チオシアン酸アンモニウム法による食品中の 過酸化水素の簡易微量定量法

(昭和 57 年 4 月 9 日受理)

浅居良輝* 桑平秀夫*
下田幸三* 佐藤勝也*

Rapid Microanalysis of Residual Hydrogen Peroxide in Foods by the Use of Ammonium Thiocyanate

Yoshiteru ASAI, Hideo KUWAHIRA, Kousou SHIMODA, and Katsuya SATO

(Central Foods Analysis Institute, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.:
13, Honshio-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan)

A method was developed for rapid microanalysis of residual hydrogen peroxide in foods: milk, natural cheese, Japanese noodles, kamaboko (fish paste), shirasu (boiled and semidried whitebait), and kazunoko (herring roe).

The procedure includes the following steps; sampling (20 g), homogenizing (solid sample), adding 40% trichloroacetic acid solution, centrifuging (3000 rpm, 5 min), filtration (TOYO No. 5c), and color development. Residual hydrogen peroxide was determined by spectrophotometry at 480 nm, after adding ferrous sulfate and ammonium thiocyanate to the extracted solution.

The calibration curve of hydrogen peroxide was linear in the range of 0.1 to 3.0 $\mu\text{g/ml}$. The detection limit was 0.05 ppm in the samples (whole base). The ferrous sulfate reagent used must be essentially free from ferric ion (0.005% or less).

(Received April 9, 1982)

Key words: 過酸化水素 hydrogen peroxide; 硫酸第一鉄 ferrous sulfate; チオシアン酸アンモニウム ammonium thiocyanate; うどん noodle; しらすぼし boiled and semidried whitebait; かずのこ herring roe; かまぼこ fish paste products (kamaboko); ナチュラルチーズ; natural cheese

1. ま え が き

過酸化水素 (以下 H_2O_2 と略す) のマウスに対する発ガン性の報告により、厚生省は「食品、添加物等の規格基準」の一部を改正し、「 H_2O_2 は最終食品の完成前に分解又は除去しなければならない」と定めた (昭和55年10月1日より実施)¹⁾。これに関連して、微量 H_2O_2 の定量法として改良 4-アミノアンチピリン法²⁾、及び酸素電極法³⁾ が厚生省環境衛生局食品化学課長より通知されている³⁾。しかし前者の方法は操作が繁雑で熟練を要し、又後者の方法は高価な専用器が必要である。今回報告する方法は既存の器具を用い、操作も簡便である。

本法は酸性溶液下における H_2O_2 の酸化作用を利用し

た方法であり、試験溶液中に H_2O_2 が存在すると添加した第一鉄イオンが酸化されて第二鉄イオンとなり、それがチオシアン酸と反応して、チオシアン酸鉄の錯体を生成し、この溶液は 480 nm に極大吸収を有する吸収スペクトルを示し、第二鉄イオンが微量であればベールの法則に従う⁴⁾。本法で用いる約 1 M のチオシアン酸濃度の場合、鉄 (III)-チオシアン酸錯体は $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ 、 $\text{Fe}(\text{SCN})_4^-$ のような化学種を生成すると報告されている⁵⁾。従って、本法のモル吸光係数は 4% トリクロル酢酸 (以下 TCA と略す) 水溶液では約 5.1×10^3 となる。

本研究において、食品中の微量の残留 H_2O_2 の簡易定量法を確立するために各種の条件を検討した結果について報告する。

* 雪印乳業 (株) 分析センター: 東京都新宿区本塩町13

2. 実験方法

2.1. 試料

うどん（生めん）、しらすぼし、かまぼこ、かずのこ、牛乳、ナチュラルチーズは東京都内で購入したものを使用した。

2.2. 試薬

1.2 M チオシアン酸アンモニウム溶液：試薬特級チオシアン酸アンモニウム (NH_4SCN) 9.1 g を 0.5 N 塩酸に溶かし 100 ml とする。ただし本溶液は用時調製する。

1% 硫酸第一鉄溶液：試薬特級硫酸第一鉄 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1 g を 0.5 N 塩酸で溶かし 100 ml とする。通常、試薬特級でも第二鉄イオンを多く含有しているものがあり、測定の際妨害となる。そのため、試薬の空試験溶液 (4% TCA 溶液 5 ml + 1% 硫酸第一鉄溶液 1 ml + 1.2 M チオシアン酸アンモニウム溶液 5 ml) で 480 nm における吸光度が 0.10 以上の場合は、以下の操作により第二鉄イオンを除去する。まず 1.4% の硫酸第一鉄溶液 50 ml を調製し、200 ml 容の分液漏斗に移す。次に 1.2 M チオシアン酸アンモニウム溶液 5 ml を加え、第二鉄イオンとの錯体を生成させた後、50 ml のイソアミルアルコールを加えて錯体を抽出除去する。再度 1.2 M チオシアン酸アンモニウム溶液 5 ml を加えて錯体を生

