

Fig. 7 Proposed structures of main compounds

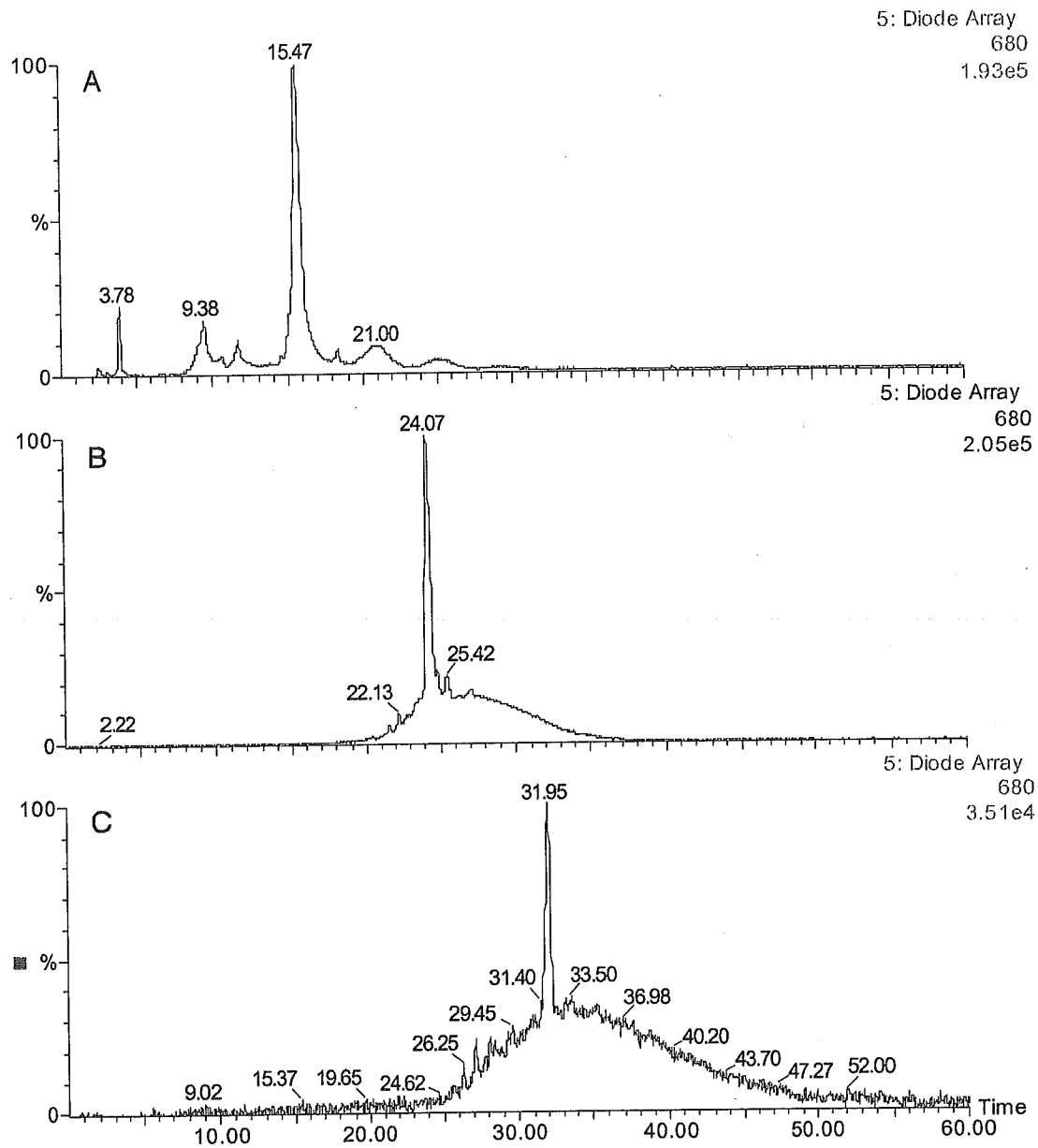


Fig. 4 Comparison of LC conditions  
 Detect, 680 nm; A) HILIC column (LC Conditions 1). B) CN column (LC  
 Conditions 3). C) C8 column (LC Conditions 2).

