コーヒー中の過酸化水素生成要因の検討

(平成3年2月14日受理)

辻 澄子^{*1} 柴田 正^{*1} 小原 一雄^{*2}
岡田 直子^{*2} 伊藤 誉志男^{*1}

Studies on the Factors Affecting the Formation of Hydrogen Peroxide in Coffee

Sumiko TSUJI^{*1}, Tadashi SHIBATA^{*1}, Kazuo OHARA^{*2},
Naoko OKADA^{*2} and Yoshio ITO^{*1}

(^{*1}National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch: 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku,
Osaka, Japan; ^{*2}Japan Food Research Laboratories, Osaka Branch: 3-1,
Toyotu-cho, Suita-shi, Osaka, Japan)

The factors affecting formation of hydrogen peroxide (H_2O_2) in coffee have been studied. H_2O_2 in coffee was identified by TLC and determined by using an oxygen electrode method and modified 4-aminoantipyrine colorimetry. H_2O_2 was not detected in green coffee beans, but was detected in coffee infusion. Coffee infusion or coffee solution prepared using a coffee maker contained less H_2O_2 than those prepared using a filter or a beaker. The greater the degree of roasting, the greater was the formation of H_2O_2 in coffee beans. The formation of H_2O_2 was also influenced by temperature and light.

Some components of coffee beans, saccharose, chlorogenic acid, glycine, caffeine, caffeic acid and quinic acid, did not contain H_2O_2 , but when these components were roasted in the same manner as coffee beans and an infusion was prepared, H_2O_2 was formed. Formation of H_2O_2 from roasted caffeic acid was particularly marked.

(Received February 14, 1991)

Key words: 過酸化水素 hydrogen peroxide; コーヒー coffee; 薄層クロマトグラフィー thin layer chromatography; 酸素電極法 oxygen electrode method; 改良 4-アミノアンチピリン比色法 modified 4-aminoantipyrine colorimetry; ばい煎 roasting; コーヒー酸 caffeic acid; 熱分解物 thermal decomposite

緒 言

コーヒーに変異原性が認められ^{1), 2)}, その変異原性は酵素^{3)~5)}や亜硫酸^{6), 7)}により不活化されることから, 過酸化水素 (以下 H_2O_2) の存在がクローズアップされるようになった⁸⁾. これに関連して種々の分析法で H_2O_2 を測定した報告が見られるようになった^{9)~12)}. 著者らは種々の食品中の H_2O_2 含有量を従来から用いられている酸素電極法 (従来法)^{14), 15)} で測定したところ, コーヒー (焙り豆, インスタント) 及び茶葉類から $10 \mu\text{g/g}$ 以上の H_2O_2 を検出したが, それらのばらつきは大きかった¹³⁾. 特に, コーヒーについては, H_2O_2 の含有量が大きく, そ

のばらつきも非常に大きかった. そこで, コーヒー中の H_2O_2 として定量されているものが真の H_2O_2 であるかどうかを薄層クロマトグラフィー (以下 TLC) で確認した後, 酸素電極法及び改良 4-アミノアンチピリン (以下 4-AA) 法¹⁶⁾により定量し, H_2O_2 生成要因について検討し, 若干の知見が得られたので報告する. さらに, コーヒー成分についてモデル実験を試み, H_2O_2 生成要因について若干の考察を加えたので合わせて報告する.

実験方法

1. 試料

インド, タンザニア, コロンビア, ペルー, アイボリー, ボンジュラル, ウガンダ, エチオピア, ブラジル及びインドネシアの 10 か国の生コーヒー豆, それらの焙り豆及びインスタントコーヒーは全日本コーヒー協会よ

^{*1} 国立衛生試験所大阪支所: 大阪市中央区法円坂 1-1-43

^{*2} (財)日本食品分析センター大阪支所: 大阪府吹田市豊津町 3-1

Fig. 1. Chemical structures of various components of green coffee beans

り供与されたものを使用した。

缶入りコーヒーは大阪市内の市場で購入した。Fig. 1に示したコーヒーの成分であるショ糖、クロロゲン酸、グリシン、コーヒー酸及びキナ酸はそれぞれ、片山化学工業(株)、東京化成工業(株)、片山化学工業(株)、ナカライテスク(株)から購入した。

2. 試薬

1) H_2O_2 の標準溶液、リン酸緩衝液① (以下PB①) (pH 7.0) 及びカタラーゼ溶液の調製: 従来法^{14), 15)}に従った。

2) 4-AA 溶液、フェノール溶液、リン酸緩衝液② (以下PB②) (pH 7.3) 及びペルオキシダーゼ溶液の調製: 伊藤らの方法¹⁶⁾に従った。

3) 4-AA 反応試薬の調製: 4-AA 溶液、フェノール溶液、PB②及びペルオキシダーゼ溶液を等量混合した。用時調製した。

4) TLC 板: 東京化成(株)製スポットフィルム®シリカゲルを用いた。

5) 展開液 (a) 及び (b) の調製: クロロホルム-メタノール混液 (5:4) を展開液 (a) として用い、クロロホルム-メタノール混液 (49:1) を展開液 (b) として用いた。

