報 文

3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾンによる 食品中の過酸化水素の定量法

(昭和 52 年 2 月 10 日受理)

石 崎 睦 雄* 村 上 り つ 子* 上 野 清 一* 片 岡 不 士 雄*
小 山 田 則 孝* 久 保 田 か ほ る* 勝 村 馨*

Determination of Hydrogen Peroxide in Foods by the 3-Methyl- 2-benzothiazolone Hydrazone Method

Mutsuo ISHIZAKI, Ritsuko MURAKAMI, Seiichi UENO, Fujio KATAOKA,
Noritaka OYAMADA, Kaoru KUBOTA and Kaoru KATSUMURA

(Ibaraki Hygienic Laboratory: 4-1, Atago-cho, Mito, Ibaraki)

An advanced method of determination of hydrogen peroxide in foods has been investigated.

Hydrogen peroxide in sample was extracted with two times volume of methanol. 1 ml of the extract containing hydrogen peroxide was transferred into a 20 ml of test tube, and 3 ml of distilled water and catalase solution (2,000 I. U.) were added to the extract in the test tube and warmed for 15 min at 37°C to produce the formaldehyde quantitatively. Then 1 ml of 0.4% 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride solution was added into the test tube and warmed again for 25 min at 37°C, and 5 ml of 0.2% ferric nitrate solution was added, then the test tube was allowed to stand for 5 min at room temperature for complete development of the color. The reaction mixture was diluted to 20 ml with acetone. The absorbance of the solution was determined at 635 nm of the wave length.

Under the condition described above, it was found that the hydrogen peroxide in some kind of food could be determined with recovery 97~107% and variation coefficient of about 5%.

(Received February 10, 1977)

1. 緒 言

過酸化水素は食品添加物として、殺菌、漂白の目的で各種の食品に使用されている。しかしながら、過酸化水素処理した食品中には、過酸化水素の一部が比較的長時間残存し、これが毒性¹⁾や、製品の味に与える影響などの問題があるため、その残存量については食品衛生法により制限が設けられている。一方、食品中に残存する過酸化水素の定量法としては、ヨウ素法²⁾が広く利用され

ている。しかしながら、この方法は、終末点の見極めが困難なため、操作に熟練を要する。特に、低濃度の定量は、測定値の誤差が大となる欠点を有する。そのため、硫酸第二チタン法³⁾などの比色法も検討されているが、定量下限が 40 ppm と比較的高濃度であるため、通常試料中の過酸化水素残存量の 10 ppm 前後を測定するには満足すべき方法とはいえない。著者らは、3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾン (MBTH) がホルムアルデヒドと定量的に反応し、その呈色物質からホルムアルデ

* 茨城県衛生研究所：茨城県水戸市愛宕町 4-1

ヒドを精度よく測定する方法^{4),5)}に着目し、過酸化水素をメタノール存在下カタラーゼ処理し、定量的にホルムアルデヒドを生成させ、さらに MBTH と反応させ、微量の過酸化水素を比色定量する方法について検討し、満足すべき結果が得られたので報告する。

2. 実験方法

2.1 装置および試薬

分光光度計: (株)日立製作所製 102 型

恒温水槽: 池本理化学工業(株)製

0.4% 塩酸 MBTH 溶液: 塩酸 MBTH アルデヒド定量用 (和光純薬(株)製) から調製。

メタノール: 吸光度測定用 (和光純薬(株)製), または, 特級メタノールを精製し, 無アルデヒドとしたものの。

カタラーゼ液: カタラーゼ100万単位 1ml (ベーリンガーマンハイム(株)製)の懸濁液を10倍希釈して使用した (不純物を含むカタラーゼは Blank 値を高くするため高純度カタラーゼを使用した)。

過酸化水素標準液: 30% (w/w) 過酸化水素水を蒸留水で希釈して 1% 溶液とする。これをチオ硫酸ナトリウムで標定し, 次いでメタノールを用いて希釈し, 過酸化水素濃度が 0.5~50 ppm になるように調製した (用時調製)。

