報 文

食 品 中 の リ ン 酸 塩 の 定 量 法

(昭和 48 年 11 月 14 日受理)

外 海 泰 秀* 田 中 清 子*

On the Determination of Phosphates in Foods

Yasuhide TONOGAI and Kiyoko TANAKA

(National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch: 6, Hoenzaka-cho,
Higashi-ku, Osaka)

To establish the determination methods of phosphates in foods, the following methods were examined, being followed with satisfactory results. Polyphosphates contained in foods could be separated qualitatively by thin-layer chromatography using Avicel-SF cellulose powder as adsorbent and a mixture of 0.5% pyridine-acetone solution and 20% trichloroacetic acid solution as the developing solvent. The quantity of phosphates was determined indirectly by determining the amount of molybdenum by atomic absorption spectrophotometry, after the formation of complex between phosphate and molybdate. Ion-exchange column chromatographic technique was applied for the separation of various kinds of polyphosphates contained in soft drink. These methods were applied to various kinds of foods, and from our results it was found that polyphosphates were present only in pressed ham, sausage and soft drink, and the amount of phosphates added to foods was found to be not so much.

(Received November 14, 1973)

ま え が き

リン酸塩、縮合リン酸塩が広範囲の食品に品質改良などの目的で使用されているが、カルシウム塩を除いてはその使用基準が定められておらず¹⁾、食品中のリン酸塩の簡便な定量法も見当たらない。

リン酸の過度の摂取はミネラルの平衡を乱し、人体に害を及ぼすことが考えられるので、食品中のリン酸塩の薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略記) による定性法および原子吸光法による定量法を開発して、その添加状況を調べるとともに、清涼飲料水については添加された種々の縮合リン酸塩の分別定量法を検討した。

実 験 方 法

1. 試薬および装置

1-1. 試薬 正リン酸塩標準溶液: リン酸一ナトリウム ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 特級) 1.691 g を水に溶かして

1000 ml とした (P_2O_5 濃度: 1000 ppm)。

縮合リン酸塩標準溶液: ジおよびトリポリリン酸塩は市販品から、テトラ以上のポリリン酸塩は、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} : \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = 5 : 4$ (モル比) の混合物を加熱脱水縮合して得た縮合リン酸塩から、それぞれイオン交換カラムクロマトグラフィー²⁾ により分離精製した (Fig. 1)。

アンモニア緩衝液: 0.01 M アンモニア水と 0.01 M 塩化アンモニウム溶液とを混合して pH 9.3 に調整した。

塩化カリウム・アンモニア緩衝液: アンモニア緩衝液に各種濃度になるように塩化カリウムを溶かした。

モリブデン試薬: モリブデン酸アンモニウム 1 g, 70% 過塩素酸 5 ml, および 12 M 塩酸 1 ml に水を加えて 100 ml とした。

還元試薬: 塩化第一スズ 1 g を 10% 塩酸 100 ml に溶

* 国立衛生試験所大阪支所: 大阪市東区法円坂町 6

Fig. 1. Elution curve of polyphosphates by ion-exchange chromatography: Resin, Dowex 1×4 (100~200 mesh), Cl⁻ form; eluent, KCl solution, pH 9.3; flow rate, 40 ml/hr; sample, a mixture of polyphosphates prepared by heat condensation of monobasic sodium phosphate and 12 hydrate of dibasic sodium phosphate.

