

とから、今回の結果は予想の範囲内であった。また、公定法(TiCl₃法および質量法)の結果を基準として考えると、各タール色素によって多少異なるが、公定法値% = qNMR 値% × 1.01~1.12 の関係式が成り立つことが確認された。

D. まとめ

qNMR は、原理的に一次標準比率法の一つとしての資格を有し、求められた値は計量学的にも従来法に比べ信頼性も高いと考えられる。昨年度に引き続き、タール色素について qNMR による絶対定量を行った結果、タール色素の定量法として、TiCl₃法および質量法以外に qNMR が有効な手段の一つに成り得ることが明らかとなった。qNMR では、分析対象とする化合物の標準品が入手できない場合や不純物の混入がある場合においても、NMR シグナルが十分分離したものであれば、信頼性の高い絶対量の測定が可能であること、qNMR スペクトルデータが定量性を伴った参照スペクトルとして有用であること、化学構造の確認が可能であること等、従来法より優れている。また、今回行った qNMR による定量分析は、タール色素を qNMR 標準液に溶解して測定するだけで操作が単純である点、1測定当たりの所要時間が約 10 分以内で迅速である点が優れていた。

以上のことから、タール色素の迅速かつ正確な定量分析法として、qNMR は十分に実用レベルであると考えられる。また、公定法における確認試験法、純度試験法あるいは定量法としての資格を有すると共に、SI にトレーサブルな分析値を算出可能であることから、分析値、分析法の国際整合性の確保が可能な次世代の定量分析法としても有望であると考えられた。

E. 参考文献

- 1) Sugimoto, N., Koike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K.: Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Add. Contam.*, **24**, 799-806 (2007).
- 2) Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hirai, T.: A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79-86 (2009).
- 3) 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 川原信夫, 正田卓司, 杉本直樹, 靄島由二, 品川麻衣, 榛葉信久, 宮田一義, 岡村隆志, 塚本秀樹, 千秋和久, 長谷川泰介, 河合健蔵, 余田 光, 掛樋一晃, 合田幸広, 奥田晴宏, 棚元憲一, 山口照英: ヘパリンナトリウム純度試験に関する研究(第1報): ¹H-NMR によるヘパリンナトリウム不純物の分析. *医薬品研究*, **39**(10), 651-659 (2008).
- 4) 川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 泰 艶, 細山沙織, 戸井田敏彦, 山口照英: ヘパリンナトリウム純度試験に関する研究(第4報): 合成過硫酸化コンドロイチン硫酸の日局標準品としての適用性の評価. *医薬品研究*, **39**(11), 721-729 (2008).
- 5) Ihara, T., Saito, T., Sugimoto, N.: Expansion of organic reference materials for the analysis of hazardous substances in foods and environments. -Realization of an efficient metrological traceability using the quantitative NMR method-. *Synthesiology*, **2**, 12-22 (2009).
- 6) 田原麻衣子, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 多田敦子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壮, 棚元憲一, 中澤裕之, 西村哲治: qNMR に基づく有機リン系農薬イソキサチオンオキシソンの品質管理. *食化誌*, **16**, 28-33 (2009).
- 7) Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.: Quantitative determination of atractylon in *Atractylodis rhizoma* and

Atractylodis Lanceae rhizoma by ¹H-NMR spectrometry. Natural Medicines, in press (2010).

- 8) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 伊藤澄夫, 山崎 壮, 河村葉子, 西村哲治: 定量 NMR を用いたコチニール色素中のカルミン酸の絶対定量. 食衛誌, in press (2010).
- 9) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 久保田領志^a, 山崎 壮^a, 河村葉子^a, 西村哲治: 定量 NMR を用いた天然有機化合物の絶対定量法の開発. 第 51 回天然有機化合物討論会講演要旨集, p.31-36 (2009).
- 10) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀: 定量 NMR を用いた有機化合物の絶対定量法

の開発と食品分析の信頼性の確保 (総説). FFI ジャーナル, in press (2010).

F. 研究発表

学会発表

1. Sugimoto, N., Tada, A., Sato, K., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Kubota, R., Yamazaki, T., Kawamura, Y., Nishimura, T.: Application of quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy to determination of the contents of synthetic food colors. 123rd AOAC Annual Meeting (2009.9).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

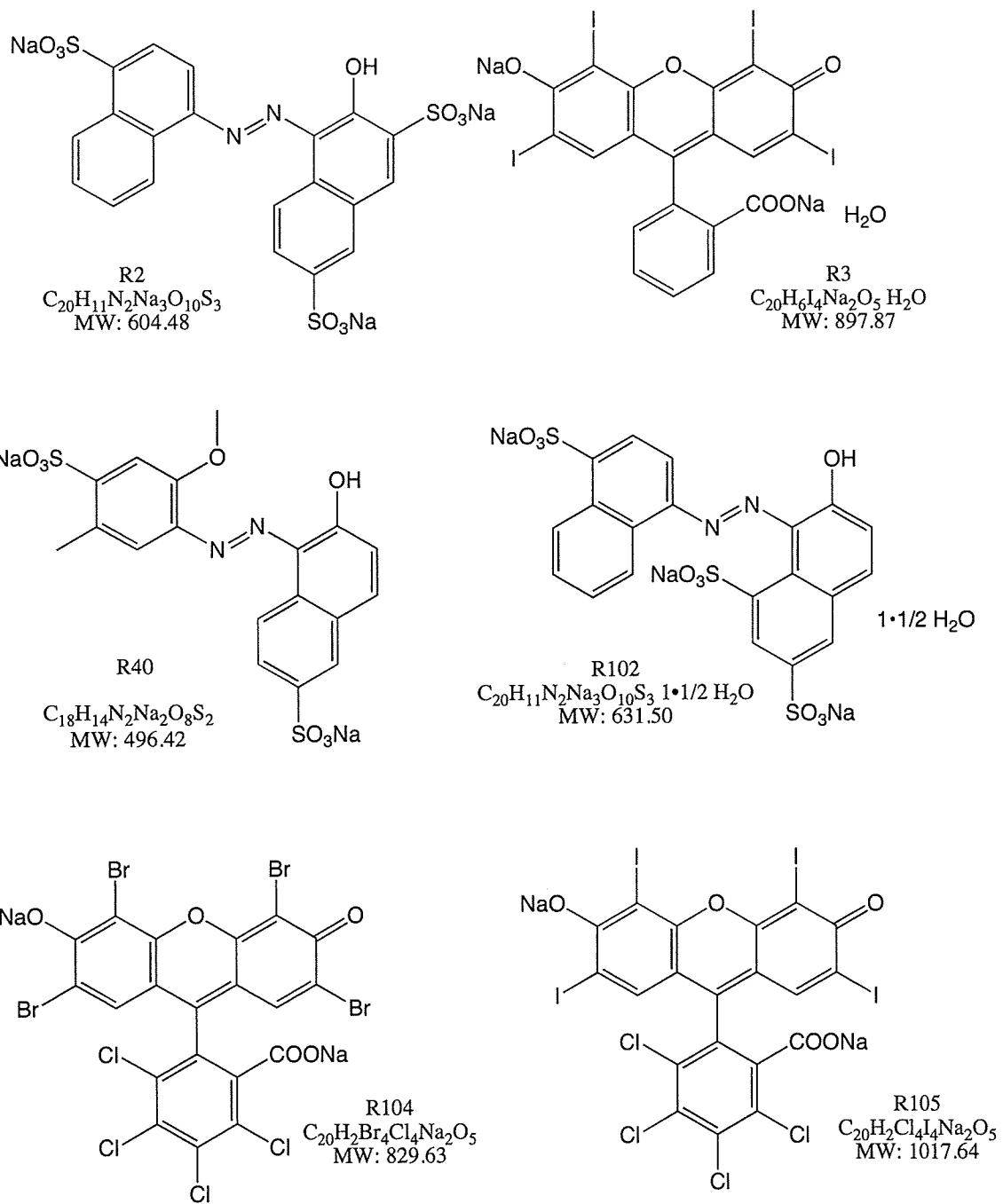
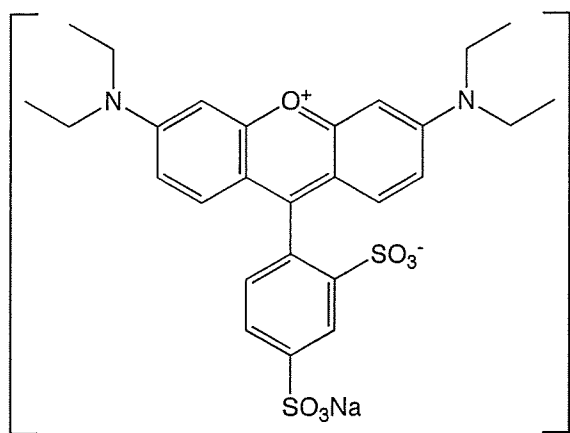
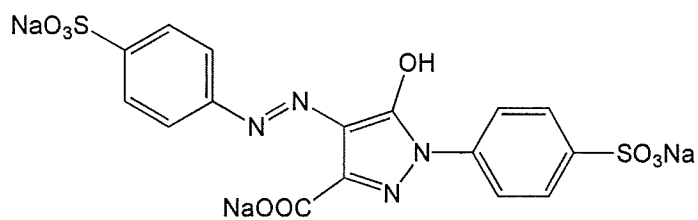


