

食品における過酸化水素の生成について

宮本文夫、中西希代子、橋本博之、本郷 猛、石井俊靖

An Investigation of the Generation of Hydrogen Peroxide from Foods

Fumio MIYAMOTO, Kiyoko NAKANISHI, Hiroyuki HASHIMOTO, Takeshi HONGO and Toshiyasu ISHII

Summary

Hydrogen peroxide in infusions prepared from 16 kinds of food and 20 kinds of related substance under 6 conditions was determined in order to investigate the differences of amounts of generated hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide contents in infusions prepared from 3 kinds food, i.e., roasted coffee bean, black tea leaf and oolong tea leaf, and from 9 kinds related substance, i.e., chlorogenic acid, roasted chlorogenic acid, caffeic acid, roasted caffeic acid, gallic acid, roasted gallic acid, D (+) catechin, roasted D (+) catechin and roasted ascorbic acid were much larger than those from other foods and other related substances. Eight in 9 related substances described above are polyphenols which are mainly contained in roasted coffee bean, black tea leaf and oolong tea leaf. Therefore, it is considered that these polyphenols are deeply related to the hydrogen peroxide generating in infusions prepared from roasted coffee bean, black tea leaf and oolong tea leaf.

Hydrogen peroxide in infusions prepared from 16 kinds of food and 20 kinds of related substance were determined during the standing for 2hrs under 2 conditions. The differences between hydrogen peroxide contents in infusions under 2 conditions indicates generated hydrogen peroxide by autoxidation such as photooxidation, air oxidation, etc. Amounts of generated hydrogen peroxide by autoxidation in infusions prepared from 6 kinds food, i.e., roasted coffee bean, black tea leaf, oolong tea leaf, roasted barley, dried shiitake mushroom and caramel sauce, and from 5 kinds related substance, i.e., roasted caffeic acid, roasted gallic acid, roasted D (+) catechin, roasted sucrose and roasted ascorbic acid were larger than those from other foods and other related substances.

キーワード：過酸化水素、食品、関連物質、浸出液、自動酸化、酸素電極法、改良酸素電極法

Keywords: hydrogen peroxide, food, related substance, infusion, autoxidation, oxygen electrode method, modified oxygen electrode method

はじめに

過酸化水素 (H_2O_2) は現在食品添加物の殺菌料として使用が認められているが、昭和 55 年より使用基準が“最終食品の完成前に分解または除去しなければならない”と定められ¹⁾ であり、 H_2O_2 の使用による残存 H_2O_2 は検出されてはならないこととなっている。しかしながら、現在繁用されている食品衛生検査指針に収載の酸素電極法²⁾ (以下、検査指針法とする) による市販食品中の H_2O_2 含有量の実態調査結果³⁾ では、多種多数の食品から天然由来と考えられる H_2O_2 が検出されている。天然由来の H_2O_2 が検出される食品の場合には検出された H_2O_2 が天然由来のものか人為的に添加されたものか不明であるため、使用基準に適合しているか否かの判断が極めて困難であり、問題視されている。その判断の一助として、また H_2O_2 の摂取の実態を正確に把握する上においても、天然由来の H_2O_2 を正確に測定し、各食品のバックグラウンド値を精査すると共に天然由来の H_2O_2 の生成についても調査しておくことが必要である。

著者らはこれまで検査指針法について種々検討し、改良酸素電極法 (以下、改良法とする) を開発報告^{4)・6)} してきた。改良法と検査指針法の比較⁶⁾ において、固体食品では改良法と検査指針法の測定値

に差が見られ、改良法は検査指針法より H_2O_2 値が非常に低く、検討した食品種のほとんどで不検出であった。その原因として検査指針法では H_2O_2 の抽出操作中に食品成分から生成される H_2O_2 が測定値に加算され、高い値となっていることが考えられた。一方、改良法では抽出操作中の生成 H_2O_2 を別途測定し、それを差し引くことによって生成 H_2O_2 の影響を除いていることから、固体食品中の H_2O_2 を正確に測定しているものと考えられた。また液体食品では抽出操作がないため、検査指針法と改良法の測定値は同等の値を示し、両方法とも液体食品中の H_2O_2 を正確に測定しているものと考えられた。

改良法⁶⁾ による市販加工食品中の H_2O_2 測定結果および含有量実態調査の結果⁷⁾ によれば、固体食品 22 種類中コーヒー焙り豆およびヨーグルト以外の 20 種では H_2O_2 は検出されなかったが、液体食品では 19 種類中 15 種から H_2O_2 が検出された。特にコーヒー、紅茶及びウーロン茶等の市販飲料からは $0.03 \sim 30.8 \mu\text{g/g}$ の H_2O_2 が検出され、製品間の大きな差が見られた。この差は飲料の製造工程での浸出条件および保存条件の相違が原因と推定される⁸⁾。

本研究では、食品からの H_2O_2 生成の基礎資料とするため、 H_2O_2 生成能が高いと考えられる食品³⁾ および H_2O_2 生成関連物質 (以下、関連物質

とする)^{9)・17)}の H_2O_2 含有量を改良法により測定し、次いで各食品および各関連物質について 6 種の条件で浸出液を調製し、浸出条件による H_2O_2 生成の差異等について検討した。また、併せて浸出液の保存条件による H_2O_2 生成の差異についても検討したので、それらの結果を報告する。

実験方法

1. 試料

千葉市内で購入した 16 種の市販食品（コーヒー焙り豆、紅茶、ウーロン茶、ココア粉末、麦茶、干しいたけ、黒ごま、白ごま、乾燥ひじき、乾燥わかめ、焼きのり、乾燥昆布、煮干し、即席めん、植物油、カラメルソース）を用いた。関連物質として和光純薬工業製および東京化成工業製のクロロゲン酸、コーヒー酸、没食子酸、D (+) カテキン、グルコース、スクロース、アスコルビン酸、リノール酸メチル、リノレン酸メチル、クロロフィル油、ならびにクロロゲン酸、コーヒー酸、没食子酸、D (+) カテキン、グルコース、スクロース、アスコルビン酸の各々を焙煎したもの、リノール酸メチル、リノレン酸メチル、クロロフィル油の各々を紫外線 (254 nm) 照射したものを用いた。