3. 装置

過酸化水素測定装置: オリエンタル電気(株)社製 Oritector Model III 型

自記分光光度計: 日立製作所(株)製 556 型

ドリップ式ろ過器: カリタ(株)社製

自動型コーヒーメーカー: ナショナル電気(株)社製 NC-A2 型

恒温槽: (株)島津製作所製 GC8A 型

4. 操作方法

1) コーヒー浸出液及びコーヒー溶解液の調製方法: 粉碎した焙り豆 10 g を熱湯 (90°) 150 ml を用いてドリ

ップ式によりろ過器またはコーヒーメーカーで浸出し、コーヒー浸出液とした。また、無菌ボックスに窒素ガス (以下 N_2) を流してコーヒーメーカーによる浸出液の調製も行った。インスタントコーヒー粉末 2 g を 200 ml ビーカーまたはコーヒーメーカーに入れ、熱湯 (90°) 150 ml を加えて溶解し、コーヒー溶解液とした。

2) コーヒー濃縮液の調製方法: ドリップ式ろ過器を用いて調製したコーヒー浸出液 200 ml を 2 ml に減圧濃縮し、コーヒー濃縮液とした。

3) 脂質の除去法: 粉碎した焙り豆 5 g はエーテル 100 ml で 2 回洗浄した。

4) TLC (1) 方法 (a): コーヒー濃縮液 20 μl を TLC 板に塗布し、展開液 (a) で展開後褐色のスポットの有無を確認した。さらに 4-AA 反応試薬を噴霧して、桃色を帯びるか否かを確認した。 H_2O_2 標準液 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 20 μl を塗布して同様に展開して対照とした。

(2) 方法 (b): 調製直後のコーヒー浸出液 200 ml に 4-AA 反応試薬 4 ml を加えて反応させ、伊藤らの 4-AA 法¹⁶⁾に準じてフロリジルカラム処理した後、1 ml に減圧濃縮した。その 20 μl を TLC 板に塗布し、展開液 (b) で展開し、桃色のスポットを確認した。 H_2O_2 標準液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10 ml に 4-AA 反応試薬 4 ml を加えて反応させ、以下同様に操作し対照とした。

5) コーヒー成分を用いた際の実験方法

(1) 試料溶液の調製法: 中林らの方法^{17), 18)}に従って、各コーヒー成分について Table 4 の右欄に記した量を取り、McIlvaine 緩衝液¹⁹⁾ (pH 5.5) 2 ml に溶解させ、試料溶液とした。ただし、クロロゲン酸、コーヒー酸及び各成分混合物は完全には溶解しなかったため懸濁液とした。

(2) ばい煎方法: 中林らの方法^{17), 18)}に従った。各試料溶液 2 ml (コーヒー生豆 2 g に相当する量) を精製セラ

イト 1.5 g と混和してコーヒー成分を吸着させ、試験管（丸底 ϕ 1.6 $\times$ 2.5 cm）の壁に約 5 mm の層状に付着させ、同一試料を二つずつ作り、一方は室温下に置き、ばい煎前試料とした。他方は、恒温槽で 200°で 15 分間加熱後、室温下で 15 分間放冷し、ばい煎後試料とした。ばい煎後試料は、焙り豆 1.6 g に対応するものとして以後の実験を行った。

(3) 浸出方法：ばい煎前及びばい煎後の試料に直ちに 90°の熱湯を 24 ml 加え、ガラス棒で試験管の壁に付着させたセライト部分を迅速に 20 回こすりながら浸出した液を、0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し試験溶液とした。これらはコーヒー焙り豆 10 g を熱湯 150 ml で浸出した液に対応するものとして実験を行った。

(4) H_2O_2 生成率の計算方法：各コーヒー成分浸出液中の H_2O_2 濃度 (μ g/ml) に熱湯の量 24 ml を乗じた値を各 H_2O_2 生成量とし、その生成量を各成分で割り、分率で示した値を H_2O_2 生成率とした。同一重量の成分から生成してくる H_2O_2 量の分率である。

6) H_2O_2 の測定方法

(1) 酸素電極法 (i) 固体試料：

〔酸素電極法①〕従来法^{14), 15)}に従って行った。すなわち、粉碎した固体試料 5.0 g をとり、消泡剤（シリコーン樹脂）1 滴及び PB① 40 ml を加え、ホモジナイズした後、ろ紙ろ過し、ろ液を試料液とした。ただし、PB①を加えてからろ液を得るまでの間を 10 分以内とした。試料液 2 ml を直ちに酸素電極装置の試料セル内に入れ N_2 で酸素を追い出した後、カタラーゼを加えて H_2O_2 を分解して生じた酸素を測定し、同様に操作した H_2O_2 の標準溶液の検量線より試料中の H_2O_2 を算出した。

