

食品中の食品添加物分析法 解説書

監修 谷村 顕雄
藤井 正美
義平 邦利
伊藤 誉志男
城 照雄

14. 過酸化水素

Hydrogen Peroxide

H_2O_2 : 34.01

1. 試験法の概要

食品中の過酸化水素は、水抽出した後、酸素電極によりカタラーゼ分解で生成する酸素を検知することにより測定する¹⁾。

2. 試験法 (酸素電極法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する²⁾。

(2) 試料液の調製

試料約 5g を正確に量り、ホモジナイザー用カップに入れ、リン酸緩衝浸出液 40ml を加え、外槽を氷水で冷却しながら約 2~3 分間ホモジナイズする³⁾。シリコーン樹脂 1 滴を加え、50ml のネスラー管に移し、リン酸緩衝浸出液を用いて正確に 50ml とし、軽く振り混ぜ、速やかにひだ折りろ紙⁴⁾で受器を氷冷しながらろ過する⁵⁾。ろ液の最初の数滴は捨て、その後のろ液を試料液⁶⁾とする。試料液は直ちに測定に供する。

(3) 検量線用標準液の調製

過酸化水素水 1ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml として過酸化水素溶液とし、次のとおり標定する。

過酸化水素溶液 1ml を正確に量り、100ml の共栓フラスコに入れ、水 20ml、硫酸(1 → 10) 10ml 及びヨウ化カリウム溶液(1 → 10) 10ml を加え、10 分間暗所に放置した後、遊離したヨウ素を 0.02N チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する(指示薬：デンプン試液)。このときの値を V (ml) とし、別に空試験を行ったときの滴定値を V_0 (ml) とし、次式より過酸化水素濃度を求める。

$$\text{過酸化水素濃度 (mg/ml)} = (V - V_0) \times 0.3401$$

標定後、過酸化水素溶液約 10ml を正確に量り、リン酸緩衝浸出液を加えて、正確に 1ml 中に過酸化水素 1mg を含むように調製し、過酸化水素標準原液とする。

用時、過酸化水素標準原液 1ml を正確に量り、リン酸緩衝浸出液を加えて正確に 1,000ml とし、標準液とする(この液 1ml は、過酸化水素 $1.0\mu\text{g}$ を含む)⁷⁾。

標準液 0, 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、それぞれにリン酸緩衝浸出液を加えてそれぞれ正確に 5ml とし、それぞれを検量線用標準液とする(これらの液 1ml は、それぞれ過酸化水素 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 μg 及び $1.0\mu\text{g}$ を含む)⁸⁾。

(4) 測定法

① 測定

図 1 に示すような酸素電極装置を用い、次の操作手順によって測定する。

試料液 2ml を正確に量り、図 1 の試料セル内⁹⁾に入れ、ごく少量のシリコン樹脂を加えた後、密栓する。スターラーでセル内をかき混ぜながら A より窒素ガスを流し、試料液中の溶存酸素を追い出す。コックを切り換え、窒素ガスを B よりセルのヘッドスペースに流しながら、酸素電極による電位の変化を記録計上で読みとり、安定した時点で 0 調整を行う。あらかじめ窒素置換したカタラーゼ溶液 $20\mu\text{l}$ ¹⁰⁾ をセル内に注入して、試料液中の過酸化水素の分解により生じた酸素による電位をピーク高さ¹¹⁾として測定する。なお、ジャケット内には 30° の恒温水を循環させる¹²⁾。