2. 食品および関連物質の浸出液の調製方法および保存方法

1) 浸出液の調製方法：食品試料 0.2 g~2 g、関連物質試料 0.04 g~2 g を用いて浸出液を調製した。浸出溶液として 0.05 mol/L クエン酸溶液 (pH2)、0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH7)、0.05 mol/L ホウ酸ナトリウム溶液 (pH9) の各 20 mL を用い、室温で 3 分間振とう浸出することにより調製した浸出液をそれぞれ浸出液 I、II、III とした。浸出液 I、II、III の浸出操作に更に沸騰水浴中での 10 分間加温操作および 30 分間水冷操作を追加して得られた浸出液をそれぞれ浸出液 I'、II'、III' とした。

2) 浸出液の保存方法：食品試料 0.2~2 g および関連物質試料 0.04~2 g に 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH7) 20 mL を加え、遮光下で窒素通気 (400 mL/分) しながら室温にて 10 分間スターラーで攪拌して浸出液を調製した。調製した各浸出液を保存条件 A：紫外線照射 (UV 254 nm)、室温 (20°C)、窒素通気なし、保存条件 B：遮光、氷冷 (1°C)、窒素通気 (400 mL/分) で 2 時間放置した。

3. 試薬及び試液

浸出液調製用クエン酸溶液 (0.05 mol/L, pH2)：クエン酸一水和物 10.5 g を水に溶解し、全量を 1 L としたものを用いた。

浸出液調製用リン酸緩衝液 (0.2 mol/L, pH7.0)：リン酸一カリウム 27.2 g を水に溶解し、全量を 1 L

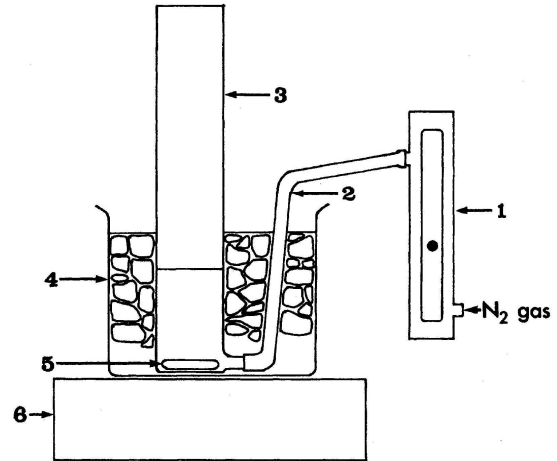


Fig. 1. Extraction apparatus for hydrogen peroxide
1, flow meter; 2, silicone tubing, 5mm id; 3, amber test tube, 25mm id × 180 mm; 4, ice-water bath; 5, magnetic stirring bar, 6 mm id × 20 mm; 6, magnetic stirrer.

としたものおよびリン酸二ナトリウム (12 水塩) 71.6 g を水に溶解し、全量を 1 L としたものを約 3:5 の割合で混合し、pH を 7.0 に調整し使用した。

浸出液調製用ホウ酸ナトリウム溶液 (0.05 mol/L, pH9)：四ホウ酸ナトリウム 10.1 g を水に溶解し、全量を 1 L としたものを用いた。

H_2O_2 標準溶液：30% H_2O_2 水 (和光純薬工業製試薬特級品) を用い、検査指針法に従い 1.0 mg/mL の標準原液を調製し、この原液を水で 2 倍に希釈した H_2O_2 定量用リン酸緩衝液で用時希釈して用いた。

H_2O_2 定量用リン酸緩衝液 (0.4 mol/L, pH7.0)：リン酸一カリウム 54.4 g を水に溶解し、全量を 1 L としたものおよびリン酸二ナトリウム (12 水塩) 143.2 g を水に溶解し、全量を 1 L としたものを約 3:5 の割合で混合し、pH を 7.0 に調整した。この混液 1 L に臭素酸カリウム 10 g を溶解して使用した。

硫酸溶液：硫酸 49 g および臭素酸カリウム 10 g を水に溶解し、全量を 1 L としたものを用いた。

水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 80 g を水に溶解し、全量を 1 L としたものを用いた。

シリコン樹脂：オリエンタル電気 (株) 製消泡用を用いた。

カタラーゼ溶液：カタラーゼ (Sigma Chemical 社製、牛肝臓製、1600 units/mg) 80 mg を用時水 20 mL に溶解して用いた。

シリコン樹脂およびカタラーゼを除く試薬はいずれも和光純薬工業、関東化学製の試薬を用いた。水、硫酸溶液、水酸化ナトリウム溶液およびリン酸緩衝液は使用前に窒素ガスを 400 mL/分の速度で 30 分以上通じて用いた。

4. 装置

酸素電極装置：オリエンタル電気（株）製
Oritector Model III

H₂O₂ 抽出装置：改良法⁶⁾の装置 (Fig.1) を用いた。

マグネチックスターラー：東洋科学産業（株）製
Model B-2

5. H₂O₂ 定量方法

1) 市販食品および関連物質

改良法⁶⁾に準じて H₂O₂ を定量した。すなわち、試料から調製した試験溶液 a の H₂O₂ 量 (a 値) とカタラーゼ処理試料から調製した試験溶液 b の H₂O₂ 量 (b 値) を求め、a 値から b 値を差し引いて試料中の H₂O₂ 含有量を算出した。

(1) 試験溶液 a の調製方法

試料は 2 mm 以下に細切し、2.0 g を H₂O₂ 抽出装置の試験管内に入れ、硫酸溶液 4 mL、水 4 mL およびシリコン樹脂 1 滴を加えて、400 mL/分の速度で窒素ガスを通じながら氷水中で 10 分間攪拌子により攪拌した。これに水酸化ナトリウム溶液 2 mL およびリン酸緩衝液 8 mL を加え、続けて 30 秒間攪拌した。ピペットで抽出液 2 mL 以上を取り、これを試験溶液 a とした。

