

以高效離子層析法分析食品中磷酸鹽類成分

蔡佳芬¹ 郭景豪¹ 潘志寬² 施養志³

¹研究檢驗組 ²北區管理中心 ³科技中心

摘要

本研究建立以高效離子層析法(high performance ion chromatography, HPIC)進行食品中磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽等磷酸鹽類之檢驗方法，取均質後之檢體，加去離子水萃取，萃取液加入二氯甲烷使蛋白質沉澱，離心後取上清液經微孔濾膜過濾後，取濾液以離子層析儀進行含量檢測。離子層析條件部分，以IonPac AS 11 (4 mm) + IonPac AG 11 (4 mm)層析管柱進行分離，以30 mM - 80mM NaOH溶液為移動相，Suppressed Conductivity為檢出器進行檢測。空白魚丸檢體添加磷酸鹽類標準溶液使其濃度各為100及1000 µg/g進行回收試驗，其回收率分別為磷酸鹽94.7及96.2%，變異係數為6.7及2.5%；焦磷酸鹽之回收率為83.6及104.2%，變異係數為4.3及3.7%；三聚磷酸鹽之回收率為85.5及95.5%，變異係數為6.5及2.6%，顯示本方法對磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之回收狀況良好。抽購市售生鮮冷凍水產品8件及魚漿製品11件，合計19件，經檢驗結果以磷酸鹽計其含量為未檢出~0.35 g/kg，均低於食品添加物使用範圍及限量暨規格標準中有關磷酸鹽類限量3 g/kg之規定。

關鍵詞：磷酸鹽、焦磷酸鹽、三聚磷酸鹽、高效離子層析法

前言

一般而言，加工食品為增加其保水性，使產品之表面緊實、乾燥，提高製成率，可添加使用磷酸鹽類物質，同時使其pH值偏鹼性為佳⁽¹⁾。經由提高加工食品之pH值，可增加蛋白質之電荷。此外，因多磷酸鹽可螯合金屬離子而抑制脂肪氧化，並且有保護製品顏色的功用。因此，市售的肉製品及水產煉製品中，使用磷酸鹽作為結著劑極為普遍。惟添加量太多時，會使製品產生不良氣味。

食品添加物所使用之磷酸鹽種類繁多。由「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」之第13類結著劑規定，可分為焦磷酸鹽類(pyrophosphate)、多磷酸鹽類(Polyphosphate)、偏磷酸鹽類(metaphosphate)及磷酸鹽類(phosphate)等16種不同鈉、鉀鹽類之結著劑。其使用範圍與限

制狀況規定，只允許使用於肉製品及魚肉煉製品之製造或加工過程中，其用量以Phosphate計為3 g/kg以下⁽²⁾。

行政院衛生署依食品衛生管理法第十二條之規定，公告「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」，各類食品添加物之品名、使用範圍及限量，應符合標準之規定，非表列之食品品項，不得使用各該食品添加物⁽³⁾。因此有關生鮮冷凍水產品，則不得使用磷酸鹽類作為結著劑。

就目前所蒐集到的資料顯示，歐盟要求水產品中磷酸鹽類之含量不得超過0.5 g/kg，而我國對於磷酸鹽類結著劑之規定用量，僅以Phosphate計，顯示無法跟隨國際潮流。因此針對個別磷酸鹽類之檢測方法仍有進一步探討之空間。

有關各磷酸鹽類含量之檢驗方法，除將檢體灰化後，進行磷離子的呈色反應，結果以P₂O₅計，得知磷之總量外^(4,5)，文獻中尚有利用

離子層析法⁽⁶⁻⁹⁾，將不同磷酸鹽分離後，分別鑑別及定量；利用*Escherichia coli*的polyphosphate kinase (PPK)將多磷酸鹽轉變為ATP (adenosine 5'-triphosphate)，再以冷光素(luciferin)經冷光酵素(luciferase)作用而發光之強度為ATP多寡之計量方式(assay)⁽¹⁰⁾；利用毛細電泳分析法(capillary electrophoresis, CE)，分析7種磷酸鹽⁽¹¹⁾；利用薄層層析法檢測肉及肉製品中多磷酸鹽⁽¹²⁾等。在考量分析步驟有否涵蓋衍生化反應、是否直接偵測待測標的物、儀器操作之方便性、檢測值易於量化等因素後，本研究擬以高效離子層析法建立食品中多重磷酸鹽及其中間產物之檢驗方法，並藉由各方法間之相互驗證，進行市售食品中磷酸鹽類及其中間產物之含量調查。

