

Scotter らが総説で紹介している⁴⁾。

ソルビン酸はチーズ、魚肉ねり製品、くん製品、あん類、漬物類、果実酒、乳酸菌飲料等々、多くの食品の保存料として使われているが上記の種々の知見から、食品成分との相互作用が考えられる。そこで食品成分として最も普遍的なもののひとつであるアミノ酸を取り上げ、ソルビン酸との相互作用による消長調査を行なうことにした。

B. 研究方法

1. 概略

(1) 少量の試料を数十秒間で数十度に加熱あるいは加温することができ、その操作のくり返しが可能な方法として、マイクロ波加熱器（電子レンジ）の応用が考えられる。そこで試料の量およびマイクロ波暴露時間の最適条件を求めた。

(2) ソルビン酸（図1）は炭素数6の2価不飽和脂肪酸であり、その2重結合はトランス型の共役構造を持つ平面分子である。この極めてユニークな構造を持つソルビン酸は比較的化学反応性に富む物質であり、保存料としての静菌作用⁵⁾との関連においても関心が持たれる。

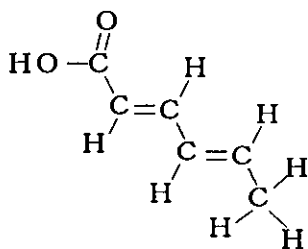


図1 ソルビン酸

2. 試薬及び試験溶液の調製

(1) 試薬

ソルビン酸（和光純薬工業：特級）、アミノ酸（BIOMEDICAL 製）、メタノール（和光純薬工業：液体クロマトグラフィ一用）、リン酸（和光純薬工業：特級）、純水は実験室で製造した超純水を用いた。

(2) 試験溶液の調製

ソルビン酸標準液：100mg を秤取しメタノール 10mL に溶解した後、純水で 100mL とした【1,000 μ g/mL】。グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トリプトファン、システイン並びにメチオニンの各アミノ酸溶液：各アミノ酸 100mg を秤取し純水で 10mL とした【10,00 μ g/mL】。これを 1 mL 取り純水で 10mL とした【1,000 μ g/mL】。ソルビン酸と各アミノ酸との混合液：ソルビン酸 1,000 μ g/mL を 1 mL、各アミノ酸 10,000 μ g/mL を 1 mL 加え純水で 10mL とし、ソルビン酸+各アミノ酸混合液を個別に調製した【ソルビン酸 100 μ g/mL+各アミノ酸 1,000 μ g/mL】。ソルビン酸とシステイン混合液：ソルビン酸 1,000 μ g/mL を 1 mL とシステイン 1,000 μ g/mL を 1 mL 加え純水で 10mL に調整した【ソルビン酸 100 μ g/mL+システイン 100 μ g/mL】、並びにソルビン酸 1,000 μ g/mL を 1 mL とシステイン 10,000 μ g/mL を 1 mL 加え純水で 10mL にした【ソルビン酸 100 μ g/mL+システイン 1,000 μ g/mL】。

3. 装置

(1) マイクロ波加熱器（電子レンジ）
Imaflex MO-0341 今西金属工業株式会社

製の固定照射式を用いた。使用電圧:100V、高周波出力:400W、発振周波数:2450MHz、定格消費電力:800W、加熱室:幅 245mm、奥行 247mm、高さ 168mm。本装置は、タイマーを作動させておけば、装置内の照射皿上に試料の入ったガラス瓶を置き、扉を閉じた瞬間から照射が始まり、停止ボタンを押した瞬間に照射が終了する。ストップウォッチを用いれば、秒単位の照射が可能である。

(2) UV 検出器付き高速液体クロマトグラフ

送液ポンプ:島津製作所製 LC-9A

UV検出器:島津製作所製 SPD-6A

データ処理:島津製作所製 C-R6A クロマトパック

カラムオープン:クロマトサイエンス製 CS-300B

カラム:日本分光製 Crest Pack C18S

(5 μ)、4.6mm I. D. x15cm

移動相:0.05%リン酸含有 50%メタノール水

流速:0.5mL/min.

波長:254nm

カラムオープン温度:30°C

注入量:10 μ L

4. 試験操作

(1) 電子レンジでの加熱時間

褐色硬質ガラス瓶(容量 15mL、外径 22mm、高さ 50mm)に純水 3mL を注ぎ、緩めにプラスチックキャップを締めて、一定時間マイクロ波照射後、直ちに水銀温度計にて瓶内の液温を測定した。

(2) ソルビン酸と各アミノ酸の加熱操作

調製したソルビン酸と各アミノ酸の混合液を2つのグループに分けた。加熱群は電子レンジで30秒間マイクロ波照射を施した後、非加熱群とともに室温の暗所に静置した。一週間毎にそれぞれ10 μ LをHPLCで分析した。

(3) ソルビン酸の定量

ソルビン酸標準液を種々の濃度に希釈し、その10 μ LをHPLCに注入した。得られたクロマトグラムの面積から、絶対検量線法で作成した検量線から定量した。

C. 研究結果

1. マイクロ波照射時間と液温

電子レンジの照射皿の上に、試料を入れた褐色ガラス瓶を置き、マイクロ波を10秒から35秒まで照射した直後の液温を図2に示す。

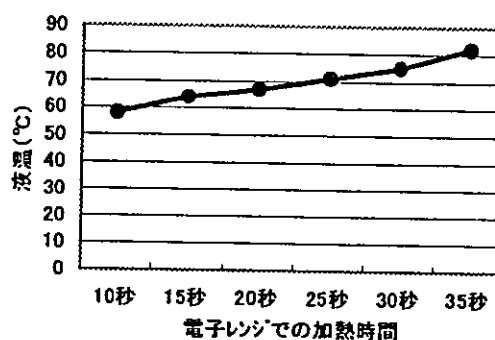


図2. 電子レンジでの加熱時間と液温

本ガラス容器中の3mLの水(水温24°C)は30秒間の照射で80°C近くにまで達した。80°Cを越えると、瓶内液の蒸発が激しくなり濃縮されることが懸念されたため、電子レンジによる加熱時間を30秒とした。

2. ソルビン酸および各アミノ酸混合液で

のソルビン酸の消長

(1) UV 検出器付き HPLC によるソルビン酸の定量

ソルビン酸標準液のクロマトグラムとソルビン酸+システイン混合液を室温冷暗所に3週間静置した時のクロマトグラムを図3に示す。

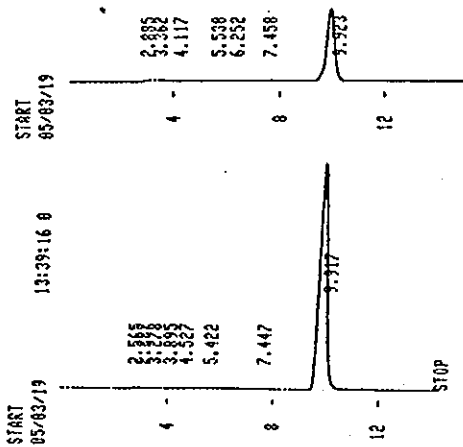


図3. ソルビン酸の HPLC クロマトグラム
 上段: ソルビン酸 100 µg/mL+システイン 1,000 µg/mL
 混合液を室温冷暗所に3週間静置した時のクロマトグラム
 下段: ソルビン酸 100 µg/mL 標準液