乾燥品の試料は 2 mm 以下に細切し、試料量を 0.5 g、水量を 5.5 mL とし、上記と同様に試験溶液 a を調製した。関連物質試料は 0.04~0.5 g を採取し、水量を 5.96~5.5 mL とし、上記と同様に試験溶液 a を調製した。

(2) 試験溶液 b の調製方法

試料は 2 mm 以下に細切し、2.0 g を H₂O₂ 抽出装置の試験管内に入れ、水 3.8 mL を加え、カタラーゼ溶液 0.2 mL およびシリコン樹脂 1 滴を加え、400 mL/分の速度で窒素ガスを通じながら氷水中で 10 分間攪拌子により攪拌した。更にこれに硫酸溶液 4 mL を加え、続けて 10 分間攪拌した後、水酸化ナトリウム溶液 2 mL およびリン酸緩衝液 8 mL を加え、続けて 30 秒間攪拌した。ピペットで抽出液 2 mL 以上を取り、これを試験溶液 b とした。酸性の試料の場合は、試料に水と水酸化ナトリウム溶液を加えて pH6-8 に調整し、添加水量が 3.8 mL となるようにしてカタラーゼ溶液を加え試験溶液 b を調製した。

乾燥品の試料は 2 mm 以下に細切し、試料量を 0.5 g、水量を 5.3 mL とし、上記と同様に試験溶液 b を調製した。関連物質試料は 0.04~0.5 g を採取し、水量を 5.76~5.3 mL とし、上記と同様に試験溶液 b を調製した。

(3) 試験溶液中の H₂O₂ の定量

検査指針法に従って酸素電極装置を用いて試験溶液 a および b の H₂O₂ 濃度を求めた。

2) 浸出液

検査指針法に記載されている液体食品に準じて H₂O₂ を定量した。

Table 1. Hydrogen Peroxide Contents in Used Foods

Sample	Hydrogen peroxide ($\mu\text{g/g}$)
Roasted coffee bean 1	ND
Roasted coffee bean 2	0.88
Black tea leaf 1	ND
Black tea leaf 2	ND
Oolong tea leaf 1	ND
Oolong tea leaf 2	ND
Cocoa powder 1	ND
Cocoa powder 2	ND
Roasted barley 1	ND
Roasted barley 2	ND
Dried shiitake mushroom 1	ND
Dried shiitake mushroom 2	ND
Black sesame seed 1	ND
Black sesame seed 2	ND
White sesame seed 1	ND
White sesame seed 2	ND
Dried hijiki 1	ND
Dried hijiki 2	ND
Dried wakame 1	ND
Dried wakame 2	ND
Toasted laver 1	ND
Toasted laver 2	ND
Dried kombu 1	ND
Dried kombu 2	ND
Boiled and dried sardine 1	ND
Boiled and dried sardine 2	ND
Instant noodle 1	ND
Instant noodle 2	ND
Vegetable oil 1	1.37
Vegetable oil 2	1.41
Caramel sauce 1	ND
Caramel sauce 2	ND

ND: not detected (below detection limits of 0.4 $\mu\text{g/g}$ for dried food and 0.1 $\mu\text{g/g}$ for other food).

結果及び考察

1. 使用した食品および関連物質中の H₂O₂ 含有量
使用した食品は、検査指針法による H₂O₂ 含有量の実態調査結果³⁾で高い値を示していた食品種で、H₂O₂ 生成能が高いと考えられる食品である。各食品中の H₂O₂ 含有量を Table 1 に示した。16 種 32 食品中の H₂O₂ 含有量はコーヒー焙り豆 2 0.88 $\mu\text{g/g}$ 、植物油 1 1.37 $\mu\text{g/g}$ 、植物油 2 1.41 $\mu\text{g/g}$ であったが、

Table 2. Hydrogen Peroxide Contents in Used Related Substances

Sample	Hydrogen peroxide ($\mu\text{g/g}$)
Chlorogenic acid	ND
Roasted chlorogenic acid ^a	ND
Caffeic acid	ND
Roasted caffeic acid ^a	ND
Gallic acid	ND
Roasted gallic acid ^a	ND
D (+) Catechin	ND
Roasted D (+) catechin ^a	ND
Glucose	ND
Roasted glucose ^b	ND
Sucrose	ND
Roasted sucrose ^b	ND
Ascorbic acid	ND
Roasted ascorbic acid ^b	ND
Methyl linoleate	ND
UV irradiation methyl Linoleate ^c	1.66
Methyl linolenate	ND
UV irradiation methyl Linolenate ^c	0.95
Chlorophyll oil	ND
UV irradiation chlorophyll oil ^c	ND

ND: not detected (below detection limits of 0.4–5 $\mu\text{g/g}$).

^a Roasting for 1hr at 180°C. ^b Roasting for 3hrs at 180°C. ^c UV irradiation for 5-20 hrs at 254 nm wavelength.

その他の食品は全て不検出であった。

また、使用した関連物質は Table 1 の食品に含まれ、 H_2O_2 の生成に関与すると考えられる食品成分、およびそれらを焙煎したもの、または UV 照射したものについて検討することとした。各関連物質中の H_2O_2 含有量を Table 2 に示した。20 種類の関連物質中の H_2O_2 含有量は UV 照射リノール酸メチル 1.66 $\mu\text{g/g}$ 、UV 照射リノレン酸メチル 0.95 $\mu\text{g/g}$ であったが、その他の物質は全て不検出であった。

2. 各食品の浸出液における H_2O_2 の生成

3 種の pH 条件下での浸出における H_2O_2 生成量の差、および室温のみでの浸出と沸騰水での加温・水冷を追加した時の浸出における H_2O_2 生成量の差を調べるために、各食品について 6 種の浸出液を調製し、各浸出液中の H_2O_2 量を測定した。