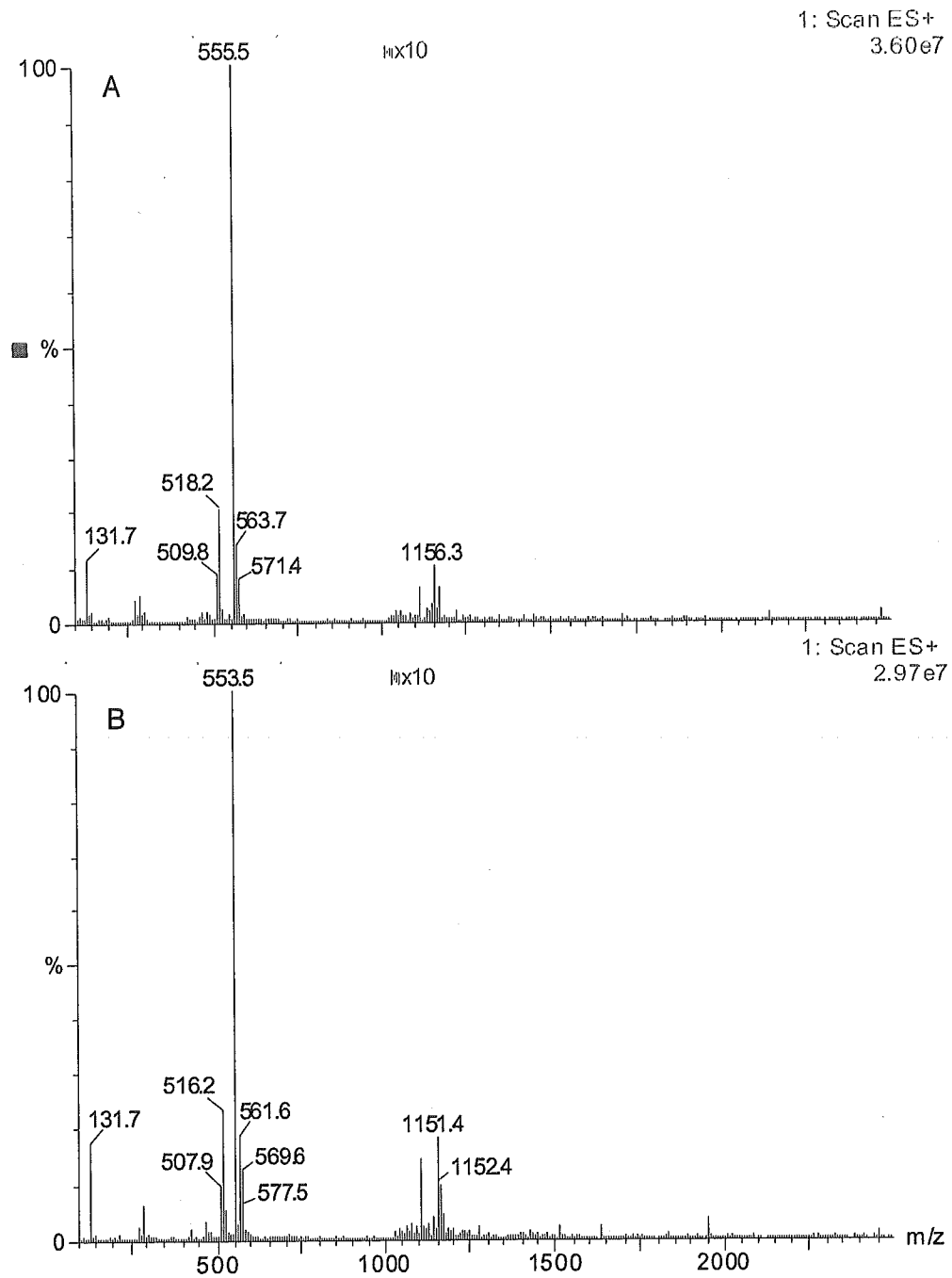


Fig. 5 Mass spectra of peak X

A) Reaction product between  $^{15}\text{N}$ -benzylamine and genipin

B) Reaction product between  $^{14}\text{N}$ -benzylamine and genipin

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）  
分担研究報告書  
食品中の食品添加物の流通状態における消長調査

分担研究者 扇間昌規（武庫川女子大学薬学部）  
峯 孝則（サントリー（株））

研究要旨

食品添加物のうち製造基準、使用基準があるものについては、対象食品、使用量、使用制限などが細かく定められている。そのような規制の下で完成された食品中の添加物が、流通過程の様々な条件の中でどのように変動するかを解明することは、食品の安全性や品質を高める上で極めて重要な事柄である。

昨年、保存料であるソルビン酸が、食品成分として共存し得るアミノ酸のシステインにより構造変化をきたし、新たな化学物質の生成を示唆する実験結果を得た。構造変化した物質は保存料としての機能は失われるであろうし、反応生成物の安全性については全く未知である。それらの疑問点を早急に解明しようとするのが本年度の研究である。

A. 研究目的

昨年度、保存料の一種であるソルビン酸とアミノ酸のシステインとが水溶液中での室温放置又は電子レンジによる短時間の加熱により両者の反応生成物が生じることを見出した。今年度はこの生成物の分取規模での生成方法、生成物の分取条件及びその分取を試みた。

B. 研究方法

1. 概略

(1) 昨年度実施した電子レンジでの加熱による反応生成物を得る方法は大量処理するには適さなかったため、緩慢な方法で比較的少量に反応生成物を得る方法を検討し

た。

ソルビン酸及びソルビン酸カリウムのメタノール水溶液とシステイン塩酸塩及びシステイン遊離塩基のメタノール水溶液とを等量混和した4つの組合せで室温放置した時、分取を容易に行うために、主生成物の量が多くかつ副生成物が少ない組合せのものを選択した。次にHPLCによる分取条件を検討し、反応生成物を含む溶液から分取クロマトにより、主反応生成物を分取することを試みた。

(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り比較的化学反応性に富み、分子構造と保存料としての静菌作用<sup>1)</sup>との関連においても

関心が持たれる。

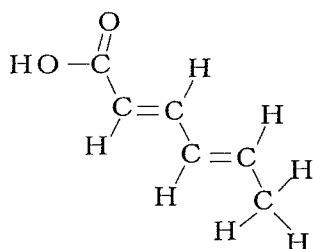


図1 ソルビン酸

## 2. 試薬及び試料溶液の調製

### (1) 試薬

ソルビン酸：和光純薬工業特級、ソルビン酸カリウム：和光純薬工業一級、L-システイン塩酸塩 1 水和物：MP BIOMEDICALS、L-システイン遊離塩基：MP BIOMEDICALS、メタノール：和光純薬工業液体クロマトグラフィー用、リン酸：和光純薬工業特級

### (2) 試料溶液の調製

ソルビン酸 500mg と L-システイン塩酸塩 1 水和物 500mg とを 50mL メスフラスコにとり、50%メタノール水溶液で溶解できる限り溶解させ、50mL にメスアップした。この溶液を①とする。

ソルビン酸カリウム 500mg と L-システイン塩酸塩 1 水和物 500mg とを 50mL メスフラスコにとり、50%メタノール水溶液で溶解できる限り溶解させ、50mL にメスアップした。この溶液を②とする。

ソルビン酸 500mg と L-システイン遊離塩基 500mg とを 50mL メスフラスコにとり、50%メタノール水溶液で溶解できる限り溶解させ、50mL にメスアップした。この溶液を③とする。

ソルビン酸カリウム 500mg と L-システイン遊離塩基 500mg とを 50mL メスフラスコにとり、50%メタノール水溶液に溶解できる限り溶解させ、50mL にメスアップした。この溶液を④とする。  
これらの溶液を室温、暗所に保存した。

## 3. 装置

### (1) UV 検出器付き高速液体クロマトグラフ

- ・送液ポンプ：日本分光 PU-980
- ・UV検出器：日本分光 UV-970
- ・データ処理：島津製作所製 C-R6A クロマトパック
- ・プレカラム：ダイソー DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP (4.6mmI. D. x5cm)
- ・分取カラム：和光純薬 Wakosil-II 5C18RS Prep (20mmI. D. x5cm)
- ・移動相：0.01%リン酸水溶液—メタノールによるグラディエント
- ・グラディエント条件：メタノール 0 →70% (25分) →90% (5分) →0%
- ・流速：3mL/min.
- ・波長：220nm
- ・注入量：30 $\mu$ L
- ・他に検討した分取カラム：  
DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP (20mmI.D.x25cm)  
Wakopak Wakosil-II 5C18 RS Prep (20mmI.D.x25cm)