〔酸素電極法②〕酸素電極装置のセル内に PB① 2.0 ml を入れ、あらかじめ N_2 を通気して酸素を追い出した後、粉碎した固体試料 20 mg をセル内に入れ、1 分以内にカタラーゼを加え、以下酸素電極法①と同様に操作した。

(ii) 液体試料：〔酸素電極法③〕酸素電極法②に相当する辻らの方法²⁰⁾に従った。すなわち、酸素電極装置のセル内に、PB① 1.0 ml を入れ、あらかじめ N_2 を通気して酸素を追い出した後、液体試料 1 ml をセル内に入れ、

N_2 を通気して、液体試料を加えてから 1 分以内にカタラーゼを加え、以下酸素電極法①と同様に操作した。

(2) 4-AA 法：伊藤らの方法¹⁶⁾に従った。

7) 過酸化水素（以下 POV）の測定：衛生試験法・注解²¹⁾に従って、ヨウ化カリウムの酸化物として測定した。ただし、試料の量はコーヒー焙り豆に含有されている油脂の量ではなく、焙り豆の量とした。

(8) 焙り豆の保存方法：種々の温度の恒温槽内で焙り豆を 600 ルックスの白色けい光灯下または遮光して保存した。

実験結果及び考察

1. コーヒー液の pH

コーヒー浸出液、インスタントコーヒー液及び缶コーヒーの液性を調べた。

Table 1 に示したように、ミルクの入った缶コーヒー以外はいずれも酸性であった。コーヒー中の H_2O_2 を酸素電極法で測定する場合にはカタラーゼの至適 pH でなければならない。そこで、アスコルビン酸含有清涼飲料水²⁰⁾の場合と同様に PB①による 2 倍以上の希釈が必要となり、希釈時には、アスコルビン酸含有清涼飲料水²⁰⁾のように、コーヒー成分から H_2O_2 が生成する可能性がある。したがって、液体試料はアスコルビン酸含有清涼飲料水と同様に酸素電極装置の試料セル内で希釈して 1 分以内に H_2O_2 を測定する酸素電極法③を用いることにより空気酸化の影響を除いた。

2. コーヒー液中の H_2O_2 の確認

インド産コーヒー焙り豆（ばい煎度：H-i, Table 2 参

Table 1. pH Ranges of Commercial Coffees and Coffee Beverages at Drinking Concentration

Sample	Range of pH (n*)
Soluble coffee solution	4.8~5.2 (10)
Regular coffee infusion	4.9~5.5 (10)
Liquid coffee beverage with milk type	6.3~6.9 (5)
without milk type	4.8~5.6 (5)

*n: Number of samples

Table 2. Effects of Roasting Degree on H_2O_2 Contents in Roasted Coffee Beans

→deeper

Roasting degree	L*			M*			H*			
	i	ii	iii	i	ii	iii	i	ii	iii	iv
Concn, of H_2O_2 (μ g/g)										
Indian beans	54	62	72	71	89	89	110	110	140	150
Brazilian beans	68	59	77	120	110	120	120	140	140	150

These values are averages of three determinations.

* Coffee beans were roasted in different roasting degrees.

Fig. 2. Thin layer chromatograms of coffee concentrates

Sample: ① H_2O_2 standard solution; ② coffee concentrate; ③ H_2O_2 standard solution reacted with coloring reagent; ④ coffee concentrate; ⑤ coffee concentrate reacted with coloring reagent

Developing solvent (CHCl_3 : MeOH) (a) 5:4; (b) 49:1

Coloring reagent: mixture solution of 4-AA, phenol, peroxidase and phosphate buffer (pH 7.3)

照)をドリップ式ろ過器を用いて浸出した。そのコーヒー浸出液を酸素電極法③(カタラーゼ処理)²⁰⁾並びに4-AA法(ペルオキシダーゼ処理)¹⁶⁾により測定したところ、浸出液中の H_2O_2 含量は平均値(3試行)として $2.63 \mu\text{g/ml}$ 及び $2.60 \mu\text{g/ml}$ であった。測定原理が異なるにもかかわらず定量値が極めて近いことから、両法により定量された値は H_2O_2 によるものであると考えられる。山東ら²²⁾はエーテル洗浄により過酸化脂質由来の H_2O_2 を除去している。コーヒー焙り豆をエーテルにより脱脂した後、浸出した液中の H_2O_2 値には変化がなかった。したがって、コーヒー中の H_2O_2 値は過酸化脂質が要因ではないと考えられる。

このコーヒー浸出液を濃縮したものを試験液とし、直ちに展開溶媒(a)を用いてTLCを行った。展開後のTLCプレートは H_2O_2 標準液と同様の R_f 値に褐色のスポットが観察され、4-AA試薬を噴霧すると桃色を帯びたスポットに変化した。TLCの塗布あるいは4-AA試薬の噴霧が遅れると桃色を帯びた褐色のスポットが得られず、褐色のスポットのみであった。そこで、さらにコーヒー浸出液に4-AA試薬を反応させた後濃縮したものについて、直ちに展開溶媒(b)を用いてTLCを行った。4-AA試薬を反応させなかったコーヒー成分のスポット

