

Figure 1. Typical structures of polysorbates 20, 60, 65 and 80. The formulae and EO (%) were estimated based on the assumption that there were 20 moles of EO per molecule.

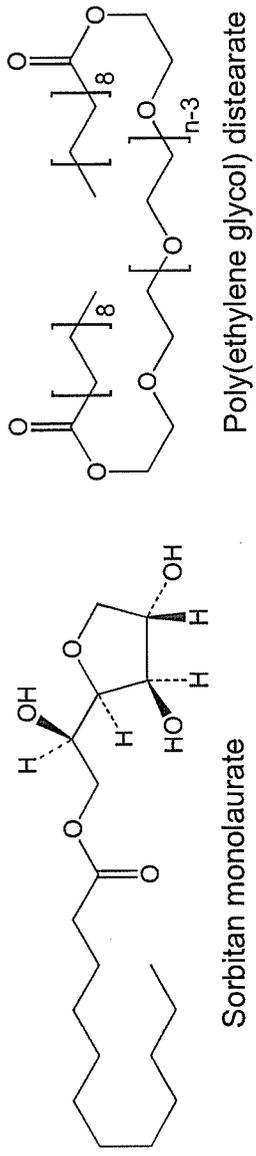


Figure 2. Structures of sorbitan monolaurate and poly(ethylene glycol) distearate.

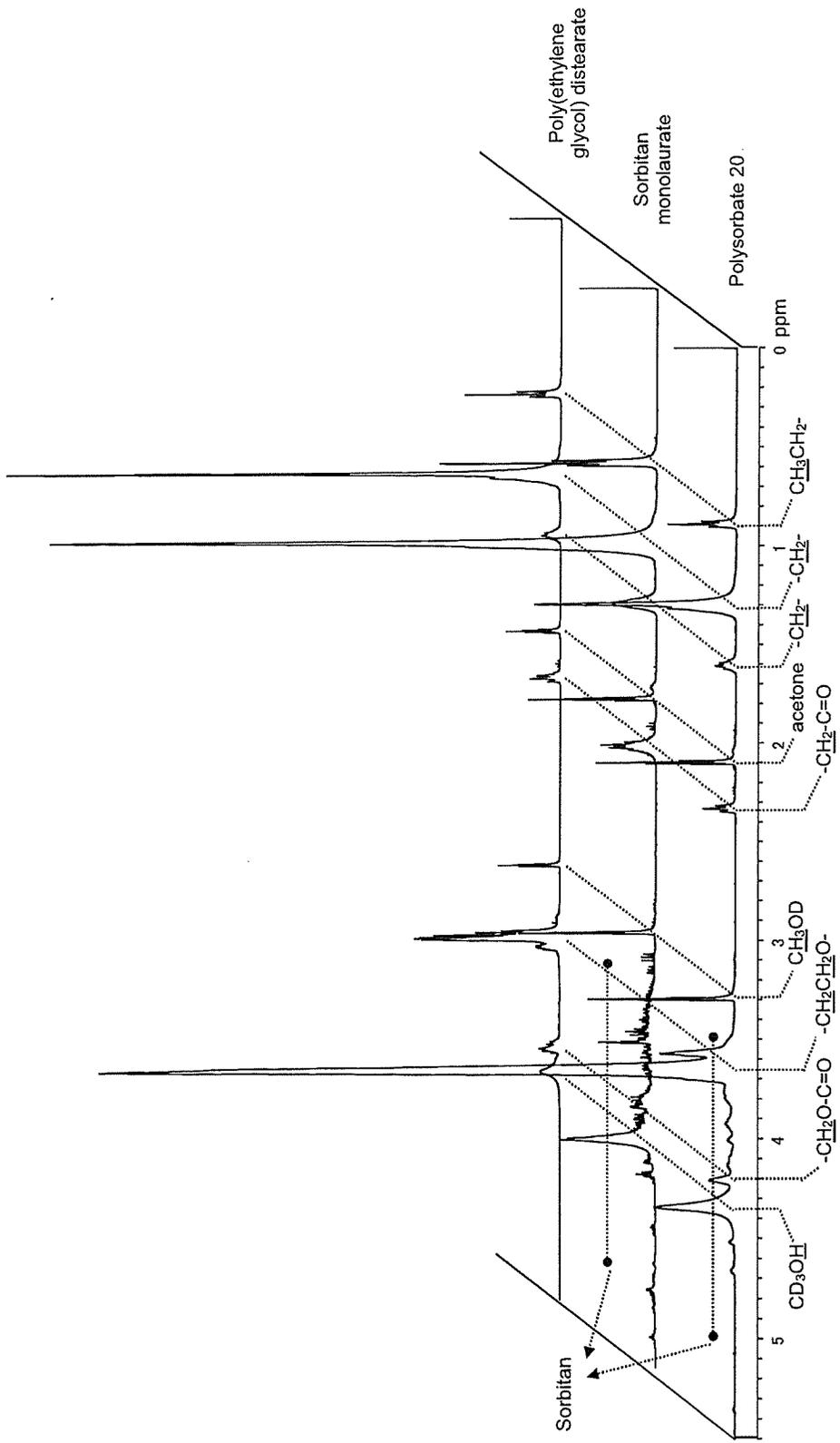


Figure 3. Comparison of NMR spectra of polysorbate 20, sorbitan monolaurate and poly(ethylene glycol) distearate. <sup>1</sup>H-NMR spectra were obtained using the ECA500 system (500 MHz; JEOL) under the conditions shown in Table I.