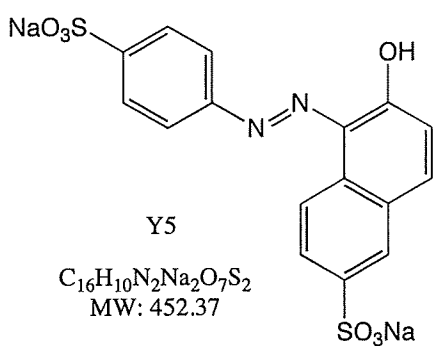
Fig. 1 Structures of tar dyes



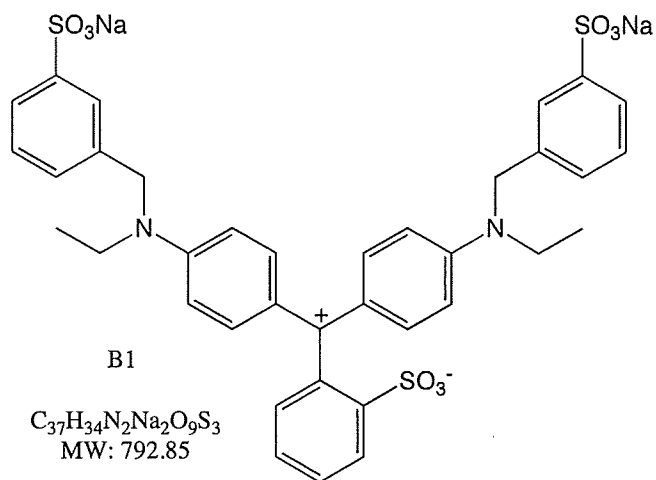
R106
 $C_{27}H_{29}N_2NaO_7S_2$
 MW: 580.65



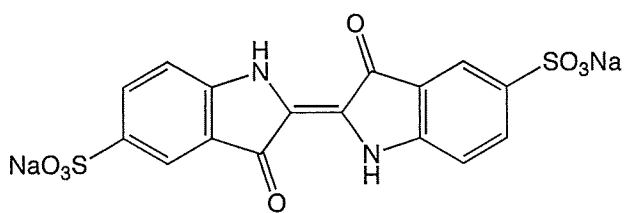
Y4
 $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$
 MW: 534.36



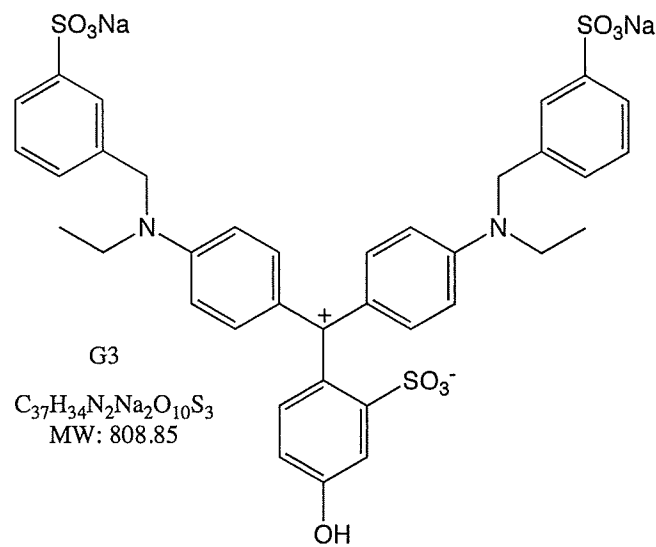
Y5
 $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$
 MW: 452.37



