清涼飲料水中のアセスルファム K, サッカリン 及びアスパルテムの同時分析法

(昭和 63 年 10 月 31 日受理)

守安 貴子* 齊藤 和夫* 中里 光男*
菊池 洋子* 藤沼 賢司* 二島 太一郎*

Simultaneous Determination of Acesulfame K, Saccharin and Aspartame in Soft Drinks

Takako MORIYASU, Kazuo SAITO, Mitsuo NAKAZATO, Yoko KIKUCHI,
Kenji FUJINUMA and Taichiro NISHIMA

(The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho,
Shinjuku-ku, Tokyo, Japan)

A rapid convenient method for the simultaneous determination of acesulfame K (AK), saccharin (SA) and aspartame (APM) in soft drinks by high performance liquid chromatography (HPLC) using an ion-pair partition system was developed.

McIlvaine buffer, pH 4.5, and 0.1 M tetrabutylammonium bromide were added to a sample and the solution was passed through Bond Elut C₁₈. The column was washed with water, and the sweeteners were eluted with a mixture of methanol-McIlvaine buffer, pH 3.0 (3 : 7). The eluate was determined by HPLC with a Finepak SIL C₁₈S column and a mobile phase of methanol-water (2 : 8) containing tetraethylammonium hydroxide, pH 4.0. The effluent was monitored with a UV detector at a wavelength of 210 nm. By these procedures, the 3 sweeteners can be well separated and quantitatively determined.

The recoveries of AK, SA and APM from soft drinks spiked at 50 and 200 µg/g were 95~102%, 93~104%, 90~102%, respectively. The detection limits of AK, SA and APM were 10 mg/kg of sample.

(Received October 31, 1988)

Key words: アセスルファム K acesulfame K; サッカリン saccharin; アスパルテム aspartame; イオンペアークロマトグラフィー ion-pair chromatography; ボンドエルート C₁₈ Bond Elut C₁₈; 清涼飲料水 soft drinks

緒 言

アセスルファム K (AK) は 1967 年 Clauss らにより合成されたオキサチアジノンジオキシドのカリウム塩^{1), 2)}であり, その甘味度は 3% 水溶液でショ糖の 200 倍を有する新合成甘味料¹⁾である. 現在我が国では AK の使用は認められていないが, すでにイギリス, 西ドイツをはじめおよそ 20 か国で認められており, アメリカ合衆国においても 1988 年 7 月に卓上甘味料として, また飲料, プリンなどの乾燥ベースへの使用が認められるようになった.

近年, 我が国の輸入食品の増加は著しく, AK が使用された食品が輸入される可能性もあるため, 分析対象食品に, その使用頻度が高いと考えられる清涼飲料水を選び, あわせてこれらに広く使用されている他の甘味料, サッカリン (SA) 及びアスパルテム (APM) との同時分析法について検討した.

AK の分析法としては薄層クロマトグラフィー³⁾, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法^{4)~7)}が報告されているが, AK, SA 及び APM の組合せによる分析法は, わずかにグラジエント溶離を用いた HPLC による方法⁴⁾があるのみである. この方法は分離にグラジエント溶離を用いているため, 再現性, 定量性の点で,

* 東京都立衛生研究所: 東京都新宿区百人町 3-24-1

やや問題がある。そこで、著者らは AK のみならず SA 及び APM との分別定量を目的とし、イオンペアーモードを用いたアイソクラティックな HPLC の分離条件についてカートリッジカラムによる試料の前処理法を導入して検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試薬

1) 混合標準原液: アセスルフェム K (純度 99.4% ヘキスト社製), サッカリンナトリウム (特級, 和光純薬工業(株)製), アスパルテーム (純度 99.7% 味の素(株)製) 各々 100 mg を精ひょうし, 水に溶解して全量 100 ml としたものを混合標準原液とした。

2) McIlvaine 緩衝液: 0.2M リン酸水素二ナトリウム溶液 20.5 ml または 44.1 ml と, 0.1M クエン酸ナトリウム溶液 79.5 ml または 55.9 ml を混合し, それぞれ pH 3.0 または pH 4.5 の緩衝液を調製した。

