[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
衛生化学 40 (6) 527-533 (1994)

豆腐製造過程におけるトリハロメタンの生成

今枝一男, 山本大路, 渡辺卓穂, 吉村吉博, 内山一美,
加藤嘉代子, 大沢敬子
星薬科大学

Formation of Trihalomethanes during Production of Bean-Curd

KAZUO IMAEDA, DAIRO YAMAMOTO, TAKAHO WATANABE, YOSHIHIRO YOSHIMURA,
KATSUMI UCHIYAMA, KAYOKO KATO and KEIKO OHSAWA

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku,
Tokyo, 142, Japan*

(Received May 26, 1994)

Trihalomethanes such as chloroform, dichlorobromomethane, dibromochloromethane and bromoform in food, which might be produced by the treatment of foods with sodium hypochlorite, were determined by the distillation method. The distillation method was modified for the extraction of trihalomethanes from foods containing lipids and/or proteins. Trihalomethanes in the commercially available bean-curd were determined in the range of 19.8 to 53.5 ppb, although they were not detected in ice candy and pickles. The amount of chloroform in the bean-curd increased with an increase in concentration of sodium hypochlorite used for treatment and in storage temperature. The amount of chloroform produced in the Kinu bean-curd was greater than that produced in the Momen bean-curd. In the bean-curd treated with hypochlorite a large amount of trihalomethanes was generated. On the other hand, in the bean-curd treated with chlorine dioxide or chlorite trihalomethanes were hardly generated. This fact recommends the use of chlorine dioxide or chlorite instead of sodium hypochlorite for the disinfection of food. The use of hypochlorite should be prohibited, because the hypochlorite treatment caused the generation of trihalomethanes in food.

Keywords — trihalomethane; bean-curd; chlorine dioxide; distillation method

緒 言

水の殺菌, 消毒に塩素が用いられ, 一部の食品又は食器類に次亜塩素酸塩が使用されてきた。しかし近年, この塩素系消毒剤を用いた水処理に関して衛生化学的見地から種々の問題点が指摘され, そのひとつとしてトリハロメタンの生成があげられる。トリハロメタンは水道水原水中のフミン酸, フルボ酸の前駆物質と塩素との反応によって容易に生成する¹⁾ほか, 他の有機物との複雑な反応によっても生成される²⁾ことが知られている。食品の分野では次亜塩素酸ナトリウムはごまに使用禁止とされている

ほか野菜, 果物などへの使用は知られている³⁾が, その他の食品では使用例やその影響もあまり知られていない。そこで著者らは製造過程において多量の水道水を使用又は原料とする食品, あるいは塩素消毒を製造工程中に行う可能性のあるいくつかの食品について, トリハロメタンの存在を電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフを用いたヘッドスペース法と蒸留法で比較検討し, 特に豆腐についての製造実態の調査とともにトリハロメタンの生成の可能性を検討した。

実 験

1. 試薬及び試料 標準物質のクロロホルム、ブロモクロロメタン、ジブロモクロロメタン、ブromoホルムは和光純薬工業社製のトリハロメタン測定用標準液を、希釈溶媒、抽出溶媒はそれぞれ和光純薬工業社製の水質試験用、トリハロメタン測定用を用いた。残留塩素測定用標準物質及び豆腐の塩素処理に使用した次亜塩素酸ナトリウム溶液は純正化学社製、亜塩素酸ナトリウムは和光純薬工業社製特級を、二酸化塩素は和光純薬工業社製特級塩酸と亜塩素酸ナトリウムを用いて自製した。測定及び試薬の調製にはすべて和光純薬工業社製トリハロメタン測定用精製水を用いた。