B1
 $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$
 MW: 792.85



B2
 $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$
 MW: 466.35



G3
 $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$
 MW: 808.85

Fig. 2 Structures of tar dyes

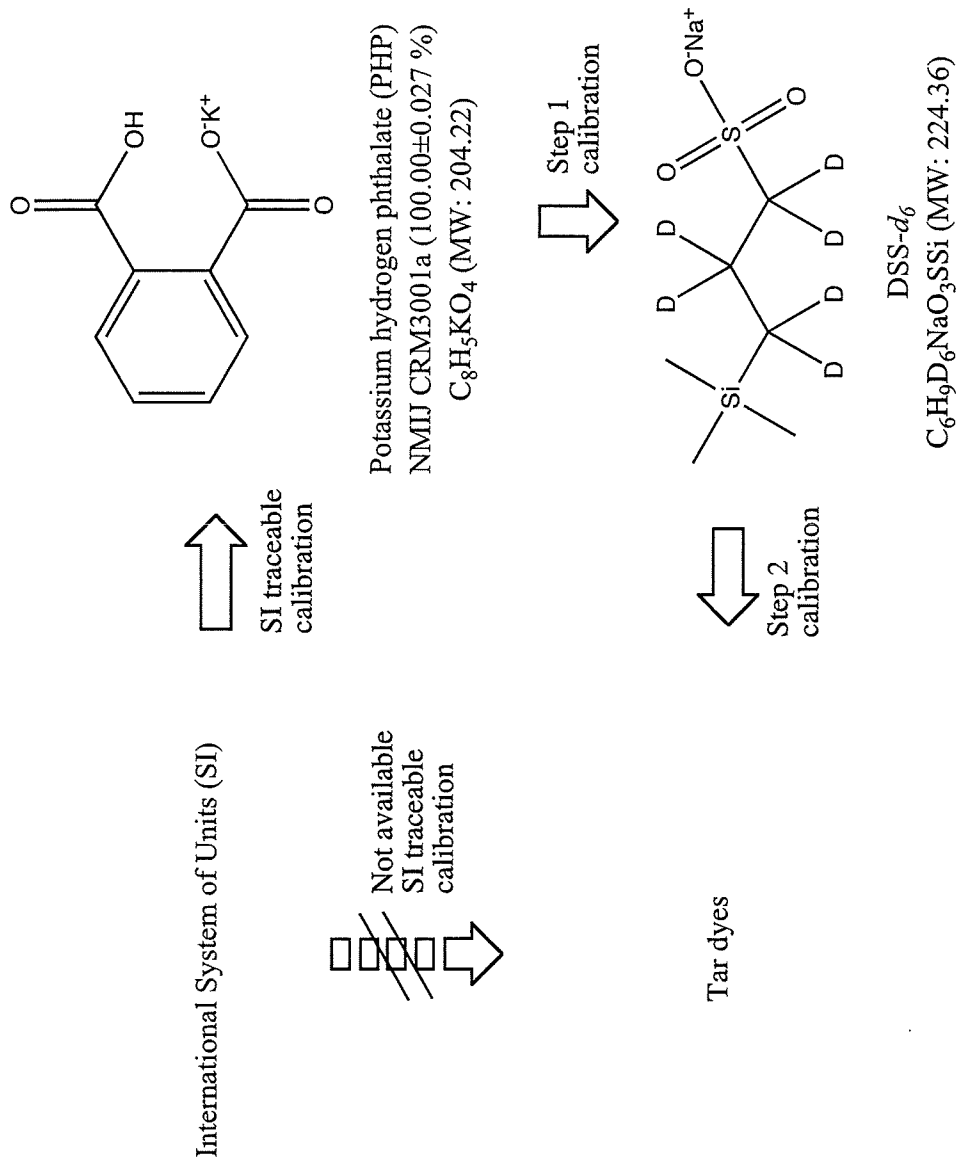


Fig. 3 Strategy of SI-traceable quantification based on qNMR.