成し、イソアミルアルコールで除去する。この操作を 2~3 回繰返すことにより第二鉄イオンをほとんど含まない溶液が得られるが、この場合の空試験溶液の吸光度は 0.08~0.10 程度である。

40% TCA 溶液：試薬特級 TCA 40 g を水に溶かし 100 ml とする。

0.8% カタラーゼ溶液：和光純薬工業(株)製 catalase from beef liver (約 3,000 IU/mg) を使用する。本品 400 mg を水に溶かして 50 ml とする。

H_2O_2 標準溶液：試薬特級 H_2O_2 (30%) 3 ml をとり、水を加えて 100 ml とし、衛生試験法注解に記載のヨウ素法⁶⁾により標定した後、10 mg/ml となるように調製する。次にこの溶液 1 ml をとり水を加えて 1 L とし、 H_2O_2 標準溶液を調製する。この標準溶液 1 ml は H_2O_2 10 μg を含む。

2.3. 試験操作

1) 試験溶液 A 液の調製

固体試料の場合、試料を乳鉢でよく粉碎した後、その 20 g を 50 ml の遠沈管に採取し、水 20 ml を加える。次に除タンパク及び H_2O_2 の安定化のため 5 ml の 40% TCA 溶液を加える。液体試料の場合、試料 20 g を同様に遠沈管に採取し、40% TCA 溶液を加える。次に遠心

Scheme 1. Analytical procedure of H_2O_2 in various foods

Sample 20 g

- add 20 ml of water (solid sample)
- add 1 ml of 0.8% catalase solution

10 min

- add 5 ml of 40% trichloroacetic acid solution

10 min

- (add H_2O_2 into samples to be 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 ppm concentration)

The following step applies to Scheme 1.

Spectrophotometry

- absorbance at 480 nm—E(b), E(c)

Residual H_2O_2 = E(a) - E(b)

Calibration curve = E(c) - E(b)

Scheme 2. Procedure of reference and calibration curve

分離 (3,000 rpm, 5 分間) し, 上澄液を 50 ml のメスフラスコにとる. 残渣に水 20 ml を加えて再抽出し, 先の上澄液と合せた後, 水を加えて 50 ml とする. 次に東洋濾紙 No. 5c でろ過し, そのろ液を試験溶液 A 液とする. ただし, しらすぼしの場合は, 水で 50 ml にした後, タンニン酸 0.3 g を添加してからろ過する. 又デンプン質の多いうどんの場合は, 再抽出にメタノールを用い, 先の上澄液と合せた後, メタノールを加えて 50 ml とする. 次に 0.5 g のセライト 545 を添加してからろ過する.

2) 試験溶液 B 液の調製

試験溶液 A 液の場合と同じ試料 20 g を取り, 固体試料の場合は水 20 ml を加えた後, 0.8% カタラーゼ溶液 1 ml を加えて室温で 10 分間放置する. 次に 40% TCA 溶液 5 ml を加えて 10 分間放置した後, 以後試験溶液 A 液の場合と同様に操作し, そのろ液を試験溶液 B 液とする. 又液体試料の場合は (試料が極端に酸性に傾いている場合は 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 附近に調整する), 0.8% カタラーゼ溶液 1 ml を試料に直接加えた後, 以下固体試料の場合と同様に行い試験溶液 B 液とする.

3) 定量操作

試験溶液 A 液及び試験溶液 B 液のそれぞれ 5 ml を試験管に採取し, 1% 硫酸第一鉄溶液 1 ml を加えてかくはんし, 1.2 M チオシアン酸アンモニウム溶液 5 ml を加えて呈色後, ただちに 480 nm でその吸光度を測定する. なおその際の対照液は水とする. そして, 試験溶液 A 液と試験溶液 B 液の吸光度差を検量線にあてはめて H_2O_2 を定量する (Scheme 1 参照).