結果を Table 3 に示した。各浸出液中の食品試料 1 g に由来する H_2O_2 量は 0.2~630 μg であり、Table 1 に示した H_2O_2 量と比べて高い値を示し、食品の浸出液の調製中に多量の H_2O_2 が生成する可能性があることがわかった。 H_2O_2 生成量は食品種および浸出条件によって差が認められた。特に H_2O_2 生成量が多かった食品はコーヒー焙り豆 1、2、紅茶 1、2、ウーロン茶 1、2 の 3 種で、各浸出液の食品 1 g 当たりの H_2O_2 量の最大値はコーヒー焙り豆 1 623 μg 、コーヒー焙り豆 2 589 μg 、紅茶 1 630 μg 、紅茶 2 487 μg 、ウーロン茶 1 560 μg 、ウーロン茶 2 436 μg であった。これらの結果から、コーヒー、紅茶、ウーロン茶等の飲料（浸出液）では浸出条件によっては H_2O_2 値の高い製品ができる可能性があり、また、家庭において飲用されているコーヒー、紅茶、ウーロン茶の自家調製の浸出液中にも多量の H_2O_2 が生成、存在する可能性があることがわかった。

浸出液中の H_2O_2 量は浸出液の pH によって差が認められる場合が多く、29 食品において室温での浸出液または沸騰水加温・水冷操作を追加した浸出液で、pH2 が pH7 と pH9 に比べ H_2O_2 生成量が少ない傾向が観察された。Akagawa ら¹⁷⁾はコーヒー、紅茶、緑茶の浸出液で pH5 の方が pH7-9 より H_2O_2 生成量が少ないことを報告しているが、著者らの結果も同様であり、このような傾向を示す食品が多数あることが本研究で明かとなった。多くの食品の浸出液で pH2 < pH7、pH9 の傾向が観察されたが、煮干し 2 と植物油 1、2 では室温での浸出液、沸騰水加温・水冷操作を追加した浸出液の両方とも pH2 < pH7、pH9 の傾向は観察されなかった。著者らはいわしの脂質から高い値の H_2O_2 を検出しており、脂質酸化生成物が H_2O_2 生成に関与しているものと推測している⁴⁾。煮干しの場合も原料はいわしであり、煮干し中の油脂が H_2O_2 生成の原因物質と推測され、植物油における H_2O_2 生成と類似しているものと考えられる。油脂が原因の H_2O_2 生成の場合には、浸出液の pH はあまり影響を与えないものと思われる。

室温での浸出の場合と沸騰水加温・水冷操作を追加した場合とでは、24 食品において沸騰水加温・水冷操作の追加による H_2O_2 生成量の増加傾向が観察された。これは浸出時間の延長と浸出温度の上昇による効果で増加したものと考えられる。Akagawa ら¹⁷⁾はコーヒー、紅茶、緑茶の浸出液（リン酸緩衝液 (pH7.4)）で 37°C、48 時間保存で、プラトーに達することなく H_2O_2 生成量が増加していくことを報告しているが、著者らの結果でも沸騰水加温・水冷操作の追加による増加が数多く観察され、このような傾向を示す食品が多数あることがわかった。しかしながら、紅茶、ウーロン茶においては pH2、pH7 の条件下では沸騰水加温・水冷操作の追加による増加

Table 3. Hydrogen Peroxide Contents in Infusions Prepared from Foods

Sample	Hydrogen Peroxide content (μg) in infusion obtained from 1g of food					
	I ^a	II ^a	III ^a	I ^{'b}	II ^{'b}	III ^{'b}
Roasted coffee bean 1	32	127	206	26	541	623
Roasted coffee bean 2	32	110	193	25	448	589
Black tea leaf 1	22	81	630	37	446	473
Black tea leaf 2	15	56	487	26	359	408
Oolong tea leaf 1	13	40	560	15	358	508
Oolong tea leaf 2	14	36	436	16	327	380
Cocoa powder 1	3.6	12.4	16.4	3.7	56.9	66
Cocoa powder 2	4.0	20.4	17.3	4.1	56.6	50.8
Roasted barley 1	1.7	12.6	19.8	5.3	30.8	37.5
Roasted barley 2	4.0	16.1	31.2	5.7	25.7	42.2
Dried shiitake mushroom 1	1.7	11.1	23.2	4.8	85.3	106
Dried shiitake mushroom 2	2.0	5.2	13.1	4.4	64.2	61.7
Black sesame seed 1	1.7	13.1	43.2	3.5	69.5	81.9
Black sesame seed 2	1.3	3.9	23.6	2.2	37.4	53.8
White sesame seed 1	1.4	4.1	10.1	4.6	41.8	34.5
White sesame seed 2	1.3	1.5	3.3	6.2	35.9	77.7
Dried hijiki 1	1.7	4.9	13.7	5.0	68.1	84.5
Dried hijiki 2	1.4	2.1	9.7	3.1	99.7	97.8
Dried wakame 1	1.8	1.6	2.6	4.6	40.1	41
Dried wakame 2	3.9	5.4	8.8	2.8	63.7	71.9
Toasted laver 1	3.0	6.5	17.4	3.7	52	26.9
Toasted laver 2	5.9	5.5	10.1	5.8	26.2	38.3
Dried kombu 1	1.7	1.0	1.8	6.8	44.5	30.7
Dried kombu 2	1.6	0.9	1.4	4.9	14.4	8.7
Boiled and dried sardine 1	1.5	1.3	2.8	3.1	3.9	3.1
Boiled and dried sardine 2	0.8	0.2	0.3	3.9	4.2	3.4
Instant noodle 1	2.9	11.7	21.7	2.9	5.5	10.7
Instant noodle 2	0.8	0.9	1.3	1.7	2.8	7.7
Vegetable oil 1	2.1	2.0	2.4	2.8	2.1	2.2
Vegetable oil 2	2.0	1.5	1.5	3.0	1.5	2.0
Caramel sauce 1	4.7	30.1	31.5	5.4	37.6	30
Caramel sauce 2	4.1	10.5	8.9	7.1	23.4	19.8

^a Infusion I, II, III were prepared by use of 20ml of 0.05 mol/L citric acid solution (pH2), 0.2 mol/L phosphate buffer solution (pH7), 0.05 mol/L sodium borate solution (pH9), respectively, under the condition of shaking for 3min at the room temperature.