かした。

TLC 用セルロースパウダー: Macherey, Nagel & Co. 製“セルロースパウダー MN 300” (以下 MN 300 と略記) および旭化成 (株) 製微結晶セルロース“アビセル SF” (以下アビセルと略記) を使用した。

陰イオン交換樹脂: Dowex 1×4 (100~200 mesh), Dow Chemicals 社製

活性炭: Merck 社製

なお、試薬はすべて特級品を用い、水は蒸留水を使用した。

1-2. 装置 原子吸光分析装置: Nippon Jarrell Ash 製 AA-1 型

pH メータ: Beckmann Zeromatic SS-3

2. TLC による定性分析

吸着剤としてアビセル SF を 250 μ の厚さに塗布し、60~80°で30分間乾燥したプレートを用い、展開溶媒としては、0.5%ピリジン・アセトン溶液、水、およびトリクロル酢酸をそれぞれ 70, 25 ml, および 5 g の割合に混合した溶媒を用い、ホモジナイズした試料の水抽出液を検液として展開を行った。検出はモリブデン試薬をプレートに噴霧し、80~90°で5分間加熱した後、さらに還元試薬を噴霧して青色に発色させる方法による。

3. 原子吸光法による定量分析

試料 1 g を過塩素酸と硝酸で灰化して種々のリン酸化合物をすべて正リン酸に変え、リン酸含量が 1~2 ppm (P_2O_5 として) となるよう希釈したものを検液とした。検液 5~10 ml を分液漏斗に取り、5 N 過塩素酸溶液 5 ml, 5% モリブデン酸アンモニウム溶液 2.5 ml, および

Table 1. Operating Conditions for the Determination of Phosphate by Atomic Absorption Spectrophotometry

Light source	Mo hollow cathode lamp
Wavelength	313.4 nm
Lamp current	20 mA
Burner type	Slot burner
Flow rate	N ₂ O: 6 L/min C ₂ H ₂ : 4 L/min

水を加えて 25 ml とし、これに酢酸 *n*-ブチル 10 ml を加えて振り混ぜ、有機層に移行したリンモリブデン酸錯体のモリブデン量を原子吸光法で測定することにより間接的に試料中のリン含量を求め、すべて P_2O_5 として表した。原子吸光法の測定条件は Table 1 に示したとおりである。

4. 清涼飲料水中の縮合リン酸塩の分別定量法

清涼飲料水 (無果汁で炭酸を含むもの) 100~200 ml を少量の活性炭で脱色後、0.1 M アンモニア水で pH 9.3 に調整し、試料溶液とした。アンモニア緩衝液で調整した Dowex 1×4 カラム (1.15×60 cm) に上記の試料溶液を流して、各種リン酸イオンを吸着させた後、アンモニア緩衝液 50 ml 次いで 0.2 M 塩化カリウム・アンモニア緩衝液 50 ml で洗浄した。続いて塩化カリウムの濃度を 0.2 から 0.35 M まで段階的に変え流速 40 ml/hr で溶出²⁾を行って、モノ、ジ、トリポリリン酸の順に溶出させ、さらに 2 M 塩化カリウム・アンモニア緩衝液

Table 2. Solvent System for Thin-Layer Chromatography

Solvent		Solvent system				
		A	B	C	D	E
Methanol	(ml)	60	75			180
Dioxane	(ml)	30		70		60
Isopropanol	(ml)					35
Isopropanol soln. ^{a)}	(ml)	30	20			
Acetic acid (100%)	(ml)					4
Acetic acid soln. (20%)	(ml)	8	6			
Trichloroacetic acid (TCA)	(g)				5	
TCA soln. I ^{b)}	(ml)	40	25			
TCA soln. II ^{c)}	(ml)			30		
TCA soln. III ^{d)}	(ml)					32
Pyridine—acetone soln. ^{e)}	(ml)				70	
Water	(ml)				25	21

^{a)} 700 ml of isopropanol plus 100 ml of water

^{b)} 125 g of TCA plus 32 ml of 28% ammonia water, filled up with water to 1 L

^{c)} 160 g of TCA plus 8 ml of 28% ammonia water, filled up with water to 1 L

^{d)} 375 g of TCA plus 96 ml of 28% ammonia water, filled up with water to 1 L

^{e)} 199 ml of acetone plus 1 ml of pyridine

Fig. 2. Thin-layer chromatogram of various phosphates in foods: Adsorbent, Avicel-SF (cellulose powder); developing solvent, a mixture of 70 ml of 0.5% pyridine/acetone and 25 ml of 20% trichloroacetic acid; Std, standard; 1, pressed ham; 2, sausage; 3, soft drink; 4, cheese; 5, "Kamaboko" (fish-paste product); 6, noodle.