## 4. 試験操作

### (1) ソルビン酸と L-システインの混合組合せによる反応生成物の違い

試料溶液の調製で得られた①、②、③、④を室温暗所に保管し、試料を HPLC によ



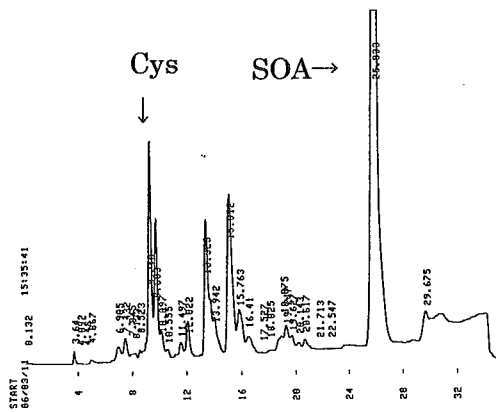


図3. ② (ソルビン酸 SOA カリウム、システイン Cys 塩酸塩) のクロマトグラム

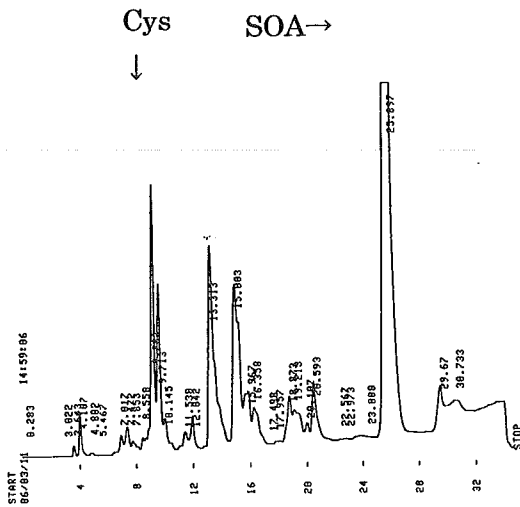
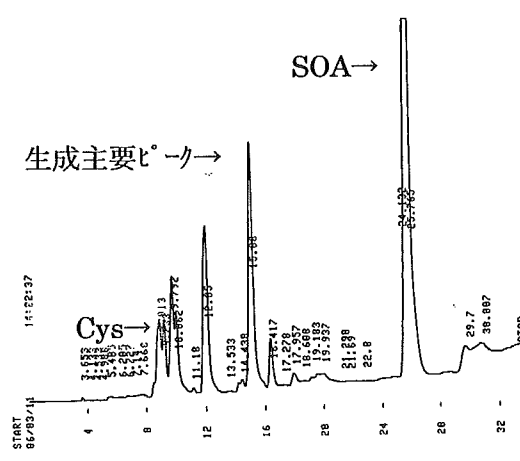


図4. ③ (ソルビン酸 SOA、システイン Cys 離塩基) のクロマトグラム



テイン Cys 遊離塩基) のクロマトグラム

図2. ~図5. において、保持値が約 9.2 分のピークがシステイン (Cys) であり、約 25.8 分の最大ピークがソルビン酸(SOA) である。その他のピークは両者の反応によって生成したピークである。①~④のクロマトグラムの中で、生成ピーク数の少ないクロマトグラムは図5に示した④であったことから、分取しやすいこの④を分取用試料として用いることにした。

#### 4. 反応生成物の分取

④の溶液 30  $\mu$ L を B.3.(1)の条件で分析し、図5. に示したクロマトグラムの保持値約 15 分のピーク (以下、生成主要ピークと呼ぶ) を分取した。

次にこの生成主要ピークを十数回分取した時の分取液のクロマトグラムを図 6a. に示した。図 6b.はこの時のグラジエントによるバックグラウンドである。

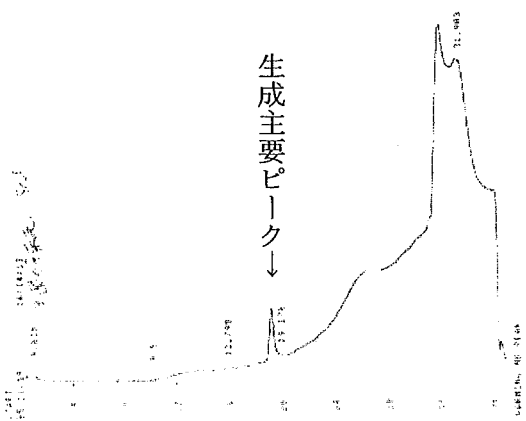


図 6a. 分取液のクロマトグラム

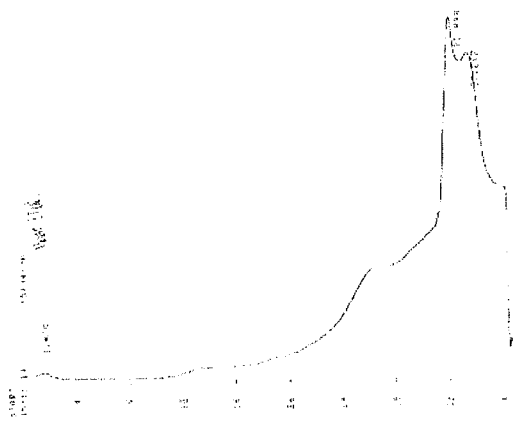


図 6 b. 図 6 a. 分析時のグラジエントによるバックグラウンド

図 6a、6b から生成主要ピークは単一ピークとして分取できていると思われる。

現在、この生成主要ピークに分取量はまだまだ微量であるため、構造解析のためには更に大量分取が必要で、分取を繰り返しているところである。

#### D. 考察

1. 昨年度、ソルビン酸とシステインを室温下、水溶液中に放置するか、あるいは電子レンジでの短時間加熱により、両者による生成物を生じることを見出した。この反応はシステインのチオール基とソルビン酸の二重結合との反応ではないかと推測されるが明らかにされていない。そこで、この反応生成物の構造を決定するために、今年度は主に分取条件の確立を目指した。ソルビン酸は図 1. に示したとおり、共役不飽和結合を有する脂肪酸であり、平面構造がとれる極めてユニークな構造をしている。この化合物は食品の保存料として、食品添加物に指定されており、その作用機序は静菌作用と、保存料としては緩慢な効果