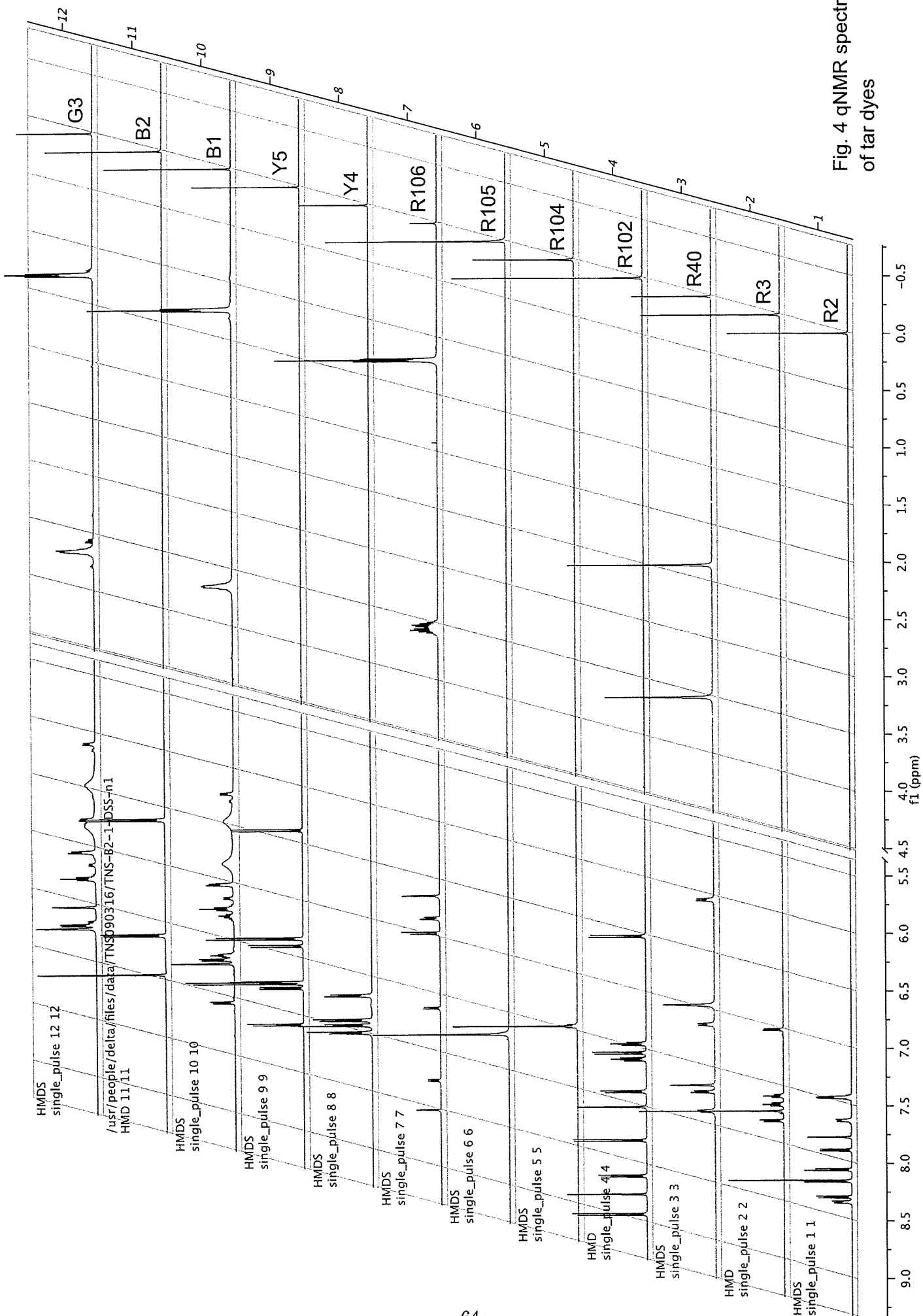


Fig. 4 qNMR spectra of tar dyes

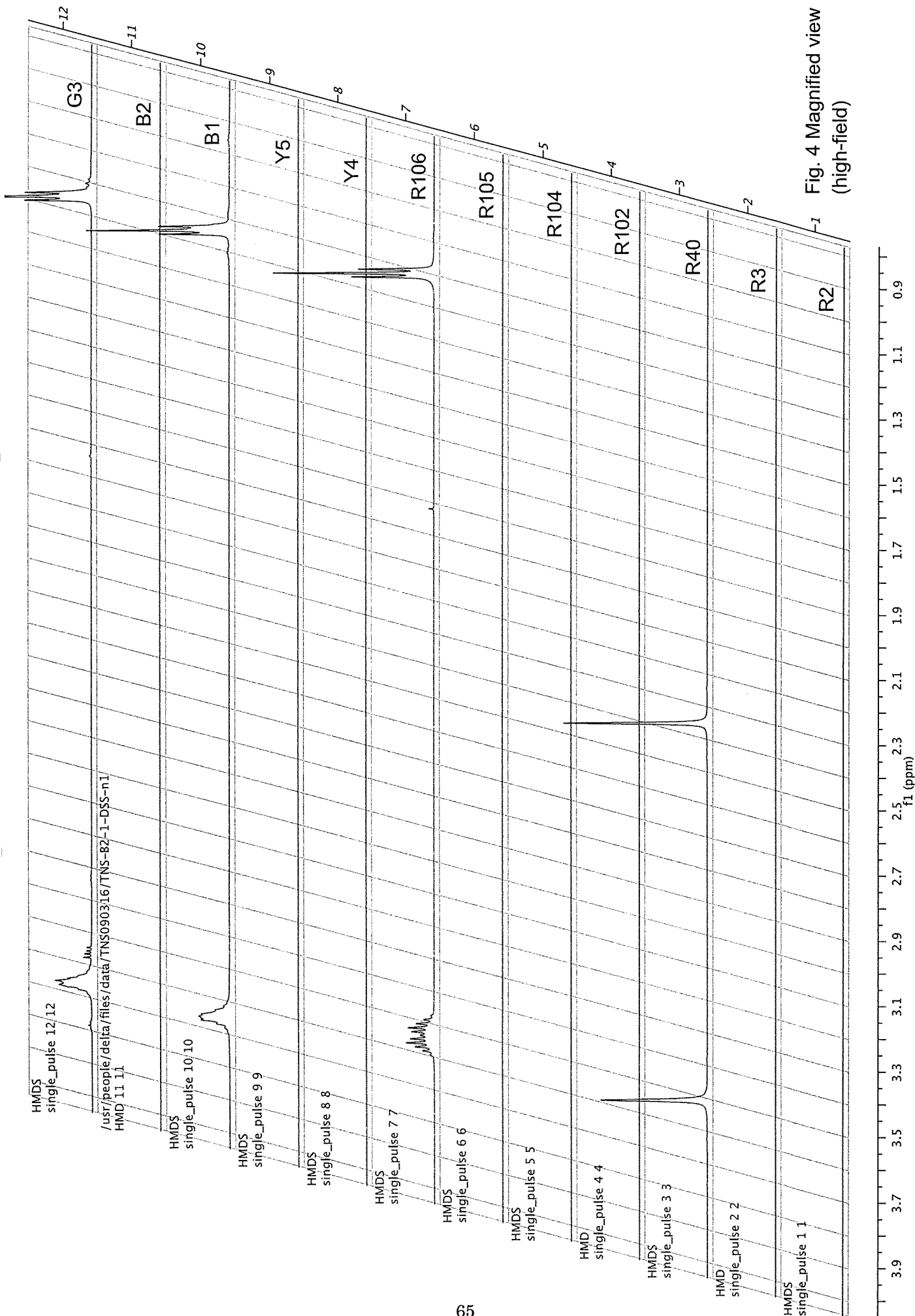


Fig. 4 Magnified view (high-field)

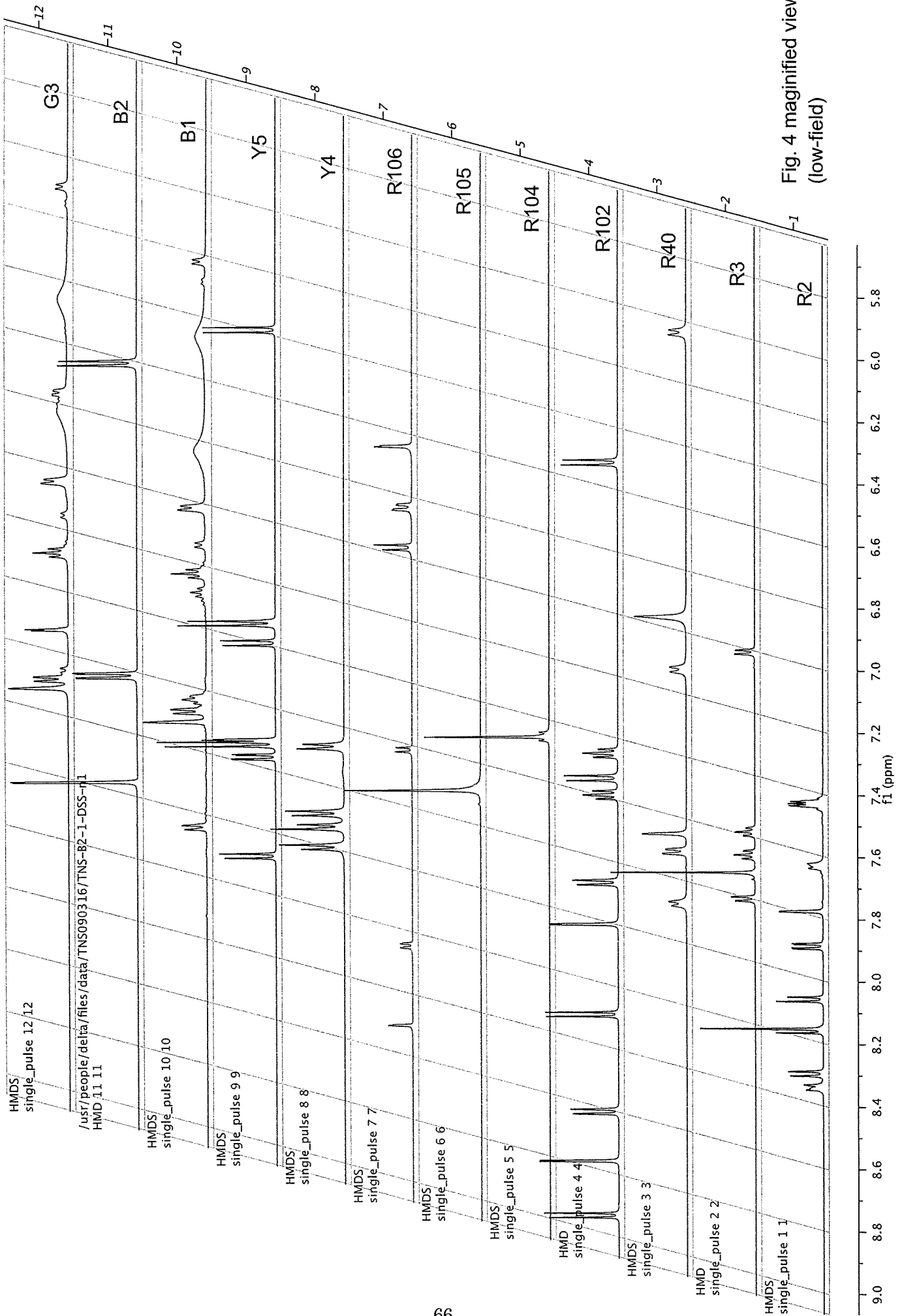


Fig. 4 magnified view (low-field)

Table 1 Instruments and acquisition parameters

Spectrometer	ECA600 (JEOL)
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	- 5 - 15 ppm
Data points	32000
Auto filter	on (8 times)
Flip angle	90°
Pulse delay	60 s ($>5 \cdot T_1$)
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	25°C
Solvent	D ₂ O
qNMR reference material	DSS- <i>d</i> ₆
Primary standard material	Potassium hydrogen phthalate (PHP) (NMIJ CRM3001a)

Table 2 The Purity of Tar Dyes calcd. by qNMR.