50 ml, 次いで 6 N 塩酸 50 ml で残存する高次のポリリン酸塩を溶出させた。各溶出分画を TLC で定性した後、モノ、ジ、トリ、およびテトラポリリン酸以上の分画として集め、それぞれ 3. の方法で定量を行った。

実験結果と考察

1. TLC による定性分析

1-1. 展開条件の検討

吸着剤と展開溶媒との組み合わせを検討した^{3)~5)}。吸

Fig. 3. Effect of perchloric acid on the extraction of phosphate and arsenate

着剤としては MN 300 とアビセルとの 2 種類について、展開溶媒は Table 2 の 5 種類について、それぞれ検討した。溶媒 A、E では、ジ、トリポリリン酸以上の分離が不可能であった。溶媒 C は、テトラ以上の高次のポリリン酸の分離がよく、発色の際の色調がすべてのポリリン酸について同じで好ましいが、展開に長時間を要することと非常に退色しやすいという欠点があった。また、どの溶媒の場合も MN 300 の方がテーリングを起こしやすい傾向にあった。アビセルと溶媒 B、D、および

Fig. 4. Calibration curve of phosphate by atomic absorption spectrophotometry

MN 300 と溶媒Bの組み合わせではテトラ以上の分離はやや困難であるが、トリまでは完全に分離でき、そのうち呈色度、展開時間の点からアビスセルと溶媒Dとの組み合わせが最も適当と思われた。しかし、ジ以上のポリリン酸では重合度の違いにより発色の際、青色の色調が異

なった。この原因はポリリン酸の加水分解が完全に行われていないためと考えられ、薄層プレート上でのデンシトメトリーを定量に応用することは不適当と考えられた。

1-2. 食品への応用

TLC 用の検液作製のため、食品中のリン酸の抽出法として水抽出と10%トリクロル酢酸抽出とを比較検討したところ、加水分解の危険性の高いトリクロル酢酸による除タンパクを行わなくても水抽出で十分リン酸が抽出されることが分かった。実験方法2.の方法で数種の食品について TLC を試みた結果を Fig. 2 に示す。食肉製品であるプレスハム、ソーセージと清涼飲料水の一部にポリリン酸塩の添加が認められた他は、ほとんどの場合正リン酸の位置にのみスポットが検出された。また、食品原料の場合は正リン酸の位置にのみスポットが認められた。

2. 原子吸光法による定量分析

前述したように食品中のリン酸塩は正リン酸塩がほとんどであり、ポリリン酸塩が添加されても食品加工の過程や保存中により低次のリン酸塩に加水分解されることが考えられるので、食品中のリン酸塩の含量を求めるには、正リン酸として定量する方法でよいと考えられる。

Table 3. Recovery of Phosphate Added to Various Foods

Food (1 g)	Content (mg)	Recovery ^{a)}		
		Added ^{b)} (mg)	Recovered (mg)	%
Margarine	0.21	1.00	0.98	98.0
Noodle	0.90	1.00	1.00	100.0
"Kamaboko"	2.72	1.00	1.05	105.0
Bean paste	4.40	5.00	5.04	100.7
Pressed ham	4.96	5.00	4.62	92.4
Cheese	23.2	5.00	4.80	96.0

^{a)} Mean value of ten trials

^{b)} Sodium monophosphate solution was used

Table 4. Distribution of Phosphates in Processed Foods

Food	Content ^{a)} (mg/g)	Food	Content ^{a)} (mg/g)
Soft drink	0.40	Soy sauce	3.52
Ketchup	0.94	Pressed ham	4.65
"Chikuwa" ^{b)}	1.10	Cracker	4.80
Bean curd	1.60	Sausage	5.50
Mayonnaise	2.40	Frozen bean curd	18.50
Bread	2.86	Parmesan cheese	23.20