両クロマトグラムにはソルビン酸以外の顕著なピークは認められず保持値も一致した。

(2) ソルビン酸標準液の経時変化

ソルビン酸標準液の調製で、ソルビン酸が純水に溶解し難かったため、10%メタノール水溶液で 1,000 µg/mL を調製した。これを純水で 10 倍希釈して 100 µg/mL の標準液 (1%メタノール水溶液) とした。ソルビン酸標準液を室温冷暗所に保存し 1 週間毎の経時変化を、用時調製した標準液と比較してソルビン酸残存率(%)を求め表1に示した。

表1. ソルビン酸標準液の経時変化(残存%)

標準液	スタート時	1週間後	2週間後	3週間後
100 µg/mL	100.0%	100.2%	99.8%	99.7%

表1から室温冷暗所保存のソルビン酸は3週間ではほとんど変化のないことが認められた。

(3) ソルビン酸とシステイン以外のアミノ酸混合液の経時変化

室温冷暗所保管したソルビン酸と各アミノ酸の個別混合液について、ソルビン酸の経時的変化を調べた結果を表2に示す。

表2. ソルビン酸と各アミノ酸混合液でのソルビン酸の経時変化(残存%)

	スタート時	1週間後	2週間後	3週間後
Gly	100	96	96	94
Ala	100	96	95	94
Val	100	99	99	99
Leu	100	98	97	96
Ile	100	98	98	98
Ser	100	95	94	93
Try	100	101	101	101
Met	100	98	98	98

Gly: グリシン 1000 µg/mL+ソルビン酸 100 µg/mL の混合液

Ala: アラニン 1000 µg/mL+ソルビン酸 100 µg/mL の混合液

Val: バリン 1000 µg/mL+ソルビン酸 100 µg/mL の混合液

Leu: ロイシン 1000 µg/mL+ソルビン酸 100 µg/mL の混合液

Ile: イソロイシン 1000 µg/mL+ソルビン酸 100 µg/mL の混合液

Ser: セリン 1000 µg/mL+ソルビン酸 100 µg/mL の混合液

Try: トロプトファン 1000 µg/mL+ソルビン酸 100 µg/mL の混合液

Met: メチオニン 1000 µg/mL+ソルビン酸 100 µg/mL の混合液

経時的劣化の最も大きかったセリンでも3週間後のソルビン酸残存率は93%であり、比較的安定であった。

(4) ソルビン酸とシステイン混合液中

のソルビン酸の経時変化

ソルビン酸 100 $\mu\text{g/mL}$ とシステイン 2 水準 (1,000 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$) の各混合液について電子レンジ加熱したものではないものについて、1 週間毎の経時変化を調べた。加熱操作については上記の他に、システイン 10,000 $\mu\text{g/mL}$ と 1,000 $\mu\text{g/mL}$ の水溶液 3 mL をそれぞれ電子レンジ加熱した後、各 1 mL とり、これにソルビン酸を各 1 mL 加え、純水で 10 mL にした【ソルビン酸 100 $\mu\text{g/mL}$ +システイン 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 混合液及びソルビン酸 100 $\mu\text{g/mL}$ +システイン 100 $\mu\text{g/mL}$ 混合溶液】。これらの経時変化を図 4 に示す。

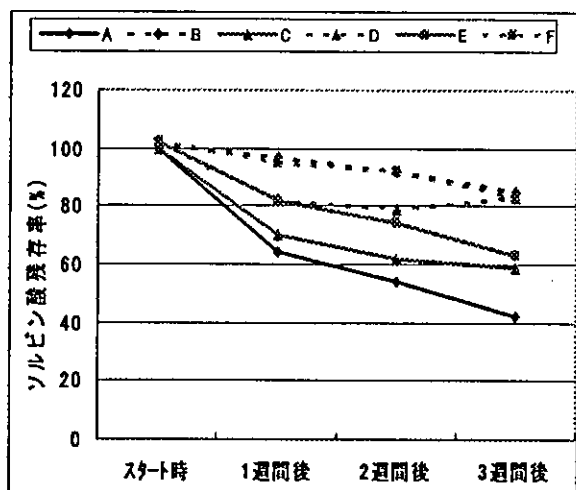


図 4. システイン共存下でのソルビン酸の経時変化

- A. (システイン 1,000 $\mu\text{g/mL}$ +ソルビン酸 100 $\mu\text{g/mL}$) 室温放置
- B. (システイン 100 $\mu\text{g/mL}$ +ソルビン酸 100 $\mu\text{g/mL}$) 室温放置
- C. (システイン 1,000 $\mu\text{g/mL}$ +ソルビン酸 100 $\mu\text{g/mL}$) 加熱後室温放置
- D. (システイン 100 $\mu\text{g/mL}$ +ソルビン酸 100 $\mu\text{g/mL}$) 加熱後室温放置
- E. (システイン 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 加熱後希釈したシステイン 1,000 $\mu\text{g/mL}$ +ソルビン酸 100 $\mu\text{g/mL}$) 室温放置
- F. (システイン 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 加熱後希釈したシステイン 100 $\mu\text{g/mL}$ +ソルビン酸 100 $\mu\text{g/mL}$) 室温放置

図 4 から、①電子レンジで加熱処理をし

ない方が加熱処理をしたものよりソルビン酸の濃度低下が顕著であった。②システインの添加量は多い方がソルビン酸の減少は大きかった。③電子レンジでの加熱はソルビン酸とシステインを混合後、加熱した方がシステインを加熱後、ソルビン酸を混合した場合よりもわずかながらソルビン酸の減少が大きかった。

D. 考察

1. 今回の予備的研究から、食品の流過程での温度変動に基づく食品添加物の変動や調理過程での変化を予測するための一つのシミュレーション法として、マイクロ波照射が有効であるかも知れないという結果が得られた。今後詳細な検討をすることにより、反復間欠的照射の影響など有益な情報が期待される。

2. ソルビン酸は世界的に広く使用されている保存料で、人体に対しては極めて安全で、酵母など微生物に対しても成長抑制を示す、いわゆる静菌作用がその有効性とされている。脂肪酸は、炭素数 2 の酢酸、4 の酪酸および 6 のソルビン酸の他、3 のプロピオン酸はいずれも食品添加物として使用されている。その中でソルビン酸はトランス型の共役 2 重結合を有する不飽和脂肪酸であるという極めてユニークな化学物質である。そのカルボキシル基は、他の有機産のカルボキシル基や、金属イオン類さらにアミン類との反応性が予想される。また不飽和脂肪酸は酸素による酸化分解とそれ由来する生成物と他の食品成分との反応も起こりえる。

3. これらの可能性を考慮し、今回ソルビ

ン酸と各種アミノ酸との水溶液中での相互作用を検討したところ、システインの存在により、ソルビン酸が急激に分解等の変化を起こしていくこと。またその変化は常温で著しいことを発見した。これは、ソルビン酸を使用する食品の製造工程においてソルビン酸の添加条件によっては、保存料としての効果を十分発揮できない場合のあることを示唆するものと思われる。

4. 今回供試した9種類のアミノ酸とソルビン酸との作用で顕著な変化が認められたのはシステインであった。ソルビン酸とチオール基との反応が推測される²⁻⁴⁾が、反応機構としてチオール基の酸化なのか、温度によるものなのか、あるいは両条件がそろって引き起こされるものか、今回の予備実験では明確でない。又、ソルビン酸が何に変化したのかその物質も特定できていない。

5. 食品に含まれるアミノ酸は一般的に20種類であるが、今回はその内の9種類しか経時変化を調べることができなかった。今後、残りのアミノ酸とソルビン酸との相互作用の検討も必要である。