② 検量線

検量線用標準液それぞれ 2ml を正確に量り、酸素電極装置に入れ、得られたピーク高さから検量線を作成する。

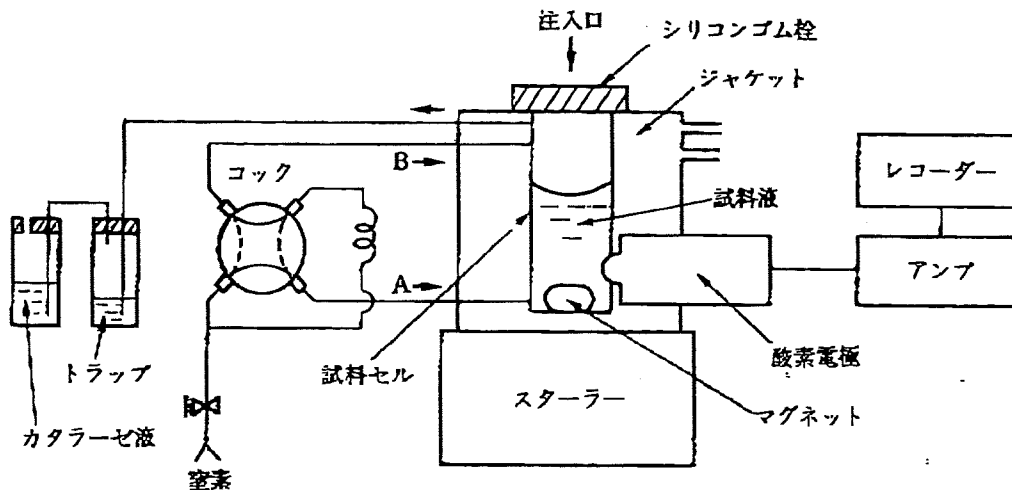


図 1 過酸化水素分析装置の概略

③ 定量

試料液について得られたピーク高さと検量線によって試料液中の過酸化水素濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中の過酸化水素含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{過酸化水素含量 (g/kg)} = \frac{C}{20 \times W}$$

C: 試料液中の過酸化水素濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W: 試料の採取量 (g)

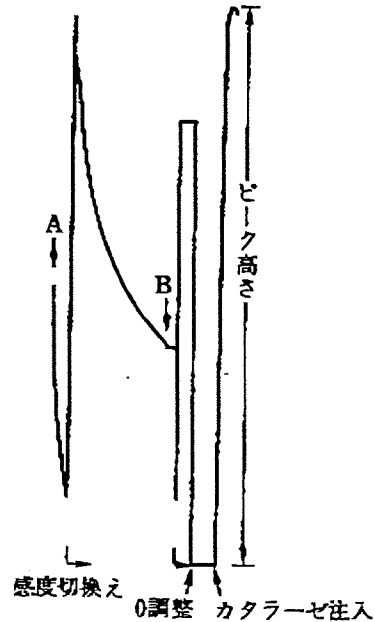
試薬・試液

1. カタラーゼ: 市販品を用いる。
2. カタラーゼ溶液: カタラーゼを水に溶かして $5,000\text{U/ml}$ となるように調製する。
3. 臭素酸カリウム: [特級]
4. シリコーン樹脂: (消泡用) (食添)
5. リン酸一カリウム: [特級]
6. リン酸二ナトリウム: (結晶) [特級]
7. リン酸緩衝浸出液: リン酸一カリウム 27.2g に水 $1,000\text{ml}$ を加えて溶かしたものと、リン酸二ナトリウム 71.6g に水 $1,000\text{ml}$ を加えて溶かしたものを、約 $3:5$ の割合で混合し、 pH を 7.0 に調整¹³⁾した混液 $1,000\text{ml}$ に、臭素酸カリウム 5g を溶かし¹⁴⁾、用時氷冷下で1時間以上窒素を通気し¹⁵⁾、冷蔵する。

〔注〕

- 1) 酸素電極装置がない場合は、次の方法等でも測定することができる。しかし、これらの定量法は酸素電極法に比し、感度及び再現性の点で劣る。
 ヨウ素滴定法: 山本ら, 食品衛生学雑誌, 22, 60(1981)
 4-アミノアンチピリン比色法: 宮本ら, 衛生化学, 22, 76(1976)
 改良4-アミノアンチピリン比色法: 伊藤ら, J. Assoc. off. Anal. chem., 64, 1448 (1981)
- 2) 過酸化水素は酸化分解されやすいので、検体は包丁、はさみ等で細切し、また長時間空気と接触させないようにし、冷蔵保存する。
- 3) ホモジナイズは激しすぎると過酸化水素が分解するので、過度な回転及び時間は避ける。
- 4) 迅速に行うため、たとえばNo.5A相当品を用いる。
- 5) ろ液の受器を氷冷する。
- 6) 液体試料の場合はそのまま試料液とし、直ちに測定に供する。
- 7) 過酸化水素の希釈溶液はきわめて不安定であるから、測定直前に調製し、調製物は氷冷する。長時間を経過したものは調製し直すほうがよい。