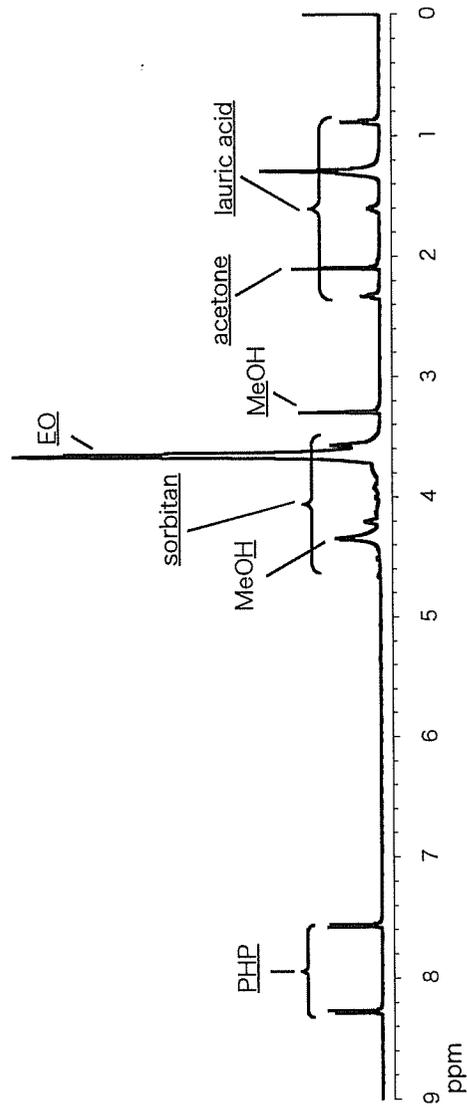


Figure 4. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of polysorbate 20.

The spectrum was obtained using the ECA500 system (500 MHz, JEOL). PHP was added as an internal standard. Signals of the four protons on the benzene ring of PHP were observed at  $\delta_H$  values of 7.46-7.66 ppm and 8.18-8.38 ppm. Most of the EO signals of polysorbate 20 were observed in a large envelope between  $\delta_H$  3.40 and 3.85 ppm.

Table I. Instruments and acquisition parameters.

Spectrometer	MERCURY 400 (VARIAN) and ECA500 (JEOL)
Probe	5 mm indirect detection probe
Spectral width	- 2.5 - 12.5 ppm
Data points	64000
Flip angle	45°
Pulse delay	30 s ( $>5 \cdot T_1$ )
Scan times	8
Sample spin	15 Hz
Probe temperature	25 °C
Solvent	Mixture of methanol- $d_4$ and acetone- $d_6$ (1 : 1)
Internal standard	Potassium hydrogen phthalate (PHP)
Range of integral signal	Oxyethylene group (EO) = 3.40 - 3.85 ppm
	4 protons of PHP = 7.46 - 7.66 ppm + 8.18 - 8.38 ppm

Table II. Determination of EO contents in polysorbates by qNMR.

Sample name	MERCURY (400 MHz, VARIAN)		ECA500 (500 MHz, JEOL)	
	entry	EO(%)	entry	EO(%)
Polysorbate 20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)	1	73.0	1	72.2
	2	71.8	2	71.8
	3	73.2	3	72.3
	4	71.7	4	72.5
	5	71.9	5	71.6
			6	72.9
			7	72.0
			8	72.7
			9	73.7
AV		72.3	AV	72.4
		0.7		0.6
Polysorbate 60 (polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate)	1	67.7	1	67.4
	2	65.3	2	67.7
	3	68.9	3	67.5
	4	67.8	4	67.9
	5	66.9	5	68.6
	AV	67.3	AV	67.8
		1.3		0.5
Polysorbate 65 (polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate)	1	49.1	1	49.8
	2	49.8		
	3	49.5		
	4	49.8		
	5	48.7		
	AV	49.4		
		0.5		
Polysorbate 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate)	1	65.0	1	67.0
	2	65.5		
	3	66.2		
	4	64.8		
	5	65.1		
AV	65.3			
		0.6		

Reagent grade polysorbates were purchase from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. The "entry" means the same sample was measured repeatedly on different days.

Table III. EO contents in commercial polysorbates determined using qNMR.

Name	Stipulated value	Brand	EO(%)	SD	Name	Stipulated value	Brand	EO(%)	SD
Polysorbate 20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)	70.0-74.0%	A	71.2		Polysorbate 65 (polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate)	46.0-50.0%	A	48.3	
		B	73.0				B	46.0	
		C	70.3				C	-	
		D	71.0				D	47.2	
		E	71.5				E	48.1	
		AV	71.4	1.0			AV	47.4	1.1
Polysorbate 60 (polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate)	65.0-69.5%	A	66.9		Polysorbate 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate)	65.0-69.5%	A	67.4	
		B	65.4				B	65.1	
		C	68.0				C	69.3	
		D	68.1				D	66.7	
		E	67.2				E	68.0	
		AV	67.1	1.1			AV	67.1	1.6

Brands A~E were purchased from five manufacturers. Brand C does not supply polysorbate 65.

