法に従って作った緑麦芽について、電気乾燥と都市ガス焙燥を行い、得られた試料中の NNA 分析を実施した。その結果を Table 3 に示した。なお試料中の水分含量が異なるため DMNA 濃度は乾燥重量に換算して示した。

DMNA が検出されなかった大麦を 13 日間かけて発芽させ、電気乾燥と都市ガスによる焙燥を試みた。緑麦芽は焙燥処理を行わない場合でも 1.0 ppb の DMNA を検出した。大麦は発芽しながら生長する段階でタンパク分解が起こり、アミンが生成増加するという報告^{(10), (11)}がある。特に、Drews ら⁽¹²⁾は麦芽中にジメチルアミンのみが生成すると報告していることから、この 1.0 ppb という値は麦芽中のジメチルアミンと二酸化窒素とが麦

芽生育過程で反応したものと思われる。次にこの緑麦芽を電気乾燥器に入れ、24 時間 50° に加温しても DMNA 生成量は 1.1 ppb でほとんど増加が認められなかった。さらに 3 時間ずつかけて 70° および 85° と二段階に温度を上昇させ、それぞれの試料を分析したところ、DMNA はやや増加したものの 1.6 ppb および 2.3 ppb と 2 倍程度の増加に止まった。

一方、都市ガス焙燥により同様の条件で温度を上昇させ DMNA を分析したところ、温度の上昇とともに生成量は増加した。すなわち、50° では 5.8 ppb, 70° では 8.9 ppb, 85° では 13.8 ppb の値を示し、電気乾燥の場合に比べ数倍高い DMNA 生成が見られた。このことは長谷川ら⁽¹³⁾が明らかにしているように都市ガスの燃焼により発生する NO_x 成分による影響が大きいことを示唆している。

実際のビール麦芽焙燥温度と同一条件である 85° 焙燥により得られた麦芽の DMNA 値 13.8 ppb は Scheme 1 に示した製造法に用いていた原料麦芽の DMNA 含有量 (平均 16.4 ppb) とほぼ同じレベルであった。

結 論

市販されているほとんどのビールから平均約 2 ppb の DMNA を検出した。その DMNA の由来は主原料である乾燥麦芽に含まれる DMNA が移行したものであり、この事実はホップの添加、主発酵および熟成など製造工程の各段階においては DMNA の生成増加がみられなかったことおよび麦芽の焙燥実験により明らかにすることができた。

一般に、ビール製造においては使用する乾燥麦芽量に対して約 9 倍量のビールが作られるが、今回得られた結果から、麦芽の乾燥や焙燥の条件を検討することにより原料麦芽ならびに製品中の DMNA 含有量を少なくすることができる。

文 献

- 1) Gough, T. A., Webb, K. S., Coleman, R. F.: Nature, **272**, 161~163 (1978).
- 2) Fine, D. H., Rounbehler, D. P., Belcher, N. M., Epstein, S. S.: Science, **192**, 1328~1330 (1976).
- 3) Fan, T. Y., Goff, U., Song, L., Fine, D. H.: Fd. Cosmet. Toxicol., **15**, 423~430 (1977).
- 4) Fine, D. H., Ross, R., Rounbehler, D. P., Silvergleid, A., Song, L.: Nature, **265**, 753~755 (1977).
- 5) Wang, T., Kakizoe, T., Dion, P., Furrer, R., Varghese, A. J., Bruce, W. R.: *ibid.*, **276**, 280~281 (1978).
- 6) 真木俊夫, 田村行弘, 嶋村保洋, 西垣 進, 直井家壽太: 東京衛研年報, **28-1**, 145~148 (1977).
- 7) 真木俊夫, 田村行弘, 嶋村保洋, 西垣 進, 直井

Table 3. Occurrence of DMNA in Barley and Its Malt Dried with Electric Desicator or Kilned with Fuel Gas

Samples	DMNA (ppb)	Moisture (%)
Barley	n.d.	8
Green malt	1.0	41
Elec. desi. 50° 3h	1.0	31
Kilned 50° 3h	5.8	34
Elec. desi. 50° 24h	1.1	20
Elec. desi. 70° 3h	1.6	7
Kilned 70° 3h	8.9	7
Elec. desi. 85° 3h	2.3	4
Kilned 85° 3h	13.8	4

n.d., not detected

- 家壽太: 同上, 29-1, 256~260 (1978).
- 8) 真木俊夫, 田村行弘, 嶋村保洋, 小関正道, 西垣進, 直井家壽太: 同上, 30-1, 145~148 (1979).
- 9) Spiegelhalder, B., Eisenbrand, G., Preussmann, R.: *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 17, 29~31 (1979).
- 10) 日本醸造協会編: 新版“醸造成分一覽” p. 215 (1977), 日本醸造協会発行
- 11) *Brauwelt-Report*, 5, (1), 137~138 (1979).
- 12) Drews, B., Just, F., Drews, H.: *Proc. European Brewery Conv.* 172, 167~172 (1957).
- 13) 長谷川利雄, 城戸勝義, 小猿和男: 公害と対策, 12, (10), 82~92 (1979).