その他の試薬は, 和光純薬(株)製, 試薬特級品を適宜希釈して用いた。

2.2 測定方法

細切した, ゆでうどん, ゆでそば, なんと巻, かまぼこ, はんぺん, かずのこなどの試料 10~40 g を精秤後, 倍量のメタノールを加え, 3 分間ホモジナイズし, 過酸化水素を抽出する。ろ紙を用いてメタノール液をろ過し, ろ液を試験溶液とする。試験溶液 1 ml を内容 20 ml の目盛付試験管に採り, 1% ホウ酸ナトリウム液, または, 2% 塩酸で pH を 5~7 に調整し, 蒸留水を加えて全量を 4 ml とする。次いで 37° の恒温水槽に試験管を入れ, 3 分間加温後, 10 万単位 1 ml のカタラーゼ液 5~20 μ l, すなわち, 500~2000 単位のカタラーゼを加え, 37°, 15 分間加温する。次いで, 0.4% MBTH 溶液 1 ml を加え, さらに 25 分間, 37° で加温後, 0.2% 硝酸第二鉄溶液 5 ml を加え, 室温に 5 分間放置する。次いで, 試験管の内容物を 20 ml のメスフラスコに移し, アセトンを用いて全量を 20 ml とし, この溶液の吸光度を波長 635 nm で測定した。別に, 空試験として, 試験溶液にカタラーゼ処理をせず, その他は試験溶液と同様に操作した吸光度を求め, 試験溶液をカタラーゼ処理して得られた吸光度から差し引いて, 過酸化水素量を求めた。吸光度測定時の対照液は, 試験溶液の代わりに 75% メタノール 1 ml を目盛付試験管に採り, 以下, 試験溶液と同様に操作したものを用いた。

3. 実験結果および考察

3.1 カタラーゼ処理時の pH の影響

本法では試料からの過酸化水素の抽出にメタノールを用い, このメタノールを利用し, 過酸化水素をカタラーゼ処理することで, 定量的にホルムアルデヒドを生成させる方法を検討したが, 対象食品の種類により, 抽出液の pH が相違する可能性を考え, カタラーゼ処理時の抽出液の至適 pH を求めた。5 ppm の過酸化水素標準液 1 ml を採り, 希塩酸, または 1% ホウ酸ナトリウム液で pH を 1~8.5 の範囲に調整した水溶液 3 ml を加え, 混液の pH を調べた後, 2.2 の方法で呈色させ吸光度を求めた。その結果, Fig. 1 に示したように, pH 4~8 の範囲で一定の吸光度を示すことが明らかとなった。一般に試料の抽出液の pH は大部分がこの範囲内にあるため, 抽出液 pH の調整は, pH がこの範囲外の場合のみ行うことにした。

Fig. 1. Effect of pH on the catalase reaction with hydrogen peroxide

Fig. 2. Relation between reaction time and catalase activities

- , catalase activity 50 I. U.;
- , catalase activity 200 I. U.;
- △—, catalase activity 2000 I. U.;
- , catalase activity 20000 I. U.

3.2 カタラーゼ添加量と加温時間について

過酸化水素を本法によってカタラーゼ処理する際に用いるカタラーゼ量と反応に要する加温時間を求めた。10 ppm の過酸化水素標準液 1 ml を採り、蒸留水 3 ml を加え、37°の恒温水槽で3分間加温後、それぞれカタラーゼ、20,000, 2,000, 200, 50単位を加え、1~20分の範囲で加温し(37°), 2.2の方法に準じて吸光度を測定した。その結果(Fig. 2 参照), 200単位以上のカタラーゼを添加すれば、加温時間10分以上で一定の吸光度を示すことが明らかとなったが、著者らの実験では以後の操作で安全を期すためカタラーゼ添加量 2,000 単位、加温時間37°, 15分に設定した。

