蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる 食品中のアスパルテームの定量

(昭和 60 年 5 月 9 日受理)

玉瀬喜久雄^{*2} 北田 善三^{*2} 佐々木美智子^{*2}
上田 保之^{*2} 竹下 隆三^{*3}

Determination of Aspartame in Foods by High Performance Liquid Chromatography with a Fluorescence Detector

Kikuo TAMASE^{*2}, Yoshimi KITADA^{*2}, Michiko SASAKI^{*2}, Yasuyuki UEDA^{*2}
and Ryuzo TAKESHITA^{*3}

(^{*2}Nara Prefectural Institute of Public Health: 57-6, Ohmori-cho, Nara,
Japan; ^{*3}School of Pharmaceutical Science, Toho University:
2-2-1, Miyama, Funabashi, Chiba, Japan)

A sensitive method for the determination of aspartame (APM) in foods by high performance liquid chromatography with a fluorescence detector is described.

APM was extracted from a food sample with water. The extract was passed through a C₈ column (LiChroprep RP-8, 40-63 μ m, 1 g). The column was washed with 0.05 M acetate buffer solution (pH 6.0), then APM was eluted with a mixture of acetonitrile-0.05 M acetate buffer solution (3:7). APM in the eluate was derivatized with fluorescamine and injected onto a LiChrosorb RP-8 column; a mixture of acetonitrile-0.05 M acetate buffer solution (pH 6.0) (22:78) was used as a mobile phase.

The recoveries of APM added to foods were more than 92%. The detection limits of APM in liquid food and solid food were 2 ppm and 4 ppm, respectively.

(Received May 9, 1985)

Key words: アスパルテーム aspartame; フルオレスカミン fluorescamine; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 蛍光検出器 fluorometric detector

緒 言

合成甘味料のアスパルテーム (APM) は、昭和 58 年に我が国でも食品添加物として使用することが認められ、今後、さまざまな食品に使用されることが考えられる。APM は人体への安全性が高いとされ、今のところ使用基準は設定されていない。しかし、フェニルケトン尿症の患者には APM の摂取が好ましくないことや、APM の分解物として、メタノールやジケトピペラジンなどが生成する¹⁾ことから APM の食品への使用実態

を正しく把握する必要があり、簡便で精度のよい定量法の開発が望まれている。

食品中の APM の定量法として、アミノ酸アナライザーによる方法^{2),3)}及び高速液体クロマトグラフ (HPLC)^{4)~8)}による方法が報告されているが、アミノ酸アナライザーによる方法は日常分析法として、あまり一般的でなく、HPLC 法は、いずれも UV 検出器を用いていることから、定量に際して、他の共存物質の影響を受けやすく、また、高い測定感度を得るためには HPLC へ試料溶液の多量負荷が必要となる。これらの問題を解決するため、今回、APM を蛍光試薬にてラベル化し、蛍光検出 HPLC にて定量する方法を検討したところ良好な結果が得られたので報告する。

*1 高速液体クロマトグラフィーによる食品添加物の分析 (第 5 報)

*2 奈良県衛生研究所: 奈良市大森町 57-6

*3 東邦大学薬学部: 千葉県船橋市三山 2-2-1

実験方法

1. 試料

以下の食品20検体を試料に供した。

1) 液体食品: 清涼飲料水 (4 種類), コーヒ飲料, 乳酸菌飲料, しょう油

2) 固形食品: 粉末清涼飲料, チューインガム, フルーツゼリー, 氷菓子, みそ, 漬物類 (4 種類), プリン

3) 脂肪性食品: チョコレート, アイスクリューム, ホイップクリーム

2. 試薬及び器具

0.5 M 酢酸塩緩衝液 (Ac. B. S.): 0.5 M 酢酸ナトリウム溶液に 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 6.0 に調整した。

0.05 M Ac. B. S.: 0.5 M Ac. B. S. を水にて 10 倍希釈した。

0.2 M ホウ酸塩緩衝液: ホウ酸 2.47 g を水約 180 ml に溶かしてこれに 1 N 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 7.5 とし, さらに水を加えて全量 200 ml とした。