二酸化塩素溶液——40%亜塩素酸ナトリウム溶液 50 ml に 6 N 塩酸を徐々に滴下し、気体として発生した二酸化塩素を氷冷した精製水中に赤色沈殿が出現するまで捕集し冷暗所に保存した。この二酸化塩素溶液の濃度は調製時約 40 g/l であった。この二酸化塩素溶液は用時希釈し、ヨウ素滴定に基づき溶液をリン酸緩衝液で pH 7 とし、チオ硫酸ナトリウムで滴定し、さらに希塩酸で pH 2 とし同様に滴定しその滴定量が 1:4 になることを確認し、滴定量の合計から二酸化塩素濃度を定量した。これより次亜塩素酸及び亜塩素酸の混入がないことが確認できた。また、その他の試薬は特級を使用した。

試料は市販されているパック豆腐及びその浸漬水、氷菓キャンディー、漬物及びその浸漬水をそれぞれヘッドスペース分析用、蒸留分析用に調製した。

2. 装置 ガスクロマトグラフは電子捕獲型検出器 (ECD⁶³Ni) 付島津製作所製 GC-14 A を用いた。キャピラリーカラムは Restek 社製 Rtx-Volatiles (60 m, 0.32 mm i.d.) を使用した。ガスクロマトグラフ分析条件は注入口温度 210°C, 検出器温度 260°C, カラムオープン初期温度 80°C, 昇温速度 5°C/分, 最終温度 145°C, スプリット比 20:1, 注入量 1 µl で行った。

ヘッドスペース用ボトルはジーエルサイエンス社製容量 100 ml のものを、精油定量装置はツシマ製を使用した。

3. 測定方法 ヘッドスペース法によるトリハロメタンの測定において最適な気相、液相比率と液相中のイオン強度を変化させ、気相への分配率の最も高い最適塩濃度⁴⁾を検討した。最適気液比については 50 ml 容量と 100 ml 容量のヘッドスペースボトルを用い、26°C 室温中でそれぞれ気液比を 1:3,

Fig. 1. Analytical Procedure for Trihalomethane

1:1, 3:1 と 1:4, 1:1, 4:1 に設定しトリハロメタン類 4 成分を 0.02 µg/ml 及び 0.04 µg/ml 相当量添加して、ガスクロマトグラム上の各ピーク面積を比較した。

最適塩濃度については 100 ml 容量のヘッドスペースボトルを用い、気液比 1:1, 26°C 室温中で液相の塩化ナトリウム濃度を 0, 5, 15% 及び飽和溶液としてガスクロマトグラム上の各ピーク面積を比較した。

また、蒸留法では厚生省食品衛生検査指針オルトフェニルフェノールの方法⁵⁾の精油定量器を用い、抽出溶媒を *n*-ヘキサン 5 ml とし、トリハロメタン分析における蒸留法を検討した。

4. 残留塩素とトリハロメタンの測定 各食品中の次亜塩素酸ナトリウムの残留とトリハロメタンの存在を見るため、それぞれの試料について厚生省食品衛生検査指針食品の残留塩素測定の方法⁶⁾に従って次亜塩素酸ナトリウムの残留を測定し、蒸留法とヘッドスペース法でトリハロメタンの測定を行った。蒸留操作法は Fig. 1 に示す。

結果及び考察

1. ヘッドスペース法における気液比率と液相の塩濃度

ガスクロマトグラムのピーク面積の比較では 50 ml 容量のヘッドスペースボトルについて 4 成分

ピーク面積の和は気液比 1:1, 1:3, 3:1 でそれぞれ 63939, 61435, 48594 であり 100 ml 容量のヘッドスペースボトルでは気液比 1:1, 1:4, 4:1 でそれぞれ 31345, 24762, 17553 でありいずれも気液比 1:1 が最大で他の気液比は感度が下がる傾向であった。また、塩濃度を検討した結果、塩化ナトリウム無添加に比べ 5% 塩化ナトリウムではトリハロメタン各成分について 5—10% 感度が向上したが塩濃度をそれより上昇させると感度は低下した。したがって本実験のヘッドスペース法によるトリハロメタンの測定は気液比 1:1, 液相への塩化ナトリウム添加量を 5% (w/v) とした。