E. 結論

1. 食品中の食品添加物の流通過程における消長のうち、温度変化による影響を予測する方法が浮かび上がってきた。

2. ソルビン酸を使用する場合、機械的に添加することは、その有効性を十分発揮できなくする可能性のあり得ることが示唆された。

F. 健康危機管理情報

本研究で得られた結果においては、現在健康危機管理に関する特筆すべき知見は特に無かった。わが国ではソルビン酸ナトリウムおよびソルビン酸カルシウムの使用は許可されていない。健康危害と言うより、不許可添加物の輸入については非常に厳しく管理されている。

G. 研究発表

今後、学会発表及び学会誌等に投稿する予定である。

H. 引用文献

- 1) B.R.Thakur, R.K.Singh: Food Rev. Intern.,10(1),71-91(1994)
- 2) B.L.Wedzicha and M.ABrook: Food Chem.,31,29-40,(1989)
- 3) G.D.Khandelwal and B.LWedzicha: Food Chem.,37,159-169,(1990)
- 4) M.J.Scotter and L.Castle: Food Add. Contam.,21(2),93-124,(2004)
- 5) S.Tetsumoto: J.Agr.Chem.Soc.,9, 338,569(1933)

厚生科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
分担研究報告書

食品添加物の食品中の共存物質との相互作用により生ずる分解生成物の解明
分担研究者 久保田浩樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

(研究要旨) カット野菜を次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理したときに生成するトリハロメタンなどの副生成物の挙動を明らかとするため、ヘッドスペースGC/MSを用いてカット野菜に残存する揮発性有機化合物の分析を行った。

カット野菜を次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理したところ、クロロホルムが生成し、また、微量成分としてブロモジクロロメタン及びテトラクロロエチレンの生成も確認された。クロロホルムの生成量は次亜塩素酸ナトリウムの濃度やpHの塩基性度に応じて増加し、殺菌処理の温度上昇にともない生成速度が速まる傾向がみられた。

また、殺菌効果を高めることを目的として次亜塩素酸に酸を添加して使用する場合もあるため、酸共存下における揮発性有機化合物の生成量の調査を行ったところ、リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、フマル酸添加ではクロロホルム生成量に変化はみられなかったが、クエン酸を添加して殺菌処理した場合、クロロホルム生成量が増加する傾向が認められた。しかし、殺菌処理後、カット野菜を十分な水により洗浄を行うことでクロロホルムの残存量は減少し、次亜塩素酸単独処理とほぼ同様のレベルまでクロロホルムを除去することが可能であった

A. 研究目的

次亜塩素酸ナトリウムは、野菜や魚介類加工品及び食品製造工程に用いられる装置や器具などの殺菌料として広く利用されている食品添加物である。近年、食の安全性に対する要求の高まりとともに HACCP システムが食品製造工程に導入されるようになり、この中で次亜塩素酸ナトリウムはカット野菜などの非加熱食品の微生物学的危害を防ぐ上で重要な役割を果たしている。

次亜塩素酸は古くから水道の消毒薬としても利用されてきたが、1972年に Rook らが河川水からクロロホルムを検出し¹⁾、また、河川水の塩素処理によってクロロホル

ムを始めとした様々なトリハロメタン (THM) が生成されることが明らかとなり²⁾、さらに、1976年には米国の国立癌研究所 (NCI) が動物実験の結果、クロロホルムに発癌性が認められ³⁾、THM が公衆衛生上の重要な問題として取り上げられるようになった。

現在、国際がん研究機関(IARC)による評価ではクロロホルムはヒトに発癌性を示す可能性がかなり高いとしてグループ 2B に、ジブロモクロロメタン(DBCM)がグループ 3 に、ブロモジクロロメタン(BDCM)がグループ 2 に、ブromoホルム(BF)がグループ 3 にそれぞれ分類されている。

このため各国において飲料中の THM 濃度の水質基準値が設けられ、米国 EPA では総 THM の最大許容濃度(MCL)を年間平均として 0.08 mg/l とし、最大汚染濃度目標値(MCLG)を BDCM が 0 mg/l, DBCM が 0.06 mg/l, BF が 0 mg/l に設定されており、EU では、総 THM として 0.1 mg/l に設定しており、WHO の飲料水ガイドラインでは、クロロホルムが 0.2 mg/l, BDCM が 0.06 mg/l, DBCM が 0.1 mg/l, BF が 0.1 mg/l に設定されている⁴⁾。わが国では平成 15 年に水道法の水質基準の見直しが行われ、現在 50 項目の水質基準が設けられている⁵⁾。この中で THM 類は、総 THM として 0.1mg/l, クロロホルムが 0.06 mg/l, BDCM が 0.03 mg/l, DBCM が 0.1 mg/l, BF が 0.09mg/l 以下であることが定められている。

食品中の THM 類残存量の分析については、豊田らがパーミアンドトラップ(P&T)法を用いてクロロホルム残存量を分析したのを始めいくつかの報告があり、油脂類や乳製品、野菜類などを中心に様々な食品より THM が検出されている⁶⁻⁹⁾。また、食品の次亜塩素酸ナトリウム処理に伴う THM 生成挙動の解明に関しては、日高らによる野菜中のクロロホルムの生成¹⁰⁻¹²⁾や、今枝らによる豆腐製造過程における THM 生成¹³⁾、また、Resch らによる牛乳製造プラントにおける次亜塩素酸洗浄によるクロロホルム生成挙動の解明などの報告があるが¹⁴⁻¹⁶⁾、これまでのところ THM 生成機構の詳細を解明するまでには至っていない。

近年、食品添加物の殺菌料の使用状況にも変化がみられ、2002 年に新規指定食品添加物として食塩水又は塩酸を電解することにより得られる次亜塩素酸水（いわゆる電

解水）が新たに指定され¹⁷⁾、また、昨年には次亜塩素酸ナトリウムに酸を混和して使用することが認められている¹⁸⁾。このため殺菌処理に伴う THM 生成挙動の解明も現況に合わせた調査が必要となる。そこで本研究では、食品添加物の食品中の共存物質との相互作用により生ずる分解生成物の解明として、次亜塩素酸ナトリウム処理により生成する THM などの揮発性有機化合物(VOC)に着目し、水道法により水質基準が定められている VOC23 種についてヘッドスペース GC/MS を用いて分析を行い、THM 類の生成挙動の解明に向け検討を行うこととした。

B. 研究方法

- 1) 試料 都内スーパーで購入したキャベツを幅約 1mm に細切し実験に用いた。
- 2) 試薬 揮発性有機化合物標準原液及び内部標準原液として関東化学社製の水質試験用揮発性有機化合物混合標準液 II 及びフルオロベンゼン標準原液、4-ブromofluorobenzene 標準原液を用いた。希釈溶媒には和光純薬工業社製のトリハロメタン用メタノールを用い、塩化ナトリウムは和光純薬工業社製の水質試験用を用いた。次亜塩素酸ナトリウム及びクエン酸、DL-リンゴ酸、L-酒石酸には和光純薬工業社製又は関東化学社製の食品添加物用を用い、フタル酸水素ナトリウムには和光純薬工業社製の試薬 1 級を用いた。測定用精製水には、妨害成分が含まれていないことをあらかじめ確認したエビアン（カルピス伊藤忠）を用いた。その他の試薬は特級を用いた。次亜塩素酸ナトリウムは食品添加物公定書第 7 版に従いあらかじめヨウ素滴定法¹⁹⁾で定量

