

高速液体クロマトグラフィーによるポリリン酸塩の分析法——清涼飲料水への適用

松永明信,^a 山本 敦,^a 水上英一,^a 早川和一,^b 宮崎元一^b
富山県衛生研究所,^a 金沢大学薬学部^b

Determination of Polyphosphates by High-Performance Liquid Chromatography—Application to Soft Drinks

AKINOBU MATSUNAGA,^a ATSUSHI YAMAMOTO,^a EIICHI MIZUKAMI,^a
KAZUICHI HAYAKAWA^b and MOTOICHI MIYAZAKI^b
*Toyama Institute of Health,^a 17-1 Nakataikoyama, Kosugi-machi,
Toyama 939-03, Japan and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Kanazawa University,^b 13-1 Takaramachi,
Kanazawa 920, Japan*

(Received August 12, 1987)

A high-performance liquid chromatographic method using post column reaction system was established for the determination of polyphosphates (PP). Linear polyphosphates with the range of polymerization from 2 to 9 (P2—P9) could be separated on an anion exchange column, TSK GEL DEAE-5PW (Toyo Soda), with 0.01 M HNO₃ containing NaNO₃ as a mobile phase at flow rate of 1.0 ml/min, with a linear gradient in NaNO₃ concentration at one hour intervals. PP were detected as the decrease of absorbance at 500 nm of ferric-sulfosalicylate complex by means of an on-line post column reaction at room temperature, with 0.5 mM FeCl₃ containing 2.5 mM sulfosalicylic acid as reaction reagent at flow rate of 0.5 ml/min.

The proposed method was applied to the analysis of 30 different commercial products of soft drinks. The pretreatment only necessary after mixing the sample with an equal volume of 0.01 M HNO₃ was filtration through 0.45 μm pore size filter. P2—P6 (total 0.231 g/kg) and P2—P4 (0.070 g/kg) were found from 2 kinds of the samples, respectively. The determination limit was 0.02 mol/kg for all of the PP.

Keywords—HPLC; post column reaction method; determination; linear polyphosphate; pyrophosphate; tripolyphosphate; tetrapolyphosphate; soft drink

緒 言

食品添加物のポリリン酸塩 (PP) は、清涼飲料水、かまぼこ、ちくわ、ハム、ソーセージなどの水産練り製品、畜肉加工品、チーズなど広範囲な食品に、ビタミンCの安定化、変色防止、沈殿防止や肉類の結着力増大、保水性の増加、老化防止などの目的で使用されている。¹⁾ 食品中の PP 分析法としては、トリクロル酢酸溶液で抽出し、薄層クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーで分離した後、高濃度の酸でオルトリン酸 (P1) に分解してモリブデン酸と錯体を生成させて比色定量、^{2,3)} あるいは原子吸光法で測定する方法^{4,5)} などが

ある。しかしこれらの方法は操作が繁雑であり、かつ長時間を要するなどの難点があるため、現在まで食品中の PP の調査はほとんど行われていない。

近年、PP の迅速分析法として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用い、ポストカラム法でモリブデン酸錯体を生成させる方法⁶⁾ や原子発光分析計と組み合わせた方法⁷⁾ あるいは等速電気泳動法⁸⁾ などが報告されている。しかし、これらの方法には高濃度の酸に耐えられる装置あるいは高価で特殊な装置が必要であり、食品の分析に利用された例もみられない。そこで著者らは、日常的な食品の検査業務に適する PP の簡便な分析法の開

発を試み、リン酸エステルの錯体生成能⁹⁻¹¹⁾に着目し、PPをP1に分解することなく、ポストカラム法で鉄・スルホサリチル酸錯体と反応させてPPの配位子置換反応に基づく吸光度の減少を測定する方法を検討した。その結果、PP(縮合度2-9:P2-P9)を分析する新しいHPLC法を確立し、清涼飲料水に適用したところ、良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料 市販の清涼飲料水を用いた。

2. 試薬 1) ポリリン酸塩標準物質——ピロリン酸ナトリウム十水和物は和光純薬工業社の特級品、トリポリリン酸ナトリウム六水和物(純度98%)、テトラポリリン酸アンモニウム六水和物(純度95%)、トリメタリン酸ナトリウム(純度98%)はSigma社の製品を用いた。