2. 蒸留法によるトリハロメタン分析の検討

トリハロメタンの蒸留抽出条件はオルトフェニルフェノールの方法⁵⁾を参考にし抽出溶媒を *n*-ヘキサンとし、蒸留時間を検討した結果、1 時間以上で回収率は一定となったことから 1 時間とした。また、蒸留法によるトリハロメタンの回収率は精油定量装置の改良によって良好な結果が得られた。すなわち改良点は還流冷却管を直線的な玉入り冷却管から蛇管冷却管に変え、それに伴い冷却管との接続部にトラップ的な役割を果たすジョイントを追加した。また冷却水を水道水から 5℃ の冷却水に変更した。この 2 点の改良で、従来の装置に比べ回収率がクロロホルムで平均 14%, プロモジクロロメタンで平均 11%, ジプロモクロロメタンで平均 12%, プロモホルムで平均 6% (それぞれ *n*=3) それぞれ向上し、4 成分の回収率はすべて 90% 以上と良好な結果が得られた。

3. ヘッドスペース法と蒸留法の比較検討

製造原料に水道水を多量に使用する食品として氷菓キャンディーは 3 製造者の 5 製品、製造工程中に次亜塩素酸ナトリウムを使用する可能性のある食品として漬物は 5 製造者の 5 製品、豆腐は 5 製造者の 10 製品についてヘッドスペース法と蒸留法を用いたトリハロメタン測定を行った。

ヘッドスペース法及び蒸留法ともに氷菓キャンディー、漬物及びその漬液はすべて不検出 (0.1 ppb 未満) であった。ヘッドスペース法では豆腐も全製品不検出 (0.1 ppb 未満) であったが豆腐パック内の豆腐浸漬水で 3 製造者 7 製品からクロロホルムを検出した。また、蒸留法では豆腐において 3 製造者 7 製品からクロロホルム、プロモジクロロメタンをそれぞれ検出し、それらの浸漬水からもクロロホルムを検出した (Table II)。なお、残留塩素については豆腐を含むすべての試料で不検出 (0.05 ppm 未満)

TABLE I. Recovery of Trihalomethanes in Bean-curd

		Added (ng)	Found (ng)	Recovery (%)
Head space method	CHCl ₃	100	5.2	5.2
	CHBrCl ₂	100	0	0
	CHBr ₂ Cl	100	0	0
	CHBr ₃	100	0	0
Distillation method	CHCl ₃	100	92.8	92.8
	CHBrCl ₂	100	94.4	94.4
	CHBr ₂ Cl	100	91.1	91.1
	CHBr ₃	100	87.6	87.6

Bean-curd: 20 g.

であった。そこで豆腐試料におけるトリハロメタンの添加回収実験をヘッドスペース法、蒸留法について比較した結果を Table I に示す。ヘッドスペース法ではクロロホルムのみ 5.2% 回収され、他のトリハロメタンは回収されなかった。蒸留法ではいずれのトリハロメタン類も 87.6—94.4% 回収された。また、対照として精製水に添加し回収した結果、いずれの方法でもすべてが 90% 以上回収された。これらの結果より、豆腐のようなタンパク質、脂質を多く含む食品のトリハロメタン測定には蒸留法が適していることが示された。蒸留法での豆腐、浸漬水のトリハロメタン及び浸漬水の残留塩素の分析結果を Table II に示す。測定は 5 製造者 10 製品について行い、クロロホルムは 7 製品から豆腐で 19.8—53.5 ppb、豆腐浸漬水から 4.4—11.6 ppb 検出された。一方、残留塩素は豆腐、浸漬水ともにすべて不検出 (0.05 ppm 未満) であった。豆腐製造メーカーに聞き取り調査を行った結果トリハロメタンが検出された 7 製品、3 製造者はすべて製造工程中に次亜塩素酸ナトリウムを 5—20 ppm 溶液として充填水等を使用していることがわかった。また、トリハロメタン不検出の 2 製造者では水道水は使用しているが次亜塩素酸ナトリウムは不使用であることが確認された。このことから豆腐中のトリハロメタンの生成は水道水中の塩素ではなく次亜塩素酸ナトリウムの使用によることが考えられた。また、これらのトリハロメタンの検出された豆腐はいずれも一般生菌数及び大腸菌群は検出されなかったことから細菌抑制効果は維持できているものと考えられる。しかし、このようにトリハロメタンが検出されたことから今後、他の殺菌あるいは制菌作用のある食品添加物等の検討を含めて、次亜塩素酸剤の使用禁止あるいは除去処理の徹底が強く望まれる。

