

# 酒類の安全性に関する調査

## -4-メチルイミダゾール、セミカルバジド、1,3-ジクロロプロパノールおよび一般微生物の分析-

後藤 邦康

### Analysis of 4-Methylimidazole, Semicarbazide, 1,3-Dichloropropanol and Microbes in Alcoholic Beverages

Kuniyasu GOTO

#### 緒 言

当所で買上げを行った市販酒類中の4-メチルイミダゾール（以下4-MI）、セミカルバジド（SEM）、1,3-ジクロロプロパノール（1,3-DCP）および一般微生物の調査結果について示す。

4-MIは2007年に米国国家毒性プログラム（National Toxicology Program : NTP）の長期動物実験の調査等の結果、変異原性は不検出であるが、発ガン性が疑われる物質とされた<sup>1)</sup>。アンモニアを使用した飼料やカラメル化色素、醤油や黒ビールやワインを含む発酵食品に存在するといわれている<sup>2)3)</sup>が、清酒についての報告はない。

SEMは動物用抗菌剤であるニトロフラゾンの代謝物として生成され、欧州連合（EU）では畜水産食品中のSEMを指標として、ニトロフラゾンの使用の有無の判断を行っているが、SEM自身にも動物実験の結果、弱い遺伝毒性と高用量投与時に弱い発ガン性を示すことが指摘されている。一方、2003年にプラスチック製パッキング（パッキン抽出物からは1～7mg/kg検出）を包装に使用した食品中からSEMの存在が見出され（検出せず～20 $\mu$ g/kg）、特にベビーフード等殺菌処理した瓶口の広い製品からの高い濃度の検出例が多いとされている<sup>4)5)</sup>。国内においては瓶口の広いワンカップ型の酒類が多く販売されているが、SEM含有に関する調査例はない。

1,3-DCPは3-モノクロロ-1,2-プロパンジオール（3-MCPD）とともにクロロプロパノール類に含まれ、動物実験により発ガン性が懸念されている。クロロプロパノール類は1970年代後半に酸加水分解植物性タンパク質（アミノ酸液）を用いた

醤油等の調味料中に見出され、現在低減に対する取り組みがなされている。一般に、アミノ酸液を使用していない本醸造醤油やパン等からも少量検出されることから発酵食品中に微量生成する可能性があるとされている<sup>6)</sup>が、酒類に関するデータはあまり蓄積されていない。

また、昨年度<sup>7)</sup>に続き市販酒類中の一般微生物についても引き続き調査を実施した。

#### 材料と実験方法

1. 4-メチルイミダゾール（4-MI）：市販清酒16点について、細孔サイズ0.22 $\mu$ mのミリポアフィルター（Advantec DISMIC-25AS）でろ過し、試料とした。Ciolinoの方法に基づき<sup>8)</sup>、第1表の条件、1-オクタンスルホン酸Na（和光純薬(株) イオンペアクロマトグラフ用）を用いたイオンペアクロマトグラフ法で、分離し215nmの吸光度の測定を行った。なお、HPLC分析には島津製作所社製LC-10Aシステムを用いた。使用試薬については蒸留水（和光純薬(株) HPLC用）、メタノール（和光純薬(株) HPLC用）、4-MI（和光純薬(株) 1級）、その他の試薬については特級試薬を用いた。絶対検量線法で

第1表 4-メチルイミダゾールのHPLC分析条件

カラム条件	ODS $\phi$ 4.6mm $\times$ 250mm（関東化学(株) Mightysil RP-18 GP, 5 $\mu$ m） カラム温度 40 $^{\circ}$ C
移動相	1 mL/min 0.05M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -5 mM 1-オクタンスルホン酸Na（塩酸でpH3.0に調整）：メタノール（9：1）
検出条件	吸光度 215 nm

第2表 セミカルバジドのLC/MS分析条件

カラム条件	ODS-3 φ2.1mm×100mm (GL Science Inertsil, 4 μm) カラム温度 40℃
移動相	0.2 mL/min A液: 0.5 mmol/L 酢酸アンモニウム B液: アセトニトリル グラジエント B液20% →15分→80% (5分間保持)
イオン化条件	イオン化法 ESI (+) イオン化電圧 5500V
測定モード等	SIM <i>m/z</i> 209/166 (SEM) 212/168 (SEM- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> <sup>15</sup> N <sub>2</sub> )