である。この作用機序と取り得る平面構造そしてその反応性が何らかの関係があるのかどうか、今後の解明が望まれる。

2. 分取のためには反応生成物は可能な限り少なく、分取の妨害とならないことが望まれる。ソルビン酸 2 種とシステイン 2 種による 4 通りの組合せで生成物比較を行ったところ、試料溶液④の生成物が最も少なかった。そこで、④を分取試料とし、まずはその生成主要ピークに分取を試みた。4 通りの組合せによって、生成物のクロマトグラムがなぜ違うのか不明であるが、今後、この生成主要ピークを特定することで反応メカニズム解明の足がかりとしたい。

#### E. 結論

1. ソルビン酸 2 種とシステイン 2 種による混合組合せで室温下、水溶液中に放置したところ両者の反応生成物が得られた。
2. HPLC による分析及び分取条件を検討し、最適条件を求めた。
3. 4 種の組合せから、生成主要ピークが得られた④の試料液について、十数回の分取を行い分取液を分析したところ、単一ピークであることが確認された。

#### F. 健康危険情報

本研究で得られた結果においては、現在健康危険性に関する知見は特に無かった。ソルビン酸に関する健康危険関連の学術文献は久しく見られなかったが、昨年 DNA 塩基類似物質を用いてソルビン酸カリウムのアルキル化能を調べた報告が出た<sup>2)</sup>。しかし生体の変異原性の研究ではなく、化学構造の特性に基づく付加体生成速度論で、保存有効期間の設定に向けられている。



#### 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. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### 引用文献

- 1) S.Tetsumoto: J.Agr.Chem.Soc.,9,  
338,569 (1933)
- 2) C.Ferrand et al.: J.Agric.Food  
Chem., 48, 3605 (2005)

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ハロアセトニトリルや抱水クロラールなどの消毒副生成物の挙動を明らかとするため、溶媒抽出-GC/MS法を用いて残存する消毒副生成物の分析を行った。

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、ジクロロアセトニトリル及び抱水クロラールの生成が確認され、これら消毒副生成物は次亜塩素酸ナトリウムの初期濃度やpH、温度に応じて変化し、生成量が増加する傾向が認められた。

また、近年、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事例もあるため、次亜塩素酸ナトリウムに各種有機酸を添加し、消毒副生成物量の変化を調べたところ、酒石酸、コハク酸、フマル酸を混和した殺菌液では変化がみられなかったが、クエン酸を混和した殺菌液よりハロケトンが、リンゴ酸を混和した殺菌液から抱水クロラールが検出され、これらは経時的に増加していく傾向が認められた。

さらに、殺菌処理後、カット野菜を十分な水で洗浄し、洗浄工程の前後における消毒副生成物の残存量変化を調べたところ、水洗浄後には消毒副生成物の残存量が減少し、殺菌処理前とほぼ同等のレベルまで消毒副生成物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り、これまでに食品衛生における微生物学的危害防止のため重要な役割を果たしてきた。

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<sup>1)</sup>、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しており<sup>2)</sup>、また、1976年にはMckinneyがジクロロアセトニ

トリル(DCAN)を検出し<sup>3)</sup>、その後、Trehy及びBieberらがブロモクロロアセトニトリル(BCAN)、ジブロモアセトニトリル(DBAN)を検出するとともに、これらハロアセトニトリル(HAN)が塩素処理された水より生成することを報告している<sup>4)</sup>。なお、これら以外にも河川水の塩素処理により、抱水クロラールやハロ酢酸など様々な消毒副生成物が生成することも知られている<sup>5)</sup>。

このため各国において飲料水中の消毒副生成物の水質基準値が設けられており、WHOの飲料水ガイドラインでは、クロロホルムが0.2 mg/l、ブロモジクロロメタン(BDCM)が0.06 mg/l、ジブロモクロロメタ

ン(DBCM)が 0.1 mg/l, ブロモホルム(BF)が 0.1 mg/l, ジブロモアセトニトリル(DBAN)が 0.07 mg/l, 暫定基準値として DCAN が 0.02 mg/l, 抱水クロラール(CH)が 0.01 mg/l に設定されており<sup>6)</sup>。また, 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, EU では, 総 THM として 0.1 mg/l に設定されている<sup>7)</sup>。

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<sup>8)</sup>。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おり, DCAN は監視項目指針値(暫定)として 0.08 mg/l, 水質管理目標値(暫定)として 0.04 mg/l, CH は水質管理目標(暫定)として 0.03 mg/l に設定されているとともに, 現在, DCAN と CH に関しては, 食品安全委員会の汚染物質専門調査会において, 清涼飲料水の規格基準の改正に係わる食品健康影響評価に関して審議が行われている。

食品中の THM 類残存量の分析については, 豊田らがパージアンドトラップ(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古くから報告があり, 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<sup>9-12)</sup>。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, 日高らによるキャベツやモヤシ中のクロロホルムの生成<sup>13-17)</sup>や, 今枝らによる豆腐製造過程における THM

生成<sup>18)</sup>, 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<sup>19-21)</sup>, これまでのところ THM の生成挙動の詳細を解明するまでには至っておらず, また, HAN や CH の生成に関しては, Chang らがフルーツジュースの塩素処理による消毒副生成物の生成について定性的な分析を行っているのみであり<sup>22)</sup>, THM に比べ食品中の生成挙動がほとんど明らかとされていない。

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<sup>23)</sup>, また, 一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<sup>24)</sup>, さらに, 次亜塩素酸水の成分規格について, 現在, 規格改定に向けて食品安全委員会の添加物専門委員会で食品健康影響評価の審議が行われるなど殺菌料の使用環境が日々変化している。このため殺菌料による消毒副生成物の生成挙動の解明も現況に合わせた調査が必要となる。

そこで昨年度は, 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に注目し, 水道法により水質基準が定められている揮発性物質 23 種についてヘッドスペース GC/MS を用いて分析を行い, 次亜塩素酸ナトリウム処理時にクエン酸を併用した場合, クロロホルム生成量が増加することを明らかとした。本年度は, 次亜塩素酸ナトリウム処理により生成する消毒副生成