2) ポリリン酸塩混合物——ガラス状リン酸ナトリウム(平均縮合度5)はSigma社、テトラポリリン酸ナトリウムは半井化学薬品社の製品を用いた。

その他の試薬は特級品を用いた。

3. 装置 HPLC装置の構成図をFig. 1に示した。島津LC-4A型ポンプ(移動相用)、同LC-6A型ポンプ用高感度フィルタユニット(ダンパー)、抵抗管(0.1mm i.d.×2m)、同SPD-6AV型UV-VIS検出器、同C-R3A型データ処理装置、レオダイン7125型インジェクター、東洋曹達CCPD型ポンプ(反応液用)、ダンパー、抵抗管(0.1mm i.d.×5m)、島津LC-6A用ミキシングブロック(ミキサー;内容積0.5ml)及び反応コイル(0.5mm i.d.×2m)を用いた。分光光度計:島津UV-160型。

4. HPLCの測定条件 カラム:TSK GEL DEAE-5PW(7.5mm i.d.×75mm,東洋曹達)。ガードカラム:TSK guardgel DEAE-5PW(6mm i.d.×10mm,東洋曹達)。移動相1:0.01M硝酸。移動相2:0.01M硝酸-0.2M硝酸ナトリウム。移動相の硝酸ナトリウム濃度のグラジエント条件:分析開始後の25分間で0.02Mから0.15Mまで濃度を直線的に増加させ、次の5分間は0.15Mに維持し、更に5分間で0.15Mから0.02Mに減少させ、0.02Mに25分間維持してカラムを再平衡化させた。移動相の流量:1.0ml/分。反応液:0.5mM塩化第二鉄-2.5mMスルホサリチル酸。反応液の流量:0.5ml/分。カラム及び反応温度:室温。検出波長:500nm。試験溶液の注入量:50μl。

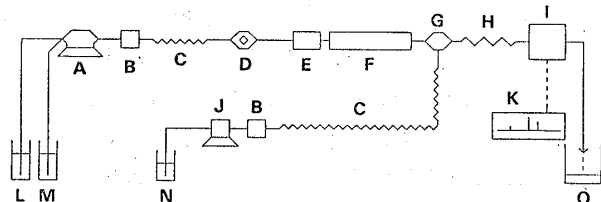


Fig. 1. Schematic Diagram of HPLC Using Post Column Reaction Method

A: main pump, B: damper, C: precoil, D: sample injector, E: guard column, F: column, G: mixer, H: reaction coil, I: UV/VIS detector, J: reagent pump, K: recorder, L: mobile phase 1, M: mobile phase 2, N: reaction reagent, O: waste.

リウム濃度のグラジエント条件:分析開始後の25分間で0.02Mから0.15Mまで濃度を直線的に増加させ、次の5分間は0.15Mに維持し、更に5分間で0.15Mから0.02Mに減少させ、0.02Mに25分間維持してカラムを再平衡化させた。移動相の流量:1.0ml/分。反応液:0.5mM塩化第二鉄-2.5mMスルホサリチル酸。反応液の流量:0.5ml/分。カラム及び反応温度:室温。検出波長:500nm。試験溶液の注入量:50μl。

結果と考察

1. 分離カラムの検討

分離カラムにはポーラスポリマのステレン・ジビニルベンゼン共重合体を基材にした陰イオン交換体(MCI GEL SCA-01,三菱化成工業),親水性シリカゲルを基材としたもの(TSK GEL IC-Anion-SW,東洋曹達)及び親水性ポリマゲルを基材としたもの(TSK GEL IC-Anion-PW)を用い、移動相の濃度グラジエント法でPP(P2-P9)の分離を検討した。このうち親水性ポリマゲルを基材とした陰イオン交換体を用いた場合だけ、テーリングやリーディング現象がみられず、縮合度(DP)の大きいPPの分離も可能であった。更に親水性ポリマゲルの陰イオン交換体として、ポリアクリレートゲルを基材とするTSK GEL IC-Anion-PW,TSK GEL DEAE-5PW,Shim-pack IC-A1(島津)及び親水性ビニルポリマを基材とするProtein Pak G-DEAE,Protein Pak G-QA(Waters)について比較した。いずれのカラムを用いてもP2-P9の分離は可能であったが、TSK GEL DEAE-5PWを使用したときの分離度は他のいずれのカラムより良かったので、以後の実験には本カラムを用いることにした。