第3表 1,3-ジクロロ-2-プロパノールのGC/MS分析条件

カラム条件	DB-WAX φ0.25mm×30m(膜厚0.25μm) カラム温度 70℃ (1 min) →10℃ / min →280℃
移動相	He 1 mL/min
イオン化条件	イオン源温度230℃・イオン化電圧70eV・イオン化法EI
測定モード等	SIM <i>m/z</i> 79

測定し、4-MI 保持時間付近で0.1mg/L を超える可能性のある試料について標準添加法により再測定を行い、標準物質の保持時間の吸光度より定量した。

2. セミカルバジド (SEM) : 試料としては市販ワンカップ型酒類9点 (清酒7点、焼酎1点、梅酒1点) を用いた。SEM は低分子量で極性が高いため、Leitner らの方法<sup>9)</sup>に基づきニトロベンズアルデヒド (NBA) 誘導體化を行った後、LC/MS により測定を行った。つまり、試料5gに0.1M HCl 10mL、アセトニトリル20mL、NaCl 5g およびサローゲート物質としてセミカルバジド (<sup>13</sup>C<sub>1</sub><sup>15</sup>N<sub>2</sub>) を加え、10分間振とう抽出し、アセトニトリル層を分取した。これにジメチルスルホキシドに溶解したニトロベンズアルデヒド添加し、37℃で16時間静置し、NBA 誘導體化を行った。pH を調整した後、珪藻土カラムに吸着させ、酢酸エチルで溶出、濃縮乾固し、アセトニトリルで定容し、第2表のLC/MS 条件により定量を行った (分析は財団法人日本食品分析センター (試験成績書発行番号第208091931号) により実施)。

3. 1,3-ジクロロプロパノール (1,3-DCP) : 試料

には市販酒類11点 (清酒4点、焼酎1点、ビール類5点、赤ワイン1点) を用いた。試料4gに蒸留水20mL およびNaCl 8g 添加し、酢酸エチル4mL を加え、1分間振とうし、酢酸エチル層を試験溶液とした。第3表のGC/MS 条件により定量を行った (分析は財団法人日本食品分析センター (試験成績書発行番号第209021283号) により実施)。

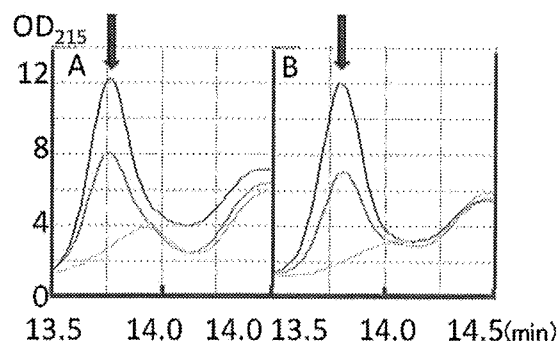
4. 微生物分析: 平成20年度買上げた市販酒37点 (清酒25点、焼酎6点、梅酒5点、赤ワイン1点) について、前報<sup>11)</sup>に基づき、一般微生物および大腸菌群の測定を行った。

## 結果と考察

### 1. 4-メチルイミダゾール (4-MI)

4-MI の保持時間は13.7-13.8分であり、清酒中には14.0分付近に夾雑ピークが生じる場合があった。夾雑ピークの影響で絶対検量線法では0.1mg/L 程度が定量限界となり、試料16点中4点に定量限界以上の4-MI を含む可能性が否定できなかった。確認のためこの4点について、標準の4-MI を終濃度0~0.5mg/L になるように添加し調整した試料について、吸光度の変化から濃度を求めた (第1図)。その結果、最大でも70μg/L を超えるものは存在しなかった。

なお、4-MI の発ガン性はマウスで異常が認められる最小摂取量は312 mg/kg 体重/日とされている<sup>1)</sup>。一方、他の食品の調査結果では1981年の国内調査では海苔の佃煮やとんかつソース等に3 mg/kg程度見出された報告<sup>2)</sup>や2006年の海外調査で



第1図 4-メチルイミダゾールを添加した清酒のHPLCクロマトグラム

矢印は標準物質 (0.25, 0.5mg/L 添加) の溶出ピークを示す。HPLC への注入量は20μL。  
A: 保持時間の吸光度から絶対検量線法で0.1mg/L (定量限界) 以上の可能性のある清酒  
B: 定量限界以下の清酒

