

【検討目的】

アスパルテームは砂糖より甘味がある低カロリーの合成甘味料で、飲料や食品に砂糖の代替品として利用されており、令和5年の薬生食基発05291第1号「食品中の食品添加物分析法」の改正についてにおいて、分析方法を改定されたところである。本検討では改正された分析法に基づいて、アスパルテームの分析に用いる固相カラム、必要な溶出溶媒量や洗浄溶媒等の検討を行い、得られた知見について報告する。

【方法】

検討① 各種固相によるアスパルテームの溶出挙動の確認

試験法では固相カラムについて、「陽イオン交換固相-逆相ミックスマードイオン交換固相カラム」と記載されている。本検討はそれに相応する3種類の固相カラムを検討した。

各種固相からアスパルテームの溶出に必要な溶媒量を確認するため、0.01 mol/L塩酸にアスパルテームを添加し、各固相カラムに負荷した。水、メタノールで洗浄後、0.5 mol/L塩化アンモニウム/アセトニトリル(3:2)で溶出した。溶出する際は1分画を1mLとし、10分画を採取し、各分画液中のアスパルテームを分析した。

表1：使用したミックスマードイオン交換固相の仕様

固相	官能基	粒子径
InertSep MCX	スルホン酸基を修飾したスチレンジビニルベンゼン共重合体	30 μm
InertSep MCX FF	スルホン酸基を修飾したスチレンジビニルベンゼン共重合体	70 μm
InertSep MPC	スルホン酸基とオクタデシル基を修飾したスチレンジビニルベンゼン共重合体	40 μm

検討② 固相の選定と透析外液中のアスパルテームの回収率の確認

固相の種類を選定するため、アスパルテームを含まない試料5種類を透析処理したサンプル液にアスパルテームを添加し、回収率を確認した。

検討③ 洗浄液の検討

「検討②」において醤油透析液の分析では、夾雑成分が多く検出されたため、洗浄用の溶媒及びその溶媒と水の混合比を検討した。洗浄液の違いによる夾雑成分の除去効果を確認した。