2. 移動相の検討

反応液の鉄・スルホサリチル酸錯体とPPとの反応の至適pHは1.5-2.5であるので⁹⁾移動相のpH調整には酸を用いた。酸としては硝酸、塩酸、硫酸及び過塩素酸などの利用が可能であるが、装置の耐久性を考慮して0.01M硝酸を用い、イオン強度は硝酸ナトリウムを加えて調整した。このpH範囲では、PPイオンの価数はDPと一致しており、DPが大きくなるにつれてカラムから溶出され難くなると考えられる。そこでPPの溶出時間と移動相の硝酸ナトリウム濃度との関係を調べFig. 2に示した。なおP5-P9標準物質は入手できなかったため、Sigma社の平均DP5の製品を用いてピークを推定し、それぞれの溶出時間とした。

低濃度の硝酸ナトリウムではDPの小さいPPは容易に分離溶出されるがDPの大きなPPはカラムに対する保持が強く溶出されず、逆に高濃度ではDPの小

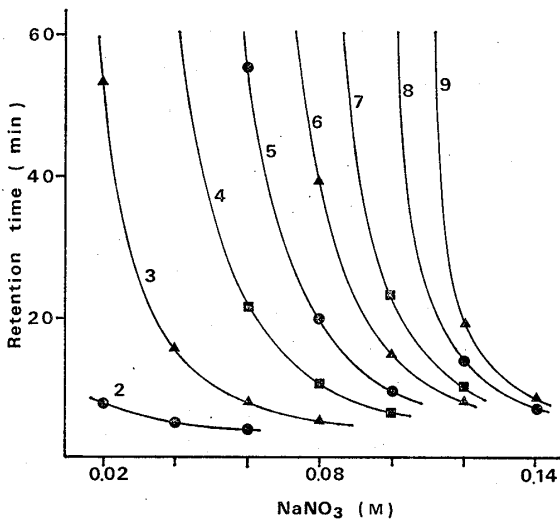


Fig. 2. Effect of NaNO_3 Concentration in Mobile Phase on the Retention Time of Polyphosphates

Numbers by the curve in the figure indicate degrees of polymerization of linear polyphosphate. Operating conditions of HPLC: mobile phase; 0.01 M HNO_3 containing various concentration of NaNO_3 , others were same as described in Fig. 3.

さいものはカラムに保持されずに素通りして分離されなかった。また硝酸ナトリウム濃度のわずかな変化で各 PP の溶出時間は大きく変化するため、アイソクラティックな条件で P2—P9 を再現性良く一斉分析することは困難であった。そこで硝酸ナトリウムの濃度グラジェント条件を実験条件 4 に示すように設定して PP の分離を行った。Fig. 3 はこの条件を用いたときの PP 混合物（半井化学薬品のテトラポリリン酸ナトリウム）のクロマトグラム例であり、P2 から P9 まで良好に分離された。Sigma 社の平均 DP5 の製品もほぼ同様なクロマトグラムを示した。なお以後の実験では、PP 混合物は半井化学薬品のテトラポリリン酸ナトリウムを用いることにした。

本法の移動相は硝酸酸性溶液であるが、PP 溶液は酸性条件下で不安定であるとの報告がある。⁹⁾ そこで P2, P3 及び P4 を 0.01 M 硝酸に溶解し、室温に 1 時間放置してその分解を測定したがいずれの PP の分解も 0.5 % 以下であり、分析中の分解は無視できると考えた。

3. 反応条件の検討

Wade らは、⁹⁾ 鉄・スルホサリチル酸錯体試薬は可視部に吸収極大を有し、PP や核酸系化合物などのリン酸エステルと室温ですみやかに反応して吸光度が減少することをみだし、ペーパークロマトグラフィーの検出試薬として用いた。またこの鉄・スルホサリチル酸錯体は、フィチン酸の比色定量法¹⁰⁾ やポストカラム反応法