^b Infusion I', II', III' were prepared by use of 20ml of 0.05 mol/L citric acid solution (pH2), 0.2 mol/L phosphate buffer solution (pH7), 0.05 mol/L sodium borate solution (pH9), respectively, under the condition of shaking for 3min at the room temperature, followed by heating in boiling water for 10 min and cooling in water for 30min.

が観察されたが、pH9 の条件下では逆に沸騰水加温・水冷操作の追加による減少が見られた。即席めん1、植物油1、2、カラメルソース1においては増加傾向は観察されなかった。岩附ら⁸⁾はコーヒー抽出液中で H₂O₂ の生成と同時に分解が起きていることを推測している。上記において沸騰水加温・水冷操作の追加により H₂O₂ 生成量が増加傾向を示した

食品は、沸騰水加温・水冷操作において H₂O₂ の生成が分解を上回っていたものと推測され、また減少傾向を示した食品は沸騰水加温・水冷操作において H₂O₂ の分解が生成を上回っていたためと推測される。

3. 各関連物質の浸出液における H₂O₂ の生成

各関連物質を用いて食品と同様に6種の浸出条件で浸出液を調製し、各浸出液中の H₂O₂ 量を調べた。

Table 4. Hydrogen Peroxide Contents in Infusions Prepared from Related Substances

Sample	Hydrogen Peroxide content (μg) in infusion obtained from 1g of related substance					
	I ^a	II ^a	III ^a	I ^{'b}	II ^{'b}	III ^{'b}
Chlorogenic acid	10	10	10	10	1210	1110
Roasted chlorogenic acid ^c	12	78	66	18	830	1256
Caffeic acid	10	12	10	10	1256	1314
Roasted caffeic acid ^c	136	1392	518	188	5690	2036
Gallic acid	10	36	88	14	1844	1746
Roasted gallic acid ^c	10	22	86	18	1668	1360
D(+)-Catechin	22	48	32	14	912	590
Roasted D (+) catechin ^c	44	204	142	52	1288	472
Glucose	ND	ND	ND	0.2	0.5	3.0
Roasted glucose ^d	3.1	13.4	7.2	5.9	12.4	8.8
Sucrose	ND	ND	ND	0.2	0.9	0.8
Roasted sucrose ^d	10.3	31.7	18.5	10.9	52.5	45.4
Ascorbic acid	ND	ND	74	715	10	74
Roasted ascorbic acid ^d	30.5	98.5	166	326	2030	3590
Methyl linoleate	1.0	1.2	1.1	4.3	3.3	3.4
UV irradiation methyl linoleate ^e	5.3	5.9	4.9	10.4	7.7	10.1
Methyl linolenate	1.3	1.0	1.2	6.5	4.8	15.2
UV irradiation methyl linolenate ^e	7.3	8.4	4.8	17	10.6	116
Chlorophyll oil	68	31.6	20.2	63	23.8	8.2
UV irradiation chlorophyll oil ^e	64.8	30.4	14.8	70	28.4	7.6

ND: not detected (below detection limit of 0.1 μg).

^a Infusion I, II, III, ^b Infusion I', II', III': see table 3.

^c Roasting for 1hr at 180°C. ^d Roasting for 3hrs at 180°C. ^e UV irradiation for 5-20 hrs at 254 nm wavelength.

結果を Table 4 に示した。各浸出液中の試料 1 g に由来する H₂O₂ 量は ND~5690 μg であり、Table 2 に示した H₂O₂ 量と比べて高い値を示し、Table 3 の食品の浸出液の場合と同様に関連物質の浸出液の調製中に多量の H₂O₂ が生成する可能性があることがわかった。H₂O₂ 生成量は食品の場合と同様に関連物質の種類および浸出条件によって差が認められた。特に H₂O₂ 生成量の多かった関連物質はクロロゲン酸、焙煎クロロゲン酸、コーヒー酸、焙煎コーヒー酸、没食子酸、焙煎没食子酸、D (+) カテキン、焙煎 D (+) カテキン、焙煎アスコルビン酸の 9 種類で、そのうち 8 種類はポリフェノール類であった。各浸出液の関連物質 1 g 当たりの H₂O₂ 量の最大値はクロロゲン酸 1210 μg 、焙煎クロロゲン酸 1256 μg 、コーヒー酸 1314 μg 、焙煎コーヒー酸 5690 μg 、没食子酸 1844 μg 、焙煎没食子酸 1668 μg 、D (+) カテキン 912 μg 、焙煎 D (+) カテキン 1288 μg 、焙煎アスコルビン酸 3590 μg であった。以上の結果から、ポリフェノール類およびその焙煎物は H₂O₂ 生成能が非常に高い成分であることが確認された。ポリフェノール類はコーヒー、紅茶、ウーロン茶に多く含

有されることから、コーヒー、紅茶、ウーロン茶における H₂O₂ 生成に深く関与している¹⁵⁻¹⁷⁾ものと推測される。

浸出液中の H₂O₂ 量は浸出液の pH によって差が認められる場合が多く、15 種の関連物質において室温での浸出液または沸騰水加温・水冷操作を追加した浸出液で、pH2 < pH7、pH9 の傾向が観察された。Nakayama ら¹⁶⁾ はカテキン溶液で、Akagawa ら¹⁷⁾ は 4 種のフェノール化合物の溶液で pH5 の方が pH7-9 より H₂O₂ 生成量が少ないことを報告しているが、著者らの結果も同様であり、多くの関連物質の H₂O₂ 生成に pH 依存性があることがわかった。アスコルビン酸の室温での浸出液では pH2 < pH7、pH9 の傾向が観察されたが、沸騰水加温・水冷操作を追加した浸出液では逆に pH2 > pH7、pH9 の傾向が観察された。リノール酸メチル、UV 照射リノール酸メチルでは室温での浸出液、沸騰水加温・水冷操作を追加した浸出液の両方とも pH による明瞭な差は観察されなかった。クロロフィル油および UV 照射クロロフィル油では室温での浸出液、沸騰水加温・水冷操作を追加した浸出液の両方とも pH2 >

pH7 > pH9 の傾向が観察され、他の関連成分とは異なった傾向を示した。pH2 < pH7、pH9 の傾向を示さなかった 5 種の関連物質のうち 4 種は油脂関連物質であり、植物油や煮干しが pH2 < pH7、pH9 の傾向を示さなかったことと類似していた。