物として HAN や CH などの不揮発性塩素化合物を中心に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 ハロアセトニトリル(HAN)混合標準原液(トリクロロアセトニトリル [TCAN], クロロアセトニトリル [MCAN], ジクロロアセトニトリル [DCAN], 抱水クロラル [CH], プロモアセトニトリル [MBAN], プロモクロロアセトニトリル [BCAN], ジプロモアセトニトリル [DBAN])及び内部標準原液として、関東化学社製の水質試験用ハロアセトニトリル混合標準原液 II 及び 1,2,3-トリクロロプロパン標準原液を用いた。希釈溶媒には関東化学社製の残留農薬・PCB 試験用 tert-ブチルメチルエーテル (MTBE)を用い、塩化ナトリウムには和光純薬工業社製の水質試験用を、硫酸ナトリウムには和光純薬工業社製の残留農薬試験用いた。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。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<sup>25)</sup>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 GC/MS は島津製作所製の GCMS-QP2010 を用いた。全てのガラス器具は 110℃で 3 時間加熱後、放冷して用いた。

## 4) GC/MS 測定条件

GC/MS 条件 カラム:DB-1 (J&W) 60m×0.25mmI.D. 膜厚 1.0µm, カラム温度: 35℃(10min)→(20℃/min)→300℃, スプリットレス, 注入口温度: 250℃, インターフェース温度: 250℃, イオン化法: EI, イオン化電圧: 70ev, 線速度: 43 cm/min

## 5) 次亜塩素酸ナトリウム処理方法

試料 2 g を 50 ml のスクリーキャップバイアルに採り、有効塩素濃度として 100 µg/ml となるように調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液 20 ml を加え、直ちに密栓し、10 分間殺菌処理を行った。殺菌処理後、40% アスコルビン酸ナトリウム 200µl 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 30 ml のスクリーキャップバイアルに採り、塩化ナトリウム 8 g を加え、軽く振って溶かした後、MTBE 2 ml を加え、1 分間激しく振りまぜ、静置後、MTBE 層を分取した。MTBE 層を硫酸ナトリウムで脱水し、一定量を 1.5 ml バイアルに分取し、次いでマイクロシリンジを使用して内部標準液を注入して直ちに密栓し、GC/MS 用試験液とした。

## 7) 検量線用標準液の調製

HAN 混合標準原液 1ml を 100 ml のメスフラスコに正確に採り、MTBE を加えて正確に 10ml とし、HAN 混合標準液とした。HAN 混合標準液を段階的にメスフラスコに採り、MTBE で正確にメスアップし、検量線用標準液とした。各検量線用標準液をそれぞれ正確に採り、以下、GC/MS 用試験液と同様に操作を行った。

## C. 研究結果

### 1) 溶媒抽出—GC/MS 法による HAN 及び CH の測定

HAN 6 種と CH について水質試験法を参考にして溶媒抽出—GC/MS 法により分析を試みた (Fig. 1). 各混合標準液及び内部標準液は 16 分までにすべてのピークが検出され、良好な分離を示した。また、いずれも塩素及び臭素原子を含むため、特異的な同位体パターンを示し、スキャンによるマススペクトルパターンにより容易に定性的確認を行うことができた (Fig. 2).

### 2) 添加回収試験

カットキャベツに HAN 及び CH を 10 ng/g 又は 100 ng/g 添加し、添加回収試験を行った (Table 1). TCAN は回収率が著しく低下したが、その他の化合物の回収率は、10 ng/g 添加において 7.0~10.6 ng/g, 100 ng/g 添加では 70.1~108.6 ng/g であり、また、変動係数は 7%以内となり概ね良い結果が得られた。なお、TCAN を除いた、その他の化合物の定量下限値は 1 ng/g であった。

### 3) 次亜塩素酸ナトリウム処理により生成する消毒副生成物の分析

次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理を行ったときに生成する消毒副生成物について GC/MS により測定を行った (Fig. 3). 試料としてカットキャベツを用い、有効塩素濃度として 100 µg/ml の次亜塩素酸ナトリウム溶液により殺菌処理を行ったところ、8.9分と 9.8分の保持時間に新たなピークが検出された。これらのピークは、NIST 及び WILEY のライブラリとの照合や、HAN 及び CH 標準品との比較から、それぞれ DCAN と CH であることが判明した。

### 4) 次亜塩素酸ナトリウム処理により生成する消毒副生成物の経時変化

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、生成する消毒副生成物生成量の経時的な測定を試みた (Fig. 4). DCAN 及び CH 共に、殺菌処理直後より生成され始め、1 時間後には DCAN が 102.0 ng/g, CH が 121.4 ng/g 生成した。さらに、カットキャベツ殺菌処理後の次亜塩素酸ナトリウム浸漬液を同様に測定したところ、殺菌処理から 1 時間以内に DCAN 及び CH が速やかに生成し、その後、ほぼ一定の値を示していた。浸漬液中では、カットキャベツに比べ、CH に対する DCAN 濃度比が高くなる傾向が見られた。また、MCAN 及び BCAN の保持時間にもピークが検出されたが、定量下限値以下であり、スキャンによるマススペクトルの解析においても、検出感度が十分でなく、同定には至らなかった。

### 5) 次亜塩素酸ナトリウム浸漬液の濃度変化による消毒副生成物生成量の変化

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 10 分間浸漬させ、生成する消毒副生成物量の測定を行った (Fig. 5). DCAN, CH 共に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、DCAN が 87.5 ng/g, CH が 102.8 ng/g であった。また、高濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理した群において、MCAN の保持時間にもピークが検出されたが、定量下限値以下であり、同定には至らなかった。殺菌処理後の次亜塩素酸ナトリウム浸漬液中の消毒副生成物残存量では、CH に比べ DCAN 濃度が高くなる傾向がみとめられた。

6) 次亜塩素酸ナトリウム浸漬液の温度による消毒副生成物生成量の変化

次亜塩素酸ナトリウム浸漬液の温度を 4, 22, 35°Cに変更し, カットキャベツを 10 分間殺菌処理したときの消毒副生成物生成量の変化を調べた(Fig. 6). 浸漬液の温度が高まるにつれて, DCAN, CH 共に生成量が増加した. また, 4°C及び 22°C条件下では, DCAN 及び CH の生成量はほぼ同程度であったが, 35°C条件下では, DCAN 残存量が相対的に高まる傾向が認められた. なお, 今回対象とした, その他の HAN については, いずれも定量下限値以下であった.