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 武庫川女子大学薬学部 扇間昌規

研究協力者 日本ミネラルウォーター協会 峯 孝則

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。本研究は、食品に使用された食品添加物の流通状態における消長を実験室レベルでシミュレーションする方法を検討するとともに、消長の機構について分子レベルからの解明を試み、それらの結果を実際の食品への応用へと提案することを目的としている。対象とした食品添加物は、保存料として国内外で広く使用されているソルビン酸であるが、本研究で、ソルビン酸は食品成分として共存し得るアミノ酸のシステインと相互作用して、新たな物質を生成することが示唆された。ソルビン酸の保存料としての活性のみならず、生成物の有害性あるいは有益性の問題は早急に解明されなければならない。本年度は効果的に生成物を単離・精製しその構造の解明を目的とした。

A. 研究目的

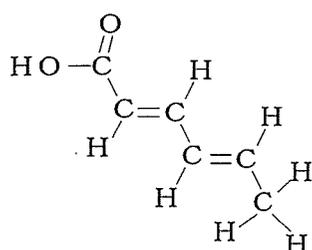


図1 ソルビン酸

ソルビン酸(以下 SOA)は図1に示されるように、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構造の低分子であるが、官能基を複数持ち化学反応性に富み、保存料としては

静菌作用との関連においても関心が持たれる。ソルビン酸自体は室温で安定で、安全な保存料とされ、広く使用されている。

しかし、本研究で、SOAをアミノ酸のシステイン（以下 Cys）と水溶液中で混在させて室温放置させたところ、両者の反応生成物が生じることを見出した。昨年度はこの生成物の分取規模での生成方法、などの条件を検討したので、本年度は生成物の分取を実施し、その構造に関する情報を NMR から得ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 概略

(1) 構造解析や有害性、有効性の研究に

必要な量の生成物を単離、精製する条件を確立し、実施するために、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。

SOA あるいはソルビン酸カリウム(以下 SOAK)のメタノール水溶液と Cys 塩酸塩(以下 Cys・HCl) あるいは Cys 遊離体のメタノール水溶液とをそれぞれ等量混和した各組合せで室温放置した、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。反応生成物を含む溶液から、HPLC を用いた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. 試薬及び試料溶液の調製

### (1) 試薬

SOA : 和光純薬工業特級、SOAK : 和光純薬工業一級、L-Cys・HCl 1 水和物 : MP BIOMEDICALS、L-Cys 遊離体 : MP BIOMEDICALS、メタノール : 和光純薬工業 LC/MS 用、トリフルオロ酢酸 (以下 TFA) : 和光純薬工業 高速液体クロマトグラフ用

### (2) 試料溶液の調製

SOA 500mg を 50%メタノール水溶液に溶解させた後、50mL にメスアップする (10mg/mL : SOA 原液)。SOAK 500mg を 10%メタノール水溶液に溶解させた後、50mL にする (10mg/mL : SOAK 原液)。Cys 遊離体 500mg を同様に 10%メタノール水溶液に溶解させた後、50mL にする (10mg/mL : Cys 遊離体原液)。Cys・HCl 1 水和物 500mg を 10%メタノール水溶液に溶解させた後、50mL にする (10mg/mL : Cys・HCl 1 水和物原液)。

SOA 原液 20mL と Cys 遊離体原液 20mL とを混合しこれを (A) 液とする (各 5mg/mL 含有)。SOA 原液 20mL と Cys・HCl 1 水和物原液 20mL とを混合しこれを (B) 液とする (各 5mg/mL 含有)。SOAK 原液 20mL と Cys 遊離体原液 20mL とを混合しこれを (C) 液とする (各 5mg/mL 含有)。SOAK 20mL と Cys・HCl 1 水和物 20mL とを混合しこれを (D) 液とする (各 5mg/mL 含有)。

(A)液、(B)液のメタノール濃度は約 30%、(C)液、(D)液のメタノール濃度は約 10% である。これらの液を室温、暗所に保存した。

## 3. 装置

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 : 0.1%TFA 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% (リニアグラディエント)
- ・流速 : 3mL/min.
- ・波長 : 230nm
- ・注入量 : 20  $\mu$ L
- ・他に検討した分取カラム :  
DAISOPAK SP-102-5-ODS-BP  
(20mmI.D.x25cm)

Wakopak Wakosil-II 5C18RS Prep  
(20mm I.D. x 25cm)

4. 試験操作

SOA と Cys の混合組合せと反応生成物

上記の(A)、(B)、(C)、(D)を室温暗所に保管し、試料を HPLC によるグラディエント分析した。

C. 研究結果

1. 試料溶液の見かけ上の変化

試料溶液(A)、(B)、(C)、(D)を室温で暗所に3週間保管したときの、それぞれの溶液は表1. に示すような変化が見られた。

表1. 試料溶液の外観 (3週間後)

試料	液性、沈殿物の生成等
(A)	淡黄色透明
(B)	黄色透明
(C)	微淡黄色透明、粉状沈殿物あり
(D)	淡黄色、針状の綿様沈殿物あり

2. HPLC での単離条件

カラムとして負荷量の大きな DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP(20mm I.D.x25cm)及び Wakopak Wakosil-II 5 C18 RS Prep (20mm I.D.x25cm)を検討したが、シャープな分離が得られなかった。そこで、ある程度の分取量が期待できて分離の良いカラム条件として、カラム径は分取カラムと同じで、カラム長の短いカラムを検討した。その適切なものとして、Wakosil-II 5C18RS Prep (20mm I.D. x5cm) を選択した。プレカラムは DAISO PAK SP-120-5-ODS-BP(4.6mm I. D. x5cm)を用いた。