室温での浸出の場合と沸騰水加温・水冷操作を追加した場合とでは、17 種の関連物質において沸騰水加温・水冷操作の追加による増加傾向が観察された。これは食品の浸出液の場合と同様に浸出時間の延長と浸出温度の上昇による効果で増加したものと考えられる。焙煎グルコース、クロロフィル油、UV 照射クロロフィル油では沸騰水加温・水冷操作の追加による増加傾向は観察されず、クロロフィル油、UV 照射クロロフィル油では逆に減少する傾向が観察された。Nakayama ら¹⁶⁾ はカテキン溶液（リン酸緩衝液(pH7.0)）を 37~82℃で 8 分間保存し、温度が上昇するに従い H₂O₂ 生成量も増加すること、また 80℃で 8 分間および 45℃で 60 分間保存し、保存時間が長くなるに従い H₂O₂ 生成量が増加することを報告している。また Akagawa ら¹⁷⁾ は 4 種のフェノール化合物溶液（リン酸緩衝液(pH7.4)）における 37℃、48 時間保存実験で、6 時間までは 4 成分全てで H₂O₂ 生成量が増加する傾向を示し、6 時間以降は成分によって増加、減少、増減なしの場合があり、一定の傾向を示さなかったという結果を得ている。このことは H₂O₂ 生成と同時に分解も起こっていることを示唆しており、浸出液を測定する時点で、分解が生成を上回っている場合には減少傾向を示すものと考えられる。

沸騰水加温・水冷操作の追加により増加傾向を示した関連物質は、食品の場合と同様に沸騰水加温・水冷操作において H₂O₂ の生成が分解を上回っていたためであり、減少傾向が見られた関連物質は沸騰水加温・水冷操作において H₂O₂ の分解が生成を上回っていたためであると推測される。

4. 食品の浸出液の保存による H₂O₂ 含有量の変化

食品にリン酸緩衝液（pH7）を加えて遮光下で窒素通気しながら、室温にてスターラーで攪拌して調製した浸出液を、保存条件 A（紫外線照射・室温・窒素通気なし）と保存条件 B（遮光・氷冷・窒素通気）で 2 時間保存し、H₂O₂ 量の変化を調べた。浸出液は遮光下で窒素通気しながら調製したが、これは浸出液調製中の H₂O₂ の生成をできるだけ抑制するために行ったものである。結果を Table 5 に示した。

植物油を除く 15 種の食品の浸出液で H₂O₂ 量は増加し、保存条件 A と B の H₂O₂ 生成量に差が認められた。保存条件 A と B の H₂O₂ 生成量の差が大きい食品種はコーヒー焙り豆、紅茶、ウーロン茶、麦茶、干しいたけ、カラメルソースの 6 種で、2 時間保存後における浸出液の H₂O₂ 生成量の差は 1.06~

5.83 μg/mL であった。これらは紫外線照射の有無、温度の相違、窒素通気の有無による差であり、浸出液での光酸化や空気酸化等による自動酸化で H₂O₂ が生成していることが示された。

保存条件 B では紅茶、ウーロン茶、ココア粉末、麦茶、干しいたけ、黒ごま、カラメルソースの 7 種の食品の浸出液で H₂O₂ の生成が認められたが、2 時間保存後の H₂O₂ 生成量は 0.01~0.09 μg/mL で、保存条件 A に比べて極微量で H₂O₂ の生成が抑制されていた。

なお、コーヒー焙り豆、紅茶、ウーロン茶については保存条件 A、B の他に別途、遮光・室温・窒素通気なしの条件、および遮光・氷冷・窒素通気なしの条件下でも測定したが、2 時間保存後の各々の H₂O₂ 生成量は保存条件 A（紫外線照射・室温・窒素通気なし） > 遮光・室温・窒素通気なしの条件 > 遮光・氷冷・窒素通気なしの条件 > 保存条件 B（遮光・氷冷・窒素通気）の傾向を示しており、光、温度、空気の各々が H₂O₂ の生成に関与しているものと考えられた。

岩附ら⁸⁾は、コーヒー抽出液の H₂O₂ は空気通気で増加すること、保持温度が高いと生成量が多くなること、酸素の存在下で光により生成が促進されること等を報告している。また、Akagawa ら¹⁷⁾はコーヒー、紅茶、緑茶の浸出液（リン酸緩衝液(pH7.4)）を空気中および窒素中で 37℃、24 時間保存し、H₂O₂ 生成が窒素で抑制されることを報告している。著者らの検討結果はこれらの結果を支持するものであった。

5. 関連物質の浸出液の保存による H₂O₂ 含有量の変化

関連物質にリン酸緩衝液（pH7）を加えて、食品の場合と同様に窒素通気しながら調製した浸出液を、保存条件 A と B で 2 時間保存し、H₂O₂ 量の変化を調べた。結果を Table 6 に示した。

クロロゲン酸を除く 19 種の関連物質の浸出液で H₂O₂ 量は増加し、保存条件 A と B で H₂O₂ 生成量に差が認められた。保存条件 A と B の H₂O₂ 生成量の差が大きい関連物質は焙煎コーヒー酸、焙煎没食子酸、焙煎 D (+) カテキン、焙煎スクロース、焙煎アスコルビン酸で、2 時間保存後における浸出液の H₂O₂ 生成量の差は 1.56~10.59 μg/mL であり、浸出液での光酸化や空気酸化等による自動酸化で H₂O₂ が生成していることが示された。