- 8) 定量限界付近の測定では、標準液 0, 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、それぞれにリン酸緩衝浸出液を加えて正確に 50ml とし、それぞれを検量線用標準液とする(これらの液 1ml は、それぞれ過酸化水素 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 μg 及び 0.1 μg を含む)。ただし、検量線の直線性は 10 倍濃度のものに比し、若干悪くなる。
- 9) セル内の洗浄は水洗 3 回で十分であるが、気泡が壁に付着しやすくなった場合には、通常の器具洗浄剤にて数回洗い、更にもろ紙で内部をぬぐった後、水でよく洗浄する。
- 10) 過酸化水素 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に対し、カタラーゼは 30U 以上あれば十分であるが、食品成分による妨害等を考慮し、100U 用いている。また注入量は少ないほど測定に対する影響が少ないので、できるだけ濃厚なカタラーゼ溶液を用いることが望ましい。
- 11) 過酸化水素 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液の典型的なチャートを図 1 に示す。
- 12) 本法は酵素反応を用いているため、一定の温度条件下で測定する必要があり、常温より若干高い 30° としたが、20~30° の間の任意の温度を用いてもよい。
- 13) カタラーゼの至適 pH は 6~8 の間でほぼ一定であるから、ここでは中間の pH7 を用いた。
- 14) 臭素酸カリウムは、食品中の還元物質の作用を抑制することにより過酸化水素の分解を防止する。臭素酸カリウム濃度は 0.5% 以上で良好な回収率を示す。
- 15) 約 1 時間窒素ガスを通気することにより、リン酸緩衝浸出液中の溶存酸素量は 1/10 以下となる。本浸出液を用いることにより過酸化水素の回収率は約 20% 上昇し、1ppm 添加の場合、80% 以上の回収率が得られるようになる。

注図 1 H_2O_2 の測定パターン

解 説

I. 試験法の概説

本法は、過酸化水素を、安定化剤であるリン酸緩衝液にて食品より抽出した後、カタラーゼの作用で生成する酸素を酸素電極により検知することにより測定する。

過酸化水素は使用しても最終食品の完成前に分解、除去しなければならない。しかし、過酸化水素は自然界では普通に存在する成分である。たとえば生体組織の肝臓中で生成されたり、汚染大気中や雨水中にも存在し、またヨーグルト等の乳製品に用いる一部の乳酸菌 *Lactobacillus lactis* は過酸化水素を生成することが報告されている。また食品中には相当多量の脂質が含まれている場合も多く、この食品中の脂質は自動酸化又は光酸化されることにより過酸化脂質、アルデヒド、過酸化水素等を生成する。したがって本法のようにごく微量(検

出限界0.01~0.1mg/kg)の過酸化水素が測定可能である場合、定量値は成分由来の過酸化水素と残留過酸化水素の合計値である。なお、カタラーゼを多く含有する食品の場合は、ホモジナイズすることにより過酸化水素が分解され、成分由来の過酸化水素あるいは微量添加の過酸化水素を検出できない場合がある(文献1)。したがって、添加した過酸化水素か、天然由来の過酸化水素かを判定しなければならないので、操作中の過酸化水素の生成は極力抑える必要がある。通常の使用実態を考慮すると数十mg/kgレベル以上の試料については添加後除去されていない可能性がある。

(試験時間) 本法は結果を得るのに固体食品は約20分間、液体食品は約10分間である。

(適用範囲) 固体食品一般に適用できるが、食用油等は試料1.0mlをエーテル1.0mlに溶解後、リン酸緩衝浸出液10.0mlで抽出することにより適用できる(文献2)。