し、この希釈液を次亜塩素酸ナトリウム液として用いた。

3) 器具及び装置 ヘッドスペースバイアル(20 ml)及びテフロンライナー付シリコンセプタム、アルミクリンプキャップは、Agilent Technologies 社製を用いた。オートヘッドスペースサンプラーはHewlett-Packard製のHP-7694を、GC/MSはHewlett-Packard製のHP6890/5973を用いた。全てのガラス器具は110°Cで3時間加熱後、放冷して用いた。

4) ヘッドスペース GC/MS 測定条件

ヘッドスペース条件 バイアルオープン温度:60°C, サンプルループ温度:130°C, トランスファーライン温度:170°C, バイアル加熱時間:30 min, バイアル加圧時間:0.2 min (15 psi), 注入法:スプリット(1:1)又は(1:20), スプリット比はGC/MS用試験液に含まれるTHM濃度に応じて適宜変更を行った。

GC/MS 条件 カラム:AQUATIC 60m×0.25mm I.D. 膜厚 1.0µm, カラム温度:40°C(2min)→(4°C/min)→200°C, 注入口温度:200°C, トランスファーライン温度:200°C, イオン化法:EI, イオン化電圧:70ev

5) 次亜塩素酸ナトリウム処理方法

試料2gを50mlのスクリュウキャップバイアルに採り、有効塩素濃度として100µg/mlとなるように調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液20mlを加え、直ちに密栓し、室温(25°C)で10分間放置し、殺菌処理を行った。殺菌処理後、40%アスコルビン酸ナトリウム200µl及び塩酸(1→10)2滴を加えて反応を止め、よく攪拌した後、試料を採取した。

6) GC/MS 用試験液の調製

試料をヘッドスペースバイアルに採り、塩化ナトリウム3g及び測定用精製水8mlを加え、次いでマイクロシリンジを使用して内部標準液を2µl注入し、直ちにテフロンシート付きセプタムをのせ、アルミキャップで密封し、GC/MS用試験液とした。

7) 検量線用標準液の調製

フルオロベンゼン標準原液及び4-ブロモフルオロベンゼン標準原液1mlをそれぞれ正確に少量のメタノールを入れたメスフラスコ10mlに採り、メタノールを加えて正確に10mlとし内部標準原液とした。この液1mlを正確に採り、メタノールを加えて正確に10mlとし内部標準液とした。

内部標準原液1mlを正確に少量のメタノールを入れたメスフラスコ10mlに採り、次いで、揮発性有機化合物混合標準液0, 50, 100, 200, 500, 1000µlをそれぞれ正確に採り、メタノールを加えて正確に10mlとし、検量線用標準源液とした。塩化ナトリウム3g及び測定量精製水10mlをヘッドスペースバイアルに採り、次いでマイクロシリンジを使用して検量線用標準源液を2µl注入し、直ちにテフロンシート付きセプタムをのせ、アルミキャップで密封し、検量線用標準液とした。

C. 研究結果

1) ヘッドスペース GC/MS による測定

測定対象とした揮発性有機化合物(VOC)混合標準液23種のGC/MSクロマトグラムをFig. 1に示した。35分までに全てのピークを検出することができた。このうちm-キシレン及びp-キシレンはピークが分離せず検出された。また、これらは異性体のた

めマススペクトルも類似しており分別が困難であった。このため m-キシレン及び p-キシレンは m,p-キシレンの合計量として算出することとした。なお、1,2-ジクロロエタンとベンゼンもピークが分離しなかったが、フラグメントイオンピークの m/z が異なるため、分別定量は可能であった。その他の化合物は良い分離を示した。

2) 添加回収試験

カットキャベツに VOC 混合標準液を 10 ng/g 又は 100 ng/g 添加し、添加回収実験を行った (Table 1)。オートヘッドスペースサンプラーのバイアル振とう機能を使用せず分析した場合、回収率が著しく低下したが、バイアルを強く振とうすることで、10 ng/g 添加において 7.6~10.9 ng/g, 100 ng/g 添加では 72.6~107.6 ng/g と良好な回収率が得られた。また、いずれの添加においても変動係数は 4%以内であり、分析精度も良好であった。なお、本法におけるクロロホルムの定量限界は 1 ng/g であった。

3) 次亜塩素酸処理カットキャベツの分析

本法を用いて次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理を行ったときに、試料に残存する VOC の測定を行った (Fig. 2)。試料としてカットキャベツを用い、有効塩素濃度 100 µg/ml の次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬させたところ、GC/MS クロマトグラム上の 12.8 分の位置にピークが検出された。また、このピークについてスキャンモードによるマススペクトラムの解析を行ったところ、m/z 118 に分子イオンピークが、m/z 47, 83, 85, 87 にフラグメントピークが確認され、これらは NIST ライブラリとの照合の結果、クロロホルムと同定された。なお、8.6 分に検出されたピークは、NIST ライブ

ラリーとの照合により食品成分由来の硫化ジメチルと同定された。

4) 次亜塩素酸処理に伴うカットキャベツ中の VOC 残存量の経時変化

次亜塩素酸ナトリウム溶液にカットキャベツを浸漬させ生成する VOC 量の経時的な測定を試みた (Fig. 3)。クロロホルムは、次亜塩素酸処理直後より生成され、20 分後には 70 ng/g となり、以降ほぼ一定の値を示した。また、微量であるがプロモジクロロメタン及びテトラクロロエチレンが検出された。これらはスキャンモードのマススペクトラムによる確認はできなかったが、SIM モードによる測定において標準液と保持時間が一致し、また、フラグメントピークが確認され、このフラグメントピークの相対比率も一致することから同定に至った。

5) 次亜塩素酸浸漬液の濃度に伴う VOC 生成量の変化

有効塩素濃度として 0, 50, 100, 200, 500 µg/ml の次亜塩素酸ナトリウム溶液にカットキャベツを浸漬させ、生成する VOC 量の測定を行った (Fig. 4)。クロロホルム生成量は濃度依存的に増加し、500 µg/ml 次亜塩素酸添加において 157 ng/g のクロロホルムが生成した。また、50 µg/ml 以上の添加濃度においてプロモジクロロメタンが、100 µg/ml 以上の添加濃度においてテトラクロロエチレンが検出された。テトラクロロエチレンは次亜塩素酸濃度に比例して生成量が増加する傾向が見られたが、プロモジクロロメタンの生成量は次亜塩素酸濃度によらず、ほぼ一定の値となった。

6) 次亜塩素酸浸漬液の温度に伴うクロロホルム生成量の変化

次亜塩素酸浸漬液の温度を 2, 25, 35°C に

変更し、カットキャベツを殺菌処理したときのクロロホルム生成量の変化を経時的に調べた(Fig. 5). 浸漬液の温度が 25°Cまたは 35°Cの場合、次亜塩素酸処理直後から速やかにクロロホルムが生成し、20 分後には約 70 ng/g となり、以後はほぼ一定の値を示した。一方、2°Cの浸漬液中ではクロロホルムの生成が遅く、時間経過に伴い徐々に増加していく傾向が見られ、次亜塩素酸処理 1 時間後における生成量は 45 ng/g であった。