保存条件 B では焙煎コーヒー酸、焙煎 D (+) カテキン、焙煎グルコース、焙煎スクロース、焙煎アスコルビン酸、UV 照射リノレン酸メチルの 6 種の関連物質の浸出液で H₂O₂ の生成が認められたが、2 時間保存後の H₂O₂ 生成量は 0.02~0.51 μg/mL であり、保存条件 A に比べて微量で、H₂O₂ の生成が抑制されていた。

Table 5. Changes in Hydrogen Peroxide Contents in Infusions Prepared from Foods during Standing under 2 Conditions

Sample	Standing condition	Hydrogen Peroxide ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		Before standing	After 1hr standing	After 2hrs standing
Roasted coffee bean	A ^a	0.17	1.63	1.98
	B ^b	0.17	0.16	0.17
Black tea leaf	A	0.11	3.93	5.96
	B	0.11	0.12	0.13
Oolong tea leaf	A	0.04	2.52	3.12
	B	0.04	0.05	0.05
Cocoa powder	A	0.01	0.27	0.48
	B	0.01	0.02	0.02
Roasted barley	A	0.07	0.84	1.20
	B	0.07	0.07	0.08
Dried shiitake mushroom	A	0.04	0.63	1.13
	B	0.04	0.06	0.07
Black sesame seed	A	0.07	0.42	0.58
	B	0.07	0.07	0.08
White sesame seed	A	0.02	0.26	0.40
	B	0.02	0.02	0.02
Dried hijiki	A	0.02	0.40	0.52
	B	0.02	0.01	0.01
Dried wakame	A	0.04	0.56	0.91
	B	0.04	0.03	0.04
Toasted laver	A	0.02	0.50	0.62
	B	0.02	0.02	0.02
Dried kombu	A	0.01	0.12	0.17
	B	0.01	ND	ND
Boiled and dried sardine	A	0.04	0.53	0.87
	B	0.04	0.03	0.03
Instant noodle	A	0.02	0.15	0.24
	B	0.02	0.02	0.02
Vegetable oil	A	0.19	0.19	0.13
	B	0.19	0.17	0.17
Caramel sauce	A	0.14	2.01	2.81
	B	0.14	0.23	0.23

ND: not detected (below detection limit of 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

^a A : standing under UV irradiation at 254 nm wavelength, standing at room temperature (20°C), without nitrogen gas bubbling.

^b B : standing under light shielding, cooling in ice-water (1°C), bubbling with nitrogen gas.

なお、焙煎クロロゲン酸、焙煎コーヒー酸、焙煎没食子酸、焙煎 D (+) カテキンについては保存条件 A、B の他に、別途、遮光・室温・窒素通気なしの条件、および遮光・氷冷・窒素通気なしの条件下でも測定したが、2 時間保存後の各々の H_2O_2 生成量は保存条件 A (紫外線照射・室温・窒素通気なし) > 遮光・室温・窒素通気なしの条件 > 遮光・氷冷・窒

素通気なしの条件 > 保存条件 B (遮光・氷冷・窒素通気) の傾向を示しており、コーヒー焙り豆、紅茶、ウーロン茶の場合と同様に光、温度、空気の各々が H_2O_2 の生成に関与しているものと考えられた。

辻ら¹⁴⁾ はアスコルビン酸水溶液で、水溶液の溶存酸素量および温度 (0°C、5°C、16°C) の H_2O_2 生成への影響を検討し、溶存酸素量は少ない方が、

Table 6. Changes in Hydrogen Peroxide Contents in Infusions Prepared from Related Substances during Standing under 2 Conditions

Sample	Standing Condition	Hydrogen Peroxide (µg/ mL)		
		Before standing	After 1hr standing	After 2hrs standing
Chlorogenic acid	A ^a	ND	ND	ND
	B ^b	ND	ND	ND
Roasted chlorogenic acid ^c	A	0.02	0.25	0.40
	B	0.02	0.02	0.02
Caffeic acid	A	ND	0.01	0.02
	B	ND	ND	ND
Roasted caffeic acid ^c	A	0.10	6.93	11.2
	B	0.10	0.36	0.61
Gallic acid	A	ND	0.32	0.86
	B	ND	ND	ND
Roasted gallic acid ^c	A	0.01	0.88	1.57
	B	0.01	0.01	0.01
D(+)Catechin	A	0.03	0.07	0.10
	B	0.03	0.03	0.03
Roasted D (+) catechin ^c	A	0.08	0.89	2.17
	B	0.08	0.20	0.31
Glucose	A	ND	0.01	0.01
	B	ND	ND	ND
Roasted glucose ^d	A	0.11	0.68	1.10
	B	0.11	0.13	0.15
Sucrose	A	ND	ND	0.01
	B	ND	ND	ND
Roasted sucrose ^d	A	0.21	1.26	1.98
	B	0.21	0.21	0.25
Ascorbic acid	A	ND	0.01	0.04
	B	ND	ND	ND
Roasted ascorbic acid ^d	A	0.11	2.84	3.24
	B	0.11	0.16	0.22
Methyl linoleate	A	ND	0.02	0.03
	B	ND	ND	ND
UV irradiation methyl linoleate ^e	A	0.04	0.05	0.11
	B	0.04	0.04	0.04
Methyl linolenate	A	ND	0.02	0.04
	B	ND	ND	ND
UV irradiation methyl linolenate ^e	A	0.11	0.18	0.38
	B	0.11	0.13	0.13
Chlorophyll oil	A	ND	0.03	0.04
	B	ND	ND	ND
UV irradiation chlorophyll oil ^e	A	ND	0.05	0.05
	B	ND	ND	ND

ND: not detected (below detection limit of 0.01 µg/ mL).

^a A , ^b B: see table 5. ^c Roasting for 1hr at 180°C. ^d Roasting for 3hrs at 180°C. ^e UV irradiation for 5-20 hrs at 254 nm wavelength.