材料與方法

一、檢體來源

於97年8月至97年10月間，自超市抽購生鮮冷凍水產品8件及魚漿製品11件，共計19件。

二、化學藥品

三聚磷酸鈉採用試藥級(美國Fluka公司)、磷酸二氫鉀、十水焦磷酸鈉均採用試藥級(日本和光純藥工業株式會社)、氫氧化鈉採用試藥級(德國Merck公司)及二氯甲烷(荷蘭J. T. Baker公司)均採用試藥級。

三、儀器與設備

(一)離子層析儀採DIONEX DX-600 Ion Chromatograph，包含自動取樣器，Spectra AS 1000。抑制系統，Anion Self-regenerating Suppressor, ASRS 300 (4 mm)。

(二)振盪器(Thermolyne, type 37600 mixer)。

四、標準品溶液之調製

分別稱取磷酸二氫鉀1.432 g、十水焦磷酸鈉2.560 g及三聚磷酸鈉1.454 g，精確稱定，以去離子水定容至1 L，成為1000 ppm之標準原液，再取各標準原液混合，以去離子水稀釋成合適之濃度

作為混合標準溶液。

五、檢液製備

取均質後之檢體約1 g，精確稱定，加95°C去離子水50 mL，振盪5分鐘，離心5分鐘(4000 rpm，15°C)，取上層液5 mL於15 mL離心管中，加入二氯甲烷10 mL。振盪5分鐘，離心5分鐘(4000 rpm，15°C)，取上清液經孔徑0.45 μm濾膜過濾，取濾液1 mL供作檢液。

六、高效離子層析法之操作條件

層析管：IonPac®AS11-HC，內徑4 mm × 25 cm。

保護柱：IonPac®AG11-HC，內徑4 mm × 5 cm。

離子抑制器：自動再生離子抑制器，ASRS 300 (4 mm)。

流洗液：30 mM – 80 mM氫氧化鈉。

流速：1 mL/min。

檢出器：導電度檢出器。

注射量：25 μL。

七、標準曲線之繪製

精確量取含2.5、4、6、8、10 μg/mL等6種濃度之磷酸、焦磷酸及三聚磷酸根離子之混合標準溶液，各取25 μL，注入離子層析儀，就標準溶液所得波峰面積與濃度繪製成標準曲線。

八、回收試驗

取空白檢體，分別加入適量之磷酸、焦磷酸及三聚磷酸根離子之混合標準溶液，使檢體濃度各為100及1000 μg/g，依檢體製備流程得到檢液，再以離子層析方法進行檢測，求出其回收率。每一添加量進行3重複試驗，同時進行空白試驗。

九、檢出限量：

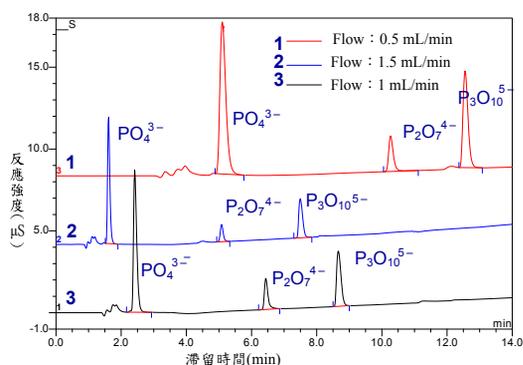
取空白檢體分別添加各種濃度之標準溶液，依本實驗建立之離子層析方法進行分析，以訊噪比(S/N ratio)大於3作為判定標準，估計其檢出限量。