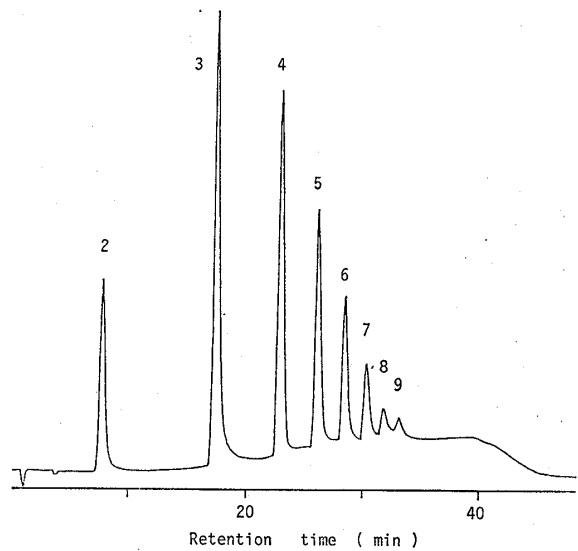


Fig. 3. Typical Chromatogram of Polyphosphates

Numbers by the peak in the figure indicate degrees of polymerization of linear polyphosphate.

Operating conditions of HPLC: column; TSK GEL DEAE-5PW (7.5 mm i.d. \times 75 mm; Toyo Soda), guard column; TSK guardgel DEAE-5PW (6.0 mm i.d. \times 10 mm), mobile phase A; 0.01 M HNO_3 , mobile phase B; 0.01 M HNO_3 -0.2 M NaNO_3 , linear gradient profile of NaNO_3 concentration in mobile phase; segment 1=0.02 to 0.15 M over 25 min, segment 2=hold on 5 min, segment 3=0.15 to 0.02 M over 5 min, segment 4=hold on 25 min for reequilibration, flow rate of mobile phase; 1.0 ml/min, reaction reagent; 0.5 mM FeCl_3 -2.5 mM sulfosalicylic acid, flow rate of reagent; 0.5 ml/min, column and reaction temperature; ambient, detection wavelength; 500 nm, injection volume; 50 μ l.

の試薬¹¹⁾ としても用いられている。本研究ではこれを PP のポストカラム反応試薬に利用することを試みた。まず反応液の至適濃度条件を検討するために、反応液 1 ml と 0.01 M 硝酸に溶解した 2 ml の 0.05 mM PP を混合してその溶液の吸収極大の 500 nm における吸光度の減少を測定した。反応液の鉄濃度を 0.5 mM に定め、スルホサリチル酸 (SS) 濃度を変え (0.5—20 mM), PP と反応させたときの吸光度の減少を Fig. 4 に示した。なおいずれの場合も吸光度の減少が平衡になる 0.5 分後の値である。また P1 やトリメタリン酸はほとんど吸光度の減少を示さなかった。P2 は 1 mM, P3 は 1—2.5 mM, P4 は 2.5—5 mM SS の場合に吸光度の変化が最大になった。そこで至適 SS 濃度は 2.5 mM に定めた (鉄の 5 倍)。次に SS と鉄の濃度比を 5 に定め、反応液濃度を変え (鉄濃度 0.2—2 mM), P2—P4 との反応を調べた。いずれの PP も、反応液濃度に関係なく、吸光度の変化は 2.5 mM SS-0.5 mM 鉄の場合と一致した。

以上の原理に基づくポストカラム反応を行う場合、分離カラム用移動相は無色であり、反応液は吸収をもつため、混合割合の変化がベースラインのノイズとして現れ

TABLE I. Reproducibility of Retention Time and Analytical Value of Polyphosphates

		P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Retention time (min)	Min.	7.73	17.47	23.11	26.35	28.72	30.62	32.17	33.46
	Max.	7.77	17.56	23.20	26.45	28.83	30.73	32.31	33.58
	Mean	7.75	17.51	23.15	26.40	28.78	30.68	32.25	33.52
	C.V. (%)	0.20	0.16	0.13	0.13	0.13	0.14	0.15	0.13
Analytical value (mm)	Min.	0.119	0.261	0.179	0.118	0.078	0.044	0.019	0.011
	Max.	0.126	0.275	0.195	0.124	0.084	0.049	0.022	0.013
	Mean	0.123	0.269	0.187	0.122	0.081	0.047	0.020	0.011
	C.V. (%)	2.1	1.6	2.5	1.6	2.3	3.6	5.6	6.9

PP mixture (0.5 g/l) was injected.

Mean of seven determinations.

Operating conditions of HPLC were same as described in Fig. 3.