7) 次亜塩素酸浸漬液の pH によるクロロホルム生成量の変化

次亜塩素酸浸漬液の pH を 2~12 の範囲で変更し、カットキャベツを殺菌処理したときのクロロホルム生成量の変化を調べた(Fig. 6). pH の調製には塩酸を用いた。浸漬液が酸性条件である場合、クロロホルム残存量は 19 ng/g でほぼ一定の生成量となったが、塩基性条件下では pH が高くなるにつれて、クロロホルム生成量が増加する傾向がみられた。浸漬液 pH12 におけるクロロホルム生成量は 76 ng/g であり、pH6 の 4 倍量であった。また、浸漬液が pH2 の条件において四塩化炭素が検出されたが、その他の pH 条件では検出されなかった。

8) 酸共存下におけるクロロホルム生成量の変化

次亜塩素酸ナトリウム原液は塩基性の液体であるが、酸性側において殺菌力が増すため、次亜塩素酸ナトリウム溶液に酸を添加して使用することが行われている。そこで本研究においても次亜塩素酸に各種酸を添加してカットキャベツを殺菌処理したときのクロロホルム生成量の変化を調べた(Fig. 7). 添加する酸には食品添加物としての使用が認められているクエン酸、リンゴ

酸、酒石酸、コハク酸、フマル酸水素ナトリウム、塩酸を用いた (Fig. 8). 次亜塩素酸ナトリウム溶液の pH は、文献²⁰⁾を参考に殺菌処理において一般に使用していると考えられる pH6 付近に調整した。また、次亜塩素酸ナトリウム・酸混液が調製後、直ちに使用されず、冷暗所にて数時間保存された場合を想定し、pH 調整後 0, 30, 60, 180 分間冷暗所(10°C)にて保管した貯留液を用いてカットキャベツを殺菌処理(10 分間)したときのクロロホルム残存量を測定した。

次亜塩素酸ナトリウム・酸混液を調製直後(0 min)の浸漬液を用いて殺菌処理を行った場合、次亜塩素酸単独処理に比べ、クロロホルム生成量が若干低くなる傾向が見られた。一方、酸添加後に冷暗所にて保存した混液を用いた場合では、リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、フマル酸水素ナトリウム及び塩酸を添加した混液では、次亜塩素酸単独使用の場合と大きな違いは認められなかったが、クエン酸添加した場合、時間経過と共にクロロホルム生成量が増加した。次亜塩素酸・クエン酸混液調製 3 時間後の浸漬液を用いてカットキャベツを殺菌処理したときのクロロホルム残存量は、1.2 µg/g であり、これは次亜塩素酸単独の場合の 28.7 倍であった。

また、試液のみを用いて次亜塩素酸ナトリウム溶液と各種酸を反応させ、生成する VOC 量を経時的に測定を行った (Fig. 9). リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、フマル酸水素ナトリウム及び塩酸を添加した混液では、クロロホルムはほとんど生成しなかったが、クエン酸を添加した混液のみ、時間経過と共にクロロホルムの生成量が増加する傾向

が認められ、添加 24 時間後のクロロホルム生成量は 7.1 $\mu\text{g/ml}$ であった。なお、その他の VOC は検出されなかった。

9) 水洗浄によるクロロホルム除去効果

次亜塩素酸トリウムにより殺菌処理を行った場合、食品に塩素が残存することから、十分な流水ですすぎ洗いを行うことが「大量調理施設衛生管理マニュアル」において指示されている²¹⁾。そこで、食品に残存するクロロホルムの水洗浄による除去効果について検討を行った(Table 2)。カットキャベツに対し、次亜塩素酸単独、或いは、冷暗所において 1 時間保存した次亜塩素酸・クエン酸混液を用いて殺菌処理を行い、各工程におけるクロロホルム残存量の測定を行った。殺菌処理後、クロロホルム残存量が次亜塩素酸単独では 31.9 ng/g 、次亜塩素酸・クエン酸混液では 366.0 ng/g まで増加したが、水洗浄によりそれぞれ 16.2 ng/g と 17.9 ng/g まで低下し、いずれの場合においてもクロロホルムが殆ど残存していないことが明らかとなった。

D. 考察

1) ヘッドスペース GC/MS によるカット野菜中の VOC の分析

カット野菜に含まれる VOC 残存量を明らかとするため、ヘッドスペース GC/MS を用いてカット野菜中の VOC23 種の分析を行った。本試験法の分析感度及び精度はともに良好であった。本法は多量の検体を簡便に分析が行えることから、カット野菜中の THM 分析法として有用な試験法と考えられた。ただし、今枝らは豆腐中の THM 類の残存量をヘッドスペース法を用いて分析し、回収率が著しく低下したことを報告している。これはクロロホルムなどの THM

類は低極性化合物であるため、脂溶性成分やタンパク質に吸着し、ヘッドスペースボットの気相中への移行が妨げられことが原因と考えられた。このため今後も適用可能な食品の範囲拡大に向けて、引き続き試験法の改良を行う予定である。

2) VOC 生成に関与する要因の検討

カット野菜の次亜塩素酸処理にともなう VOC の生成について解明するため、次亜塩素酸濃度、温度、pH 等の因子を様々な条件で検討を行い、VOC 生成量の変化を調べた。次亜塩素酸ナトリウムの濃度を段階的に変更してカット野菜を殺菌処理したところ、次亜塩素酸ナトリウムの濃度に応じて VOC 生成量が増加した。生成した VOC の約 97% はクロロホルムであり、この他にブロモジクロロメタンやテトラクロロエチレンが検出された。

一般に次亜塩素酸によるクロロホルムの生成メカニズムとしては、ハロホルム反応などが考えられている²²⁾、この反応ではメチルケトン構造をもつ化合物に対しメチル基を連続的に塩素化しクロロホルムを生成する(Fig. 10)。本試験ではカット野菜より滲出した成分が次亜塩素酸溶液とハロホルム反応しクロロホルムが生成したものと考えられる。クロロホルム生成に関与する主要前駆物質としては、水道水中ではフミン質などが考えられているが、食品中ではあまり明らかにされていない。しかし、その候補の一つとしては、ポリケタイドなどが挙げられている。ポリケタイドは、植物に多く含まれる成分であり、また、活性メチレン基をもつためハロホルム反応を受けやすく、反応の初期段階において関与している可能性が高いと考えられる。

ブロモジクロロメタンが生成した原因としては、一般に反応溶液中に臭素イオンが多く共存する場合、ブロモジクロロメタンや、ジブロモクロロメタン、ヨードホルムなどが同時に生成することが知られており²³⁾、試料に残存していた臭素イオンが酸化され臭素化合物となり、次亜塩素酸と競合的に反応し生成したものと思われる。ただし、本試験では、あらかじめ十分な精製水により洗浄処理をしたカットキャベツを使用しており、土壌由来などの臭素イオンの混入もなく臭素化 THM の生成は低く抑えられていると考えられる。通常、野菜等の殺菌処理工程においても、流水で十分洗浄した後に殺菌処理を行うことが指示されており²¹⁾、食品中の臭素化 THM の生成量も低いと予想される。

次亜塩素酸溶液の pH による THM 生成量についてみると、次亜塩素酸溶液が塩基性条件において THM の生成量が増加する傾向が見られた。これはハロホルム反応のメカニズムにおいて、カルボアニオンの形成(Fig. 10 反応①)及び加水分解(Fig. 10 反応②)の反応に水酸化物イオンが関与するため塩基性条件下において反応が進行したと考えられる²⁴⁾。また、塩基性条件下では次亜塩素酸が次亜塩素酸イオンに解離するため反応活性が低下するとの報告もあるが²⁵⁾、本実験では pH12 の条件において THM の生成量が最も高まっており、イオン解離の影響はあまり受けていないと思われる。また、pH2 の条件では四塩化炭素が検出された。同様の報告が市川らにおいても示されており²⁶⁾。強酸性条件では四塩化炭素が生成しやすいと考えられる。