Fig. 1. Calibration curve of H_2O_2 in various foods

○—○, milk; □—□, Japanese noodle; △—△, kamaboko; ×—×, water; ▲—▲, natural cheese; ■—■, kazunoko; ●—●, shirasu

4) 検量線の作製

試験溶液 A 液の場合と同じ試料 20 g をそれぞれ 4 本の遠沈管にとり, 固体試料の場合は水 20 ml を加えた後, 0.8% カタラーゼ溶液 1 ml を加えて室温で 10 分間放置する. 次に 40% TCA 溶液 5 ml を加えて 10 分間放置した後, H_2O_2 標準溶液を試料当たり 0.10, 0.25, 0.50, 1.0 ppm となるように添加する. 次に遠心分離し, 以下試験溶液の場合と同様に操作し, そのろ液を呈色させ, 480 nm でその吸光度を測定する (その際の対照溶液は水とする). そして試験溶液 B 液との吸光度差をプロットして検量線を作製する (Scheme 2 参照).

なお検量線は Fig. 1 に示すように食品に含まれる成分の種類によりチオシアン酸鉄の呈色に増色効果や減色効果が見られるので, 食品の種類別に各々作製する.

3. 実験結果及び考察

3.1. 測定条件の検討

1) 呈色用試液の最適濃度

4% TCA 溶液 5 ml 中の H_2O_2 の濃度を 1 μ g と 2 μ g に調製し, 各種濃度の硫酸第一鉄溶液 1 ml とチオシアン酸アンモニウム溶液 5 ml を加えて呈色し, その時の H_2O_2 1 μ g と 2 μ g の吸光度差から, 呈色用試液の最適濃度について検討し, その結果を Fig. 2 に示す.

Fig. 2 に示すとおり, それぞれの最適濃度は, 硫酸第一鉄が 1%, チオシアン酸アンモニウム 1.2 M で吸光度が最大となったので, この条件を用いることとした.

Fig. 2. Effect of concentration FeSO_4 and NH_4SCN in 4% trichloroacetic acid solution on absorbance

2) カタラーゼ溶液の濃度と分解時間

本法は、対象となる試料に対してカタラーゼを添加した場合と無添加の場合の吸光度差より残留 H_2O_2 を測定する方法であるため、対照溶液を調製する時の H_2O_2 を十分に分解するカタラーゼ溶液の濃度とその分解時間について検討した。

H_2O_2 を含有しない4種類の試料に対して、しらすばし、かまぼこ、牛乳は20g 当り1.0mg、うどんは20g 当り0.2mgの H_2O_2 を添加し、0.1~0.8%のカタラーゼ溶液1mlを加えて一定時間ごとに40% TCA 溶液5mlを加えて反応を停止させ残留した H_2O_2 を測定した。その結果は、Fig. 3に示すとおりである。

H_2O_2 を完全に分解するために、カタラーゼ溶液の濃度は0.8%とし、分解時間は10分間とした。

3) チオシアン酸鉄の呈色後の安定性

チオシアン酸鉄は水溶液中の溶存する酸、無機塩、及び測定時における温度や光などによりフェーディング現象¹⁾が起こることが知られている。そこで、 H_2O_2 1.0 ppm を添加した試験溶液をチオシアン酸鉄として呈色させた後、その経時的变化を調べた。その結果はFig. 4に示すとおり、呈色は呈色直後から20分間安定であるので、呈色後ただちに測定することとした。

3.2. 試験溶液中の H_2O_2 の安定性

試験溶液を調製したときの4% TCA 溶液中での微量 H_2O_2 の安定性について検討した。まず各試料に H_2O_2 を1.0 ppm になるように添加した後、それぞれの調製法に従い、最終50mlとした時点を開始点として、その経時的变化について測定した。その結果をFig. 5に示す。

対象となる試料の種類にかかわらず、試験溶液中の H_2O_2 は3時間程度まで安定であった。

Fig. 3. Relation between reaction time and catalase activities (add H_2O_2)

Concentration of catalase solution:
○—○, 0.1%; ●—●, 0.2%; △—△, 0.4%; ×—×, 0.8%

Fig. 4. Effect of time on ferric thiocyanate in extracted solution after the coloration (add H_2O_2 : 20 $\mu\text{g}/20\text{g}$)

○—○, milk; ●—●, japanese noodle; △—△, kamaboko; ×—×, water; ●—●, shirasu

3.3. 繰返し精度について

しらすばし、うどん、かまぼこ、牛乳の4種類の試料について H_2O_2 濃度1.0 ppm で、10回の繰返し実験の定量精度をみた。その結果、Table 1に示すとおり、変動係数 (C. V) は2.6~5.5(%)と良好な結果が得られた。