3) 前処理用カートリッジカラム: ボンドエルート C₁₈ (アナリティケム社製) 充てん量 1,000 mg を用いた。

4) ボンドエルート C₁₈ 用溶出溶媒: メタノール-McIlvaine 緩衝液 pH 3.0 (3:7) 混液を用いた。

5) イオンペアー試薬: 10% 水酸化テトラエチルアンモニウム (TEA-OH) 溶液 (イオンペアークロマトグラフィ用, 東京化成工業(株)製) 及び臭化テトラブチルアンモニウム (TBA-Br) (和光純薬工業(株)製) を用いた。

メタノール: HPLC 用を用いた。

その他の試薬は市販特級品を用いた。

2. 装置

高速液体クロマトグラフ: 日本分光工業(株)製 BIP-I 型ポンプ, 同 UVIDEC-VI 型検出器, (株)島津製作所製 C-R3A 型データ処理装置及びレオダイン社製 7125 型インジェクターにより構成した。

3. HPLC 条件

カラム: Finepak SIL C₁₈S (5 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm i.d.)
移動相: TEA-OH を 0.03M 含有したメタノール-水 (2:8) 混液をリン酸で pH 4.0 に調整した。

流速: 1.0 ml/min

検出波長: 210 nm

注入量: 20 μ l

4. 試験溶液の調製

試料 10 g を 50 ml のメスフラスコにひょう取し, 0.1 M TBA-Br 溶液 2 ml を加え, McIlvaine 緩衝液 pH 4.5 で全量を 50 ml としたものを試料溶液とした。この 10 ml を, あらかじめメタノール 10 ml 及び 0.01 M TBA-Br 溶液 10 ml で洗浄したボンドエルート C₁₈ に毎分 3~4 ml の速度で負荷した。次いで水 10 ml を用いてカラムを洗浄した後, ボンドエルート C₁₈ 用溶出溶媒

10 ml で 3 種の甘味料を溶出し, HPLC 用の試験溶液とした。

5. 検量線の作成

混合標準原液を水で希釈し, 2, 5, 10, 50 及び 100 μ g/ml の混合標準溶液を調製し, その 20 μ l を HPLC に付し, ピーク面積法により検量線を作成した。

結果及び考察

1. クリーンアップ

果汁飲料, 乳酸菌飲料, コーヒー飲料などは固形分をはじめ夾雑物が多いので, フィルター処理のみで HPLC に直接注入した場合は多くのピークが長時間にわたって出現し, さらにカラムの寿命を著しく縮めるおそれもある。そこで, これらの問題を解決するために, カートリッジ式の前処理カラムを用いたクリーンアップ法について検討した。

前処理カラムとして逆相系のセップバック C₁₈, 充てん量 500 mg 及び 1,000 mg のボンドエルート C₁₈ を用いて, 3 種の甘味料を同時に効率よく保持あるいは分離でき, かつ夾雑物との分離が可能な条件について検討した。

1) カートリッジカラム及びイオンペアー試薬の選択
AK と SA は解離定数の大きい強酸性物質であるため, 3 種のカートリッジカラムにほとんど保持されず, また, 水溶液の pH を 1 程度に調整しても保持されなかったことから, イオン抑制法によるカラムへの保持はほとんど効果がないことが分かった。そこで AK と SA のカラム保持にイオンペアー試薬を用いることとし, TEA-Br と TBA-Br について検討した。TEA-Br はいずれのカラムにおいても保持が弱く, AK では試料溶液を負荷する際に 40%, 洗浄する際に 60%, SA では洗浄する際に全量溶出した。しかし, TBA-Br の場合には AK 及び SA いずれも全量保持できたのでこれを用いることとした。

一方, ジペプチドの APM はイオンペアー試薬の添加による効果はほとんど認められず, むしろ APM の等電点付近に試料溶液の pH を調整することによって, カラムへの保持が可能となった。しかし APM は, 試料溶液 10 ml をカラムに負荷する際に pH の調整を行っても, 充てん量の少ないセップバック C₁₈ では負荷する際に 19%, 洗浄する際に 22% 溶出し, 充てん量 500 mg のボンドエルート C₁₈ では負荷する際に 4%, 洗浄する際に 34% 溶出した。しかし, 保持容量の大きい充てん量 1,000 mg のボンドエルート C₁₈ ではほぼ全量保持することができたので, これを前処理カラムとした。