3.3 カタラーゼ処理時の抽出液への水添加量について

試料から過酸化水素を抽出したメタノール溶液に直接カタラーゼを添加しても、メタノールが多すぎ酵素反応は行われない。反応を十分に進行させるには、抽出液に水を加える必要がある。そこで 10 ppm の過酸化水素標準液 1 ml を用い、この反応に必要な添加量を求めた。その結果、Fig. 3 に示すようにメタノール 1 ml に対し 2 ml 以上の水を加えれば、最大かつ一定の吸光度を示すことが明らかとなった。

3.4 ホルムアルデヒドと MBTH との反応時間

カタラーゼによる酵素反応で過酸化水素とメタノールから生成したホルムアルデヒドを MBTH と反応させ、定量的にアジン (Scheme 1) を生成させるに必要な37°における至適反応時間を求めた。10 ppm の過酸化水素標準液 1 ml を採り、37°における加温時間を10~40分間の範囲で変化させ、他の条件は2.2に準じて反応を行い、吸光度を測定した。その結果、反応時間 20 分以上で最大、一定の吸光度を示した。

Fig. 3. Relation between volume of water added to 1 ml of methanol as extractive solution before catalase was added and absorbance

Scheme 1. The reaction mechanism of proposed method⁴⁾

3.5 呈色時間と呈色物質の安定性について

MBTH とホルムアルデヒドとを反応させアジン (Scheme 1 の B) を生成後、さらに MBTH の酸化剤とこのアジンとを反応させ呈色させる必要がある。そこで、アジンを生成後、酸化剤として、0.2%硝酸第二鉄溶液 5 ml を加えたが、このものを添加後に呈色するまでの必要時間を検討した結果、室温で5分間以上放置することで一定の吸光度を示した。さらに、呈色物質の安定性についても検討した結果は、呈色後3時間は吸光度の低下は認められず安定な呈色物質であった。また、呈色液を一定容量に希釈する際、Sawicki ら⁴⁾が報告しているように、希釈液に水を用いると不明の懸濁または沈殿を生ずる場合があるため、アセトンを用いて全量を 20 ml にした。

3.6 共存物質の影響

過酸化水素処理した食品中には、過酸化水素以外の添加物が併用されている場合もあるため、併用される可能性のある添加物が過酸化水素測定時に与える影響を検討した。10 ppm の過酸化水素標準液 1 ml を採り、通常使用濃度に相当する、ソルビン酸 1.1 mg, 臭素酸カリウム 0.85 mg, リン酸一カリウム 10 mg, リン酸二カリウム 10 mg を加え、2.2の方法に準じて過酸化水素量を求めた結果、これらの濃度では、その吸光度に何ら影響は認められなかった。また、ショ糖、ビタミンCについても同様に実験を行ったところ、ショ糖は 50 mg, ビタミンCは 500 μg まで添加しても全く影響は認められなかった。

3.7 検量線の作成

上記の結果から、メタノール中 0~10 μg/ml の範囲の過酸化水素量の検量線を作成した結果、原点を通る直線が得られた。また、これらの濃度のうち、4, 8 μg/ml の2種について10回繰り返し測定を行った結果は、4 μg/ml で標準偏差 ±0.0052, 変動係数 1.2%, 8 μg/ml で標準偏差 ±0.0056, 変動係数 0.8% の再現性を示した。

3.8 食品中の水分によるメタノール抽出液の希釈化について

本法では、食品中の過酸化水素をメタノールで抽出するが、試料中には70~85%の水分を含み、これが抽出メタノール液を希釈することが考えられる。そこで Table 1 に示した試料（6種）について、それぞれ6~7件ずつ、計40件について抽出液中のメタノール量をクロモソルブ 102 を担体としたガスクロマトグラフィーにより測定した結果、抽出液中のメタノール量は73~78%で、その平均は75%と、ほぼ一定の割合でメタノールは希釈されているものと考えられる。そこで、試料中の過酸化水素の測定値に1.333 を乗じ、値を補正することにした。Scheme 2 にその計算式を示した。

$$\frac{At - At_0}{As - As_0} \times C \times 1.333 \times 2$$

As, Absorbance of standard solution

As₀, Absorbance of blank test of standard solution

At, Absorbance of test solution

At₀, Absorbance of blank test of test solution

C, Concentration of H₂O₂ in standard solution (μg/ml)