フルオレスカミン-アセトン溶液: フルオレスカミン (Roche 製) 25 mg をアセトンに溶かして全量 10 ml とした。

APM 標準溶液: APM (Aldrich Chem. 製) 100 mg を, あらかじめ 0.001 N 塩酸を用いて pH 4.0 に調整した水に溶かして全量 100 ml とし, これを標準原液とした。標準原液を適宜水にて希釈し, 標準溶液とした。

APM 分離用カラム: 分取高速液体クロマトグラフィ用充填剤 LiChroprep RP-8 (40~63 μ m) 1 g を内径 10 mm のカラム管に詰め, メタノール 10 ml, 次いで水 20 ml で洗浄した後, 使用直前に 0.05 M Ac.B.S. 5 ml を流して用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ: (株)島津製作所製 LC-3A
蛍光検出器: (株)島津製作所製 RF-510

4. 操作

4.1 試料溶液の調製

a) 液体食品: 試料 2 g に 0.5 M Ac. B. S. 1 ml, 水 7 ml を加えて振りまぜた後, APM 分離用カラムに負荷する。次に, カラムを 0.05 M Ac. B. S. 10 ml で洗浄した後, アセトニトリル-0.05 M Ac. B. S. (3:7) の混合溶液で溶出して最初の 5 ml を分取し, 試料溶液とした。

b) 固形食品: 試料 10 g に水を約 30 ml 加えてホモジナイズした後, さらに水を加えて全量 100 ml とする。次に, 東洋濾紙 No. 2 のろ紙にてろ過を行い, ろ液の 10 ml に 0.5 M Ac. B. S. 1 ml を加えて振りまぜた後, 分離用カラムに負荷する。以後は液体食品と同様に操作した。

c) 脂肪性食品: 試料 5 g を 50 ml 共栓付遠沈管に採取し, これに水約 10 ml を加え, ガラス棒にてよくかきまぜ, 約 2 分間超音波をかける。その後, エーテル 25

Table 1. Operating Conditions of HPLC

Column:	LiChrosorb RP-8 (5 μ m) 4 mm i.d. $\times$ 25 cm
Column temp:	40°C
Mobile phase:	Acetonitrile-0.05 M Sodium acetate (pH 6.0) (22:78)
Flow rate:	0.7 ml/min
Detector:	FLD; Ex=390 nm Em=480 nm
Sample size:	5 μ l

ml を加えて 5 分間振とうし, 遠心分離してエーテル層を除去する。再びエーテル 25 ml を加えて同様に操作し, 水層に残っているエーテルを減圧下, 完全に留去した後, 50 ml のメスフラスコへ移し, 水を加えて全量 50 ml とする。次に, 東洋濾紙 No. 2 のろ紙にてろ過し, ろ液の 10 ml に 0.5 M Ac. B. S. 1 ml を加え, 振りまぜた後, 分離用カラムに負荷する。以後は液体食品と同様に操作して試料溶液を調製した。

4.2 定量

試料溶液 50 μ l をマイクロシリンジにて試験管に採取し, これに 0.2 M ホウ酸塩緩衝液 2 ml を加えた後, サーモミキサーでミキシングしながらフルオレスカミン-アセトン溶液 200 μ l をマイクロシリンジにて迅速に加え, 澄明な溶液が得られるまで, さらにミキシングを続けて HPLC 用試験溶液とした。HPLC の測定条件は Table 1 に示した。

結果及び考察

1. APM 分離用カラムによる前処理

試料が炭酸飲料や氷菓などの場合は APM 分離用カラムによる前処理を省いても定量が可能であったが, しょう油やみそなどの場合はアミノ酸類を多く含むため, これらが蛍光試薬のフルオレスカミンと反応して HPLC での測定時に妨害ピークとして出現した。このため, 主にアミノ酸類の除去を目的として, 今回の分離用カラムによる前処理法を検討した。