また、殺菌処理温度と THM 生成の関係

では、温度が高いほど THM 生成反応が早く進行した。同様の報告が既に多くの研究者により示されており^{11,13)}、THM 生成量のコントロールには低温での殺菌処理が重要であることが再確認された。しかし、微生物に対する殺菌力と温度の関係から考えた場合、温度が高いほど殺菌効果が高く²⁷⁾、微生物学的危害と化学的危害の両面から殺菌処理に最適な温度を考えていくことが今後必要になるとと思われる。

3) 酸共存下におけるクロロホルムの生成

次亜塩素酸ナトリウムに食品添加物として使用が認められている各種酸を添加したときの THM 生成量を調べた。次亜塩素酸溶液に塩酸を添加した場合、次亜塩素酸単独処理に比べクロロホルムの生成量が低く抑えられる傾向が見られた。これは前述の pH と THM 生成量の関係において述べたように、酸性条件ではハロホルム反応の進行が遅くなるためと考えられる。また、次亜塩素酸に有機酸を添加した場合、リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、フマル酸ではクロロホルム生成量に大きな変化は見られなかったが、クエン酸添加した場合、経時的なクロロホルムの生成量の増加が確認された。

これはクエン酸が次亜塩素酸と反応しクロロホルムが生成したためであり、同様の結果を Larson²⁸⁾らが環境水のモデル実験において既に明らかにしている。また、Streicher らは、その反応過程の一部を解明し、Fig. 11-a に示した反応メカニズムを提示している²⁹⁾。これによれば最初にクエン酸が次亜塩素酸により酸化されアセトンジカルボン酸となり、さらに酸性条件下にエノール化され、求電子付加反応に基づき 2 位及び 4 位の炭素が塩素化され、脱炭酸を

経てペンタクロロ-2-プロパノン等が生成し、最終的にクロロホルムが生成したと予想している。

しかし、Streicherらは酸性条件(pH4付近)において1,1,3,3-テトラクロロ-2-プロパノン、ペンタクロロ-2-プロパノン及びクロロホルムが主要な生成物として生成し、中性条件(pH7付近)ではクロロホルムのみが生成してくるなど、pH条件により主要生成物が異なってくることも明らかとしており、pH条件により異なる反応メカニズムに基づいてアセトンジカルボン酸の塩素化反応が進行していることも考えられる。

Fig.11-bに塩基性条件において考えられる反応メカニズムを示した。塩基性条件ではクエン酸が次亜塩素酸により酸化されアセトンジカルボン酸が生成した後、ハロホルム反応に基づき塩素化反応が進行し、最終的にクロロホルムが生成することが考えられる。この場合、クエン酸の2位又は4位炭素の一方のみが塩素化されるため、クロロプロパノン化合物は生成しないと予想される。本研究はpH6の微酸性条件で検討しているが、これまでにクロル化プロパノン化合物は検出されていない。このためハロホルム反応の関与も考えられることから、クロロホルムの生成メカニズムについては引き続き調査を行う予定である。

また、リンゴ酸はクエン酸の一部と同じ構造を有しているにもかかわらず、クロロホルムは生成されなかった。この理由としては、クエン酸が次亜塩素酸の酸化によりケトン化合物が生成したのに対し、リンゴ酸が酸化された場合、3-オキソプロパネートのアルデヒド化合物が生成することが予想され、このため塩素化反応が進行せず、

クロロホルムが生成しなかったと考えられる。また、その他の有機酸に関しても同様にその構造的な理由から塩素化反応は進行しにくいと考えられる。ただし、フマル酸については、次亜塩素酸処理により付加反応が進行し、ジクロル体やクロルヒドリン体の生成が予想されることから、今後、LC/MS等で確認を行う予定である。

カットキャベツの殺菌過程において生成したクロロホルムは、水洗浄工程を加えることで除去することが可能であった。この結果は、次亜塩素酸・クエン酸混液で殺菌処理を行った場合でも同様であり、次亜塩素酸単独とほぼ同様のレベルまでカットキャベツに残存するクロロホルムを取り除くことができた。今回の実験はモデル実験であり、必ずしも実態を反映したものではないが、十分な水で洗浄を行えば水道水中のクロロホルム残存量と変わらないレベルまでは残存量を減らすことは可能と考えられる。また、クロロホルムは揮発性であることから、密閉系に保存されない限り大気中に揮散すると考えられるため、カット野菜のような脂溶性成分を含まない食品においては、最終製品にはほとんど残存していないと予想される。

E. 健康危険情報

なし

F. 参考論文

- 1) Rook, J.J.: Water Treatment and Examination, 21(3), p259 (1972)
- 2) Rook, J.J.: Water Treatment and Examination, 23(2), p234-243 (1974)
- 3) National Cancer Institute Report on

- Carcinogenesis Bioassay of Chloroform:
(1976)
- 4) Susan D. Richardson: Trends in Analytical Chemistry, 22(10), p666-684 (2003)
 - 5) 厚生労働省令第百一号:水質基準に関する省令 (2003)
 - 6) Toyoda, M., Ishizaka, T., Saito, Y.: 食品衛生学雑誌, 27(3), p245-241 (1986)
 - 7) Tamakawa, K. et al.: 食品衛生学雑誌, 29(2), p156-160 (1988)
 - 8) Miyahara, M. et al.: J. Agric. Food Chem., 43(2), p320-326 (1995)
 - 9) René Imhof et al.: Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 85, p681-703 (1994)
 - 10) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 32(4), p308-314 (1991)
 - 11) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 33(3), p267-273 (1992)
 - 12) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 35(4), p357-364 (1994)
 - 13) Imaeda, K. et al.: 衛生化学, 40(6), p527-533 (1994)
 - 14) Tiefel, P., Guthy, K.: Milchwissenschaft, 52(12), p686-691 (1997)
 - 15) Resch, P., Guthy, K.: Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 95, p418-523 (1999)
 - 16) Resch, P., Guthy, K.: Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 96, p9-16 (2000)
 - 17) 官報 第 3378 号、厚生労働省令第七十五号、p1 (2002)
 - 18) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知:食安基発第 0825001 号 (2004)
 - 19) 厚生省:食品添加物公定書第 7 版, p269 (1999)
 - 20) 長谷川美典: カット野菜ハンドブック, p170-173 (2002)
 - 21) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知:大量調理施設衛生管理マニュアル,食安発第 0829008 号(2003)
 - 22) Sykes, P.: Reaktionsmechanismen der organischen Chemie. Einführung, VCH Weinheim (1988)
 - 23) Krasner, S. W. et al.: J. Am. Water Works Assoc., 81, p41-53
 - 24) 丹保憲仁: 水道とトリハロメタン, p121-122 (1983)
 - 25) Dore, A. et al.: J. Am. Water Works Assoc., 74, p103-107 (1982)
 - 26) Ichikawa, T. et al.: Chemosphere, 14(9), p1319-1326 (1985)
 - 27) 日本食品洗浄剤衛生協会: 次亜塩素酸ナトリウム, p13-15 (2002)
 - 28) Larson, R. A. et al.: Environmental Science and Technology, 13(3), p325-329 (1979)
 - 29) Streicher, R. P. et al.: Analytical Letter, 19(5-6), p681-696 (1986)
- G. 研究発表
なし