Sample	Purity (%)	Target signals for qNMR / Number of the Protons								RSD(%) in molecule (n = Target Signals)
		7.42 2H	7.62 1H	7.77 1H	7.88 1H	8.05 1H	8.16 2H	8.26-8.38 2H		
R2	AV(%)	84.9	84.3	85.0	84.0	84.4	85.6	85.7	85.3	0.8
	RSD(%) in sample (n=3)	0.3	0.5	0.4	0.7	0.2	0.7	0.5	0.2	
R3	AV(%)	89.4	84.1	90.3	94.8	87.5	90.2			4.1
	RSD(%) in sample (n=3)	1.8	2.3	2.2	2.0	1.8	1.1			
R40	AV(%)	83.5	84.3	84.6	80.6	82.7	84.7	85.2	85.0	2.1
	RSD(%) in sample (n=3)	0.5	0.5	0.6	0.5	0.6	0.8	0.3	0.5	
R102	AV(%)	83.9	82.2	84.2	83.7	85.2	83.5	83.9	83.7	1.1
	RSD(%) in sample (n=3)	0.2	0.5	1.3	0.7	0.6	0.3	0.3	0.3	
R104	AV(%)	85.5	85.5							-
	RSD(%) in sample (n=3)	0.3	0.3							
R105	AV(%)	82.5	82.5							-
	RSD(%) in sample (n=3)	0.2	0.2							
R106	AV(%)	92.3	95.0	95.7	92.9	93.6	93.1	89.4	89.5	2.7
	RSD(%) in sample (n=3)	1.4	1.1	1.3	1.5	1.4	1.8	1.7	1.7	
Y4	AV(%)	85.7	80.9	88.6	87.8					4.3
	RSD(%) in sample (n=3)	1.2	1.6	1.2	0.9					
Y5	AV(%)	86.2	83.9	88.1	88.3	84.4				2.4
	RSD(%) in sample (n=3)	1.4	1.7	1.1	1.3	1.6				
B1	AV(%)	84.2	83.8	82.2	83.0	87.9	84.1			2.6
	RSD(%) in sample (n=3)	4.1	3.1	2.9	5.8	3.3	5.4			
B2	AV(%)	89.2	89.3	89.6	88.8					0.4
	RSD(%) in sample (n=3)	1.2	1.4	1.2	1.2					
G3	AV(%)	87.6	94.6	69.3	91.4	83.9	93.3	93.1		10.3
	RSD(%) in sample (n=3)	1.0	1.0	0.8	1.1	0.8	1.8	1.1		

Table 3 Summary of tar dyes purities calcd. by TiCl₃ titration, gravimetry, spectrophotometry and qNMR.

	qNMR (n = 3)		TiCl ₃ titration* (n = 3)		Gravimetry* (n = 4)		Spectrophotometry (n = 5)		Official method/qNMR
	AV(%)	RSD(%)	AV(%)	RSD(%)	AV(%)	RSD(%)	AV(%)	RSD(%)	
R2	84.9	0.3	91.8	1.7			93.2	3.4	1.08
R3	89.4	1.8			94.5	1.1	94.6	3.0	1.06
R40	83.5	0.5	93.7	0.3			93.9	5.2	1.12
R102	83.9	0.2	92.3	1.3			93.4	4.2	1.10
R104	85.5	0.3			93.1	0.4	91.2	1.8	1.09
R105	82.5	0.2			92.3	0.7	91.8	1.4	1.12
R106	92.3	1.4	96.5	2.0			95.4	1.2	1.05
Y4	85.7	1.2	92.5	1.2			92.0	1.7	1.08
Y5	86.2	1.4	93.6	0.9			92.2	1.8	1.09
B1	84.2	4.1	91.7	2.1			88.8	1.5	1.09
B2	89.2	1.2	90.9	1.9			95.3	1.8	1.02
G3	87.6	1.0	88.8	1.5			91.7	2.1	1.01

* Official method for purity test.

食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明

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

カット野菜を強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水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、ダイナミックヘッドスペース-GC/MS法を用い60種の揮発性化合物の分析を行い、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理による場合と生成挙動の比較を行った。

カット野菜を次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理を行った場合、殺菌時間及び温度に比例してトリハロメタン(THM)の生成量が増加するが、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水による殺菌処理では量は増加しなかった。また、次亜塩素酸ナトリウム及び微酸性次亜塩素酸水殺菌処理では殺菌時間に応じてクロロメタンが増加し、次亜塩素酸ナトリウム及び強酸性次亜塩素酸水処理ではイソブチロニトリル、2-メチルブチロニトリル及びイソバレロニトリルの生成が確認された。

カット野菜の次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後により生成したTHMは、流水洗浄後によって水道水中のTHM量とほぼ同じレベルまで減少した。一方、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水殺菌処理ではTHMが生成せず、殺菌及び流水洗浄後のカット野菜に残存するTHMは水道水中のTHM量と同じレベルであった。

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、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。

次亜塩素酸ナトリウム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(CF)を検出し¹⁾、また、河川水の塩素処理によってCFを始めとした様々なトリハロメタン(THM)が生成されることを明らかとして

いる²⁾。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、ハロ酢酸などの様々な塩素系化合物が確認されている。

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³⁾では、CF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⁴⁾、また、EUでは、総 THM として 0.1 mg/L に設定している⁵⁾。

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 0.1mg/L、CF が 0.06 mg/L、BDCM が 0.03 mg/L、DBCM が 0.1 mg/L、BF が 0.09mg/L 以下に設定されている⁶⁾。

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 CF 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⁷⁻¹⁰⁾。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、日高らによるキャベツやモヤシ中の CF の生成¹¹⁻¹³⁾や、Resch らによる牛乳製造プラントにおける次亜塩素酸の界面活性剤との併用洗浄による CF 生成挙動の解明などの報告があるが¹⁴⁻¹⁶⁾、これまで全容の解明には至っていない。

また、近年になり新たな殺菌料として希塩酸や食塩を電気分解することで次亜塩素酸を主成分した殺菌液を生成する、いわゆる電解水生成装置が開発され徐々に普及し始めている。このうち食品添加物規格に適合する一部の酸性殺菌液に関しては、平成 14 年に次亜塩素酸水として新規指定添加物に指定されており¹⁴⁾、また、無隔膜電解方式により製造されるアルカリ性(pH>7.5)の電解液(いわゆる電解次亜水)に関しては、平成 11 年 6 月 25 日、厚生省生活衛生局食品化学課長通知「いわゆる電解水の取扱いについて」において、所定の条件を満たすものに関しては次亜塩素酸ナトリウム希釈液と同等の扱いとされている。

現在、次亜塩素酸水としては、塩化ナト

リウム水溶液を有隔膜電解槽内で電解して陽極側より得られる水溶液を用いた強酸性次亜塩素酸水と、希塩酸を無隔膜電化槽内で電解して得られる水溶液を用いた微酸性次亜塩素酸水に分類され、それぞれについて個々の有効塩素濃度と pH が規格値として設定されている。しかし、技術進歩にともない現行の規格に適合しない新たな殺菌水生成装置が開発されており、成分規格の改正が検討されるなど殺菌料の使用実態が日々変化しつつあり、殺菌処理に伴う消毒副生成物の挙動解明に関しても、現況を踏まえた調査が必要となっている。