次に分離条件を検討した。アイソクラチック条件では分離全体がシャープにならな

かったためグラディエント分析を行った。SOA のテーリングを抑えるために移動相に酸を添加することにしその酸として、分取を念頭において TFA を用いた。

移動相にはメタノールとアセトニトリルを検討したが、メタノールのほうがシャープな分離が得られたためメタノールを用いた。

最終的に決定した移動相条件は次のとおりである。0.1%TFA-メタノールによるグラディエント条件：メタノール 0→70% (25分) →90% (5分) →0% (リニア・グラディエント)。検出波長は230nmとした。

3. SOA と Cys との反応物生成物の HPLC

SOA と Cys の4種の組合せで調製した試料溶液(A)、(B)、(C)、(D)について、HPLC によるグラディエント分析をした。図2. に室温暗所に3ヶ月間放置した時の(A)のクロマトグラム、同様に図3～図5に(C)～(D)のクロマトグラムをそれぞれ示す。

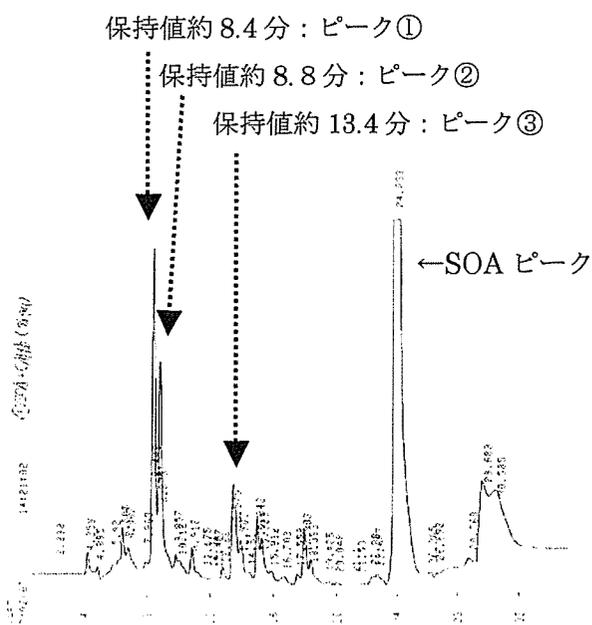


図2. (A) の HPLC クロマトグラム

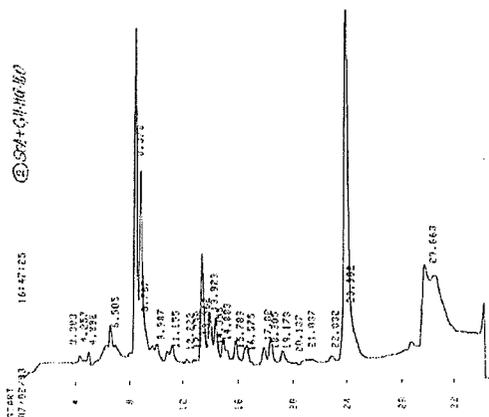


図3. (B)のHPLCクロマトグラム

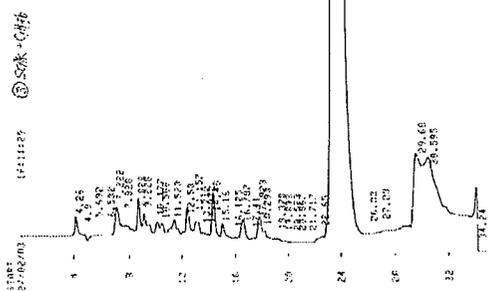


図4. (C)のHPLCクロマトグラム

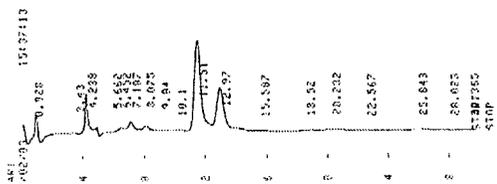


図5. (D)のHPLCクロマトグラム

(A)、(B)、(C)、(D)の各クロマトグラムの中で(A)、(B)の一部のピークに経時的な増加が認められた。そこで増加の認められたピーク：保持値約8.4分(ピーク①)、約8.8分(ピーク②)、約13.4分(ピーク③)についてその消長を調べた。