結果與討論

參考文獻之分析條件⁽⁸⁾，檢體經前處理後，以高效離子層析儀分析磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之含量，分別進行以下試驗。

一、分析條件之探討

參考相關文獻⁽⁸⁾以IonPac AS 11離子層析管柱進行磷酸、焦磷酸及三聚磷酸根之分離條件之探討。流洗液之流速提高，雖可減少檢測時間，但往往造成檢體中干擾物質之雜訊無法有效分離的現象，因此透過0.5、1、1.5 mL/min等流速之改變，探討待測物之分離情形，結果如圖一所示，當流速越快，則待測物波峰出現時間越早，但經檢液分析得知，其雜訊與待測物間會有波峰重疊的現象發生，因此本實驗採用1 mL/min流速來進行以下實驗。



圖一、磷酸鹽類離子層析圖譜

二、標準曲線與最低偵測極限之測定

以高效離子層析儀偵測磷酸、焦磷酸及三聚磷酸根之混合標準溶液，由所得標準曲線之線性迴歸係數平方值在0.997以上，顯示其濃度與積分面積之相關性相當良好(表一)。

以S/N比值大於3為判定標準，測得磷酸、焦磷酸及三聚磷酸根之儀器最低偵測極限皆為2.5 mg/L以下(表二)。

三、前處理條件之探討

本實驗採用三氯醋酸(Trichloroacetic acid,

表一、以高效離子層析法測定3種磷酸鹽類之線性範圍

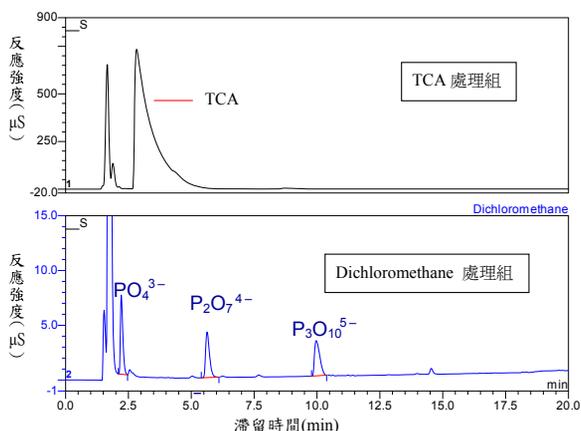
種類	Linear range (μg/mL)	Y = ax + b R ²
磷酸鹽	2~10	Y = 0.0864x - 0.0231 R ² = 0.9973
焦磷酸鹽	2~10	Y = 0.0735x - 0.0843 R ² = 0.9986
三聚磷酸鹽	2~10	Y = 0.0719x - 0.0086 R ² = 0.9981

表二、儀器偵測極限(IDL)及方法檢出限量(MDL)

種類	IDL (μg/mL)	MDL (ppm)
磷酸鹽	2.5	10
焦磷酸鹽	2.5	10
三聚磷酸鹽	2.5	10

TCA)進行蛋白質沉澱時，層析圖譜中會顯示有巨大雜波峰，並干擾標的檢測物，因此另選用二氯甲烷進行沉澱測試。檢體處理過程中，二氯甲烷與水層之分離容易，使檢液處理更為簡便，層析圖譜亦不致有雜波峰干擾，或不易去除的情形發生(見圖二)。

在Chen等人2006年針對多聚磷酸鹽穩定度所進行之研究中發現，當樣品之酵素未經完全破壞(如未經煮沸)，則添加之多聚磷酸鹽會被分解，尤其是添加量不大的情形下，焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽幾乎完全被分解殆盡，而三偏磷酸鹽之穩定度則較佳⁽¹³⁾。因此本實驗設計以沸騰之去離子水



圖二、萃取液經蛋白質沉澱後之離子層析圖譜

表三、去離子水溫度對萃取效果之影響

	反應強度(μs)		改善程度(% CV)*
	25°C(CV%)	95°C(CV%)	
磷酸鹽	0.739 (2.9)	1.324 (1.3)	84.8 (7.3)
焦磷酸鹽	0.146 (13.1)	0.491 (3.7)	242.6 (15.4)
三聚磷酸鹽	0.059 (18.2)	0.205 (4.4)	259.1 (19.8)