これらのことから、試料20gから抽出後、試験溶液50ml中の5mlを定量に使用するため本法での定量限界は0.05 ppmである。

Fig. 5. Stability of H_2O_2 in extracted solution (add H_2O_2 : $20\text{ }\mu\text{g}/20\text{ g}$)
○—○, milk; ●—●, Japanese noodle;
△—△, kamaboko; ×—×, water; ●—● shirasu

Table 1. Repeatability of Absorbance on the Proposed Method

	Milk	Kamaboko	Shirasu	Japanese noodle
1	0.225	0.180	0.127	0.194
2	0.223	0.174	0.118	0.195
3	0.235	0.180	0.110	0.180
4	0.233	0.190	0.123	0.188
5	0.227	0.174	0.110	0.184
6	0.229	0.187	0.129	0.175
7	0.215	0.182	0.123	0.197
8	0.222	0.185	0.110	0.209
9	0.215	0.179	0.118	0.190
10	0.221	0.183	0.118	0.199
$\bar{x}$	0.224	0.181	0.119	0.191
σ	0.0064	0.0052	0.0066	0.0080
C.V (%)	2.6	2.9	5.5	4.1

(add H_2O_2 : $20\text{ }\mu\text{g}/20\text{ g}$)

3.4. 測定に影響を及ぼす諸要因について

1) 共存物質の影響

本法の原理は H_2O_2 の酸化作用を利用した方法であるため、試験溶液中にその他の酸化・還元作用を有する物質が存在すると呈色の妨害となる。又チオンian酸鉄の錯体は無機イオンにより影響を受けることが報告⁴⁾ されている。

これらの物質としては、小麦粉やねり製品に使用される臭素酸カリウム、又小麦粉に使用される過酸化ベンゾイルなどの酸化剤、L-アスコルビン酸などの還元剤があり、無機イオンとしては、リン酸塩、食塩などがある。これらの影響について検討し、その結果を Table 2 に示す。

Table 2. Effect of Diverse Substance

Diverse substance	Add/5 ml	Absorbance at 480 nm
—	—	0.123
$KBrO_3$	1 μg	0.121
	2	0.124
	20	0.177
	100	above 0.4
$(C_6H_5CO)_2O_2$	1 μg	0.125
	2	0.124
	20	0.178
	0.5 mg	0.114
Na_2HPO_4	1	0.117
	2	0.103
	20	0.098
	5 mg	0.119
NaCl	20	0.117
	80	0.119
	320	0.119
	20 μg	0.124
L-Ascorbic Acid	100	0.124
	200	0.126
	400	0.110

(H_2O_2 : $2.0\text{ }\mu\text{g}/5\text{ ml}$)

臭素酸カリウム、及び過酸化ベンゾイルは試験溶液中に試料当たり 10 ppm 程度存在すると、約 40% の増色効果があった。リン酸塩は食品中にリン酸として 670 ppm 含有すると吸光度として約 10% 呈色が抑制された。しかし通常の食品の場合、これらの増・減色効果は、これらの食品添加物の含量が臭素酸カリウム、過酸化ベンゾイルそれぞれ 1.6 ppm、不検出と少ない⁷⁾ のでほとんど定量に影響を与えない。又食塩はしらすぼしのように 16% 程度含有する場合でも、呈色に影響を与えない。しかし L-アスコルビン酸は 10 mg/100 g 程度までは H_2O_2 の測定に影響を及ぼさないが、30~40 mg/100 g を含有する食品では、本法の使用はできない。

2) 牛乳のバックグラウンド値について

厚生省環境衛生局食品化学課より示された酸素電極法では、市販牛乳中の H_2O_2 を測定し、紙容器入り牛乳(殺菌乳、滅菌乳)、びん装牛乳のいずれもバックグラウンド値として、0.02~0.04 ppm の H_2O_2 が存在していると報告されている³⁾。そこで、これらの製品について本法を使用して測定し、酸素電極法とも比較調査した。その結果を Table 4 の 1 部に示す。

本法では、紙容器入り牛乳(殺菌乳、滅菌乳)では、 H_2O_2 様物質(注: 検出される物質は H_2O_2 かどうか未確認であるため、牛乳の場合 H_2O_2 様物質とした)はすべて“検出せず”(0.05 ppm 以下)であり、又酸素電極法では 0.02~0.04 ppm であって上記の厚生省の報告³⁾ とよく一致していた。しかしびん装牛乳については、本