7) 次亜塩素酸ナトリウム浸漬液の pH による消毒副生成物生成量の変化

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消毒副生成物生成量の変化を調べた(Fig. 7). pH の調製には塩酸及び水酸化ナトリウムを用いた. 浸漬液が酸性側に傾くにつれて, DCAN 及び CH 共に生成量が増加し, また, 塩基性条件においても, pH10 付近を中心として生成量が増加する傾向が認められた. さらに, カットキャベツ殺菌処理後の次亜塩素酸ナトリウム浸漬液中の消毒副生成物量について同様に分析したところ, CH は酸性側で生成量が増加し, DCAN は酸性条件で増加すると共に, pH10 付近において最も誘導されていることが明らかとなった. なお, これら以外にも pH 6 及び pH 8 の浸漬液において CH ピーク近くに未知ピークが検出されたが, 微量のため構造を同定するには至らなかった.

8) 次亜塩素酸ナトリウム・酸混液中の消毒副生成物の分析

次亜塩素酸ナトリウムは塩基性の液体で

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殺菌効果を高め使用される場合がある. そこで次亜塩素酸ナトリウム溶液に各種酸を混和した殺菌液を調製し, 生成する消毒副生成物量を経時的に調べた (Fig. 8). 混和した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. 9). 次亜塩素酸ナトリウム溶液の pH は, 文献<sup>26)</sup>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 pH6-7 付近に調整した.

次亜塩素酸ナトリウム溶液単独, 及び, 酒石酸, コハク酸, フマル酸水素ナトリウム, 塩酸を添加した群では変化はみめられなかったが, リンゴ酸を添加した群では, 次亜塩素酸ナトリウム・リンゴ酸混液を調製直後より, 速やかに CH が生成し始め, 次亜塩素酸・リンゴ酸殺菌液調製 3 時間後の CH 濃度は 1.4 µg/ml であった. 一方, 昨年度の研究において有意なクロロホルムの増加が認められた, 次亜塩素酸ナトリウム・クエン酸混液は, HAN, CH とともにピークは検出されなかったが, スキャンによるマススペクトル解析を行ったところ, 新たに複数のピークの検出され, これらのピークは NIST 及び WILEY のライブラリーとの照合の結果, 1,1-ジクロロ-2-プロパノン, 1,1,1-トリクロロ-2-プロパノン, 1,1,3-トリクロロ-2-プロパノン, 1,1,3,3-テトラクロロ-2-プロパノン, 1,1,1,3-テトラクロロ-2-プロパノンと一致した. この内, メインピークとして確認されたのは, 1,1,3,3-テトラクロロ-2-プロパノンのみであり, その他はマイナーピークとして検出された(Fig 10-11).

9) 水洗浄による消毒副生成物の除去効果  
次亜塩素酸ナ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<sup>27)</sup>。そこで、食品に残存する消毒副生成物の水洗浄による除去効果について検討を行った(Fig. 12)。カットキャベツを次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理を行い、水洗浄工程前後における消毒副生成物残存量の測定を行った。殺菌処理後、DCANが22.1 ng/g、CHが27.1 ng/gまで増加したが、水洗浄によりCHが2.1 ng/g、DCANは定量下限値以下となり、消毒副生成物がほとんど残存しないことが明らかとなった。

#### D. 考察

##### 1) 溶媒抽出-GC/MS 法によるカット野菜中の消毒副生成物の分析法の検討

カット野菜に含まれる消毒副生成物の残存量を明らかとするため、水質基準試験法に準じて溶媒抽出-GC/MS を用いてカット野菜中のHAN及びCHの分析を行った。本試験法の分析感度及び回収率は、TCANを除き概ね良好であり、特に、CHは、10 ng/g 添加で106%、100 ng/g 添加において108.6 と良好な結果が得られた。食品中の消毒副生成物の分析法に関しては、RaymerらがMTBE溶媒抽出-GC/ECDを用いて各種食品及び飲料からの分析の検討を報告しているが、今回の結果と同様に、対象とする食品によってはTCANの添加回収率が36~127%まで大きく変動しており、TCANはマトリクスへの吸着や分解などの影響により、回収率が著しく変動したと考

えられる。このため対象食品の適用範囲を広げるためには、今後、さらなる試験法の改良が必要となる。今回、TCANの分析はスキャンマスペクトルによる定性的な確認に止め、その他の消毒副生成物について定量的な分析を行った。

##### 2) 消毒副生成物の生成に関する因子の検討

カット野菜の次亜塩素酸処理にともなう消毒副生成物の生成について解明するため、次亜塩素酸ナトリウム濃度、温度、pH等の各種因子を様々な条件で検討を行い、消毒副生成物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場合、次亜塩素酸ナトリウムの濃度に応じて消毒副生成物の生成量が増加した。生成した消毒副生成物の大半はDCANとCHであり、また、これら以外にも消毒副生成物と予想される複数のピークが検出された。現在、これら化合物の同定に向けて引き続き検討を行っている。

次亜塩素酸ナトリウム処理によりDCANが生成した原因としては、一般にアミノ酸が前駆物質として反応し、DCANを生成すると考えられている。アミノ酸が塩素処理によりアセトニトリル化合物を生成することは古くより知られており<sup>28-30)</sup>、また、Trehyらはアスパラギン酸の塩素処理によりDCANとCHを同時に生成することを報告している<sup>31)</sup>。これらの報告は、本研究の結果と良く一致しており、カットキャベツに含まれていたアミノ酸が次亜塩素酸ナトリウムと反応し、DCAN及びCHが生成したことが考えられる。なお、アミノ酸の塩素処理によるクロロホルム及びHAN、CH

の生成の流れとして Fig. 13 に示す反応経路が一般に考えられている<sup>32)</sup>。これによればアミノ酸が塩素処理により、ハロアセトニトリルやハロアルデヒドを生成し、最終的にクロロホルムが生成するとされている。日高らは、キャベツやモヤシを塩素処理したときにクロロホルムを生成し、その前駆物質としてアミノ酸を挙げている<sup>16-17)</sup>。今回、カットキャベツの塩素処理により HAN を生成したことは、カットキャベツから生成する消毒副生成物の前駆物質の一つとして、アミノ酸が関与している可能性を支持するものと考えられる。ただし、クロロホルムの前駆物質としてフラバノン類などの可能性も指摘されており<sup>33)</sup>、今後あらゆる反応生成経路の可能性を考慮しつつ、引き続き検討を進めていく予定である。