Fig. 3. Effects of temperature and light on H_2O_2 content in roasted coffee beans

●: at 35°C with light; ▲: at 25°C with light
■: at 5°C with light; ○: at 35°C in the dark
□: at 5°C in the dark

は褐色であり、 H_2O_2 の呈色物(Fig. 2(b)③)の桃色のスポットとは異なった R_f 値を示した。したがって、コーヒー濃縮液(Fig. 2(b)⑤)中のコーヒー成分と H_2O_2 呈色物の桃色のスポットが区別できた。また、コーヒーを浸出してから濃縮して4-AA試薬を反応させるまでの時間が長かった場合は、 H_2O_2 呈色物の桃色のスポットが得られなかった。すなわち、コーヒー中の H_2O_2 をTLCで確認でき、その H_2O_2 は時間の経過により消失することが明らかになった。

3. コーヒー豆について

10か国の生コーヒー豆を酸素電極法①により測定したが、 H_2O_2 は検出されなかった。

インド及びブラジル産の生コーヒー豆を種々のばい煎法でばい煎した焙り豆について酸素電極法①により H_2O_2 を測定した。

H_2O_2 含有量はTable 2に示した。ばい煎度はL, M, Hになるほど深く、その中でもi, ii, iiiと番号が大きい方が深くなる。したがって、ばい煎度が深くなるほど、 H_2O_2 含量が高くなった。

また、インド産焙り豆(L-i)を豆のまま光照射あるいは暗所にて各種温度で保存したときの H_2O_2 含量の変化を酸素電極法①により検討した。

Fig. 3に示したように、暗所に保存しても、 35° の保存温度では、 H_2O_2 含有量の上昇が見られ、光照射により、さらに上昇した。

Fig. 4. Time course of H₂O₂ content and POV of roasted coffee beans

Roasted coffee beans stored with light at 30°C.

○: H₂O₂ content; ●: POV

インド産焙り豆 (L-i) の異なるロットの豆を保存温度 30°, 光照射の条件で、保存したときの H₂O₂ 含有量と POV 値との関係を Fig. 4 に示した。

Fig. 3 と同じインド産焙り豆を用いたが、ロットが異なるためか、H₂O₂ 値が少し低い値を示した。H₂O₂ 含有量と POV 値は比例関係を示すことから、POV 値はほとんど H₂O₂ に起因する値と考えられる。

コーヒー焙り豆を粉碎して、室温、冷暗所で約 1 か月間保存しても、H₂O₂ 含有量値に変化は見られなかった。

コーヒー中の H₂O₂ はアスコルビン酸を含有する清涼飲料水¹⁹⁾と同様に、溶存酸素によるコーヒー成分の自動酸化により生成すると考えられている^{8), 12)}。したがって、コーヒーの試料溶液を調製する際にも H₂O₂ が生成している可能性がある。そこで、溶存酸素の影響が少なくなるようにした酸素電極法②と従来法^{14), 15)}である酸素電極法①の両法を用いて、インド産焙り豆 (M-ii) 中の H₂O₂ の測定値を比較してみたところ、②では 12 ± 2 μg/g となり、①では 89 ± 7 μg/g であった。H₂O₂ 100 μg/g 添加時の②による回収率は 92% であったことを考え合わせると酸素電極法①では操作中に約 80 μg/g の H₂O₂ が生成されたことになる。

4. インスタントコーヒーについて

インスタントコーヒーはコーヒー焙り豆を各メーカー独自の方法で浸出して乾燥した粉末である。酸素電極法①を用いて測定した H₂O₂ 値は 194 ± 11 μg/g であり、酸素電極法②では 22 ± 4 μg/g であった。インスタントコーヒーにおいても、酸素電極法①による測定では操作中に H₂O₂ が生成され、その生成量は約 170 μg/g であり、焙り豆より多かった。インスタントコーヒーは一度

Table 3. Effects of Coffee Preparation of H₂O₂ in Coffee Infusion and Solution

Sample	Preparation method	
	H ₂ O ₂ (μg/ml)	
	Filter or Beaker* ¹	Coffee maker* ² in the air (in the N ₂ flow)
Coffee infusion* ³	(1)	4.8 ± 0.6 0.4 ± 0.2 (0.1 ± 0.1)
	(2)	5.5 ± 1.6 0.2 ± 0.2 (ND)
	(3)	4.4 ± 0.4 0.1 ± 0.1 (ND)
	(4)	5.0 ± 1.0 0.2 ± 0.1 (ND)
Soluble coffee solution* ⁴	(A)	6.7 ± 1.6 0.6 ± 0.3
	(B)	4.8 ± 0.8 0.3 ± 0.2
	(C)	5.6 ± 0.8 0.5 ± 0.2

ND < 0.1 μg/ml

Data show mean values ±SD of 3 determinations

*¹ Infusion and solution were prepared using filter and beaker, respectively.