1.333, rate of dilution of extractive solvent with water in sample

Scheme 2. The formula for calculating the amount of hydrogen peroxide

3.9 試料の定量例と測定精度

2.2 に準じて食品中の過酸化水素の定量と添加回収実験を行った結果を Table 1 に示した。なお、それぞれの測定値は繰り返し実験を行った値である。この結果、回収率 95~107%、変動係数 5%以下と良好な結果が得られた。Table 1 に示した試料のうち、はんぺんの a), b) は同一の製品であり、それぞれの値は 3.8 で述べたように抽出液中のメタノールが食品中の水分により希釈されることをさらに確認するために、a) 試料の重さの10倍量のメタノールで抽出し、食品中の水分でメタノールが希釈されることを無視し、測定値を補正しない値、b) については、2.2 の方法のように試料の2倍量のメタノールで抽出し、測定値に1.333 を乗じた補正值である。a), b) それぞれはほぼ同一の値が得られたが、a) については、抽出液中のメタノール量は、測定の結果、95%に希釈されており、その値を b) のように補正した場合には、回収率も97%となり、b) の値と一致し、3.8 に記したように測定値に、抽出溶媒のメタノールが希釈されることを考慮した補正係数を乗ずることの有効性が示された。

4. 要 約

以上の実験結果から本法は

- 1) 測定操作が極めて簡単で、再現性よく、しかも、多数の検体を同時に短時間内に測定できる。
- 2) 比較的低濃度でしか残存しない食品中の過酸化水素を 0.5 ppm の定量限界で測定できる。
- 3) 過酸化水素を試料から抽出するにメタノールを用いるが、従来のメタノール抽出、ヨウ素法による測定の

Table 1. Analytical Results of Sample by the Proposed Method

Sample	H ₂ O ₂ added (μg)	Found (ug) (range, n=6)	Mean (μg)	Coefficient of variation (%)	Recovery (%)
Noodle, boiled	0	13.9~14.1	14.0	0.7	100.0
	12.3	25.9~26.4	26.3	0.8	
Noodle, boiled (made from buckwheat)	0	0	0		99.2
	12.3	11.7~12.5	12.3	2.2	
Fish jelly products (Narutomaki)	0	3.0~3.2	3.0	4.1	106.5
	12.3	15.7~16.8	16.1	2.3	
Fish paste	0	1.2~1.3	1.3	3.1	99.2
	12.3	12.8~14.1	13.5	3.5	
Hanpen	0 ^{a)}	30.0~32.0	30.3	2.7	92.2
	106.0	125.0~130.0	128.0	2.8	
	0 ^{b)}	27.2~31.8	29.4	5.0	
Herring roe	106.0	129.0~134.0	132.0	2.4	97.2
	0	16.5~17.5	17.0	3.5	
	12.3	29.3~30.9	30.2	2.9	
	24.0	43.2~44.0	43.4	0.7	107.7

a) and b) were same sample

a) Value was uncorrected with multiplying correction factor to determined value. Volume of methanol for extraction/weight of sample=10

b) Its evaluated value was corrected with multiplying correction factor (1.333) to determined value. Volume of methanol for extraction/weight of sample=2

ように、対象食品の制限もなく、広く一般食品の検査に利用できる。などの優れた特徴を有し、日常試験法として十分実用に供し得る方法と考えられる。

文 献

- 1) 刈米達夫監修：“第三版食品添加物公定書解説書” p. 13~163 (1973), 広川書店.
- 2) 日本薬学会編：“衛生試験法注解” p. 192 (1973), 金原出版.
- 3) 棚田益夫, 内田晴彦, 沢久美子：食衛誌. 14, 431 (1973).
- 4) Sawicki, E., Hauser, T.R., Stanley, T.W., Elbert, W.: Anal. Chem., 33, 93 (1961).
- 5) Hauser, T.R., Cummins, R.L.: *ibid.*, 36, 679 (1964).