1.1 洗浄液の検討

APM を含む試料液を分離用カラムに負荷した後, カラムの洗浄を水で行うと回収率が低下したため, 水の代わりに Ac. B. S. を用いたところ, Fig. 1 に示すように, 0.02 M 以上の濃度で回収率がほぼ 100% となった。このことから今回, APM を捕集したカラムの洗浄液には 0.05 M Ac. B. S. を用いた。なお, 試料にはオレンジジュース, しょう油, たくあん漬を用いて検討を行った。

1.2 溶離液

分離用カラムから APM の溶離液として, アセトニトリルと 0.05 M Ac. B. S. の混合溶液を用いた。両者の比が 2:8, 3:7 及び 4:6 としたときの APM の溶出パターンは Fig. 2 に示すとおりとなり, 混合比が 3:7 及び

Table 2. Recoveries of Aspartame added to Foods

Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	Recovery* $\pm$ S.D. (%)	Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	Recovery* $\pm$ S.D. (%)
Fruit drinks	100	98.7 $\pm$ 2.2	Pudding	100	97.7 $\pm$ 1.7
	500	95.9 $\pm$ 1.8		500	98.0 $\pm$ 1.3
Coffee drinks	100	94.5 $\pm$ 2.1	Fruit jelly	100	93.3 $\pm$ 2.5
	500	99.5 $\pm$ 1.8		500	98.2 $\pm$ 0.6
Lactic beverage	100	99.6 $\pm$ 0.8	Ice candy	100	94.5 $\pm$ 1.6
	500	99.8 $\pm$ 2.3		500	99.7 $\pm$ 1.1
Soy sauce	100	98.9 $\pm$ 3.2	Miso	100	93.3 $\pm$ 1.6
	500	97.5 $\pm$ 0.6		500	93.6 $\pm$ 1.2
Pickles	100	94.5 $\pm$ 2.5	Chocolate	100	99.8 $\pm$ 3.1
	500	99.8 $\pm$ 0.7		500	99.3 $\pm$ 0.6
New fruit candy	100	98.4 $\pm$ 1.6	Ice cream	100	95.2 $\pm$ 3.4
	500	95.3 $\pm$ 1.9		500	92.6 $\pm$ 1.9
Chewing gum	100	92.2 $\pm$ 0.6	Whip cream	100	97.7 $\pm$ 1.5
	500	96.6 $\pm$ 1.5		500	95.0 $\pm$ 2.2

* Average of four trials

Fig. 1. Relation between recovery rate and concentration of sodium acetate

Fig. 3. Relation between amount of fluorescamine and fluorescence intensity
1: soy sauce; 2: orange juice; 3: chocolate; 4: pickled radish Fig. 2. Elution patterns of aspartame from C_8 column

(A) Eluent: CH_3CN -0.05 M CH_3COONa (2:8); (B) Eluent: CH_3CN -0.05 M CH_3COONa (3:7); (C) Eluent: CH_3CN -0.05 M CH_3COONa (4:6)

4:6 の場合に溶出液 5 ml ではほぼ 100% の溶出率となった。

2. フルオレスカミンによる蛍光ラベル化

2.1 反応と pH との関係

APM とフルオレスカミンを反応させる際の至適 pH について調べたところ、ホウ酸塩緩衝液の pH が 7.3~8.0 で最も高率に反応生成物が得られた。従って標準操作法では、ホウ酸塩緩衝液の pH を 7.5 とした。ところで、APM はアルカリ性水溶液中では分解しやすい⁹⁾とされているため、APM 標準溶液 50 μl に pH 7.5 のホウ酸塩緩衝液を加えて放置したところ、1 時間以内では、ほとんど分解せず安定であった。また、フルオレスカミンと反応させた後の蛍光誘導体は、かなり長時間安定しており、7 時間を経過しても、ほとんど変化はみられなかった。