また温度は低い方が H_2O_2 生成量は少ないことを報告している。Nakayama ら¹⁶⁾ はカテキン溶液 (リン酸緩衝液 (pH7.0)) を窒素中および空气中で $80^\circ C$ 、8 分間保存し、 H_2O_2 生成が窒素で抑制されることを、また Akagawa ら¹⁷⁾ は 4 種のフェノール化合物の溶液 (リン酸緩衝液 (pH7.4)) を空气中および窒素中で $37^\circ C$ 、3 時間保存し、 H_2O_2 生成が窒素で抑制されることを報告している。著者らの検討結果はこれらの結果を支持するものであった。

以上の検討結果から食品からの H_2O_2 の摂取を少なくするためには、できるだけ自動酸化が起らないような条件を検索して水での浸出や調理加工を行うと共に、水浸出液や調理加工後の水溶液を保存して摂取する場合には、自動酸化が起らないような条件を検索して保存することが肝要であると思われる。

まとめ

食品からの H_2O_2 生成の基礎資料とするため、 H_2O_2 生成能が高いと考えられる 16 種 32 食品および 20 種の関連物質について 6 種の浸出条件で浸出液を調製し、食品種、関連物質種、および浸出条件による H_2O_2 生成量の差を調べた。その結果、 H_2O_2 生成量の多かった食品はコーヒー焙り豆、紅茶、ウーロン茶で、関連物質はクロロゲン酸、焙煎クロロゲン酸、コーヒー酸、焙煎コーヒー酸、没食子酸、焙煎没食子酸、D (+) カテキン、焙煎 D (+) カテキン、焙煎アスコルビン酸の 9 種類で、8 種類はポリフェノール類であった。ポリフェノール類はコーヒー、紅茶、ウーロン茶に多く含有されることから、コーヒー、紅茶、ウーロン茶における H_2O_2 生成に深く関与しているものと推測される。多くの食品、関連物質の浸出液で H_2O_2 生成量は $pH2 < pH7$, $pH9$ の傾向、および室温での浸出 < 沸騰水加温・水冷操作を追加した浸出の傾向が観察された。

食品および関連物質の浸出液について 2 種の保存条件下での H_2O_2 生成量を調べたところ、保存条件による生成量の差が認められる場合が多かった。特に H_2O_2 生成量の差が大きかった食品はコーヒー焙り豆、紅茶、ウーロン茶、麦茶、干ししいたけ、カラメルの 6 種、関連物質は焙煎コーヒー酸、焙煎没食子酸、焙煎 D (+) カテキン、焙煎スクロース、焙煎アスコルビン酸の 5 種で、これらの浸出液での光酸化や空気酸化等による自動酸化で H_2O_2 が生成していることが示された。

文献

- 1) 厚生省告示第 24 号, 昭和 55 年 2 月 20 日
- 2) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針-食品添加物-, 86 - 94 (2003)

- 3) 辻 澄子, 中村優美子, 外海 泰秀, 柴田 正, 内堀 伸健, 川田 誠, 他: 農産物, 畜産物, 水産物及びそれらの加工品中の過酸化水素の含有量, 日本食品工業学会誌, 37, 111 - 123 (1990)
- 4) 宮本 文夫, 佐伯 政信: 丸干いだし中の過酸化水素の定量における妨害物質とその妨害の除去について, 食品衛生学雑誌, 27, 362 - 368 (1986)
- 5) 宮本 文夫, 佐伯 政信: 酸素電極による食品中の残存過酸化水素定量法の改良, 衛生化学, 36, 390 - 398 (1990)
- 6) Miyamoto, F., Saeki, M., Yoshizawa, T.: Improved protocol for an oxygen electrode method for determining hydrogen peroxide in foods., J. AOAC Int., 80, 681 - 687 (1997).
- 7) 宮本 文夫, 佐伯 政信: 市販加工食品中の過酸化水素含有量について, 千葉県衛生研究所研究報告, 14, 6 - 10 (1990)
- 8) 岩附 慧二, 松崎 勝, 田中 智之, 牧野 取孝, 河野 誠也, 富田 守: コーヒー抽出液中の過酸化水素生成におよぼす各種要因, 日本食品工業学会第 40 回大会講演集, p.43 (1993)
- 9) Ames, B. N.: Dietary Carcinogens and Anticarcinogens - Oxygen radicals and degenerative diseases., Science, 221, 1256 - 1264 (1983).
- 10) 中山 勉: 酸化的細胞傷害の発生および抑制機構に関する食品化学的研究, 日本栄養・食糧学会誌, 47, 1-9 (1994)
- 11) 川岸舜朗: 活性酸素による食品蛋白質の酸化的劣化とその分子機構, 日本食品科学工学会誌, 44, 689 - 695 (1997)
- 12) Hanham, A.F., Dunn, B. P., Stich, H. F.: Clastogenic activity of caffeic acid and its relationship to hydrogen peroxide generated during autooxidation., Mutation Research, 116, 333 - 339 (1983).
- 13) Endo, Y., Usuki, R., Kaneda, T.: Pheophytin Sensitized Photooxidation of Methyl Linoleate., J. Jpn. Oil Chem. Soc., 33, 447 - 448 (1984).
- 14) 辻 澄子, 石田 浩平, 中村優美子, 外海 泰秀, 江川 宏, 伊藤誉志男: アスコルビン酸を含有する清涼飲料中の過酸化水素の分析法及びその測定値について, 食品衛生学雑誌, 28, 445 - 452 (1987)
- 15) 辻 澄子, 柴田 正, 小原 一雄, 岡田 直子, 伊藤誉志男: コーヒー中の過酸化水素生成要因の検討, 食品衛生学雑誌, 32, 504 - 512 (1991)
- 16) Nakayama, T., Enoki, Y., Hashimoto, K.: Hydrogen Peroxide Formation during Catechin Oxidation Is Inhibited by Superoxide Dismutase., Food Sci. Technol., Int., 1, 65 - 69 (1995).

- 17) Akagawa, M., Shigemitsu, T., Suyama, K.:
Production of Hydrogen Peroxide by Polyphenols
and Polyphenol-rich Beverages under
Quasi-physiological Conditions., *Biosci.
Biotechnol. Biochem.*, 67, 2632 - 2640 (2003).