*：改善程度係萃取液溫度為95°C較25°C檢測值增加之百分比值

進行萃取，實驗結果發現，以沸騰(95°C以上)之去離子水萃取磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽，其偵測值分別較室溫(約25°C)之去離子水改善程度達84、242及259% (見表三)。顯示透過沸水破壞樣品中所含酵素後，可避免在實驗過程中酵素持續分解多聚磷酸鹽，而使檢測結果低於實際含量。

綜合以上實驗結果擬定前處理方法如下：取均質後之檢體約1 g，精確稱定，加入沸騰之去離子水50 mL，振盪5分鐘，離心5分鐘(4000 rpm，15°C)，取上清液5 mL置於15 mL離心管中，加入二氯甲烷10 mL，振盪5分鐘，離心5分鐘(4000 rpm，15°C)，取上清液經孔徑0.45 μm 濾膜過濾，取濾液1 mL供作檢液。

四、添加回收試驗

利用上述方法進行回收試驗，於空白魚丸檢體中分別加入磷酸、焦磷酸及三聚磷酸根標準品溶液，使其檢體濃度分別為100及1000 $\mu\text{g/g}$ ，進行回收試驗。結果在濃度為100 $\mu\text{g/g}$ 磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之添加回收率分別為94.7、83.6及85.5%，其變異係數分別為6.7、4.3及6.5%。濃度為1000 $\mu\text{g/g}$ 磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之添加回收率分別為96.2、104.2及95.5%，其變異係數分別為2.5、3.7及2.6%，顯示本方法對磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之回收狀況良好(見表四)。

五、檢驗方法之檢出限量

取磷酸、焦磷酸及三聚磷酸根標準溶液進行樣品之添加回收試驗，每一添加量進行三重複，

表四、磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之添加回收情形

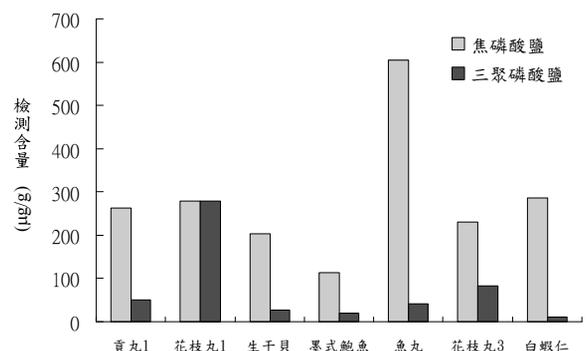
添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	平均回收率(%，CV)*		
	磷酸鹽	焦磷酸鹽	三聚磷酸鹽
100	94.7 (6.7)	83.6 (4.3)	85.5 (6.5)
1000	96.2 (2.5)	104.2 (3.7)	95.5 (2.6)

*：三重複試驗

依前述方法進行分析，就所得波峰計算其雜訊比大於3之濃度為檢驗方法之檢出限量。結果顯示磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽於10 $\mu\text{g/g}$ 檢體濃度時其雜訊比仍大於3，因此本方法之磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽檢出限量均為10 $\mu\text{g/g}$ 。

六、市售產品之檢驗

以本研究建立之離子層析方法進行19件生鮮冷凍水產品及魚漿製品之磷酸鹽類檢驗，同時檢出焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽者共計7件，其焦磷酸鹽之含量為114~605 $\mu\text{g/g}$ ，三聚磷酸鹽之含量為10~279 $\mu\text{g/g}$ ，其中有3件為生鮮冷凍產品，其焦磷酸鹽之含量為114~286 $\mu\text{g/g}$ ，三聚磷酸鹽之含量為10~27 $\mu\text{g/g}$ ，有4件魚漿製品其焦磷酸鹽之含量為230~605 $\mu\text{g/g}$ ，三聚磷酸鹽之含量為41~279 $\mu\text{g/g}$ 。其餘12件則均未檢出磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽，結果如表五所示。比較焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之含量發現，焦磷酸鹽之含量多高於三聚磷酸鹽，而魚漿製造之丸類製品其焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽含量高於生鮮冷凍水產品(見圖三)。另本實驗於探討過程中發現，生鮮食品極易