^{a)} Mean value of three trials

^{b)} A kind of fish-paste product

従来の比色法^{9)~11)}は共存物質の影響が大きく、分析操作も複雑なので、より簡便かつ正確な原子吸光法によるリン酸の間接定量法^{10), 11)}を検討した。

2-1. リンモリブデン酸錯体抽出時の酸性度の影響

リンモリブデン酸錯体抽出時の過塩素酸濃度の影響を検討した結果、Fig. 3 に示すように抽出率は 0.25~1.75 N の範囲でほぼ一定となり、灰化時に過塩素酸濃度が試料により多少異なっても抽出率に影響のないことが分かった。よって抽出時の過塩素酸濃度は 1 N とした。その時の抽出率の変動係数は 1.3% であった。また、リンと同様にモリブデンとヘテロポリリン酸を形成し、リンの測定に妨害を与える主な金属としてヒ素が考えられるが、リン酸の場合と同様の抽出法を用いて測定したヒ素は、Fig. 3 に示すように抽出率が低く、約 50 倍までのヒ素が共存してもリン酸の測定にはほとんど妨害を与えないことが分かった。

2-2. 検量線および添加回収

0~1 ppm の範囲のリン酸塩の標準系列について、実験方法 3. の原子吸光法で測定した検量線は Fig. 4 に示すように、 P_2O_5 として 1 ppm まで良好な直線性を示した。また、種々の食品 1 g にリン酸 1 ないし 5 mg (P_2O_5 として) を添加してその回収率を検討したところ、Table 3 に示すようにいずれの場合についても回収率はほぼ定量的であり、食品中の種々の共存物質の影響はほとんど認められなかった。

2-3. 食品中のリン酸塩含量

実験方法 3. の方法で代表的な食品中のリン酸塩含量を測定し Table 4 に示した。ただし、これらの試料は乾燥させずに採取したため、測定値には水分含量を考慮する必要がある。次に、添加物としてのリン酸塩含量を知るために食品原料中の天然由来のリン酸を測定した結果は Table 5 に示すとおりであり、Table 4 に示した食品の場合と同程度に多量含まれていた。このことから、現在のところ人体に害を及ぼすほど多量のリン酸塩は添加されていないことが分かった。しかし、添加量が少量であるため、天然由来のリン酸塩の平均値を差し引くことは困難なので、添加量を知りたいときは、添加直前の個々の原料中のリン酸量を空試験値とする必要がある。ただし、天然果汁の含まれていない清涼飲料水中のリン酸塩はすべて添加されたものと考えられるので、次にその分別定量法を検討した。

3. 清涼飲料水中の縮合リン酸塩の分別定量の検討

3-1. 共存物質の除去

無果汁の清涼飲料水中の添加物は砂糖、酸味料、香料、着色料などで、そのうちの大部分は樹脂にほとんど吸着されないの、カラム通過中に容易に除去できるが、着色料は強く吸着され、リン酸の樹脂からの溶出率を 70% とかなり低下させた。そのため、着色料が使用されている試料については、前操作として少量の活性炭で脱色した。なお活性炭処理によるリン酸の損失は無視できる程度であった。

Table 5. Distribution of Phosphates in Natural Foods

Food	Content ^{a)} (mg/g)	Food	Content ^{a)} (mg/g)
Wheat flour	1.68	Beef	4.10
Polished rice	2.48	Pork	4.30
Unpolished rice	6.50	Fish meat	12.70
"Azuki" bean	9.50	Egg yolk	13.30
Soybean	11.90	Sesame seed	13.60

^{a)} Mean value of three trials

Table 6. Recovery of Polyphosphates by Ion-exchange Chromatography

Phosphates	Added (mg)	Eluted (mg)		
		Mono-	Di-	Tri-
Monophosphate	33.6	33.5 (99.6)*	—	—
Diphosphate	31.5	0.5 (1.5)*	31.8 (101)*	—
Triphosphate	32.1	1.5 (4.7)*	0.8 (2.3)*	30.0 (93.0)*