次亜塩素酸ナトリウム溶液の pH と消毒副生成物の生成量の関係では、次亜塩素酸ナトリウム溶液の液性が強酸性側、もしくは弱塩基性するとき、消毒副生成物の生成量が増加する傾向が認められた。これまでに飲料水中の消毒副生成物の分析において、強酸性側で HAN や CH の生成量が増加するとの報告はあるが<sup>34)</sup>、塩基性側では明確な結論が得られていない。塩基性側では生成反応と同時に、加水分解反応も進行することが明らかとされており、さらに、この反応は温度や残留塩素濃度の影響を受けやすく、これら複合要因により消毒副生成物の生成挙動の把握を難しくしている<sup>35)</sup>。今回、弱塩基性条件下により消毒副生成物の残存量が増加したが、一般に野菜の塩素殺菌処理時間は 5~10 分と短く、今回の実験でも殺菌処理時間は 10 分間であるため、加水分解による影響をほとんど受けず、消毒

副生成物の生成速度のみに依存し反応が進行したと思われる。

また、殺菌処理温度と消毒副生成物の生成量の関係については、温度が高いほど消毒副生成物の生成量が多くなる傾向が認められた。河川水の塩素処理の結果でも同様の報告がなされており<sup>36)</sup>、消毒副生成物のコントロールには低温での殺菌処理が有効と考えられる。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<sup>38)</sup>、微生物学的危害と化学的危害の両面から見た場合、今後、殺菌処理に最適な温度を考えていくことが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混和し、生成する消毒副生成物の量を調べた。次亜塩素酸ナトリウムに酒石酸、コハク酸、フマル酸、塩酸を加え混和した溶液では、消毒副生成物生成量に大きな変化は見られなかったが、リンゴ酸を添加した場合、経時的な CH 濃度の増加が確認された。これはリンゴ酸が次亜塩素酸と反応し CH を生成したことを示すものであり、Chang らが塩素処理したフルーツジュース中から CH の生成を明らかとし<sup>22)</sup>、さらにその反応メカニズムについても言及している。それによれば、リンゴ酸が次亜塩素酸により酸化され 3-オキソプロパネートとなり、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 位炭素が連続的に塩素化され、脱炭酸を経てクロラールアルデヒドを生成し、最終的に抱水クロラールが生成したと予想している (Fig.14)。昨年の研究において、次亜塩素酸ナトリウムとリンゴ酸



を混和したときにクロロホルムを生成しないことを報告したが、今回の結果より、生成した抱水クロラールは微酸性条件で比較的安定に存在するため、クロロホルムへと分解せず、そのまま存在したことが原因と考えられる。さらに Chang らは、この反応メカニズムの中でジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸が生成する可能性についても指摘しており、今後これら化合物の解明について引き続き検討を行う予定である。

また、クエン酸は次亜塩素酸ナトリウムとの反応の結果、1,1-ジクロロ-2-プロパノン、1,1,1-トリクロロ-2-プロパノン、1,1,3-トリクロロ-2-プロパノン、1,1,3,3-テトラクロロ-2-プロパノン、1,1,1,3-テトラクロロ-2-プロパノン等のハロケトンを生じる可能性が示唆された。昨年度、次亜塩素酸とクエン酸を混和させることによりクロロホルムが生成することを報告しているが、クロロホルム生成の過程においてハロケトンを生じることを Streicher らが明らかとしており<sup>38)</sup>、Fig.15 に示す反応メカニズムを提示している。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 1,1,3,3-テトラクロロ-2-プロパノンやペンタクロロ-2-プロパノンを経て、最終的にクロロホルムが生成したと考えられる。今回、ペンタクロロ-2-プロパノンは検出されなかったが、Streicher らも強酸性条件下においてのみペンタクロロ-2-プロパノンを検出し、弱酸性～中性環境では 1,1,3,3-テトラクロロ-2-プロパノンを検出していることから、弱酸性環境では、速やかに分解し、

クロロホルムが生成したことが予想される。また、ハロケトンからクロロホルムに分解する際に、同時にハロ酢酸が生成している可能性があることから、今後、これら化合物について検討を行う予定である。

#### 4) 水洗浄による消毒副生成物の除去効果の検討

カットキャベツの殺菌過程の後に水洗浄を施すことにより、生成した DCAN や CH を塩素処理前のブランクとほぼ同等のレベルまで除去することが可能であった。DCAN や CH は、いずれも極性が高い化合物であり水に溶けやすいため、水洗浄により速やかに試料から取り除かれ、試料にほとんど残存しなかったと考えられる。

#### E. 結論

次亜塩素酸ナトリウムを用いた殺菌処理において、次亜塩素酸ナトリウムの濃度、温度、pH に依存してジクロロアセトニトリル及び抱水クロラールの生成が確認された。しかし、これら消毒副生成物は十分な流水ですすぎ洗いにより取り除かれ、食品にはほとんど残存しなかった。一般に次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理を行う場合、食品から塩素臭を取り除くため十分な流水ですすぎ洗いが行われており、消毒副生成物もこの段階で除去され、食品に残存する可能性は低いと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

H. Kubota, K. Sato, C. Yomota, K. Tanamoto: 119th AOAC annual meeting and exposition. (2005.9)

久保田浩樹, 佐藤恭子, 四方田千佳子, 棚元憲一: 日本食品衛生学会第90回学術講演会(2005.10)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

#### I. 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) Mckinney, J.D.: In *identification and Analysis of Organic pollutants in water* (Edited by L. H. Keith) Vol. 5. p417-432 (1976)
- 4) Trehy, M. L., Bieber, T. I.: In *Advances in the identification and Organic pollutants in water* (Edited by L. H. Keith) Vol. 2, p941-975 (1979)
- 5) WHO, *Environmental Health Criteria 216, Disinfectants and Disinfectant by-products* (2000)
- 6) WHO *Guidelines for Drinking-water Quality 3<sup>rd</sup> Edition* (2004)
- 7) Susan D. Richardson: *Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), p666-684 (2003)
- 8) 厚生労働省令第百一号: 水質基準に関する省令 (2003)
- 9) Toyoda, M., Ishizaka, T., Saito, Y.: 食品