圖三、檢出焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之檢體其含量比較

表五、食品中磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之含量分析

編號	檢體名稱	檢驗結果(μg/g)		
		焦磷酸鹽 P ₂ O ₇ ⁴⁻	三聚磷酸鹽 P ₃ O ₁₀ ⁵⁻	以磷酸鹽計 PO ₄ ³⁻
1	貢丸1	263	51	163
2	虱目魚丸1	N.D.*	N.D.	N.D.
3	花枝丸1	279	279	257
4	花枝丸2	N.D.	N.D.	N.D.
5	魚卵卷	N.D.	N.D.	N.D.
6	虱目魚丸2	N.D.	N.D.	N.D.
7	貢丸2	N.D.	N.D.	N.D.
8	虱目魚丸3	N.D.	N.D.	N.D.
9	蝦球	N.D.	N.D.	N.D.
10	生干貝	204	27	122
11	珍珠小干貝	N.D.	N.D.	N.D.
12	墨式鮑魚	114	20	70
13	魚丸	605	41	346
14	花枝丸3	230	83	157
15	白蝦仁	286	10	160
16	半殼生蠔	N.D.	N.D.	N.D.
17	扇貝	N.D.	N.D.	N.D.
18	智利鮑貝	N.D.	N.D.	N.D.
19	蟳管肉(中管)	N.D.	N.D.	N.D.

*Not detected

因酵素未完全破壞而使檢測值有被低估之可能，此結果與Chen等人於2006年之研究⁽¹³⁾相符。惟市售產品之檢驗結果，生干貝、墨式鮑魚及白蝦仁等生鮮冷凍水產品，仍可被檢出大量之焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽，推測其產品之焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之原始添加量應甚高。目前我國於食品添加物使用食品範圍及用量標準中，磷酸鹽類只允許使用於肉製品及魚肉煉製品的製造或加工過程中，其用量以Phosphate計為3 g/kg以下，並未准許使用於生鮮水產品，因此檢出焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之3件生鮮冷凍產品，與規定不符。至於其餘檢出之4件魚漿製品，將其焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽換算成磷酸鹽含量後加總，則其磷酸鹽含量為157~346 μg/g (0.16~0.35 g/kg)，均低於使用限量

3 g/kg之規定。

結 論

本研究建立以離子層析儀進行食品中磷酸、焦磷酸及三聚磷酸鹽等磷酸鹽類含量測定之檢驗方法，其檢驗流程簡短，回收率及再現性均佳，可據以進行例行性之食品中磷酸鹽檢驗之用。磷酸鹽之添加回收率為94.7~96.2%，變異係數為2.5~6.7%；焦磷酸鹽之添加回收率為83.6~104.2%，其變異係數為3.7~4.3%；三聚磷酸鹽之添加回收率為85.5~95.5%，其變異係數為2.6~6.5%，顯示本方法對磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽之回收狀況良好。

以本研究所建立之方法進行19件生鮮冷凍水產品及魚漿製品之磷酸鹽類檢驗，其中有12件檢體均未檢出磷酸鹽、焦磷酸鹽及三聚磷酸鹽，有3件生鮮冷凍產品其焦磷酸鹽之含量為114~286 μg/g，三聚磷酸鹽之含量為10~27 μg/g，有4件魚漿製品其焦磷酸鹽之含量為230~605 μg/g，三聚磷酸鹽之含量為41~279 μg/g。

檢出磷酸鹽類之檢體中，有3件為生鮮冷凍產品，與「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」之規定不符；其餘4件檢出之魚漿製品，其磷酸鹽含量為157~346 μg/g (0.16~0.35 g/kg)，均低於使用限量3 g/kg之規定。