II. 操作上の留意点

(a) 本法で最も注意する点は、たとえば、かずのこの試料液及び牛乳試料液を20℃以上の高温に放置すると測定値の上昇がみられ、一定した値が得られないことである。この原因は食品中の脂質が高温において自動酸化を起こし、過酸化水素を生成したためと考えられる。したがって、脂質含有食品の分析に際しては試料溶液の低温保存と迅速測定が必須であり、この条件を厳守しないかぎり安定した再現性は得られない。また、脂質以外の食品成分の中には空気酸化により過酸化水素を生成する成分もあり、分析の迅速性並びに試料調製は常に慎重を要する。

(b) 牛乳のような中性液体試料はそのまま試料液とすることができるが、酸性液体試料はリン酸緩衝浸出液で希釈しなければいけない。なお、アスコルビン酸含有清涼飲料水のように、酸性食品でかつ自動酸化を受ける液体食品の場合は、酸素電極装置のセル内で希釈を行う方法がよい(文献3)。

(c) 試料をろ過しにくい場合は遠心分離を行うとよい。

(d) 過酸化水素は凸凹面でも分解しやすいので、過酸化水素標準溶液に用いる共栓フラスコは傷のない新しいものを用いる。

(e) 過酸化水素の希釈溶液は分解しやすいので、検量線用の希釈はセル内で行うとよい。

(f) リン酸緩衝浸出液の作成の操作中は、終始水冷下で窒素を通気し、空気中の酸素の混入を防ぐ。

(g) 酸素電極の試料セルの洗浄は、切り換えコックをspace側にして洗浄する。なるべく5回ぐらい行う。

(h) 測定の際、溶存酸素を追い出してコックを切り換えるタイミングを上手に取り零調整を行わないと、必要以上に時間が経過して食品成分からの分解産物である過酸化水素を測定する場合がある。最近では装置の自動化が行われ、自動的にコックが切り換わるようになっている。

III. 実際の試験例

しらす干しにおける測定例のチャートを図14-1に示す。

検量線は過酸化水素濃度0.2~1.0 μ g/ml、試料換算では1~10mg/kgの範囲で直線関係がある。また、定量下限は0.01 μ g/ml、試料換算では0.1mg/kgである。

市販食品についての過酸化水素の添加回収率を表14-1に示した。

なお、本法により測定した各種食品中の過酸化水素含量は、ピーナッツ3.3, かれい1.7, ぼたてがい4.0, ぼたるいか3.4, かに1.2, 生らっきょう5.7, 干しいたけ7.4, せん茶6.2, ほうじ茶30.4及びウーロン茶35.3mg/kgであった。

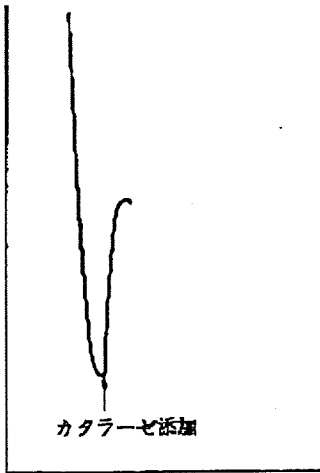


図 14-1 しらす干し試料液のクロマトグラム

IV. その他の試験法

次のような定量法が知られているが、適用食品が限られている等の短所があり、本法のほうがすぐれている。なお、衛生試験法には水抽出後、ヨウ素による定量法が記載されているが、検出限界は5~20mg/kgである(文献4)。以下に示すヨウ素滴定法と同じであり、滴定に用いるチオ硫酸ナトリウムの規定度が異なるだけである。

〔ヨウ素滴定法〕かまぼこ, しらす干し, つみれ及び牛乳では1mg/kgまで, うどんでは5mg/kgまで検出することが可能であるが, 除タンパク操作が煩雑である。また, かずのこの場合は検討を要する(文献5)。

〔4-アミノアンチピリン比色法〕ペルオキシダーゼを用いるしらす干しでの定量法として確立された方法であるが, 検出感度は約10mg/kgであり, アスコルビン酸のような色素生成を妨害する成分を含有する食品には適用できない(文献6)。