2) 試料溶液の pH 調整

APM は両性物質であるため試料溶液の pH が APM のカラムへの保持に大きく影響するので, 3 種の甘味料のカラムへの保持に及ぼす試料溶液の pH について検討した。なお, 試料溶液としては 50 ml のメスフラスコに

Fig. 1. Effect of the pH of McIlvaine buffer for preparation of sample solution on the recoveries of the sweeteners from Bond Elut C₁₈ (1,000 mg)

○—○: acesulfame K; △—△: saccharin;
□—□: aspartame

Sweeteners solution 10 ml (each 40 μg/ml) was added to Bond Elut C₁₈ (1,000 mg).

Fig. 2. Elution profiles of the sweeteners from Bond Elut C₁₈ (1,000 mg)

○—○: acesulfame K; ●—●: saccharin;
□—□: aspartame

Eluent was methanol-McIlvaine buffer pH 3.0 (3:7)

200 μg/ml の混合標準溶液 10 ml 及び 0.1 M TBA-Br 溶液 2 ml を加えた後、pH 2~6 に調整した McIlvaine 緩衝液で各々 50 ml としたものをを用い、この 10 ml を充てん量 1,000 mg のボンデルート C₁₈ に負荷した。結果は、Fig. 1 に示したように AK 及び SA は pH 2~6 の範囲で全量カラムに保持できたことから、AK 及び SA と TBA のイオンペアーは幅広い pH 領域でカラムに保持できることが分かった。一方、APM は pH 4~5 の範囲で全量保持できたので、試料溶液の pH は McIlvaine 緩衝液で pH 4.5 付近に調整することとした。

Fig. 3. Effect of ion-pair reagents on separation of acesulfame K and saccharin

1, acesulfame K; 2, saccharin

Operating conditions: column, Finepak SIL C₁₈S (5 μm, 150×4.6 mm i.d.); mobile phase, (A) methanol-water (7:3) containing 0.03 M cetyltrimethylammonium chloride, pH 4.0, (B) methanol-water (4:3) containing 0.03 M tetra-*n*-butylammonium bromide, pH 4.0, (C) methanol-water (2:8) containing 0.03 M tetraethylammonium hydroxide, pH 4.0; flow rate, 1.0 ml/min; detect, UV 210 nm

3) 溶出溶媒の検討

ボンデルート C₁₈ からの 3 種の甘味料の溶出条件について検討した。なお、溶出溶媒の組成は低極性物質が極力溶出せず、しかも、3 種の甘味料が 10 ml 前後で溶出できるメタノール-McIlvaine 緩衝液の混合比、3:7 に設定した。続いてこの McIlvaine 緩衝液の pH について検討したところ、カラムからの溶出の最適 pH は AK, SA 及び APM とともに 2.5~4.0 の範囲であった。しかし、pH 4.0 では APM を完全に溶出させるのに 10 ml 以上を必要とし、pH 4.0 以下ではより少ない溶出液量で回収できたため、溶出溶媒に用いる McIlvaine 緩衝液の pH は 3.0 とすることとした。次に溶出液量について検討したところ、Fig. 2 に示したように AK 及び APM は 8 ml, SA は 9 ml でほぼ全量溶出したので溶出液量は確実性を考慮して 10 ml で行うこととした。

なお、このクリーンアップ条件では、保存料である安息香酸 (BA)、着色料の一部、天然成分であるカフェイン (CA) などが同時に溶出したが、パラオキシ安息香酸エステル類、クエン酸などの有機酸類、ショ糖などが除去できることが分かった。

2. HPLC 条件の検討

1) イオンペアー試薬の選択

先に述べたように強酸性物質である AK と SA はそのままではカラムに保持されにくいため、移動相にイオンペアー試薬を添加することによりカラムへの保持能を

Fig. 4. Effect of the pH of mobile phase on the retention time of the sweeteners, benzoic acid and caffeine

○—○: acesulfame K; △—△: saccharin;
□—□: aspartame; ●—●: caffeine; ▲—▲: benzoic acid

Operating conditions were the same as described in Fig. 3 except for mobile phase. Mobile phase was methanol-water (2:8) containing 0.03 M tetraethylammonium hydroxide.