4. 豆腐中のトリハロメタン生成

TABLE II. Analytical Results of Trihalomethanes and Residual Chlorine in Bean-curd and Water in Bean-curd Package

Sample	Residual chlorine (ppm)	CHCl ₃	CHBrCl ₂	CHBr ₂ Cl	CHBr ₃ (ppb)
Bean-curd	A-1	<0.05	53.5	5.2	<0.1
	A-2	<0.05	39.8	5.2	<0.1
	A-3	<0.05	35.6	3.4	<0.1
	A-4	<0.05	41.1	3.8	<0.1
	B-1	<0.05	22.7	<0.1	<0.1
	B-2	<0.05	19.8	<0.1	<0.1
	C-1	<0.05	<0.1	1.2	<0.1
	C-2	<0.05	<0.1	<0.1	<0.1
	D	<0.05	43.9	4.1	<0.1
	E	<0.05	<0.1	<0.1	<0.1
Water in bean-curd package	A-1	<0.05	9.8	5.2	<0.1
	A-2	<0.05	4.4	<0.1	<0.1
	A-3	<0.05	10.1	<0.1	<0.1
	A-4	<0.05	6.7	<0.1	<0.1
	B-1	<0.05	11.6	<0.1	<0.1
	B-2	<0.05	4.8	<0.1	<0.1
	C-1	<0.05	<0.1	<0.1	<0.1
	C-2	<0.05	<0.1	<0.1	<0.1
	D	<0.05	9.5	<0.1	<0.1
	E	<0.05	<0.1	<0.1	<0.1

Fig. 2. Time Course of the Concentration of Trihalomethane in Bean-curd (Kinu) at 5°C

■ : Chloroform, ● : Bromodichloromethane, ◆ : Dibromochloromethane, ▲ : Bromoform.

トリハロメタンが検出された同一製造者、同一ロットの木綿豆腐、絹ごし豆腐について5°Cで保存し1, 3, 7, 11, 15日経過後の豆腐のトリハロメタン濃度測定を行った結果をFig. 2とFig. 3に示す。豆腐の賞味期間は3日間から6日間の製品がほとんどであるが、その間においてもクロロホルム濃度の上昇とその他のトリハロメタン成分の生成が確認さ

Fig. 3. Comparison of Chloroform in Bean-curd (Kinu) and Bean-curd (Momen) at 5°C

● : Bean-curd (Kinu), ■ : Bean-curd (Momen).

れた。これは次亜塩素酸が残留していることを示すものであり、製品中に残留するような使用は問題である。またFig. 3に示すように木綿豆腐、絹ごし豆腐など製造形態の違いによってクロロホルムの生成量は大きく異なり、本実験においては15日間保存のクロロホルム生成量は木綿豆腐の20.8 ppbに比べ、絹ごし豆腐は約5倍の104.2 ppbであった。これは木綿豆腐が豆乳を凝固させた後圧搾成形したのに対

TABLE III. Effect of the Treatment
Concentration of Hypochlorite
on Trihalomethanes Production
in Bean-curd

NaClO (ppm)	CHCl ₃	CHBrCl ₂	CHBr ₂ Cl	CHBr ₃ (ppb)
1	1.6	<0.1	<0.1	<0.1
10	4.1	0.5	0.2	0.4
100	300.8	67.2	14.2	0.9

The sample was treated with 100 ml of sodium hypochlorite for 72 h at 5°C.