#### 4. 試料溶液(A)、(B)の経時変化

上記3ピークについて、室温暗所に5週間まで放置した時の1週間毎の消長を図6. に示した。

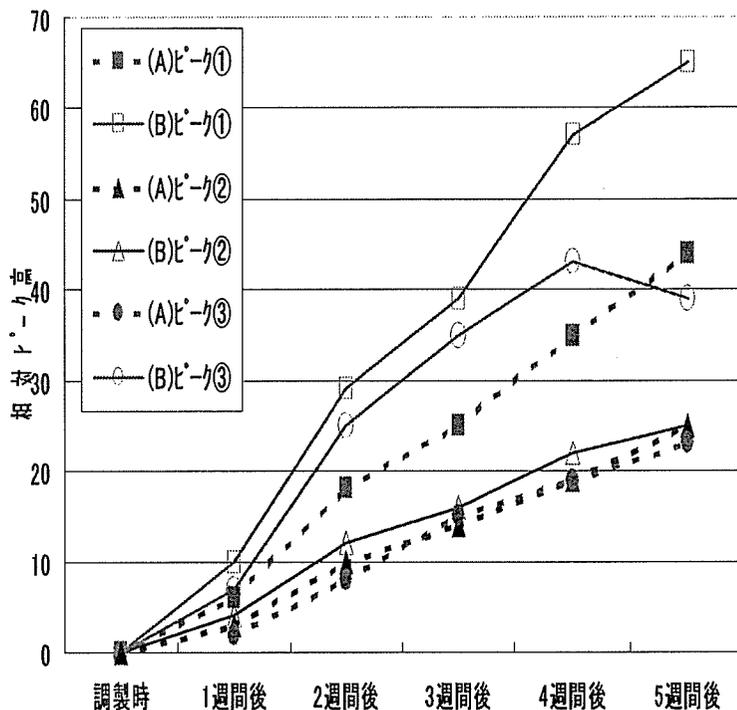


図6. 試料液(A)、(B)におけるピーク①、②、③の消長(各ポイントの測定はn=1)

図6. より、ピーク①、②、③において試料液(B)は(A)よりもピークの増加度合いが高かった。そのため、これら3ピークの同定のための分取には試料液(B)を用いて行うことにした。

## 5. 3ピークの同定のための分取および構造決定

反応生成物の同定を目的に、HPLC で分取を行い、現在 NMR で構造決定中である、

### D. 考察

1. 本研究で、SOA と Cys 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。そこで、この反応生成物の構造を決定するために、昨年度は主に分取条件の確立を検討した。

2. 本年度の研究業は、この生成物の有害性や有効性などの性質や構造解析などの研究に必要な量を回収するために分取条件を詳細に検討・確認しながら進められた。

3. 昨年度と同様に SOA 2 種と Cys 2 種による 4 通りの組合せで、反応生成物の形成を比較したが、今回は室温暗所放置する期間を 3 ヶ月としたことで、より明確な組み合わせと効果的な分取条件を見出すことができた。また、分取すべきより鮮明な生成物のクロマトグラムを判定できるようにな

った。

### E. 結論

1. SOA 2 種と Cys 2 種をそれぞれ混合し室温下、水溶液中に放置したところ、2 種の混合液から、3 つの増加ピークが認められた。

2. 3 つのピークが増加傾向を示した試料液 (B) について、同定を目的に分取を行い、NMR で構造決定中である。

3. SOA と Cys の添加形態によって、反応性の異なること、複数の生成物が形成されていることが推測される。

### 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。

### G. 研究発表

今後、生成物の分離・精製法および生成物の構造などに関して、学会発表及び学会誌等に投稿する予定である。

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消毒副生成物の生成挙動を明らかとするため、溶媒抽出-GC/MS法を用いてハロ酢酸類の分析を行った。

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、ジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸の生成が確認され、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ジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸が、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、水洗浄後にはハロ酢酸は減少し、水洗浄が消毒副生成物の低減化に有効であることが確認された。

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、食品衛生における微生物学的危害防止ため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<sup>1)</sup>、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されている<sup>2)</sup>。その後も、塩素処理により生成する消毒副生成物について広く研究が行われ、これまでにハロアセトニトリルや、抱水クロラール、ハロ酢酸などの種々の塩素系有機化合物の生成が確認されている。

このため、各国では消毒副生成物による健康影響について評価を行い、飲料水の水質基準値が設けられている。WHOの飲料水ガイドライン第3版<sup>3)</sup>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 であり, ハロ酢酸類に関しては, モノクロロ酢酸(MCAA)が 0.02 mg/l, ジクロロ酢酸(DCAA)が暫定基準値として 0.05 mg/l, トリクロロ酢酸が 0.2 mg/l に設定されている。米国 EPA では総 THM の最大許容濃度(MCL)が年間平均として 0.08 mg/l であり, ハロ酢酸類として 0.06 mg/l としている<sup>4)</sup>。また, EU では, 総 THM として 0.1 mg/l に設定しているが, ハロ酢酸類については設定されていない<sup>5)</sup>。

現在, わが国では水道水の水質基準において, THM 類は総 THM として 0.1 mg/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 0.09 mg/l 以下など 50 項目の水質基準が設けられている<sup>6)</sup>。平成 15 年には, 水道法水質基準の大幅な改正が行われ, ハロ酢酸類が新たに設定された。MCAA は 0.02 mg/l, DCAA は 0.04 mg/l, TCAA は 0.2 mg/l に設定されており, その他のハロ酢酸類については要検討項目となっている。なお, 現在, 清涼飲料水中の消毒生成物に関しても, 規格基準策定に向けた検討が行われている。

これまでに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>7-9)</sup>や, 今枝らによる豆腐製造過程における THM 生成<sup>10)</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>11-13)</sup>, これまでのところ THM の生成挙動の全容を解明するまでには至っておらず, また, その他の消毒副生成物に関しては, Chang らによるフルーツジュースの塩素処理による生

ずる消毒副生成物の研究において, ハロアセトンやハロ酢酸, ハロアセトニトリル生成の報告があるが<sup>14)</sup>, 食品における消毒副生成物の定量的な生成挙動の解析は行われていない。