高めることとした。イオンペアー試薬としては TEA-OH, TBA-Br 及び塩化セチルトリメチルアンモニウム (CTA) について検討した。なお、カラムとして Finapak SIL C₁₈S, 移動相にはメタノール-水系を用い、pH は中性付近で行った。結果は Fig. 3 に示したように、CTA を用いた際は AK と SA の保持時間は極めて近似し、両者の分離は不完全であった。また、両者の分離度はイオンペアー試薬の分子量が小さいほど大きくなる傾向を示し、TEA-OH で最も良い分離を得たのでこれを用いることとした。なお、移動相に添加する TEA-OH の濃度は、0.01 M 以下では AK と SA のピークがややブロードになる傾向が認められたのでシャープなピークを得るために、0.03 M とした。

なお、この条件において AK, SA 及び APM を分析したところ、APM の保持時間は AK と SA に比べ遅かった。そこで、APM は pH の影響を強く受けることが考えられるため、次に移動相の pH について検討した。

2) 移動相の pH

3 種の甘味料の保持時間に及ぼす移動相の pH の影響について検討した結果を Fig. 4 に示した。なお、移動相のメタノール濃度は 20% で行うこととし、また、清涼飲料水に含まれる可能性があり、しかも前処理で 3 種の甘味料と同時に溶出する BA 及び CA についてもあわせて検討した。AK, SA 及び CA の保持時間は pH 2~6 の間でほとんど変化は認められなかったが、APM 及び

Fig. 5. Effect of the concentrations of methanol on the retention time of the sweeteners, benzoic acid and caffeine

○—○: acesulfame K; △—△: saccharin;
□—□: aspartame; ●—●: caffeine; ▲—▲: benzoic acid

Operating conditions were the same as described in Fig. 3 except for mobile phase. Mobile phase was methanol-water containing 0.03 M tetraethylammonium hydroxide, pH 4.0.

Fig. 6. Absorption spectra of the sweeteners at a concentration of 10 µg/ml

—: acesulfame K;: saccharin;
---: aspartame

BA は pH により大きく変化し、pH 2 では SA と APM, pH 4.5 では APM と BA, pH 5~6 では SA と BA との分離が不十分であった。そこで、移動相の pH は 3 種の甘味料、BA 及び CA との相互分離が良い pH 4 で行うこととした。

3) 移動相の組成

メタノール濃度による 3 種の甘味料、BA 及び CA の

分離, 分析時間への影響について検討した結果を Fig. 5 に示した. メタノール濃度 10~15 v/v% では 3 種の甘味料, BA 及び CA の分離が良好であったが, 分析時間に 40 分以上の時間を要し, 30 v/v% では 20 分以内と短時間で終了したが, APM と CA の分離が不十分であった. 20 v/v% では 3 種の甘味料, BA 及び CA との分

離も良く, しかも分析時間も 30 分以内に終了した. なお, 移動相の溶媒組成については, メタノール-水系の他にアセトニトリル-水系についても検討したが, AK と SA の分離が不十分であった.

4) 検出波長

3 種の甘味料の紫外外部吸収スペクトルは Fig. 6 に示したとおりで, いずれも同濃度で比較した場合, AK の最

Fig. 7. High performance liquid chromatogram of the sweeteners

1: acesulfame K; 2: saccharin; 3: aspartame

Operating conditions: column, Finepak SIL C₁₈S (5 µm, 150×4.6 mm i.d.); mobile phase, methanol-water (2:8) containing 0.03 M tetraethylammonium hydroxide pH adjusted 4.0; flow rate, 1.0 ml/min; detect, UV 210 nm

Fig. 8. High performance liquid chromatograms of sample extracts added the sweeteners

(A): cola; (B): strawberry syrup; (C): apple juice; (D): canned coffee; 1: acesulfame K; 2: saccharin; 3: aspartame

Operating conditions were the same as described in Fig. 7.