參考文獻

1. Tprley, P. J., Arcy, B. R. D. and Trout, G. R. 2000. The effect of ionic strength, polyphosphates types, pH, cooking temperature and preblending on the functional properties of normal and pale, soft, exudative (PSE) pork. *Meat Science* 55: 451-462.
2. 行政院衛生署。食品添加物使用範圍及限量暨規格標準。[http://www.doh.gov.tw]。
3. 行政院衛生署。2008。食品衛生管理法。97.06.11總統華總一義字第09700080101號令修正公布。
4. 中華民國國家標準。總號9638，類號N5200。食品中鈣、磷含量檢驗法。
5. 中華人民共和國國家標準。GB/T

- 5009.87-2003。食品中磷的測定。
6. Cui, H., Cai, F. and Xu, Q. 2000. Determination of tripolyphosphate in frozen cod and scallop adductor by ion chromatography. *Journal of Chromatography A* 884: 89-92.
 7. Kaufmann, A., Maden, K., Leisser, W., Matera, M. and Gude, T. 2005. Analysis of polyphosphate in fish and shrimps tissues by two different ion chromatographic methods: implications on false-negative and -positive findings. *Food Additives and Contaminants* 22(11): 1073-1082.
 8. DIONEX. Application Note 71. Determination of polyphosphates using ion chromatography with suppressed conductivity detection.
 9. Liu, H., Jiang, Y., Luo, Y. and Jiang, W. 2006. Simple and rapid determination of ATP, ADP and AMP concentrations in pericarp tissue of litchi fruit by high performance liquid chromatography. *Food Technology and Biotechnology Journal* 44: 531-534.
 10. Ohtomo, R., Sekiguchi, Y., Mimura, T., Saito, M. and Ezawa, T. 2004. Quantification of polyphosphate: different sensitivities to short-chain polyphosphate using enzymatic and colorimetric methods as revealed by ion chromatography. *Analytical Biochemistry* 328: 139-146.
 11. Stover, F. S. 1999. Capillary electrophoresis of phosphorus oxo anions. *Journal of Chromatography A* 834: 243-256.
 12. 中華人民共和國國家標準。GB/T 9695.9-88。肉與肉製品聚磷酸鹽測定。
 13. Chen, X. M., Chi, H. C., Huang, C. Q., Zhu, Y., Zhu, X. Y. and Wang, X. 2006. Determination of polyphosphates in aquatic products by ion chromatography after inhibition by boiling water. 浙江省國境安全檢驗檢疫科技創新服務平台No. 2006C17014.

Determination of Phosphates in Foods by High Performance Ion Chromatography

CHIA-FEN TSAI¹, CHING-HAO KUO¹, JYH-QUAN PAN² AND DANIEL YANG-CHIH SHIH³

¹Division of Research and Analysis ²Northern Center for Regional Administration

³Center for Science and Technology

ABSTRACT

A method was developed to analyze the contents of 3 phosphates in foods by high performance ion chromatography (HPIC) in this study. Phosphate, pyrophosphate and tripolyphosphate were extracted from foods using D. I. water followed by protein denaturation with dichloromethane. The extracts were analyzed by HPIC with suppressed conductivity detector. The IonPac AS 11 (4 mm) + IonPac AG 11 (4 mm) column was used for the separation with 30 mM – 80 mM NaOH was used as mobile phase in HPIC. The recoveries of phosphates (100 and 1000 µg/g) spiked in fish ball were as follows: phosphate 94.7 and 96.2%, pyrophosphate 83.6 and 104.2%, tripolyphosphate 85.5 and 95.5%. The coefficients of variation were as follows: phosphate 6.7 and 2.5%, pyrophosphate 4.3 and 3.7%, tripolyphosphate 6.5 and 2.6%. The 3 phosphates were detected in 19 various fish products with a concentration range of not detected -0.35 g/kg, all below the Scope and Application Standards of Food Additives for phosphates (3 g/kg).

Key words: phosphate, pyrophosphate, tripolyphosphate, high performance ion chromatography