し、絹ごし豆腐は豆乳をそのまま全部凝固させたもので製造工程の違いにより次亜塩素酸の残留濃度あるいは残留総量に差があるためと考えられた。

トリハロメタンを検出しない絹ごし豆腐をおよそ2 cm角にカットし、その100 gを1, 10, 100 ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液100 ml中に5°C, 72時間浸漬処理し、トリハロメタン濃度を測定した結果をTable IIIに示す。72時間後この浸漬液の残留塩素はすべて不検出(0.05 ppm未満)であった。次亜塩素酸ナトリウム溶液による72時間処理において残留塩素はすべて吸収あるいは消費され、トリハロメタンが次亜塩素酸ナトリウム濃度に比例して生成したことから豆腐と次亜塩素酸との接触によってトリハロメタンが生成することが確認された。つまり、製品中に次亜塩素酸が残留していたことを意味し、その使用は安全衛生上問題である。

5. 保存温度によるトリハロメタン生成比較

5°Cおよび25°Cでの保存による100 ppmの次亜塩素酸ナトリウム処理した豆腐中のクロロホルムの変化をFig. 4に示す。室温放置を想定した25°C保存によるクロロホルムの生成濃度は5°C保存と比較すると2時間で約5倍の濃度の112.4 ppbとなり、24時間で約9倍の357.6 ppbに達した。25°C保存では48時間以降明らかに腐敗していたが、5°C保存同様、トリハロメタン濃度の上昇は見られなかった。このことから短時間の温度の上昇によって

Fig. 4. Time Course of the Concentration of Chloroform in Bean-curd Straged at 5°C and 25°C

The sample was treated with 100 ppm hypochlorite.
● : 25°C, ■ : 5°C.

も豆腐成分と次亜塩素酸との反応は促進され濃度も大きく上昇することがわかった。この観点から保存温度とともに、これらの豆腐を加熱処理する場合の検討も必要であろう。

6. 豆腐中のトリハロメタン分布

100 ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液100 mlで24時間及び48時間処理した豆腐の表面約5 mm部分と内部についてトリハロメタンを測定した結果をTable IVに示す。24時間処理では表面のクロロホルム濃度は内部の約7.7倍であったが、48時間処理では約4倍に濃度差が縮まっている。また、表面のクロロホルム濃度は処理時間であまり変化がなかったのに対して、内部のクロロホルム濃度は24時間処理に比べ48時間処理では約2倍となったことより処理時間によってトリハロメタンは徐々に豆腐の中心部に生成あるいは浸透していくことが推測される。この実験条件では豆腐成分と次亜塩素酸との反応の大部分は豆腐表面から数mm以内で起こると考えられる。さらに長時間の処理では内部のトリハロメタン濃度が増加することも予想される。すなわち、

TABLE IV. Concentration of Trihalomethanes in Surface and Inner Part of Bean-curd
Treated with Sodium Hypochlorite for 24 h and 48 h at 5°C

Soaking time (h)	Part	CHCl ₃	CHBrCl ₂	CHBr ₂ Cl	CHBr ₃ (ppb)
24	Surface	30.2	2.5	0.2	<0.1
	Inner	3.9	0.4	<0.1	<0.1
48	Surface	30.5	2.4	0.5	<0.1
	Inner	7.3	0.6	<0.1	<0.1

Sodium hypochlorite: 100 ppm.

これは次亜塩素酸が内部にも残留していることを示すものであるが、次亜塩素酸が内部に浸透する速度とトリハロメタンの生成速度の関係を明らかにできれば、次亜塩素酸の残留部位の推察も可能であり、また、その除去方法の検討にもつながると考えられる。

7. 豆腐処理水の比較検討

二酸化塩素⁷⁾は欧米諸国ですでに水道水の消毒剤として用いられ、次亜塩素酸ナトリウムより強い殺菌漂白作用を持ち、有機物に対し塩素化を起こしにくく処理後は亜塩素酸として存在することが知られている。⁸⁾ また、亜塩素酸は作用が温和であるが酸性下において強い殺菌効果を示す。これらの消毒剤と次亜塩素酸ナトリウムを用い豆腐中のトリハロメタンの生成を比較した。豆腐 300 g を次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素、亜塩素酸ナトリウムそれぞれ 100 ppm 溶液 100 ml 中に 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96 時間浸漬処理し、生成量の多いクロロホルムについて測定した結果を Fig. 5 に示す。次亜塩素酸ナトリウム処理試料において経時的にクロロホルム濃度の上昇が認められたが二酸化塩素、亜塩素酸ナトリウム処理ではクロロホルムはほとんど検出されなかつ