* Percentage of recovery

Table 7. Determination of Polyphosphates in Soft Drinks

Sample	Content of total phosphate (ppm)	Composition of phosphates ^{a)} (%)			
		Mono-	Di-	Tri-	Poly- ^{b)}
A	380	100	—	—	—
B	390	100	—	—	—
C	430	100	—	—	—
D	320	4.6	8.2	4.1	83.1
E	160	33.6	29.4	30.6	6.2

^{a)} Mean value of three trials^{b)} Total of polyphosphates containing more than three phosphorus atoms

3-2. イオン交換樹脂カラムによるポリリン酸塩の分離定量

pH 9.3 に調整した試料を、あらかじめ pH 9.3 に緩衝化した樹脂をつめたカラムに流すことにより、試料中の全リン酸塩が完全に吸着され、回収率も 95~103% と良好な結果が得られた。また、分離溶出パターンも Fig. 1 に示したポリリン酸塩の標準溶液のときより全体的にやや早く溶出するが、著しい相違はなかった。次に、カラムクロマトグラフィーの展開中のポリリン酸塩の加水分解を調べるため、モノ、ジ、トリの各リン酸標準溶液を用いて実験方法 4. の方法でイオン交換クロマトグラフィーを行った結果を Table 6 に示す。ジは 1.5%、トリは 7% がカラムを通過中に加水分解されることが分かったので、次の項 3-3 での各リン酸塩の定量値には若干の加水分解を考慮に入れる必要がある (Table 7)。

3-3. 応 用 例

市販の清涼飲料水数種について、実験方法 4. を用いて分別定量した結果を Table 7 に示す。コーラ類には正リン酸のみが添加されており、オレンジ類には少量の正リン酸しか添加されていなかった。ポリリン酸が添加されていたのはグレープ類だけであり、ポリリン酸の添加がグレープの風味を出すのに何らかの効果があるのではないかと思われた。

要 約

1) 食品中のリン酸塩を TLC により定性した結果、食肉製品および清涼飲料水の一部にポリリン酸塩の添加が認められた他は、大部分は正リン酸のみが検出された。

2) 簡便かつ正確な原子吸光法による定量法を検討

し、食品および食品原料中のリン酸含量を測定した結果、両者の間には著しい差が認められなかった。

3) イオン交換カラムクロマトグラフィーを利用して清涼飲料水に添加されたポリリン酸塩の分別定量法を検討し、良好な成績が得られた。

稿を終えるに当たり、種々御指導いただいた当支所食品部長慶田雅洋氏および同所前食品部長野村幸雄氏に感謝します。なお、本研究は昭和47年度国立衛生試験所特別研究（食品に関係ある諸物質の安全性に関する研究）の一部であることをここに付記する。

文 献

- 食品添加物公定書注解編集委員会編：“第二版食品添加物公定書注解” p. 959 (1968) 金原出版。
- Ohashi, S., Tsuji, N., Ueno, Y., Takeshita, M., Muto, M.: J. Chromatog., 50, 349 (1970).
- Rössel, T.: Z. Anal. Chem., 197, 333 (1963).
- Wyler, O. D.: Fleischwirtschaft, 52, 175 (1972).
- Neraal, R., Hämm, R.: *ibid.*, 52, 1171 (1972).
- 石井大道, 武内次夫: 分析化学, 10, 1391 (1961).
- 前川静弥, 加藤清敏: 同上, 17, 597 (1968).
- Boltz, D. F. 編: “Colorimetric Determination of Nonmetals”, Interscience Publishers, (1958) Chap. II.
- 大橋 茂編: “無機化学全書 IV-6 リン” p. 32 (1965) 丸善。
- 石橋雅義, 田伏正之: 分析化学, 8, 588 (1959).
- Kumamaru, T., Otani, T., Yamamoto, Y.: Bull. Chem. Soc. Japan, 40, 429 (1967).