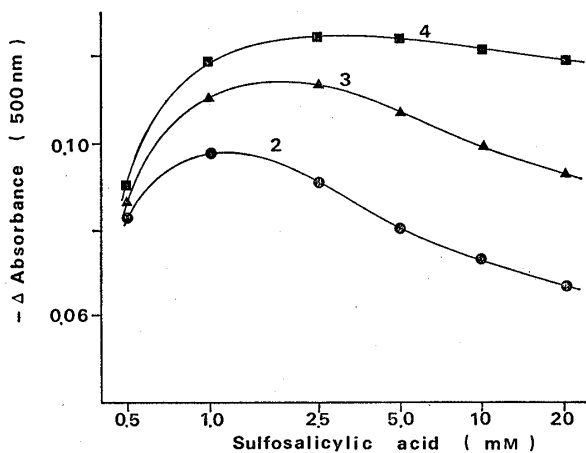


Fig. 4. Effect of Sulfosalicylic Acid Concentration in Reaction Reagent on the Formation of Ferric-Polyphosphate Complex

One milliliter of reaction reagent and 2 ml of 0.05 mM polyphosphate in 0.01 M HNO₃ were mixed and absorbance of the mixture was measured at 500 nm.

Reaction reagent; 0.5 mM FeCl₃ containing various concentration of sulfosalicylic acid.

る。ノイズを小さくして検出感度を向上させるためには、反応液濃度を低くすることが必要である。しかし濃度が低すぎると反応の定量範囲が小さくなる。これらのことを考慮して、反応液の鉄及び SS 濃度を 0.5 mM 及び 2.5 mM に定めた。

またノイズを小さくするために、移動相用ポンプと反応液用ポンプの脈流を小さくすることも必要であり、両ポンプに高感度ダンパーと抵抗管を接続した。更に移動相と反応液の混合を十分に行うため、ミキサー（内容積 0.5 ml）も接続した。移動相及び反応液の流速はそれぞれ 1 ml/分及び 0.5 ml/分に定めたので、両者の混合後 0.5 分に吸光度を測定するために、ミキサーと反応コイルの内容積の和が 0.75 ml になるように、反応コイルは

0.5 mm i.d. × 2 m のものを用いた。検出波長は 500 nm を選び、検出器の電極を逆にしてデータ処理装置に接続した。

4. 分析の再現性

実験方法 3 及び 4 に記した条件で、1 時間毎に PP 混合物 (0.5 g/l) を 7 回繰り返し測定し、PP の溶出時間及び定量値を Table I に示した。溶出時間の変動係数はいずれの PP も 0.2% 以下であった。また定量値の変動係数は、DP 6 以下のものは 3% 以下であったが、DP 7 以上では 3.6–6.9% と増加した。これは DP 7 以上の定量値が DP 6 以下に比較して小さかったためと考えられる。

5. 検量線

P2, P3, P4 標準物質の水溶液 (2 mM) を調製し、0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mM に希釈し、50 μl 注入して得られたクロマトグラムから絶対検量線法で検量線を作成した。ピーク面積から作成した検量線は、いずれも 0.01–1 mM の範囲で良好な直線性を示した。モル当たりの吸光度変化は P2 < P3 < P4 の順に大きくなり、P3 及び P4 のそれは P2 の 1.3 倍及び 1.4 倍であった。そこで P5 以上については P4 の値を適用した。

6. 清涼飲料水への適用

市販の清涼飲料水を等量の 0.01 M 硝酸と混合してポアサイズが 0.45 μm のフィルターでろ過した後、その 50 μl を用いて HPLC で PP を測定した。あらかじめ PP を含まないことを確認した果汁飲料（オレンジ）及び炭酸飲料（コーラとクリームソーダ）に等量の 0.2 mM P2, P3 及び P4 (0.01 M 硝酸溶液として) を混合し、回収実験を行ったところ、三者の P2, P3 及び P4 の回収率は 99.1–101.2%, 98.1–100.8%, 94.0–98.3% であった。また妨害成分のピークは分離カラムに保持

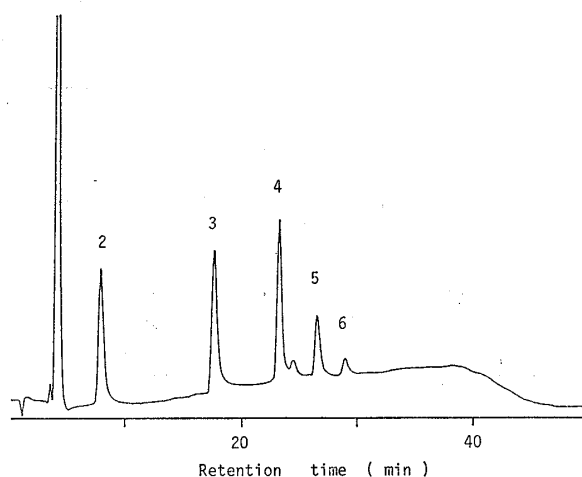


Fig. 5. Chromatogram of Polyphosphates in a Soft Drink Sample

Operating conditions of HPLC were same as described in Fig. 3.