は濃度の高いものとしてはコーヒー（調査点数10点 0.3-20.5mg/kg）や濃色系ビール（調査点数7点 1.58～28.03mg/kg）がある<sup>3)</sup>。また、醤油やワイン等についても存在が確認されているが、今回の市販清酒の調査結果では4-MIの清酒中の濃度は最大でも70 $\mu$ g/L以下と他の食品に比べて低いものであった。

## 2. セミカルバジド (SEM)

今回の分析での定量限界は1 $\mu$ g/kgであり、調査試料9点すべてに定量限界以上の検出が認められ、平均値と標準偏差は10.6 $\pm$ 5.9 $\mu$ g/kg（検出範囲は5～21 $\mu$ g/kg）であった。調査対象は、アルコール分12～16%、製造年月より製造後1～17カ月（焼酎、梅酒不表示）、容量180～200mLの製品であった。さらに、開栓後ノギスにより瓶口直径を測定した結果を第4表に示す。今回調査した項目と酒類中のSEM濃度に影響を与える要因は見出されなかった。

なお、広口瓶製品にSEMが多く存在する原因がふたのシールに使われる発泡剤（アゾジカルボナミド (ADC)）の熱処理中に生成することが知られている。また、SEMは動物実験の結果、弱い遺伝毒性と高用量投与時に弱い発ガン性が指摘されているため、EUでは予防措置としてベビーフード容器へのADC使用抑制と代替物の開発を勧告し、2005年にはプラスチックへのADCの使用を禁止している。SEMはニトロフラゾンの代謝物、ADCの熱分解以外に、次亜塩素酸処理した加工品や天然物中にも微量存在することが見出されている。しかし、SEM自身の変異原性は確

認されているものの、遺伝子障害性の発ガン物質ではなく公衆衛生上の脅威ではないとされている<sup>4)</sup>。ベビーフードを中心とした海外の調査結果では平均値として10 $\mu$ g/kg前後（最大値で140 $\mu$ g/kg）、国内（2003～2004年調査）ではベビーフードで17 $\mu$ g/kg（検出範囲6-42 $\mu$ g/kg）、他の食品では海藻やエビから1 $\mu$ g/kg前後検出されている<sup>5)</sup>。今回の結果、瓶詰めベビーフードと同様な構造を持つワンカップ型酒類中のSEMの調査を行ったが、その濃度はベビーフード等に比べて同等もしくは低い値となった。

## 3. 1,3-ジクロロプロパノール (1,3-DCP)

市販酒類11点（清酒4点、焼酎1点、ビール類5点、赤ワイン1点）について、定量限界5 $\mu$ g/kgで測定を行った。その結果、定量限界以上のものは存在しなかった。

なお、1,3-DCPは大量・長期接摂取により発ガン性・遺伝毒性があるとされ、平均摂取量0.051 $\mu$ g/kg体重/日（高摂取者0.136 $\mu$ g/kg体重/日）とされている。ガン発症率を10%増加させるための投与量の95%信頼下限値は3.3mg/kg体重/日である。ガン発症率を上げる可能性のある信頼下限値（3.3mg/kg体重/日）と平均摂取量（0.051 $\mu$ g/kg体重/日または0.136 $\mu$ g/kg体重/日（高摂取者））から、暴露マージン（信頼下限値 $\div$ 平均摂取量）を求めると平均摂取時で約65,000、高摂取者で約24,000とされ、緊急性は3-MCPDに比べると低いとされている<sup>6)</sup>。農林水産省の「自製アミノ酸液を使用した醤油中の1,3-DCP」の調査では2005年度平均値3 $\mu$ g/kg（分析点数40点、検出数7点、

範囲4未満～22 $\mu$ g/kg）と報告され、オーストラリア、ニュージーランドでの実態調査ではアミノ酸液を含まない牛挽肉、ハム、ソーセージ類からも検出され、最大値0.11mg/kgと報告されている<sup>10)</sup>。

今回の分析結果では定量できる試料はなかったが、体重50kgの人が定量限界5 $\mu$ g/kgを含む酒類を飲用した場合、ガン発症率を増加させる危険のある3.3mg/kg体重/日を超えるには毎日33000Lを飲用することとなる。

第4表 市販酒類中のセミカルバジド濃度と他の要因

	種類	SEM( $\mu$ g/L)	容量(mL)	アルコール分(%)	詰後*(月)	口径(mm)
1	清酒	14	200	13-14	6	56
2	清酒	8	200	15	17	56
3	清酒	21	180	13-14	5	53
4	清酒	11	180	13-14	12	56
5	清酒	18	180	14	5	56
6	清酒	7	180	14	1	56
7	清酒	6	180	15-16	2	64
8	焼酎	5	200	12	-	54
9	梅酒	5	160	14	-	54