*² Infusion and solution were prepared using automatic coffee maker.

*³ The roasted coffee beans of different countries were ground and infused.

*⁴ The soluble coffee powders produced by various manufactories were dissolved.

浸出したものを乾燥しているため、インスタントコーヒー粉末中のコーヒー成分の含量がコーヒー焙り豆中より多く存在している²³⁾。したがって、H₂O₂ 生成量が多くなった原因としては H₂O₂ 量が焙り豆の 12 μg/g からインスタントコーヒーの 22 μg/g と増加しているだけでなく、H₂O₂ 前駆物質が多量存在していると考えられ、酸素電極法①の操作中に溶存酸素の影響で H₂O₂ 生成量が増加したと考えられる。

5. コーヒー液について

焙り豆及びインスタントコーヒーのいずれにおいても試料溶液調製時に H₂O₂ が生成することが考えられたので、コーヒー液について検討した。

コーヒー焙り豆を粉碎し、ドリップ式でろ過器を用いた方法及びコーヒーメーカーを用いた方法により浸出液を調製した。コーヒーメーカーの場合は N₂ 気流中でも調製した。また、インスタントコーヒーの溶解はビーカーに入れて通常溶解する方法及びコーヒーメーカーに入れて溶解する方法によりコーヒー液を調製した。その結果を Table 3 に示した。

著者がろ過器で調製したコーヒー液中の H₂O₂ 値、5 μg/ml はけい光反応速度法によるコーヒー液中の H₂O₂ 値、250 ~ 300 μM (8.5 ~ 10.2 μg/ml)¹¹⁾ に類似しており、コーヒー液の調製時においても、試料液の調製時

Fig. 5. Time course of H_2O_2 content in coffee solution

●: regular coffee infusion, standing in glass server without cap

○: regular coffee infusion, placed on a hot plate

□: regular coffee infusion in glass server with special cap on surface of the solution, placed on a hot plate

▲: soluble coffee solution, standing in glass server without cap

△: soluble coffee solution, placed on a hot plate

と同様にコーヒー成分からの H_2O_2 の生成が考えられる。一方、著者らがコーヒーマーカーで調製したコーヒー液中の H_2O_2 値に近く、 N_2 気流中においてコーヒーマーカーで調製したコーヒー浸出液からは H_2O_2 をほとんど検出しなかった。これは、Rinkus *et al.* のドリップ式の自動式コーヒーマーカーを用いて調製した浸出液中には H_2O_2 をほとんど検出していない¹²⁾という結果と類似しており、コーヒー液中の溶存酸素量が異なることにより、 H_2O_2 の生成量が異なったという彼らの考えを支持する結果であった。したがって、コーヒーマーカーは溶存酸素が少ない状態でコーヒーを調製していると考えられる。

また、コーヒー液の保存時間による H_2O_2 量の変化を酸素電極法②により測定した結果、Fig. 5 に示したように、 H_2O_2 生成はホットプレート上のコーヒーが最も少なかった。これらの結果も、Rinkus *et al.*¹²⁾ のコーヒーを口まで満たして蓋をした場合や 90° で保存した場合のコーヒーからは H_2O_2 を検出しなかった結果と非常に類似しており、前述したようにコーヒー液中の溶存酸素量の差により H_2O_2 の生成量が異なるという彼らの考えを同様に支持するものである。

Table 4. Contents of Various Components in Green Coffee Beans Used for Roasting

Component	Content (%) used for roasting* ¹	Amount (mg) used for roasting* ²
Saccharose	8.0	160
Chlorogenic acid	7.0	140
Glycine	2.1	42
Caffeine	1.5	30
Caffeic acid	0.3	6
Quinic acid	2.2	44
(Others* ³)	78.9	—
Total	100.0	—
Mixture of 6 components	21.1	422

Each component or mixture of 6 components in McIlvaine's buffer solution (2 ml) was absorbed on the celite (1.5 g), and then roasted.

*¹ These contents were decided by reference to refs. ^{17), 23)~25)}.

*² Amount of each component corresponds to one contained in 2 g of green coffee beans.

*³ These components mean protein, fiber, water, etc., and were not used for roasting except for water.