されずに素通りしたものであり、PPの溶出画分にはみられなかった。市販品30検体を測定したところ、2検体からPPが検出された。それらのうち1検体のクロマトグラムをFig. 5に示した。P2, P3, P4, P5, P6がそれぞれナトリウム塩として0.049, 0.061, 0.074, 0.034, 0.013 g/kg (合計0.231 g/kg) 検出された。他の1検体からは、P2, P3, P4がそれぞれ0.027, 0.029, 0.014 g/kg (0.070 g/kg) 検出された。なお定量限界はいずれのPPも0.02 mmol/kgであった。本測定法の妨害物質としては、鉄錯体と反応するアスコルビン酸、クロロゲン酸、フィチン酸が知られている。¹⁰⁾ アスコルビン酸はカラムに保持されず、クロロゲン酸はP2とP3の中間に溶出されるが、フィチン酸はP6と接近して溶出された。PPとしてP6が単独で使

用されることはなく、P6が存在する場合は他のPPも共存しており、¹¹⁾ フィチン酸かPPかの判定はおおむね可能であると考えられる。

本法ではP2—P9の一斉分析が1時間で可能であり、清涼飲料水中のPPの分析法として簡便かつ迅速な方法であり、実用的な方法と考えられる。

まとめ

ポストカラム反応法を用いたHPLCによるPPの分析法を検討し、清涼飲料水に適用して次の結果を得た。

1) 分離カラムには親水性のポリアクリレートゲルに陰イオン交換基を結合したTSK GEL DEAE-5PWを、移動相には0.01 M 硝酸-硝酸ナトリウムを用い、濃度グラジェント法でP2—P9を分離し、P1に分解することなく鉄・スルホサリチル酸錯体と反応させ吸光度の減少を用いて定量した。

2) 本法では1時間サイクルでP2—P9の一斉分析が可能であり、再現性も良好であった。また各PPの検量線は0.01—1.0 mMの範囲で直線性を示した。

3) 清涼飲料水を等量の0.01 M 硝酸と混合して0.45 μmのフィルターでろ過するだけの簡単な処理で、妨害成分の影響を受けることなくPPを一斉分析できた。

4) 清涼飲料水30検体中の2検体からP2—P6 (合計0.231 g/kg) 及びP2—P4 (0.070 g/kg) が検出された。

本法は、前処理法が簡単であり、高濃度の酸でP1に分解することなくPPを定量でき、清涼飲料中のPPの分析法としては簡便かつ実用的な方法であると考えられる。

謝辞 本研究の遂行にあたり、御助言頂いた富山県食品研究所の川崎賢一氏、大泉徹氏に感謝します。

引用文献

- 1) 石館守三監修, “食品添加物公定書解説書,” 広川書店, 東京, 1979, pp.B-890—900, pp.B-917—927.
- 2) 藤井清次, 細貝裕太郎, 食品工業, **13**, 87 (1970).
- 3) 津波古充朝, 末吉千代子, 成相裕之, 本岡 達, 薬誌, **104**, 718 (1984).
- 4) 厚生省環境衛生局食品課, “食品中の食品添加物分析法指針 その3,” 1982, pp.24—35.
- 5) 日本薬学会編, 衛生化学, **24**, A-40 (1978).
- 6) Y. Baba, N. Yoza, S. Ohashi, *J. Chromatogr.*, **348**, 27 (1985).
- 7) W.R. Biggs, J.T. Gano, R.J. Brown, *Anal. Chem.*, **56**, 2653 (1984).
- 8) I. Motooka, K. Nakazaki, H. Nariai, M. Tshako, *J. Chromatogr.*, **367**, 271 (1986).
- 9) H.E. Wade, D.M. Morgan, *Nature (London)*, **171**, 529 (1953).
- 10) M. Latta, M. Eskin, *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1315 (1980).
- 11) J.J.L. Cilliers, P.J. Niekerk, *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 680 (1986).