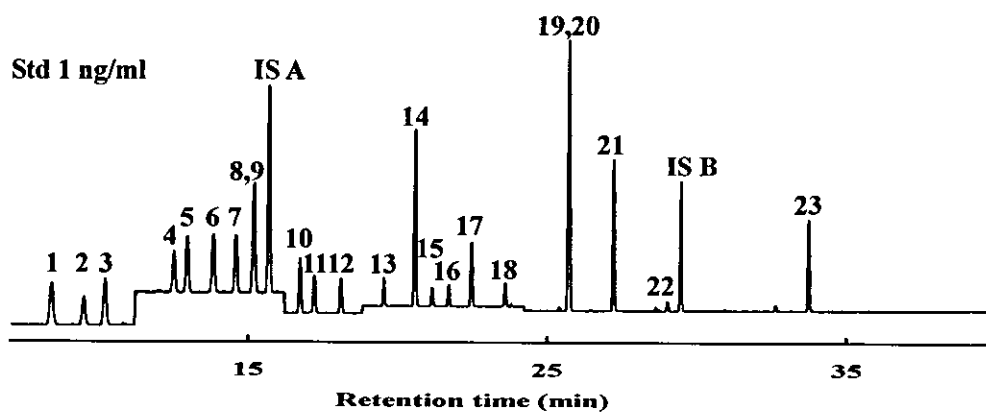


Fig. 1. 揮発性有機化合物混合標準液の GC/MS クロマトグラム

1: 1,1-Dichloroethylen, 2: Dichloromethane, 3: trans-1,2-Dichloroethylene, 4: c-1,2-Dichloroethylene, 5: Chloroform, 6: 1,1,1-Trichloroethane, 7: Carbon Tetrachloride, 8: 1,2-Dichloroethane, 9: Benzene, 10: Trichloroethylene, 11: 1,2-Dichloropropane, 12: Bromodichloromethane, 13: c-1,3-Dichloropropene, 14: Toluene, 15: t-1,3-Dichloropropene, 16: 1,1,2-Trichloroethane, 17: Tetrachloroethylene, 18: Dibromochloromethane, 19: m-Xylene, 20: p-Xylene, 21: o-Xylene, 22: Bromoform, 23: p-dichlorobenzene, IS.A: Fluorobenzene, IS.B: 4-Bromofluorobenzene