したがって、コーヒー中の成分が溶存酸素の影響により H_2O_2 を生成し、また、それらの成分が分解していく一方 H_2O_2 も分解していくことが考えられ、 H_2O_2 量は測定した時点での量として捉えているものと考えられる。

6. コーヒー成分について

6.1 生豆中の成分からの H_2O_2 生成について

生豆中のコーヒー成分組成^{23)~25)}並びに褐色色素形成のモデルばい煎のときの成分組成¹⁷⁾を参考にして、コーヒー中の H_2O_2 生成のモデルばい煎の成分組成を Table 4 のように仮定した。Table 4 の 6 成分の自動酸化の有無を調べるために、各水溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に空気を通気した。空気通気前後の水溶液中の H_2O_2 を酸素電極法③を用いて測定したところ、Table 5 に示したように、通気前では H_2O_2 を検出しなかったが、通気後ではショ糖、クロロゲン酸及びコーヒー酸からは H_2O_2 を検出し、これらは自動酸化しやすい物質であることが分かった。これらはコーヒー中の香りの研究^{26a)}及び食品の褐変現象の研究^{27), 28)}から、ショ糖のメイラード反応及びポリフェノールの自動酸化²⁹⁾として種々研究されているが、コーヒー中の H_2O_2 含有量に対し自動酸化により生成される量は少なすぎる。そこで、各成分をばい煎したものからの H_2O_2 量を測定することにした。

6.2 ばい煎したコーヒー成分からの H₂O₂ 生成について

Table 4 に示した重量%に相当する量, すなわちコーヒー生豆 2 g に含有されると考えられる各成分の重量をセライトに吸着させて, ばい煎し浸出した液中の H₂O₂ を酸素電極法③を用いて測定した. 浸出するときの熱湯量はコーヒー焙り豆 10 g を熱湯 150 ml で浸出するときの量比と同じになるようにした. すなわち, コーヒー生豆はばい煎することにより, その重量が 80% に減少する³⁰⁾ことから, 生豆 2.0 g は焙り豆 1.6 g に相当し, それを熱湯 24 ml で浸出した液がコーヒー浸出液に相当する.

Table 5. Concentration of H₂O₂ in Aqueous Solutions or Suspension Solutions of Coffee Components

Component	Content of H ₂ O ₂ (μg/ml)		Appearance
	Bubbling		
	Before	After*	
Saccharose	ND	0.09	Clear solution
Chlorogenic acid	ND	0.06	Suspension
Glycine	ND	ND	Clear solution
Caffeine	ND	ND	Clear solution
Caffeic acid	ND	0.04	Clear solution
Quinic acid	ND	ND	Suspension

ND<0.02 μg/ml

* After bubbling: Each test solution was bubbled with air (0.8 L/min) for 3 hr.

Concentration of each component: 100 μg/ml

Table 6 に示したように, ばい煎前ではいずれの成分からも H₂O₂ は検出されなかったが, ばい煎後からは数種の成分から H₂O₂ の生成が見られ, その生成量はショ糖からが最も多く, 次いでコーヒー酸, クロロゲン酸, グリシンの順であった. しかし, カフェイン及びキナ酸からは検出されなかった. また, これらの成分を混合して, ばい煎し浸出した液からは 0.8 μg/ml の H₂O₂ を検出した. 各成分の H₂O₂ 生成率はコーヒー酸が最も高かった.

H₂O₂ を比較的多く生成したショ糖, クロロゲン酸及びコーヒー酸について, ばい煎時間並びにばい煎温度が

Fig. 6. Effects of roasting time on H₂O₂ contents in infusion of roasted coffee components
Roasting temperature: 200°C

■: mixture of 6 components; △: saccharose; ●: chlorogenic acid; ○: caffeic acid

Table 6. Concentration of H₂O₂ in Infusion before and after Roasting of Various Coffee Components

Coffee components	Before roasting		After roasting	
	Content of H ₂ O ₂ (μg/ml)		Appearance	Formation rate (mg%) of H ₂ O ₂ * ²
Saccharose	ND	0.39 (*9.36)	Brown	5.85
Chlorogenic acid	ND	0.20 (4.80)	Red	3.43
Glycine	ND	0.04 (0.96)	Brown	2.29
Caffeine	ND	ND (0.00)	Colorless	0.00
Caffeic acid	ND	0.24 (5.76)	Dark purple	96.00
Quinic acid	ND	ND (0.00)	Colorless	0.00
Mixture of 6 components	ND	0.81 (19.44)	Brown	46.00
Coffee beans (2 g)	ND	0.90 (21.60)	Brown	10.80

ND<0.02 μg/ml

Average of 3 determinations

The amount of each component described in Table 4 was used.

Each component was roasted, infused and determined.

*¹ The figures in the parentheses indicate absolute amounts of H₂O₂.

*² Absolute amount of H₂O₂ in each component was divided by the amount of used component, respectively.