Table 3. Effect of Various Factors on the Determination of H_2O_2 in Milk

Sample	Condition	Presented method	Oxygen electrode
		(ppm)	(ppm)
L. L. milk	—	nd	0.02
(aseptic	80°C, 30 min	nd	0.02
brick)	add butter oil (10%)	nd	nd
	Aeration 1 L/min, 1 hr	0.08	0.05
	Light 30 min	0.25	0.23
	1 hr	0.49	0.46

Table 4. H_2O_2 Contents in Various Commercial Foods

Sample	Presented method	Oxygen electrode
	(ppm)	(ppm)
L. L. milk	nd	0.02
(aseptic	nd	0.03
brick)	nd	0.02
Milk	nd	0.04
(paper	nd	0.02
package)	nd	0.02
Milk	0.11	0.10
(bottle)	0.11	0.06
Japanese	0.13	0.10
noodle	0.25	0.20
	nd	nd
	0.12	0.10
Hanpen	nd	nd
	0.10	0.10
Kazunoko	0.08	0.10
	0.15	0.20
	nd	nd
Shirasu	0.20	0.23
	nd	nd
	42	40
	0.10	0.10
Kamaboko	nd	nd
	0.15	0.20
	nd	nd
Natural	nd	nd
cheese	0.12	0.20
	nd	nd

法で 0.1 ppm 程度検出され、酸素電極法によっても同様の結果が得られた。そこで、このびん装牛乳で H_2O_2 様物質として検出される原因について酸素電極法を併用して検討した。

この H_2O_2 様物質が増加する要因としては、温度、光、過酸化脂質、空気との接触などが考えられ、それぞれの要因について H_2O_2 が 0.05 ppm 以下の滅菌乳を用いて検討し、その結果を Table 3 に示す。

滅菌乳をしゃ光して加温 (80°, 30 分間) した場合、ほとんど H_2O_2 様物質は増加しなかった。同様に、過酸化物質 (POV) が 1.2 のバターオイルを 10% 添加してエマルジョンとしたものを用いて、過酸化脂質の影響について見たところ、 H_2O_2 様物質は増加しなかった。又しゃ光してエアレーション (1 L/min, 30 分間) することにより、 H_2O_2 様物質は若干増加していた。次に 60 W の白色燈を用い、20 cm の高さから牛乳に光を直接照射すると、30 分間で不検出から 0.25 ppm, 1 時間で 0.49 ppm と時間の経過とともに、 H_2O_2 様物質が増加した。又酸素電極法でも、同様の結果が得られた。以上のことから、びん装牛乳から H_2O_2 様物質が検出される要因は、光による影響が大きいと考えられる。なおびん装牛乳から検出された量と、実験値との H_2O_2 様物質の量的な差は、びんを透過する光の量と質によるものと考えられる。

3.5. 市販の各種食品の実態調査

東京都下で販売されていたしらすぼし、かまぼこ、うどん、はんぺん、かずのこ、ナチュラルチーズ、牛乳の各種食品について、本法と酸素電極法とで測定した結果、Table 4 に示すとおり、両法は良く一致した結果が得られた。

4. 要 約

チオシアン酸鉄の呈色を利用した食品中の H_2O_2 の測定法について検討した。チオシアン酸アンモニウムと硫酸第一鉄による呈色は H_2O_2 量 0.10~3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間で良好な直線性を示した。除タンパク剤として 40% TCA 溶液を使用すると H_2O_2 の安定化に効果があった。本法は食品中の 0.05 ppm 以上の残留 H_2O_2 の定量に使用することができる。又本法は酸素電極法と良く一致した結果が得られた。なおびん装牛乳では、光の影響により微量の H_2O_2 様物質が検出された。

なお試薬として使用する硫酸第一鉄は必ず空試験で吸光度 0.10 以下のものを使用する。

本研究の概要は、昭和56年11月20日 日本食品衛生学会 第42回学術講演会 (大阪) において発表した。

文 献

- 1) 昭和 55 年 2 月 20 日厚生省告示第 24 号。
- 2) 伊藤誉志男: 食品衛生研究 31, 15~34 (1981)。
- 3) 厚生省環境衛生局食品化学課長通牒: 食品衛生研究 31, 572~585 (1981)。
- 4) Sandel, E. B.: "Colorimetric Determination of Traces of Metals" 3rd Ed. p. 524~537 (1959), Interscience Publishers Inc., New York.
- 5) 林 謙次郎: 分析化学 27, 338~343 (1978)。
- 6) 日本薬学会編: "衛生試験法注解" p. 316~319 (1980) 金原出版。
- 7) 棚田益夫, 内田晴彦, 沢 久美子: 食衛誌, 14, 431~436 (1973)。