Fig. 5. Time Course of the Concentration of Chloroform in Bean-curd Treated with Chlorine Oxides at 5°C

■ : Hypochlorite, ● : Chlorine dioxide, ▲ : Chlorite.

た。この結果より、上水処理と同様豆腐においても、

次亜塩素酸による食品成分の塩素化によってトリハロメタンが生成するが、二酸化塩素や亜塩素酸は塩素化能力は弱く、トリハロメタンを生成し難いことが確認できた。すなわち、有機物の多い食品に対して殺菌効果に差がないならば次亜塩素酸の代わりに二酸化塩素や亜塩素酸が使用可能であり、その方がトリハロメタンの生成能の観点から安全性が高いといえる。

ま と め

1. 食品のトリハロメタン分析において多くはヘッドスペース法が用いられてきたが、タンパク質や脂質を含む食品に対しては冷却管を蛇管に改良し冷却効率をあげた蒸留法が有効であることが示された。
2. トリハロメタンが検出された豆腐製品すべての製造工程に次亜塩素酸ナトリウムでの処理が含まれ、トリハロメタンが検出されなかった製品は水道水は使用しているが次亜塩素酸ナトリウム処理はされていないことが確認された。このことから約 90% が水分である豆腐製造においても水道水程度の塩素濃度ではほとんどトリハロメタンは生成されることがわかった。
3. 豆腐は通常 10°C 以下で冷蔵保存されるが、運搬中や家庭での室温放置など温度の上昇によってトリハロメタン生成は大きく増加することから、腐敗防止のみでなく豆腐の保存中の温度管理は重要であることが示された。
4. 各種食品への次亜塩素酸ナトリウムの使用は豆腐の場合と同様に種々の塩素化合物の生成を招くことが推測され、安全衛生上不適切であることから、少なくとも豆腐製造においては使用禁止すべきであり、食品中のトリハロメタンのガイドラインを含めて、その使用基準等を早急に検討する必要がある。本実験における次亜塩素酸ナトリウム処理とほぼ同様の二酸化塩素及び亜塩素酸による処理では豆腐中にトリハロメタンが生成しなかったことからそれが次亜塩素酸とほぼ同等の殺菌あるいは制菌作用があるならば殺菌剤として二酸化塩素あるいは亜塩素酸の代用が考えられる。

本研究は平成 5 年度財団法人総合健康推進財団の助成によった。同財団に感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) J.J. Rook, *Water Trea. Exam.*, **23**, 234 (1974).

- 2) T.A. Bellae, J.J. Lichtenberg, R.C. Knoner, *J. Am. Water Works Assoc.*, **66**, 703 (1974).
- 3) 石館守三, 鈴木郁生, 谷村顕雄, “第六版食品添加物公定書解説書,” 広川書店, 東京, 1993, pp. 461—464.
- 4) 丹保憲仁, “水道とトリハロメタン,” 技報堂出版, 東京, 1983, pp.65—66.
- 5) 厚生省生活衛生局, “食品衛生検査指針, 食品中の食品添加物分析法,” 日本食品衛生協会, 東京, 1989, pp.90—93.
- 6) 厚生省生活衛生局, “食品衛生検査指針, 食品中の食品添加物分析法,” 日本食品衛生協会, 東京, 1989, pp.72—75.
- 7) W.J. Masschelein, “Chlorine Dioxide: Chemistry and Environmental Impact of Oxychlorine Compounds,” Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Mich, 1979, pp.59—88.
- 8) G.C. White, “Handbook of Chlorination,” Van Nostrand Reinhold, New York, 1972, pp.744.