これまで、食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明として、次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム殺菌処理により生成する消毒副生成物について調査を行い、次亜塩素酸ナトリウムと亜塩素酸ナトリウムでは殺菌処理後の THM やアルデヒド類の生成能が異なることを明らかとしてきた。本年は、カット野菜を強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水により殺菌処理したときの THM 類の生成挙動について明らかとするため、揮発性化合物 60 種についてダイナミックヘッドスペース GC/MS 法を用いて分析を行い、次亜塩素酸水処理により生ずるカット野菜中の副生成物について、次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理と比較検討を行った。

B. 研究方法

1) 試薬 揮発性有機化合物標準原液として AccuStandard 製の EPA Method 502.2 用揮発性化合物混合標準液を用いた。内部標準原液として関東化学社製のフルオロベンゼン標準原液、4-ブロモフルオロベンゼン標準原液を用いた。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には和光純薬工業社製の食品添加物用を用いた。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、EDS ポリッシャーを通過させた超純水を用いた。その他の試薬は特級を用いた。次亜塩素酸ナトリウム及び次亜塩素酸水は第 8 版食品添加物公定書¹⁸⁾に従いあらかじめヨウ素滴定法で定量した。定量後、次亜塩素酸ナトリウムは有効塩素濃度が 100 µg/mL となるように適宜希釈し殺菌液とした。強酸性次亜塩素酸水は陽極及び陰極隔膜槽を塩事業センターの精製塩 1.0g を溶解させた 700mL の水で満たして電解後、陽極側より得られた水溶液をそのまま使用した。微酸性次亜塩素酸水は装置付属の希釈塩酸溶液を注入した電極を 10L の水が入ったタンクに投入し、電解後、よく攪拌して用いた。次亜塩素酸水は使用前に用時調製を行い、有効塩素濃度を確認した後、希釈せずに使用した。

2) 器具及び装置 サンプルバイアル(50 mL)及びテフロンライナー付シリコンセプタムは、I-CHEM 製の EPA 規格に準拠した 40mLVOA バイアルを用いた。ダイナミックヘッドスペースシステムとして Teledyne Tekmar 製のパージ&トラップ装置 AQUA PT5000J Plus 及びオートサンプラー SOLATek72 を用いた。SOLATek72 のサンプルニードルには、ダイナミックヘッドスペース分析用に成型された長さ 4.8cm の短いニードル (ジーエルサイエンス製) を使用した。GC/MS は島津製作所製の GCMS-QP2010 を用いた。バイアル瓶は 100℃で 3 時間加熱後、放冷し、バイアル内

部及びセプタムを窒素パージ処理した後、分析に使用した。

3) ダイナミックヘッドスペース GC/MS 測定条件

ダイナミックヘッドスペース条件 サンプルカップ温度:40℃, サンプルニードル温度:60℃, バルブオープン及びトランスファーライン温度: 150℃, パージ時間: 8 min, パージ流量:40 mL/min, ドライパージ時間:5 min, ドライパージ温度: 150℃, デソープ時間:6 min, デソープ温度:220℃, ベーク時間:35 min, ベーク温度:230℃, スターラー攪拌:オン, クライオフォーカス: なし

GC/MS 条件 カラム: AQUATIC 60m×0.25mm I.D. 膜厚 1.0µm, カラム温度:40℃(3min)→(4℃/min)→200℃(7min), 注入口温度: 200℃, インターフェース温度: 200℃, イオン化法: EI, イオン化電圧: 70ev

4) 殺菌処理方法

殺菌処理は通例、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 100µg/mL となるように調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液並びに、次亜塩素酸水溶液を加え、直ちに密栓し、冷所で 10 分間放置し殺菌処理を行った。殺菌処理後、アスコルビン酸ナトリウム(4→10) 200µL を加えて反応を止め、よく攪拌した後、冷所に保管後、VOA バイアルに試料を採取した。

5) 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、攪拌子、塩化ナトリウム 3 g 及び測定用精製水 10 mL 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 5 µL 注入し、直ちにテフロンシート付きセプタムを装着したキャップで密封し GC/MS 用試験液とした。

6) 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 1 mL 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 10 mL に採り、メタノールを加えて正確に 10 mL とし内部標準原液とした。この液 1 mL を正確に採り、メタノールを加えて正確に 10 mL とし内部標準液とした。

内部標準原液 1 mL を正確に少量のメタノールを入れたメスフラスコ 20 mL に採り、次いで、揮発性有機化合物混合標準原液 1 mL を正確に採り、メタノールを加えて正確に 20 mL とし揮発性有機化合物標準液とした。この液 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mL をそれぞれ正確に採り、メタノールを加えて正確に 10 mL とし、検量線用標準源液とした。VOA バイアルに攪拌子、塩化ナトリウム 3g 及び測定量精製水 10 mL を採り、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 5 μ L 注入し、直ちにテフロンシート付きセプタムのをせ、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) ダイナミックヘッドスペースによるカット野菜中の揮発性化合物の分析

測定対象とした揮発性有機化合物(VOC)混合標準液 60 種の GC/MS クロマトグラムを Fig. 1 に示した。45 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。これら化合物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した。また、12.6 分に溶出の 2,2-ジクロロプロパン及び cis-1,2-ジクロロエチレン、

15.2 分の 1,2-ジクロロエタン及びベンゼン、25.6 分のクロロベンゼン、1,1,1,2-テトラクロロエタン及びエチルベンゼン、30.9 分の 1,3,5-トリメチルベンゼン及び 2-クロロトルエンもピークも分離が不十分であったが、ターゲットイオンの選択により各化合物の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

カットキャベツに検量線用混合標準液を 5 ng/g 又は 50 ng/g となるように添加し、添加回収試験を行った (Table 1)。ジクロロジフルオロメタン、クロロメタン、塩化ビニル、ブロモメタン、クロロエタン及びトリクロロフルオロメタンは検出感度が低く SIM モードで測定を行った。その他の化合物に関しては十分な検出感度がありスクリーンモードにより測定を行った。各化合物の定量下限値は 0.5 ng/g に設定した。ブランク試料より 6.3 ng/g のクロロメタンが検出された。このためクロロメタンは 5ng/g 添加は除外し、50 ng/g 添加試験のみ実施した。また、ジクロロメタン、CF、ベンゼン及びトルエンが極微量検出されたが、定量下限値以下であり添加回収試験の結果に影響はなかった。添加回収試験の結果、ジクロロジフルオロメタン及びブロモメタンの回収率が 120%を超えて検出された。また、cis-1,3-ジクロロプロペン、1,2,4-トリメトキシベンゼン、p-イソプロピルトルエン、n-ブチルベンゼン、1,2-ジクロロベンゼン、1,2,4-トリクロロベンゼン、ヘキサクロロブタジエン、ナフタレン、1,2,3-トリクロロベンゼン及び 50 ng/g 添加における p-イソプロピルトルエンの回収率が 70%以下となった。しかし、これら以外の化合物については、5 ng/g 添加において 73.6~115.5 ng/g, 50

ng/g 添加では 71.8~115.0 ng/g と概ね良い回収率が得られた。また、変動係数は 20% 以内であり、Horwitz の式より算出される予測変動係数よりも小さく分析精度は良好であった。