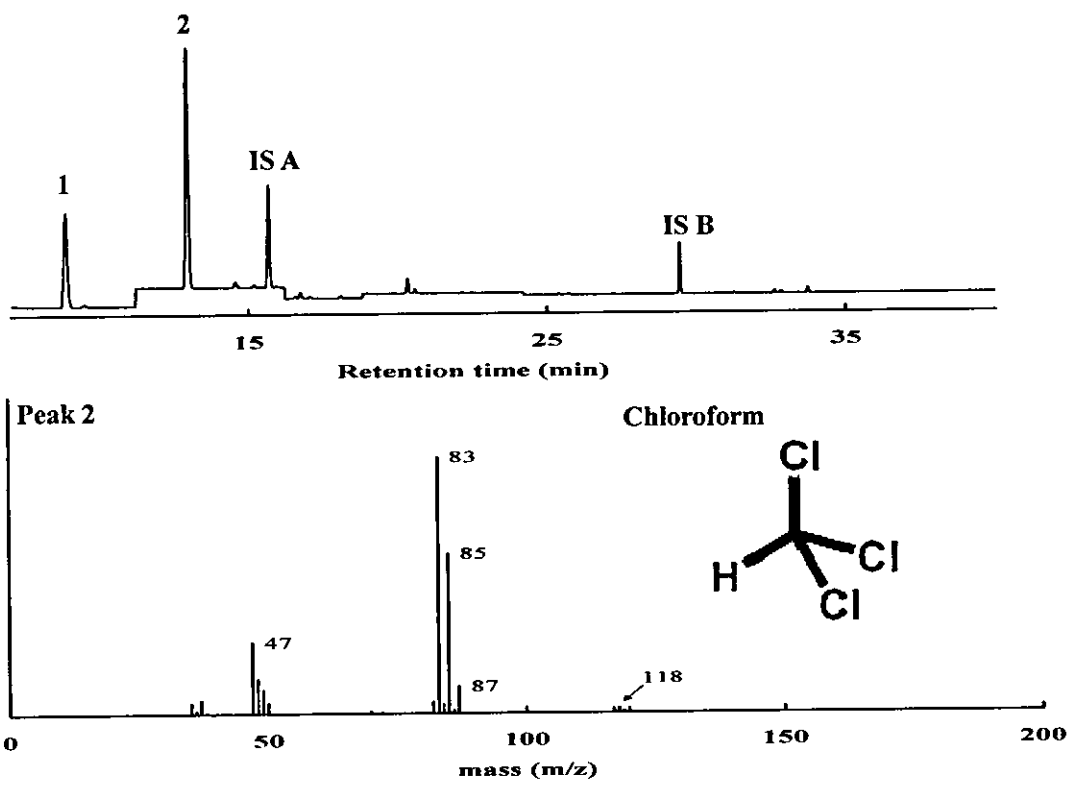


Fig. 2. 次亜塩素酸処理カットキャベツ試験液のGC/MSクロマトグラム及びマススペクトラム

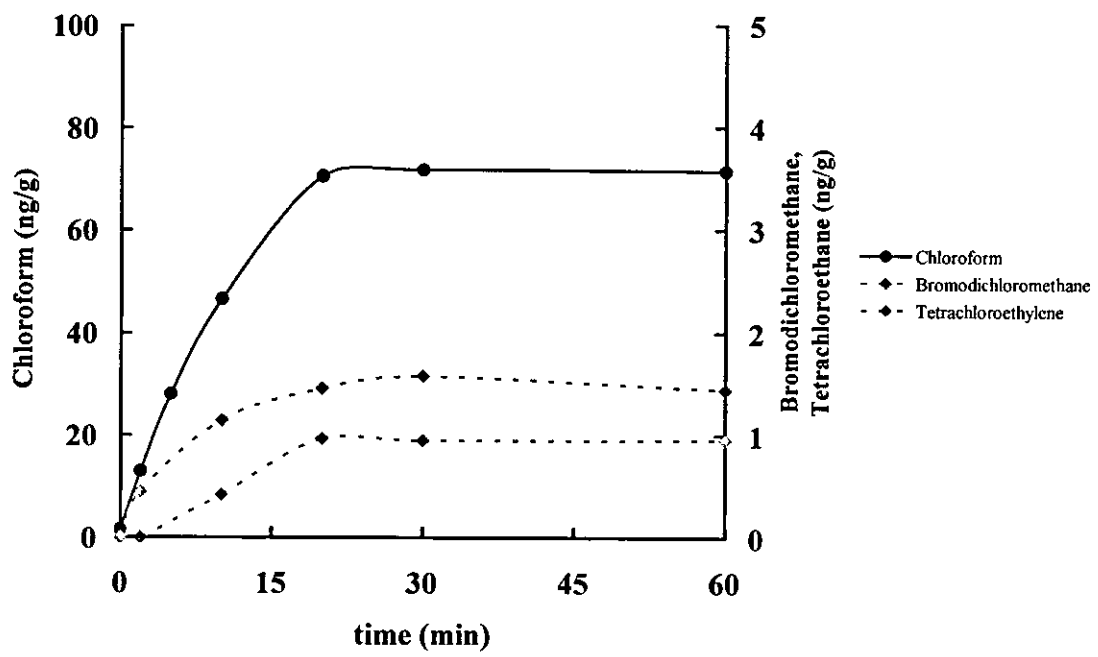


Fig. 3. 次亜塩素酸処理によるカットキャベツ中の揮発性有機化合物生成量の経時変化

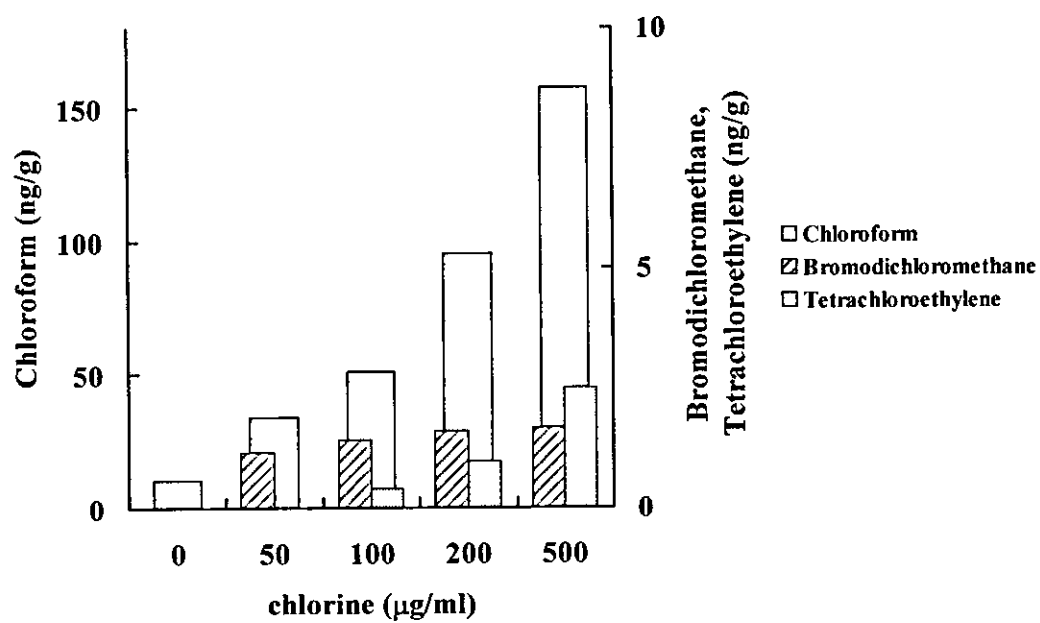


Fig. 4. 次亜塩素酸濃度によるカットキャベツ中の揮発性有機化合物生成量の変化

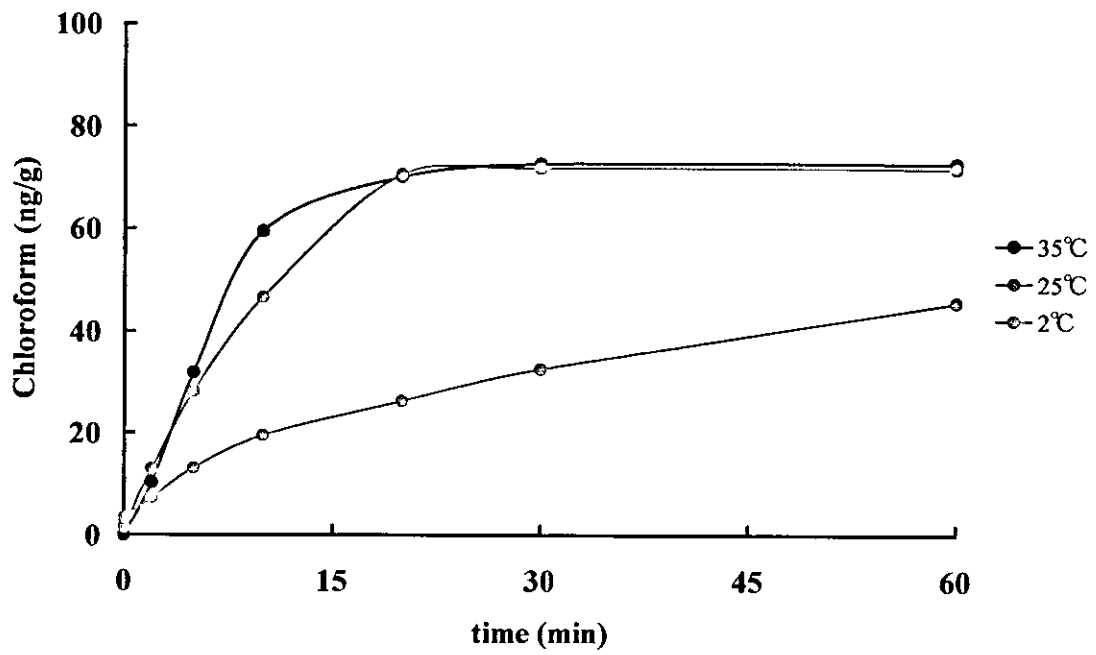


Fig. 5. 次亜塩素酸浸漬液の温度によるカットキャベツ中のクロロホルム生成量の変化

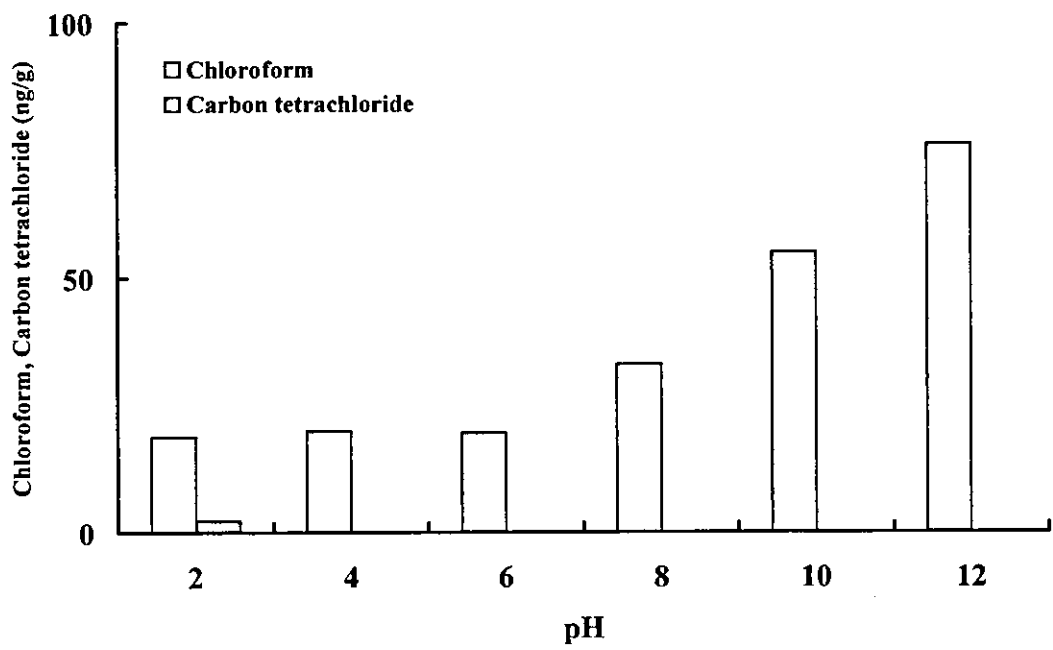


Fig. 6. 次亜塩素酸浸漬液の pH によるカットキャベツ中の揮発性有機化合物生成量の変化