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>15)</sup>, 2004 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<sup>16)</sup>。また, 次亜塩素酸水についても, 製法の多様化にともない, 成分規格の改正が検討されるなど使用実態が日々変化しつつあり, 殺菌料からの消毒副生成物の挙動解明には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消毒副生成物について 3 カ年計画で調査を行い, 一昨年度には THM などの揮発性有機化合物について, 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。昨年度は, ハロアセトニトリルや抱水クロラールなど消毒副生成物について調査し, カット野菜の次亜塩素酸ナトリウム処理により, ジクロロアセトニトリル及び抱水クロラールが生成し, さらに, 次亜塩素酸ナトリウムにリンゴ酸を併用した場合, 抱水クロラール生成量が増加することを明らかとした。本年度は, ハロ酢酸類

の生成挙動の解明に向けて検討を行った。

## 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 ハロ酢酸混合標準原液(クロロ酢酸[MCAA], ジクロロ酢酸[DCAA], トリクロロ酢酸[TCAA], ブロモ酢酸[MBAA], ジブロモ酢酸[DBAA], トリブロモ酢酸[TBAA], ブロモクロロ酢酸[BCAA], ブロモジクロロ酢酸[BDCAA], ジブロモクロロ酢酸[DBCAA])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酢酸混合標準原液 II 及び 1,2,3-トリクロロプロパン標準原液を用いた。また、サロゲートとして SUPELCO 社製の 2,3-ジブロモプロピオン酸を用いた。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)を用いた。メタノールには関東化学社製の残留農薬・PCB 試験用用い、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, MilliQ 水を用いた。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>17)</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/ECD はアジレントテクノロジー製の HP6890N を用い, GC/MS には島津製作所製の GCMS-QP2010 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) GC/ECD 測定条件

カラム : DB-1701 (J&W) 30m × 0.25mm I.D. 膜厚 0.25µm, カラム温度 : 35°C (10min) → 5°C/min → 75°C (15min) → 5°C/min → 100°C (5min) → 5°C/min → 135°C → 20°C/min → 260°C, スプリットレス, 注入口温度 : 200°C, 検出器温度 : 260°C, 線速度 : 25 cm/min

### 5) GC/MS 測定条件

カラム : DB-1701 (J&W) 30m × 0.25mm I.D. 膜厚 0.25µm, カラム温度 : 35°C (10min) → 5°C/min → 75°C (15min) → 5°C/min → 100°C (5min) → 5°C/min → 135°C → 20°C/min → 260°C, スプリットレス, 注入口温度 : 200°C, インターフェース温度 : 250°C, イオン化法 : EI, イオン化電圧 : 70ev, 線速度 : 43 cm/min

### 6) 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。

### 7) 試験液の調製

試料を測定用精製水 20 ml を含む 30 ml のスクリーキャップバイアルに採り, サロゲート及び硫酸ナトリウム 8 g を加え, よく振とうした後, 硫酸を滴下し pH0.5 以下となるように調整した。1ug/ml 内部標準液を含む MTBE 5 ml を加え, 2 分間激しく振りまぜた後, 3000 rpm, で 5 分間遠心

分離後、MTBE 層 3 ml を 10ml のスクリー  
ンキャップバイアルに採り、10%硫酸メタ  
ノール溶液 1 ml を加え、ヒートブロック上  
で 50°C、2 時間加熱し、メチルエステル化  
処理を行った。反応終了後、放冷し、飽和  
炭酸水素ナトリウム 5 ml を加え中和を行  
い、炭酸ガスの発泡が少なくなるまでボル  
テックスミキサーを用いてよく攪拌した。  
静置後、MTBE 層を 1.5 ml バイアルに分取  
し、GC/ECD 及び GC/MS 用試験液とした。

#### 8) 検量線用標準液の調製

ハロ酢酸混合標準原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、試験液  
と同様に操作を行った。

### C. 研究結果

#### 1) GC/ECD 及び GC/MS 法によるハロ酢 酸類の測定

ハロ酢酸類の挙動解明に向けて検討を行  
うに当たり、まず、ハロ酢酸類の分析法の  
開発を行った。水道水中のハロ酢酸類の分  
析法としては、ハロ酢酸類を誘導体化後、  
GC/ECD 及び GC/MS により測定を行う方  
法やイオンクロマトグラフ(IC)法<sup>18)</sup>、また、  
高速液体クロマトグラフ質量分析  
(LC/MS) 法<sup>19-20)</sup>などが報告されている。  
IC 法は簡便であるが夾雑ピークとの分離  
が悪く、食品中のハロ酢酸類分析には不向  
きと考えられた。これに対し、近年開発さ  
れた LC/MS 法は特異性に優れており、ハ  
ロ酢酸類を誘導体化することなく直接分析  
できるなど優れている。しかし、高極性化  
合物のハロ酢酸類を測定するには、不揮発  
性のイオンペアー試薬を移動相として用い

る必要があり、イオンペアー試薬とのイオ  
ン対形成により感度が著しく低下し、十分  
な検出感度が得られないなど問題がある<sup>19)</sup>。  
このため、水道水中のハロ酢酸類とともに  
分析されるダラポン(2,2-ジクロロプロピ  
オン酸)では、多量の検液から溶媒抽出後、  
濃縮操作を行い、検出感度以上の試験液を  
調製して、LC/MS により分析が行われてい  
るが<sup>20)</sup>、今回対象とする食品からの分析で  
は多検体の一斉分析を行うのに必要な試料  
採取量には限界があり、同様に操作を行う  
のは難しいため、GC 法による試験法を採  
用することにした。