3) 殺菌料原体の分析

各塩素系殺菌料溶液に含まれる有効塩素濃度、pH 及び THM 濃度の確認を行った (Table 2,3)。次亜塩素酸水生成装置には、水道管に直接接続する連続式とタンクに貯留させて電解するバッチ式の 2 つの方式がある。今回使用した装置はバッチ式であるが、連続式の装置の場合、電解液の調製に使用する水道水の水質の影響を受けて殺菌液中の THM 濃度が変化する可能性がある。このため調製溶媒として水質の影響を受けない超純水と水質の影響を受ける水道水の 2 つの溶媒を用いて殺菌液を調製し比較を行った。強酸性及び微酸性次亜塩素酸水の有効塩素濃度は、調製溶媒の種類によらず 21~25 µg/mL であった。水道水で殺菌液を調製した場合、各殺菌液の pH は成分規格の範囲内であったが、超純水で調製した微酸性次亜塩素酸水は pH が 3.3 の弱酸性溶液となった。超純水調製の強酸性次亜塩素酸水及び次亜塩素酸ナトリウムについては規格値の範囲内であった。

また、各殺菌液中の総 THM 濃度は、超純水で殺菌液を調製した場合、次亜塩素酸ナトリウムが最も高く 1.4 ng/mL であった。水道水調製の殺菌液では、次亜塩素酸ナトリウムにおいて総 THM が 27.3 ng/mL、強酸性次亜塩素酸水、微酸性次亜塩素酸水及び水道水中の総 THM 濃度は 16.9~18.2 ng/mL であった。次亜塩素酸水中の各 THM 濃度は水道水中の THM 濃度とほぼ同じであり、電解生成による次亜塩素酸水中の THM 濃度上

昇はなかった。なお、測定された何れの殺菌液中の THM 濃度も、水道水の水質基準の範囲内であった。

4) 塩素殺菌処理により生成する揮発性化合物の分析

本法を用いて次亜塩素酸ナトリウム及び次亜塩素酸水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、ダイナミックヘッドスペース GC/MS 法により分析したときのクロマトグラムを Fig.2 に示した。試料としてカットキャベツを用いた。次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理において、13.1 分に CF のピークが検出された。また、次亜塩素酸ナトリウム処理及び強酸性次亜塩素酸水処理群において、14.4 分、19.2 分及び 19.7 分にピークが確認された。これらは NIST 及び Willey のライブラリとの照合により、それぞれイソブチロニトリル、2-メチルブチロニトリル及びイソバレロニトリルと推定された。さらに、各試薬を入手してスペクトル解析を実施したところ、保持時間及びマススペクトルパターンが一致したことから推定された化合物と同じであると同定した (Fig.3)。

5) 塩素殺菌処理により生成する消毒副生成物の経時変化

各殺菌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)。次亜塩素酸ナトリウム溶液により殺菌処理した場合、殺菌処理直後より CF が生成し始め、20 分後には 26.1 ng/g となり、その後は徐々に増加し、60 分後には 31.4 ng/g となった。一方、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水により殺菌処理した場合には、CF を含む THM 量の増加は確認できなかった。また、次亜塩素酸ナトリウム及び微酸性次亜塩素酸水処理においてク

クロロメタンやクロロエタン量の経時的な増加傾向がみとめられたが、強酸性次亜塩素酸水処理では明瞭な傾向は確認できなかった。さらに、殺菌処理後の浸漬液についても同様に測定したところ、カット野菜中の CF 残存量と同様の挙動を示したが、クロロメタンは浸漬液中には検出されず試料中と異なる挙動を示した(Fig.5).

6) 殺菌液の温度による CF 生成量の変化

殺菌液の温度を 10 及び 20°C に設定し、カット野菜を各塩素系殺菌料により 10 分間殺菌後のカット野菜に残存する THM 生成量を比較した (Fig.6). 次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌した場合、温度上昇によって CF 量が約 1.6 倍に増加したが、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水処理では、温度上昇にともなう CF 量の増加は確認できなかった。また、その他の THM についても、殺菌料の種類によらず、温度上昇による THM 生成量に変化はなかった。なお、クロロメタン量については、データのばらつきが大きく、明瞭な傾向は確認できなかった。

7) 水洗浄による THM の除去効果

塩素殺菌処理を行った場合、食品に殺菌料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¹⁹⁾。そこで、食品に残存する CF の水洗浄による除去効果について検討を行った(Fig.7)。カットキャベツに対し、水道水を用いて調製した次亜塩素酸ナトリウム、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水で 10 分間殺菌処理を行い、殺菌前と殺菌後、水道水による流水洗浄後の各工程における THM 残存量の測定を行った。次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後、CF 残存量が 19.2 ng/g まで増加したが、毎分 6 L の水道水で流水洗浄することで 6.7

ng/g まで減少した。一方、次亜塩素酸水による殺菌処理と流水洗浄後の CF 残存量はそれぞれ 3.2~3.5 ng/g, 3.1~3.2 ng/g であり、次亜塩素酸水による殺菌では流水洗浄の有無によらず CF は殆ど残存していないことが明らかとなった。また、この実験に使用した強酸性及び微酸性次亜塩素酸水殺菌液中の THM 濃度は、調製に使用した水道水中の THM 濃度とほぼ同じであり、次亜塩素酸ナトリウム殺菌液のみ、次亜塩素酸水と比べて約 2 倍濃度の CF が含まれていた。ただし、いずれも水質基準値の範囲内であった (Fig.8).

D. 考察

1) ダイナミックヘッドスペース GC/MS 法によるカット野菜中の揮発性化合物の分析の検討

カット野菜に含まれる 60 種の揮発性化合物の分析をダイナミックヘッドスペース法により検討を行った。ダイナミックヘッドスペース法を採用することにより、食品成分由来の妨害を抑えながら高感度の分析が可能となり、THM 類は 0.5 ng/g 以上において定量分析が可能であった。添加回収試験において、一部の揮発性化合物の回収率が 70% 以下となった。カット野菜に添加した場合、試料への付着や分解などにより妨げられ、回収率が低くなったことが原因と考えられる。しかし、低回収率の化合物は、いずれも水道水の塩素処理においても副生成物として検出される事例は殆どないことから、あまり影響はなかったと思われる。

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関わる因子について

解明するため、殺菌料との接触時間や濃度を変更し、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により殺菌処理した場合には、殺菌料との接触時間に応じてCFの生成量が増加したが、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水による殺菌処理では、CF生成量の増加は確認されなかった。一般に塩素処理にともなうTHMの生成には、ハロホルム反応に基づく塩素の連続的付加と加水分解反応が関与していると考えられている²⁰⁾。このうち加水分解反応は塩基性条件下において反応が進むため、水道水の塩素処理においてpHが高くなるにつれてTHM量が増加することが知られている²⁰⁾。次亜塩素酸ナトリウム液はpH10の塩基性溶液のためTHM生成反応が進行するが、酸性溶液である次亜塩素酸水では加水分解反応が進行しにくく、CFが生成しなかったと考えられる。