Fig. 4. Liquid chromatograms of prepared solution obtained from various foods
(A) standard, (B) apple Juice, (C) cola,
(D) candy, (E) fruit jelly, (F) chocolate

2.2 フルオレスカミン添加量

試料溶液 50 μ l 中に含まれる APM を完全に蛍光ラベル化するために必要なフルオレスカミン量を調べた。その結果, Fig. 3 に示すように各試料ともフルオレスカミン量が 400 μ g 以上で APM 蛍光誘導体のピーク高は一定となった。このことから, フルオレスカミン添加量は 400 μ g で十分と思われるが, 余裕をみて 500 μ g とした。

なお, 試料にはたくあん漬, チョコレート, オレンジジュース及びしょう油に APM を 0.5~1.0 mg/g 添加したものを用いた。

3. HPLC 条件及び検量線

HPLC のカラムには逆相分配系の LiChrosorb RP-8 移動相としては, アセトニトリル-0.05 M 酢酸塩緩衝液 (22:78) を用いた。そのとき得られたクロマトグラムを Fig. 4 に示したが, 今回検討したすべての食品で定量を妨害するピークは出現しなかった。

ピーク高法による検量線は APM として 0.05~180 μ g/tube で良好な直線性を示した。検出限界は液体食品 2 ppm, 固形食品及び脂肪性食品が 4 ppm であり, 従来の UV 吸収-HPLC 法と比較すると HPLC へは少量の負荷量でも高い測定感度が得られた。

4. 添加回収実験

各試料に 100 ppm 及び 500 ppm に相当する APM

を添加して本法に従って操作し, 回収率を求めた。その結果は Table 2 に示すとおりで, 液体食品 94.5~99.8%, 固形食品 92.2~99.8%, 脂肪性食品 92.6~99.8% と良好な結果が得られた。また, それぞれの回収率における標準偏差 (SD) は 0.6~3.4 であり, 精度的にもほぼ満足できる結果が得られた。

ま と め

APM を蛍光誘導体化し, HPLC にて定量する方法を検討した。

蛍光試薬としてはフルオレスカミンを用いたが, APM とは簡易かつ迅速に反応し, 生成した蛍光誘導体の安定性も高かった。しかし, フルオレスカミンは第一級アミノ基を有するものと特異的に反応することから, アミノ酸類などが HPLC での測定を妨害するおそれがある。このため, APM 分離用カラムによる前処理を検討したところ, これらを除くことができた。

HPLC のカラムには逆相系の LiChrosorb RP-8, 移動相にアセトニトリル-水系を用いたが, 検討したすべての食品で, 共存物質による影響はみられず, また, 従来の方法と比較して HPLC へは少量の負荷量でも高い測定感度が得られた。

文 献

- 1) 荒井 紘一: 食品工業, 25(24), 49~61 (1982).
- 2) 石渡昭男, 鈴木幸允: 食衛誌, 16, 420~421 (1975).
- 3) 西島基弘, 冠 政光, 高橋尚子, 上村 尚, 中里光男, 渡利優子, 木村康夫: 同上 17, 78~84 (1976).
- 4) Gaylord, Lew, F., Anthony, D., Edward, P. K. Lau: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59, 1048~1050 (1976).
- 5) Norma, G. W., Darrell, D. B.: *ibid.* 67, 510~513 (1984).
- 6) Daniel, H. D., Frank, L. J. Jr., Charles, R. W., Thomas, F.: *ibid.* 67, 513~515 (1984).
- 7) Theodore, A. T.: *ibid.* 67, 745~747 (1984).
- 8) 井部明広, 齊藤和夫, 中里光男, 菊地洋子, 藤沼賢司, 直井家壽太, 二島太一郎: 食衛誌, 26, 1~6 (1985).
- 9) Furda, I., Malizia, P. D., Kolor, G. M., Vernieri, J. P.: J. Agric. Food Chem. 23, 340~343 (1975).