Table 1. Recoveries of the Sweeteners from Soft Drinks

Sample	Recovery* (%)					
	Acesulfame K		Saccharin		Aspartame	
	50 µg/g	200 µg/g	50 µg/g	200 µg/g	50 µg/g	200 µg/g
Carbonated beverage	98	97	95	95	96	95
Cola	97	96	96	93	90	95
Fruits flavored and colored drinks	99	99	99	97	96	102
Apple juice	102	102	98	97	94	97
Strawberry syrup	96	95	97	95	93	100
Lactic acid bacteria beverage	101	99	93	93	91	95
Canned coffee	101	99	104	97	91	95
Canned oolong tea	101	99	95	95	95	96

* Average of 3 times

大吸収波長である 227 nm 付近の吸光度は AK と SA がほぼ同じで、APM は 1/10 以下であった。そこで、3 種の甘味料の同時分析法であることを考慮し、AK と APM がほぼ同程度の吸光度を示し、SA がその約 2 倍を示す 210 nm を検出波長に設定した。

3. 検量線の作成

AK, SA 及び APM とも 2~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性を示した。なお繰り返し精度は、50 $\mu\text{g/ml}$ の標準溶液 20 μl を 7 回繰り返し測定した際、いずれも相対標準偏差 (RSD) は 1% 以下であった。標準品のクロマトグラムを Fig. 7 に示した。また、本法における定量限界は試料中濃度としていずれも 10 $\mu\text{g/g}$ であった。

4. 添加回収実験

炭酸飲料、コーラ、無果汁飲料、リンゴジュース、イチゴシロップ、乳酸菌飲料、缶入りコーヒー及び缶入りウーロン茶の 8 種類の清涼飲料水に AK, SA 及び APM が各々 50 $\mu\text{g/g}$, 200 $\mu\text{g/g}$ となるように添加し、本法に従って操作し、その結果を Table 1 に示した。回収率は AK で 95~102%, SA で 93~104%, APM で 90~102% であり、いずれの清涼飲料水においても 3 種の甘味料のリテンションタイム付近に妨害となるピークは認められなかった。なお、試料のクロマトグラムの一例を Fig. 8 に示した。

ま と め

HPLC による清涼飲料水中の AK, SA 及び APM の同時分析法について検討した。

1) 試料にイオンペアー試薬 (TBA-Br) を添加し、ポ

ンドエルト C_{18} (1,000 mg) で前処理することにより HPLC カラムの保護及び分析時間の短縮を可能とした。

2) 移動相にイオンペアー試薬 (TEA-OH) を添加し、pH を 4.0 に調整することにより、AK, SA 及び APM の同時分析を可能とした。

3) 本法における AK, SA 及び APM の検出限界はいずれも 10 $\mu\text{g/g}$ であった。

4) AK, SA 及び APM を各々 50 $\mu\text{g/g}$, 200 $\mu\text{g/g}$ となるように添加した際の回収率は、いずれも 90% 以上であった。

謝 辞

本研究に当たり、貴重な資料及び標準品を提供していただいた、ヘキストジャパン株式会社に深謝致します。

文 献

- 1) Hough, C. A. M., Parker, K. J., Vlitos, A. J., "Developments in Sweeteners—1", p. 151~158 (1979), Applied Science Publishers Ltd., London.
- 2) Rymon, L. G.-W. von: ジャパンフードサイエンス **9**, 78~82 (1985).
- 3) Rymon, L. G.-W. von, Brixius, H.-Ch.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **168**, 212~213 (1979).
- 4) Zache, U., Gründing, H.: *ibid.* **184**, 503~509 (1987).
- 5) Veerabhadrrao, M., Narayan, M. S., Kapur, O.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70**, 578~582 (1987).
- 6) Lawrence, J. F.: Analyst. **112**, 879~881 (1987).
- 7) GroBpietsch, H., Hachenberg, H.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **171**, 41~43 (1980).