現在、水道水の水質検査法<sup>6)</sup>では、ハロ  
酢酸類の分析に、誘導体化後 GC/MS によ  
り測定を行う方法が採用されている。しか  
し、誘導体化試薬としてジアゾメタンを用  
いている。ジアゾメタンは有害性や爆発性  
があり取り扱いには注意が必要である。こ  
のため、米国 EPA では新たな試験法として、  
硫酸・メタノール溶液を用いた誘導体化法  
が EPA method 552.2 として提示され、そ  
の後、EPA method 552.3 も提示されてい  
る。これまで、本研究課題では水質検査法  
と同等の試験法を用いることを念頭に試験  
法開発を行ってきたが、今回は安全性を考  
慮し、EPA method 552.2 及び 552.3 を参  
考として試験法の検討を行った。また、分  
離カラムとして EPA method では  
DB-5.625 及び DB-1701 の 2 種類のカラム  
を用いている。DB-5.625 は CDBAA とサ  
ロゲートとの分離不良、DB-1701 ではダラ  
ポンと DCAA の分離不良の問題があるが、  
今回、農薬のダラポンは同時分析の対象で  
はないため、DB-1701 を分離カラムとして  
採用した。分析の結果、GC/ECD 及び

GC/MS いずれにおいても、各混合標準液及び内部標準液は 40 分までにすべてのピークが検出された。GC/ECD の測定において BCAA ピーク近傍(22.4 min)に試薬由来の妨害ピークが検出されるが、妨害ピークとは分離しており直線性も良好であった (Fig.1)。CDBAA 及び TBAA は、検出感度が悪く、50 ng/ml 以上の標準液濃度においてのみ検出が可能であったが、CDBAA 及び TBAA を除く、各標準液検量線の 1・50 ng/ml の範囲における  $R^2$  値は、 $> 0.999$  で良好な直線性を示した。また、GC/MS によるスキャンマススペクトルパターン解析において、各化合物は、いずれも塩素及び臭素原子を含むため、検出感度の悪い CDBAA 及び TBAA を除く、その他のハロ酢酸誘導体は、特異的な同位体パターンを示し、容易に定性確認を行うことができた。(Fig.2)

## 2) 添加回収試験

カットキャベツに検量線用標準液を 50 ng/g 又は 500 ng/g 添加し、添加回収試験を行った (Table 1, 2)。CDBAA 及び TBAA は上述のとおり検出感度が悪く、さらに、食品成分由来の妨害ピークが重なるため、GC/MS 及び GC/ECD いずれを装置を用いても定量分析は困難であった。その他の化合物の回収率は、GC/ECD において、50 ng/g 添加において 86.6~105.0%、500 ng/g 添加では 91.3~102.8%であり、変動係数は 2.4%以内となり良好な結果が得られた。また、GC/MS を用いた場合、GC/ECD に比べると、やや低い回収率であるが、CDBAA 及び TBAA を除いたハロ酢酸類の添加回収率は 80%以上であり、概ね良い回収結果が得られた。本法における各化合物

の定量限界は、MCAA, MBAA, DCAA を 1 ng/g であり、TCAA, BCAA, BDCAA, DBAA については、食品由来の妨害ピークの影響を考慮して 5 ng/g に設定した。定量は GC/ECD を用いて行い、ピークが検出された場合には、GC/MS によるスキャンマススペクトル解析による定性確認を行った。

## 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

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生成する消毒副生成物について、GC/ECD 及び GC/MS により分析したときのガスクロマトグラフ及びマススペクトルを Fig.3 に示した。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  $\mu\text{g/ml}$  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、13.8 分 (ピーク A) と 17.5 分 (ピーク B)、20.2 分 (ピーク C) の保持時間に新たなピークが検出された。これらのピークのについて、GC/MS でスキャンによるマススペクトラムの解析を行い、NIST 及び Willy のライブラリと照合したところ、ピーク B は DCAA、ピーク C は TCAA のマススペクトルと良い一致を示し、さらに、各標準液の保持時間と一致しており同定に至った。なお、13.8 分に検出されたピーク A は、ライブラリとの照合の結果から、昨年度報告したジクロロアセトニトリルであることが明らかとなった。

## 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)。

DCAA 及び TCAA 共に、殺菌処理直後より生成され始め、1 時間後のカットキャベツ中の残存量は DCAA が 535 ng/g, TCAA が 36.3 ng/g であった。また、同様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について分析したところ、殺菌処理から 1 時間以内に DCAA 及び TCAA が速やかに生成し、その後、ほぼ一定の値を示した。また、マイナーピークとして MCAA 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、GC/MS によるスキャンマススペクトルの解析においても、検出感度が足りず、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)。DCAA, TCAA とも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、DCAA が 780 ng/g, TCAA が 183 ng/g であった。また、MCAA の保持時間にもピークが検出されたが、定量下限値以下の極微量であり、GC/MS によるスキャンマススペクトル解析においても同定できなかった。

#### 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、DCAA 及び TCAA ともに生成量が急激に増加した。各温度毎の、TCAA に対する DCAA の比率を求めた場合、温度が高くなるにつれて DCAA の割合が大きくなる傾向が認められた。

#### 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

次亜塩素酸ナトリウム浸漬液の 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 調製には塩酸及び水酸化ナトリウムを用いた。浸漬液が酸性領域では、強酸性条件において TCAA 生成量が若干高くなるが、弱酸性から中性領域においては DCAA 及び TCAA 生成量に殆ど変化はみられなかった。一方、アルカリ性領域では、pH10 の弱アルカリ性領域を中心として DCAA 及び TCAA ともに生成量が増加する傾向が認められ、強アルカリ性になると DCAA 及び TCAA 生成量が急激に低下した。