Fig. 7. Effects of roasting temperature on H_2O_2 contents in infusion of roasted coffee components

Roasted time: 15 min

■: mixture of 6 components; △: saccharose;
●: chlorogenic acid; ○: caffeic acid

H_2O_2 生成にどのように関与するかを検討した。

Fig. 6 に示したように、ショ糖はばい煎時間が長くなるに連れ、 H_2O_2 の生成が少なくなった。これはばい煎により、ショ糖が分解し、カラメル化する速度が早い¹⁷⁾ ことによると考えられ、実際に、外見的にも炭化が一部見られた。クロロゲン酸及びコーヒー酸の場合はばい煎時間が長くなっても H_2O_2 の生成量は一定であり、外見上の変化はショ糖に比較して焦げている度合は少なかった。混合成分の場合は、外見上各成分単独のときよりも早く焦げ炭化まで進んでいた。そのため、 H_2O_2 の生成が各成分単独の場合に比較して初期に多く、一部炭化することにより、 H_2O_2 の生成が起こらなくなったと考えられる。したがって、混合成分では、各成分が相互作用して、熱分解が成分単独の場合よりも早くなり、漸次熱分解していった炭化したと考えられ、初期の熱分解物から H_2O_2 が生成されると考えられる。

Fig. 7 に示したように、各成分からの H_2O_2 の生成は温度の影響を受け、ショ糖に比較して、クロロゲン酸及びコーヒー酸の方が大きい。又、 H_2O_2 の生成量は 225° と 250° で特に大きい。すなわち、ショ糖の分解は温度が高いほど早くなり、炭化が進み、高温のときは H_2O_2 前駆物質はすでに分解してしまったと考えられる。一方、クロロゲン酸はコーヒー酸とキナ酸との縮合物 (Fig. 1) であるため、熱により、コーヒー酸とキナ酸への分解から更に H_2O_2 前駆物質へと分解していていると考えられる。したがって、コーヒー酸は生豆に含まれているだけでなく、焙り豆及びインスタントコーヒーにも常に含まれている^{23)~25)} ことから、その熱分解物である H_2O_2 前駆物質も含まれていると考えられる。

Fig. 8. Effects of standing time on H_2O_2 content in infusion of roasted caffeic acid

Roasting temperature: 200°C; roasting time: 15 min

p-vinyl catechol

Fig. 9. Chemical structure of *p*-vinyl catechol

6.3 ばい煎したコーヒー酸からの H_2O_2 生成の経時変化

ばい煎したコーヒー酸の浸出液を保存したときの H_2O_2 生成の経時変化を検討した。

Fig. 8 に示したように、ばい煎したコーヒー酸の浸出液を放置することにより H_2O_2 は増加した。

コーヒー酸は加熱することにより脱炭酸が起こり、Fig. 9 に示したような *p*-ビニルカテコールになり、これが直ちに重合するといわれている³¹⁾。この *p*-ビニルカテコールが空気酸化してケト体になると同時に H_2O_2 が生成されたのではないかと考える。

これらのことから、コーヒー成分から H_2O_2 が生成してくることが推察される。したがって、 H_2O_2 を測定する場合は溶存酸素の影響の少ない酸素電極法②及び③で行うことにより、真の値が得られると考える。また、浸出あるいは抽出直後のコーヒーは H_2O_2 量が非常に少ないが、保存している間に、溶存酸素の影響で H_2O_2 が生成してくる。その量は食品衛生上問題はないが、溶存酸素は H_2O_2 の生成ばかりではなく、味及び香りなどの品質を劣化させるので、飲用するには入れたてのコーヒーの方が良い^{26b)}。また、保存する場合でも、溶存酸素を絶つ

た方法, すなわち, 蓋をしたり, ホットプレート上に置いたり, 窒素置換したりすることにより H_2O_2 量の増加を防ぎ, 味, 香りの変化が少ない。

ま と め

コーヒー中の H_2O_2 含量に影響を及ぼす要因について, 酸素電極法及び改良 4-アミノアンチピリン法を用いて検討し, 次のような知見が得られた。

- 1) H_2O_2 であることの確認を TLC で行った。
- 2) 酸素電極法及び改良 4-アミノアンチピリン法による定量値が同じであった。脱脂の影響はなかった。
- 3) 生コーヒー豆からは H_2O_2 を検出しなかった。コーヒー豆のばい煎度が深いほど H_2O_2 含量が増加し, 光照射, 30° , 100 日間保存した焙り豆中の H_2O_2 含量は約 $300 \mu\text{g/g}$ であった。ドリップ式コーヒーメーカーで浸出あるいは溶解したものの H_2O_2 含量は $0.6 \mu\text{g/ml}$ 以下であり, ろ過器で浸出あるいは溶解したものは約 10 倍となり, 溶存酸素によるコーヒー成分からの H_2O_2 生成が考えられる。
- 4) コーヒー豆の成分であるショ糖, クロロゲン酸, グリシン, カフェイン, コーヒー酸及びキナ酸から H_2O_2 は検出されなかった。しかし, これらの成分をコーヒー豆と同様にばい煎して浸出した液のうち, ショ糖, クロロゲン酸, グリシン及びコーヒー酸から H_2O_2 を検出した。ばい煎したコーヒー酸からの H_2O_2 の生成率が他の成分よりも高かった。コーヒー酸の熱分解物がコーヒー中の H_2O_2 生成前駆物質として一番大きく寄与するものと考えられる。