また、次亜塩素酸の殺菌効果は、次亜塩素酸イオン型(CIO⁻)よりも、次亜塩素酸分子型(HCIO)において殺菌効果が高まることが知られている²¹⁾。次亜塩素酸ナトリウムのpKaは7.5であり酸性領域において分子型となり殺菌効果が高まるため、酸性溶液では塩基性溶液に比べて低い有効塩素濃度で同等の殺菌効果を得ることができる。カット野菜の殺菌処理に使用される次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素濃度は、一般に100~200 µg/mLであるのに対し、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水の有効塩素濃度は21~25 µg/mLであり、次亜塩素酸ナトリウムの約4~8分の1の有効塩素濃度であった。これによって塩素の連続付加反応に必要な塩素濃度が不足しておりTHM生成量に影響を及ぼした可能性が考えられる。次亜塩素

酸ナトリウム及び微酸性次亜塩素酸水においてクロロメタンが生成したが、これは塩基性及び微酸性条件下においてハロホルム反応によって塩素が一つ付加したものが途中で分解生成した化合物と考えられ、THM生成反応が途中まで進行したことを示すものである。以上より次亜塩素酸水においても塩素付加反応は進行するが、有効塩素濃度不足と酸性条件下における加水分解進行の低下によりTHM生成反応が進行しなかったとの結論に至った。なお、クロロメタンは、IARCによる発癌性リスク分類においてGroup 3（この化合物はヒトに対する発癌性について分類できない）に分類されており、生成量も極微量であることから、仮にクロロメタンが殺菌処理の結果、生成したとしても、この化合物による健康影響は殆どないと思われる。

また、今回分析対象とした60種の揮発性化合物以外の消毒副生成物として、次亜塩素酸ナトリウム及び強酸性次亜塩素酸水処理においてイソブチロニトリル、2-メチルブチロニトリル及びイソバレロニトリルの生成が確認された。従来、食品中の揮発性化合物の分析には、スタティックヘッドスペース法が一般的に用いられており、このため半揮発性のニトリル化合物は検出されなかった。しかし、ダイナミックヘッドスペース法を採用することで、半揮発性化合物も一緒に高感度分析が可能となり、新たにニトリル化合物の検出が可能となった。

水道水の塩素処理により生じる副生成物の研究において、水道水中のアミノ酸が塩素と反応し、ニトリル化合物が生成することが知られている²²⁻²³⁾。この報告をもとに考えると、カット野菜に含まれていたアミノ酸のバリン、イソロイシン、ロイシンが

塩素処理によって、それぞれイソブチロニトリル、2-メチルブチロニトリル及びイソバレロニトリルに変化したと推定される (Fig.9)、水道水の塩素処理では、ニトリル化合物はマイナー成分であるが、食品の場合、タンパク質やアミノ酸が多く含まれることから、塩素殺菌処理後のニトリル化合物についても今後調査が必要と思われる。

殺菌処理温度と THM 生成量の関係について調査したところ、次亜塩素酸ナトリウムでは、10℃から20℃への温度の上昇によってCF濃度が約1.6倍に増加したが、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水では変化しなかった。次亜塩素酸水は殺菌時間だけでなく、殺菌処理温度の上昇によっても、THMが生成しないことが示された。

3) 殺菌処理後の水洗浄による THM の除去効果

次亜塩素酸ナトリウムで殺菌処理した場合、殺菌処理後にカット野菜に生成したCFは水洗浄工程を加えることで、水道水中のTHM濃度量とほぼ同等のレベルまで減少させることが可能であった。また、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水処理において、殺菌処理前にはTHMは不検出であったが、次亜塩素酸水殺菌処理後には約3 ng/g 検出された。ただし、実験に使用した殺菌液及び水道水には17~18 ng/mLのTHMが含まれており、カット野菜に残存していたTHMは、殺菌液の調製に使用した水道水由来のTHMが殺菌処理過程でカット野菜に付着したと考えられた。このため次亜塩素酸水では流水洗浄を行わなくとも、殺菌処理後のカット野菜にTHMは殆ど残存していないことが示された。次亜塩素酸水については、残存THMの除去を目的とした流水洗浄は不要であるが、次亜塩素酸水の使用基準

において最終食品の完成前に次亜塩素酸水を除去することが定められており、殺菌処理後の残留塩素を除去するためには必要と考えられる。

なお、今回の結果をもとに次亜塩素酸水殺菌処理によりカット野菜に残存するTHMの暴露影響を考えた場合、カット野菜に残存するTHMは水道水由来のTHMと考えられ、さらに、水道水における水質基準値の設定において、1日当たり体重50kgのヒトが1日2L飲むと仮定して暴露量を計算しているが、2Lには調理用の水も含まれていることから、カット野菜に残存したTHMは水道水の水質基準において既に考慮されていると考えられる。以上より、水道水の水質基準値が規定の範囲内であれば、次亜塩素酸水による殺菌処理によってカット野菜に残存するTHMも許容範囲内に抑えられるため、新たに健康に影響を及ぼす可能性ないと推察される。

E. 結論

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場合にはTHMが生成するが、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水による殺菌処理ではTHMを生成しないことが明らかとなった。THMの生成影響についてのみ考えた場合、次亜塩素酸水のほうが次亜塩素酸ナトリウムに比べ優れていると考えられるが、殺菌料としての利便性や有用性を考えた場合、次亜塩素酸ナトリウムの方が優れた面もあるため、目的に応じた選択が望まれる。これら殺菌料は、野菜や魚介類加工品など生鮮食品の微生物学的危害を防止する上で欠かすことのできない重要な役割を果たしている。今後とも微生物学的リスクを十分に考慮した上での化学的リス

ク評価の検討が必要と考えられる。

F. 研究発表

学会発表

H. Kubota, K. Sato, K. Tanamoto, Y. Kawamura: 123rd AOAC annual meeting and exposition. (2009.9)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 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) WHO: Guidelines for Drinking-water Quality 3rd Ed. (2004)
- 4) Susan D. Richardson: Trends in Analytical Chemistry, 22(10), p666-684 (2003)
- 5) Official Journal of the European Communities Council Directive 98/83/EC (1998)
- 6) 厚生労働省令第百一号:水質基準に関する省令 (2003)
- 7) Toyoda, M., Ishizaka, T., Saito, Y.: 食品衛生学雑誌, 27(3), p245-241 (1986)
- 8) Tamakawa, K. et al.: 食品衛生学雑誌, 29(2), p156-160 (1988)
- 9) Miyahara, M. et al.: J. Agric. Food Chem., 43(2), p320-326 (1995)
- 10) René Imhof et al.: Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 85, p681-703 (1994)
- 11) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 32(4), p308-314 (1991)
- 12) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 33(3), p267-273 (1992)
- 13) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 35(4), p357-364 (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) 厚生省:食品添加物公定書第 7 版, p269 (1999)
- 19) 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)
- 20) Critical Reviews in Environmental Control, 20, p341-407 (1991)
- 21) 丹保憲仁, 小笠原紘:浄水の技術, p101-102 (1985)
- 22) Freuze, I. et. al.: Water Research, 39, p2636-2642 (2005)
- 23) Brosillon, S. et. al.:Chemosphere, 77, p1035-1042 (2009)