#### 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アルカリ性の液体であるが、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。次亜塩素酸ナトリウム浸漬液の pH は、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<sup>21)</sup>。

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、ハロ酢酸類の

生成量の増加は確認できなかったが、クエン酸を添加した場合には、次亜塩素酸ナトリウム・クエン酸混液を調製直後より、速やかに DCAA が生成し始め、TCAA も僅かながら生成が確認された。一方、次亜塩素酸ナトリウム・リンゴ酸混液は、調製直後において DCAA が僅かに生成するが、混液調製 10 分以降は、ほぼ一定の濃度となり、以後の DCAA 濃度上昇は認められなかった。

#### 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>22)</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のモデル実験を行った(Fig. 9)。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後、カット野菜に超純水を加えて、3 回繰り返しによる振とう洗浄を行い、水洗浄工程前後における消毒副生成物量の測定を行った。殺菌処理後、DCAA が 379 ng/g、TCAA が 22.9ng/g まで増加したが、水洗浄により DCAA が 63.4 ng/g、TCAA が 6.8 ng/g となり、水洗浄後にはハロ酢酸が減少していた。

### 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、EPA method 552.2 及び 552.3 に準じて溶媒抽出—GC/ECD によるカット野菜中のハロ酢酸類の分析を行った。本試験法の分析感度及び回収率は、CDBAA 及び TBAA を除き概ね

良好であった。今回の実験において、カット野菜の塩素殺菌処理により生成したハロ酢酸は、塩素系のハロ酢酸のみであり、臭素を含むハロ酢酸類は検出されおらず、臭素を含む CDBAA と TBAA の低回収率の問題は、実用上のほとんど影響はないと考えられる。仮に臭素を含むハロ酢酸が生成される場合においても、CDBAA や TBAA に先立ち、BCAA 及び DBAA, BDCAA が優先的に生成すると考えられるため、これら化合物を指標としてモニタリングすることにより、CDBAA 及び TBAA の生成挙動の推定も可能と思われる。

また、塩素系ハロ酢酸の DCAA と TCAA に関しては、いずれも検出感度が高く、添加回収試験の結果も良好であり、本法は食品中の消毒副生成物分析法として有用な試験方法と考えられる。GC/ECD 及び GC/MS を比較した場合、GC/MS はスキャンマススペクトルによる定性確認など優れた面もあるが、定量性においては GC/ECD が優れており、本研究では定性と定量のそれぞれの目的に応じて二つの装置を併行して使用し、分析を行った。

#### 2) 消毒副生成物の生成に関与する因子の検討

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。生成したハロ酢酸の大半は DCAA と TCAA であり、また、これ

ら以外にも MCAA の保持時間にもピークが検出されたが、微量であり確認には至らなかった。

次亜塩素酸ナトリウム処理により DCAA や TCAA が生成した要因については、詳細は不明である。河川水における THM やハロ酢酸類の生成機構に関して、Rook はフルボ酸分解生成物であるレゾルシノールの塩素化反応による推定経路を提示しており、レゾルシノールに対する塩素付加反応、酸化反応及び加水分解反応の進行と開裂の程度により、最終生成物としてクロロホルムや、DCAA、TCAA が生成する反応メカニズムを提示している<sup>23)</sup>。しかし、富田らは、レゾルシノールの塩素化反応の検討において、生成中間体として五員環化合物の 3,5-トリクロルシクロペンテンジオンを確認しており、Rook によるハロホルム型の反応メカニズムを否定している<sup>24)</sup>。このため、レゾルシノールなど 1,3-ジヒドロベンゼン構造を有する有機化合物を前駆物質とするハロ酢酸の生成メカニズムは十分に解明されておらず、今後さらなる詳細な検討が必要である。しかしながら、基本的な反応メカニズムとして、カルボニル基に隣接する炭素に対する、塩素付加反応、酸化反応、加水分解反応の結果、ハロ酢酸類が生成している可能性が高く、THM に付随して生成してくるものと思われる。

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酸性領域では DCAA 及び TCAA の生成量に大きな変化は認められないが、弱アルカリ性領域(pH10)において DCAA 及び TCAA 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結果において、アルカリ性領域では DCAA は弱アルカリ性において生成量が若干増加するが、TCAA 生成量は急激に低下しており<sup>24)</sup>、今回の結果とやや異なる傾向が認められている。アルカリ性領域では生成反応と同時に、加水分解反応も進行しており、さらに、温度や残留塩素との接触時間や濃度など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が変化していると考えられる。今回、弱アルカリ性条件下により消毒副生成物の残存量が増加したが、一般に水道水の塩素処理実験では 24 時間反応後の消毒副生成物量を観察するのに対し、野菜の塩素殺菌処理時間は 5~10 分と短く、今回の実験でも塩素殺菌処理時間は 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た結果、反応が進行し、アルカリ性領域における DCAA 及び TCAA 生成量が変化したものと推察される。

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。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が、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>26)</sup>、微生物学的危害と化学的危害の両面から見た、殺菌処理に最適な温度を考えていくことが今後、必要になると思われる。なお、温度が高くなるにつれて DCAA に対する TCAA 生成の割合が低下しているが、これは反応の初期段階では過剰の塩素原子による連続的な付加反応が進行し TCAA が生成するが、反応が進行するにつれて浸漬液