謝 辞

各国の生コーヒー豆, それらの焙り豆及びインスタントコーヒーを提供して戴いた全日本コーヒー協会に深謝いたします。

文 献

- 1) Nagao, M., Takahashi, Y., Yamanaka, H., Sugimura, T.: *Mutation Res.* **68**, 101~106 (1979).
- 2) Kosugi, A., Nagao, M., Suwa, Y., Wakabayashi, K., Sugimura, T.: *ibid.*, **116**, 179~184 (1983).
- 3) Fujita, Y., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T.: *ibid.* **142**, 145~148 (1985).
- 4) Friederich, U., Hann, D., Albertini, S., Schlatter, Ch., Wurgler, F. E.: *ibid.*, **156**, 39~52 (1985).
- 5) Aeschbacher, H. U., Ruch, E., Meier, H., Wurzner, H. P., Munoz-Box, R.: *Food Chem. Toxicol.* **23**, 747~752 (1985).
- 6) Suwa, Y., Nagao, M., Kosugi, A., Sugimura, T.: *Mutation Res.*, **102**, 383~391 (1982).
- 7) Nakasato, F., Nakayasu, M., Fujita, Y., Nagao, M., Terada, M., Sugimura, T.: *ibid.*, **141**, 109~112 (1984).
- 8) Fujita, Y., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T.: *ibid.*, **144**, 227~230 (1985).
- 9) Ariza, R. R., Dorado, G., Barbancho, M., Pueyo, C.: *ibid.*, **201**, 89~96 (1988).
- 10) Aeschbacher, H. U., Wolleb, U., Loliger, J., Spadone, J. C., Liardon, R.: *Food Chem. Toxicol.* **27**, 227~232 (1989).
- 11) Peinado, J., Toribio, F., Perez-Bendito, D.: *Anal. Chem.* **58**, 1,725~1,729 (1986).
- 12) Rinkus, S. J., Taylor, R. T.: *Food Chem. Toxicol.* **28**, 323~331 (1990).
- 13) 辻 澄子, 中村優美子, 海外泰秀, 柴田 正, 内堀伸健, 川田 誠, 小林建夫, 鈴木 宏, 室井順子, 鈴木由記子, 兼田 登, 鈴木英喜, 宮本文夫, 伊藤善志男: *日食工誌*, **37**, 111~123 (1990).
- 14) 厚生省生活衛生局監修: “食品衛生検査指針—食品中の食品添加物分析法—” p. 68~71 (1989) 日本食品衛生協会.
- 15) Toyoda, M., Ito, Y., Iwaida, M., Fujii, M.: *J. Agric. Chem.*, **30**, 346~349 (1982).
- 16) Ito, Y., Tonogai, Y., Suzuki, H., Ogawa, S., Yokoyama, T., Hashizume, T., Santo, H., Tanaka, K., Nishigaki, K., Iwaida, M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64**, 1,448~1,452 (1981).
- 17) 中林敏郎, 渡辺千賀子: *日食工誌*, **24**, 124~129 (1977).
- 18) 中林敏郎, 児島裕二郎: 同上 **27**, 108~111 (1980).
- 19) 日本化学会編: “化学便覧基礎編 II” 改訂 3 版, p. 355 (1984) 丸善.
- 20) 辻 澄子, 石田浩平, 中村優美子, 海外泰秀, 江川 宏, 伊藤善志男: *食衛誌*, **28**, 445~452 (1987).
- 21) 日本薬学会編: “衛生試験法注解” p. 187~188 (1990) 金原出版.
- 22) 山東英幸, 橋爪 崇, 横山 剛: *食衛誌*, **23**, 325~330 (1982).
- 23) Sivetz, M., Desrosier, N. W.: “Coffee Technology” p. 560~697 (1979), Avi Publ. Comp. Inc., Westport, Connecticut.
- 24) Feldman, J. R., Ryder, W. S., Kung, J. T.: *J. Agr. Food Chem.* **17**, 733~739 (1969).
- 25) Maier, H. G.: “Kaffee” p. 61 (1981) Verlag Plaul Parey, Berlin und Hamburg.
- 26) 工業技術会編: “コーヒーとお茶の現況と展望” (a) p. 90~105 (1989), (b) p. 142~163 (1989) 工業技術会.
- 27) 野村男次, 大村浩久: “レダクトンの化学” p. 307~337 (1969) 内田老鶴圃新社.
- 28) Cilliers, J. J. L., Singleton, V. L.: *J. Agric. Food Chem.* **37**, 890~896 (1989).
- 29) Hanham, A. F., Dunn, B. P., Stich, H. F.: *Mutation Res.* **116**, 333~339 (1983).
- 30) 中林敏郎, 鈴木邦男: *日食工誌*, **33**, 779~782 (1986).
- 31) 中林敏郎: “世界のコーヒー生産国” 全日本コーヒー協会編, p. 219 (1985).