表 14-1 過酸化水素の各種食品での添加回収率 (%)

食 品	酸素電極法	改良4-AA比色法
生めん(うどん)	98.3	92.0
生めん(そば)	96.6	95.6
はんぺん	86.5	97.5
かまぼこ	88.1	86.2
ちくわ	90.0	91.3
しらす干し	95.7	88.9
かずのこ	94.1	84.8
牛乳	98.9	-
ヨーグルト	93.3	-
プロセスチーズ	91.8	-

いずれもH₂O₂1mg/kg添加。3試行の平均値

表 14-2 各種食品の過酸化水素測定値 (mg/kg)の比較

食 品	酸素電極法	改良4-AA比色法
生めん(うどん)	0.1	0.1
生めん(そば)	0.2	0.2
はんぺん	0.1	0.2
かまぼこ	0.3	0.3
ちくわ	0.2	0.2
しらす干し	0.6	0.4
かずのこ	0.6	0.6
牛乳	0.02	0.2
プロセスチーズ	0.1	1.4
ヨーグルト	1.1	1.2

いずれも3試行の平均値である

〔改良4-アミノアンチピリン比色法〕上記の改良法で生成した色素をフロリジルカラム精製することにより感度を10倍にした(文献7)。測定値を本法と比較した場合、大部分の食品ではほぼ一致するが、チーズ、牛乳については測定困難である(表14-1, 14-2)。

〔定性試験法〕AOAC法にはバナジウムによる定性試験法があるが、感度はよくない(文献8)。

衛生試験法に硫酸チタン及び硫酸バナジウムによる定性法がある(文献4)。また、4-アミノアンチピリン法による薄層クロマトグラフィーがある(文献9)。しかし、いずれも感度が悪い。

V. 過酸化水素の使用状況

〔使用目的及び使用基準〕食品の殺菌漂白を目的に使用される。使用基準は「最終食品の完成前に分解又は除去すること」となっており、現在公式に使用されている食品は北海道におけるかずのこのみである。

昭和55年まで本添加物は食品の腐敗防止、食中毒菌の繁殖防止の観点から生めん、生マカロニ、かまぼこ及びしらすに好んで用いられた。残留基準は100ppmであったが、マウスの十二指腸に発がん作用のあることがわかり、上記の使用基準に変更された。当時過酸化水素を0.01ppmまで測定する機器が開発されたばかりであり、この機器利用による全ロット検査のもと、使用基準の運用が行政指導された。

〔使用事例〕かずのこの原卵は塩水洗浄し、過酸化水素塩水中に2~5日浸漬後、塩水洗浄を繰り返した後、カタラーゼ水中で残留過酸化水素を分解させ、検査後箱詰め出荷されている。

近年食品衛生上残留しない殺菌剤の役割はきわめて大きく、食品工場内で微生物を制御するところが多くなり、過酸化水素は分解して水になること、匂いのないことから高価ではあるが使用され、そのほか紙容器の殺菌、醸造メーカーの設備消毒等の使用例がある。

〔1日摂取量〕過酸化水素の主要生産は3社であり、本添加物の年間生産出荷量は約3000tと推定される。食品に実際使われる過酸化水素はかずのこを対象に約1000tと見積もられるが、最終的には除去されるので摂取は0とみなされる。

本添加物はWHOのCリスト品目に相当する。

文献

- 1) 辻 澄子ら, 食品衛生学雑誌, 28, 196(1987)
- 2) 辻 澄子ら, 食品工業学会誌, 37, 111(1990)
- 3) 辻 澄子ら, 食品衛生学雑誌, 28, 445(1987)
- 4) 日本薬学会編, 衛生試験法注解, p.458, 461, 金原出版(1990)
- 5) 山本 都ら, 食品衛生学雑誌, 22, 60(1981)
- 6) 宮本邦彦ら, 衛生化学, 22, 76(1976)
- 7) Y. Ito *et al.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64, 1448(1981)
- 8) *Official Methods of Analysis of the AOAC*, 15th ed., p.1149(1990)
- 9) 山東英幸ら, 食品衛生学雑誌, 23, 325(1982)