\*：製造年月より

#### 4. 微生物検査結果

平成20年度買上げた市販酒37点（清酒25点、焼酎6点、梅酒5点、赤ワイン1点）について、一般微生物および大腸菌群について検査を行ったところ、大腸菌群についてはすべて不検出であった。一般微生物については清酒7点、焼酎1点、計8点について検出され、検出された製品中の生菌濃度は平均2.75cfu/mL（検出範囲1～6cfu/mL：コロニー形成数/mL）であった。3年継続して検出される製造場はあるものの<sup>7)11)</sup>、生菌濃度が極端に変動するもの（連続して検出された製造場の一般微生物濃度1～4cfu/mL）でもなかった。なお、今回検出された最大の濃度でも6cfu/mLと水道水の水質基準の一般細菌基準値（100cfu/mL以下）より十分低い値であった。

#### ま と め

市販酒類中の4-メチルイミダゾール（以下4-MI）、セミカルバジド（SEM）、1,3-ジクロロプロパノール（1,3-DCP）および一般微生物についての調査を行った。4-MIについては市販清酒16点中4点について存在の可能性が示されたが、最大でも70 $\mu$ g/kg以下の濃度であった。SEMについてはワンカップ型清酒7点、焼酎、梅酒各1点計9点を定量限界1 $\mu$ g/kgでの分析を行い、全試料定量限界以上の濃度を示し、平均値10.6 $\mu$ g/kg（検出範囲5～21 $\mu$ g/kg）となったが、他の食品と比較して高いものではなかった。1,3-DCPについては清酒4点、ビール類5点、焼酎、赤ワイン各1点計11点を定量限界5 $\mu$ g/kgで分析を行ったが、すべて定量限界以下の結果となった。微生物検査については清酒25点、焼酎6点、梅酒5点、赤ワイン1点計37点について調査したところ、大腸菌群はすべて不検出であったが、一般微生物では清酒7点、焼酎1点計8点について検出された。検出された製品中の生菌濃度は平均2.75cfu/mL（検出範囲1～6cfu/mL）であった。

#### 参 考 文 献

1) National Toxicology Program (NTP, 2007). Toxicology and Carcinogenesis Studies of 4-Methylimidazole (CAS No. 822-36-6) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). NTP Technical Report Series No. 535. NIH Publication No. 07-4471. U.S.

Department of Health and Human Services, NTP, Research Triangle Park, NC.

- 2) 吉川俊一, 藤原光雄: 薄層クロマトグラフィーによる食品中の4(5)-メチルイミダゾールの分析, 食衛誌, 22, 189-196 (1981)
- 3) Klejdus B. ら: Solid-phase extraction of 4(5)-methylimidazole (4MeI) and 2-acetyl-4(5)-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-imidazole (THI) from foods and beverages with subsequent liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric quantification., J. Sep. Sci., 29, 378-384 (2006)
- 4) 厚生労働省「食品中のセミカルバジド」:  
<http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/chemical/semicarbazide/sem.html>
- 5) 食品安全委員会「食品健康影響評価結果通知について（府食第461号平成19年5月10日）」:  
[http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-tuuchi-nitrofurazone\\_k\\_190115.pdf](http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-tuuchi-nitrofurazone_k_190115.pdf)
- 6) 農林水産省「食品中のクロロプロパノール類に関する情報」:  
[http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/c\\_propanol/index.html](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/c_propanol/index.html)
- 7) 後藤邦康: 外因性内分泌かく乱物質と一般微生物の分析, 酒類総合研究所報告, 180, 43-56 (2008)
- 8) Ciolino L. A.: Determination and Classification of Added Caramel Color in Adulterated Acerola Juice Formulations, J. Agric. Food Chem., 46, 1746-1753 (1998)
- 9) Leitner A, Zöllner P, Lindner W.: Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A, 939, 49-58 (2001)
- 10) 農林水産省「食品に含まれているクロロプロパノール類」・「含有実態調査結果の概要について」:  
[http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/c\\_propanol/report.html](http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/c_propanol/report.html)
- 11) 後藤邦康: 酒類および清酒粕中のアスベストと一般微生物の分析, 酒類総合研究所報告, 179, 44-48 (2007)