衛生学雑誌, 27(3), p245-241 (1986)

10) Tamakawa, K. et al.: *食品衛生学雑誌*, 29(2), p156-160 (1988)

11) Miyahara, M. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 43(2), p320-326 (1995)

12) René I. et al.: *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 85, p681-703 (1994)

13) Hidaka, T. et al.: *食品衛生学雑誌*, 32(4), p308-314 (1991)

14) Hidaka, T. et al.: *食品衛生学雑誌*, 33(3), p267-273 (1992)

15) Hidaka, T. et al.: *食品衛生学雑誌*, 35(4), p357-364 (1994)

16) Hidaka, T. et al.: *食品衛生学雑誌*, 38(2), p62-68 (1999)

17) Hidaka, T. et al.: *食品衛生学雑誌*, 40(2), p143-148 (1999)

18) Imaeda, K. et al.: *衛生化学*, 40(6), p527-533 (1994)

19) Tiefel, P., Guthy, K.: *Milchwissenschaft*, 52(12), p686-691 (1997)

20) Resch, P., Guthy, K.: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 95, p418-523 (1999)

21) Resch, P., Guthy, K.: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 96, p9-16 (2000)

22) Chang, T. L. et al.: *Analytical Letters*, 21(11), p2049-2067 (1988)

23) 官報 第 3378 号、厚生労働省令第七十五号、p1 (2002)

24) 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)

25) 厚生省: 食品添加物公定書第 7 版, p269

(1999)

26) 長谷川美典: カット野菜ハンドブック,  
p170-173 (2002)

27) 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)

28) Langheld, K.: Chem. Ber., 42,  
p2360-2374 (1909)

29) Dakin, H. D.: Biochem. J., 10,  
p319-323 (1916)

30) Dakin, H. D.: Biochem. J., 11, p79-95  
(1917)

31) Trehy, M. L.: Environ. Sci. Technol.,  
20, p1117-1122 (1986)

32) 日本水道協会: 上水試験法・解説, p670

(2001)

33) 松尾宏: 水質汚濁研究, 12(9),  
p582-588 (1989)

34) Stevens, A. et al : J. AWWA, 81(8),  
p54-60 (1989)

35) Reckhow, D. A. et al : J. Water  
Supply: Research and Technology, 50(1),  
p1-13 (2001)

36) 日本水道協会: 上水試験法・解説, p681  
(2001)

37) 日本食品洗淨剤衛生協会: 次亜塩素酸  
ナトリウム, p13-15 (2002)

38) Streicher, R. P. et al.: Analytical  
Letter, 19(5-6), p681-696 (1986)

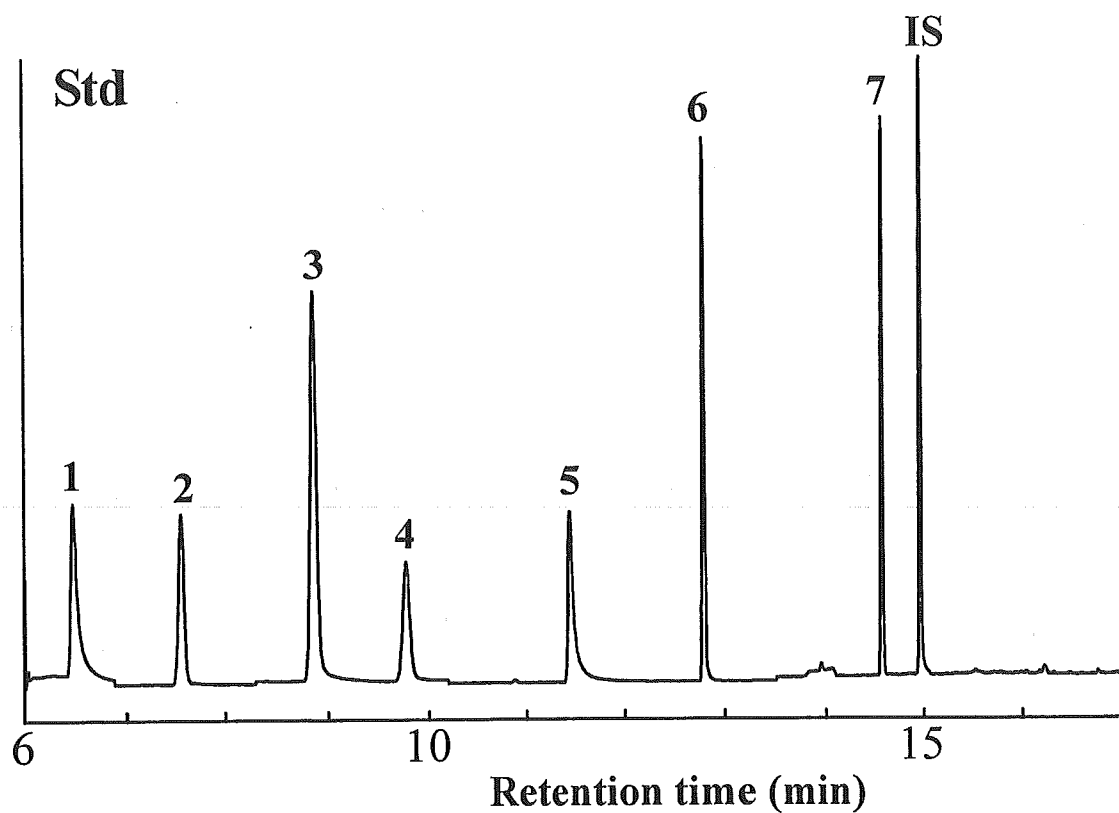


Fig.1. ハロアセトニトリル及び抱水クロラール標準液の GC/MS クロマトグラム

1: Chloroacetonitrile (MCAN), 2: Trichloroacetonitrile (TCAN) 3: Dichloroacetonitrile (DCAN), 4: Chloral hydrate (CH), 5: Bromoacetonitrile (MBAN), 6: Bromochloroacetonitrile (BCAN), 7: Dibromoacetonitrile (DBAN), IS: 1,2,3-Trichloropropane (IS)