➤ 前処理手順

前処理手順は図1のフローに示した。

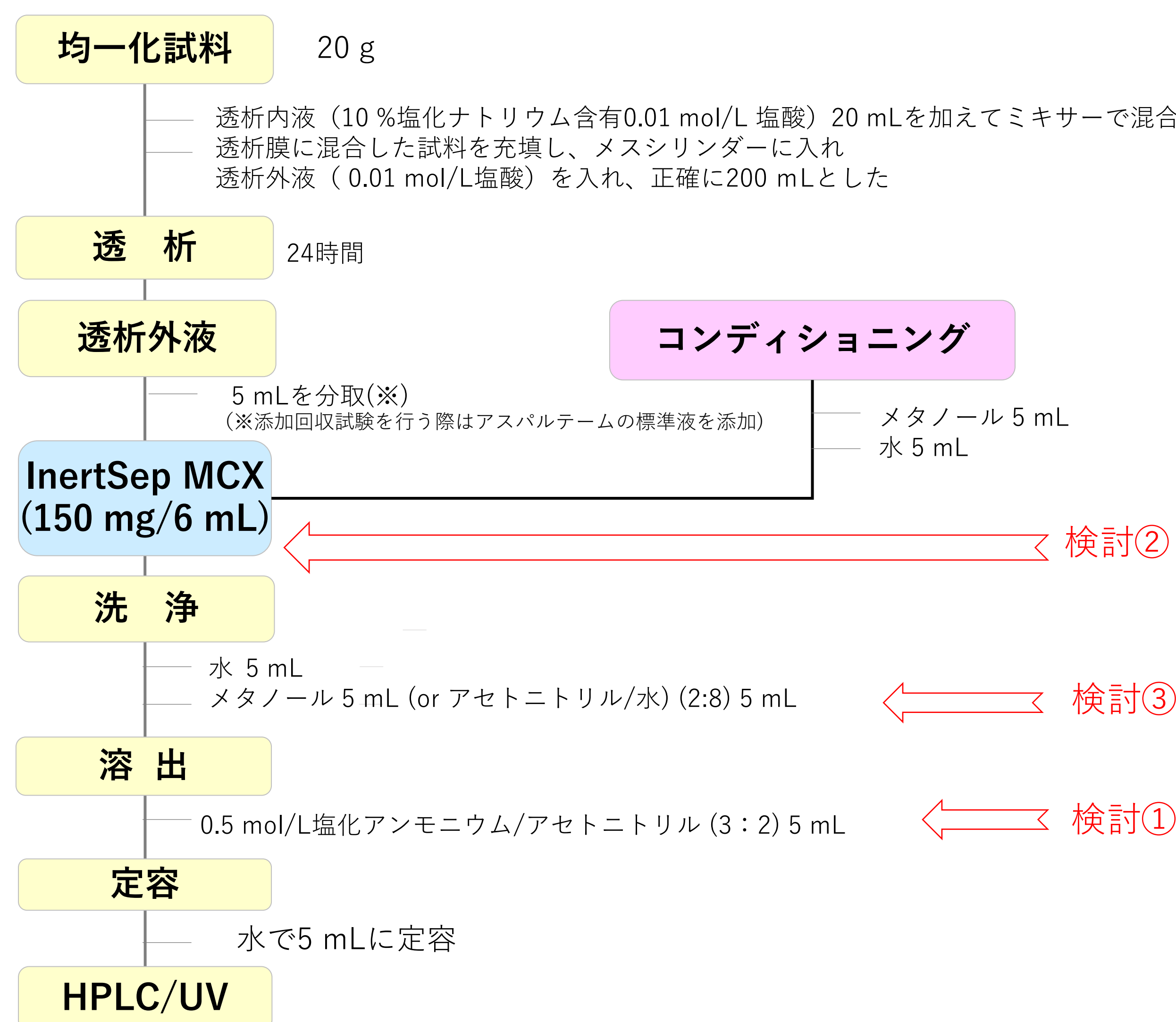


図1：前処理の手順

➤ 分析条件

HPLC System : Primaide
Column : InertSustain C18 (GL Sciences Inc.)
(5 μm, 4.6 mm I.D. x 150 mm)
Eluents : A) 0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0)
B) メタノール
A/B = 3/1 (v/v)
Flow Rate : 1 mL/min
Col. Temp. : 40 °C
Detection : UV 210 nm
Injection Vol. : 20 μL

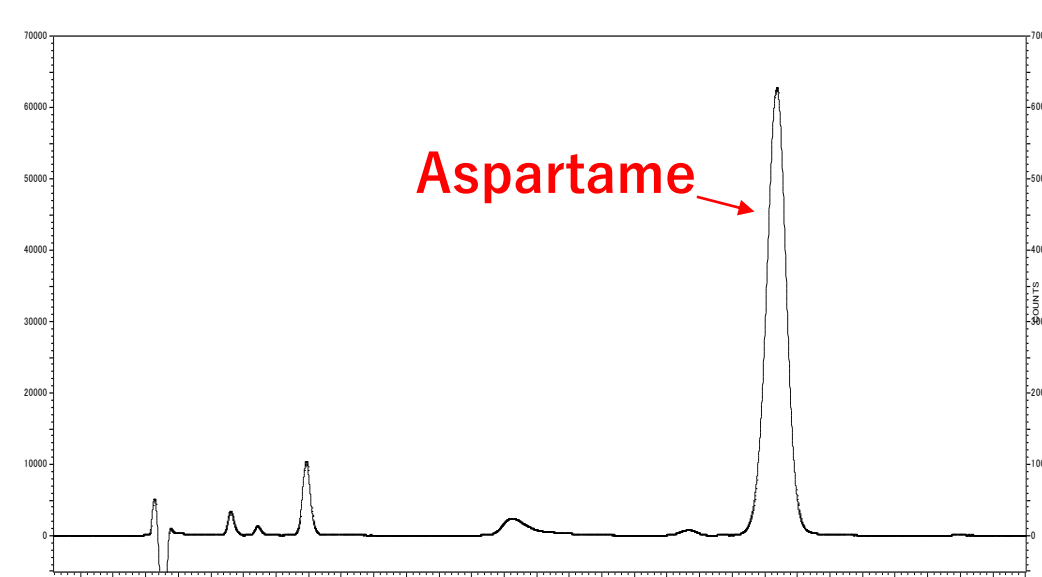


図2：アスパルテーム標準液(0.01mg/mL)を測定したクロマトグラム

【検討結果】

結果① 各種固相によるアスパルテームの溶出挙動の確認

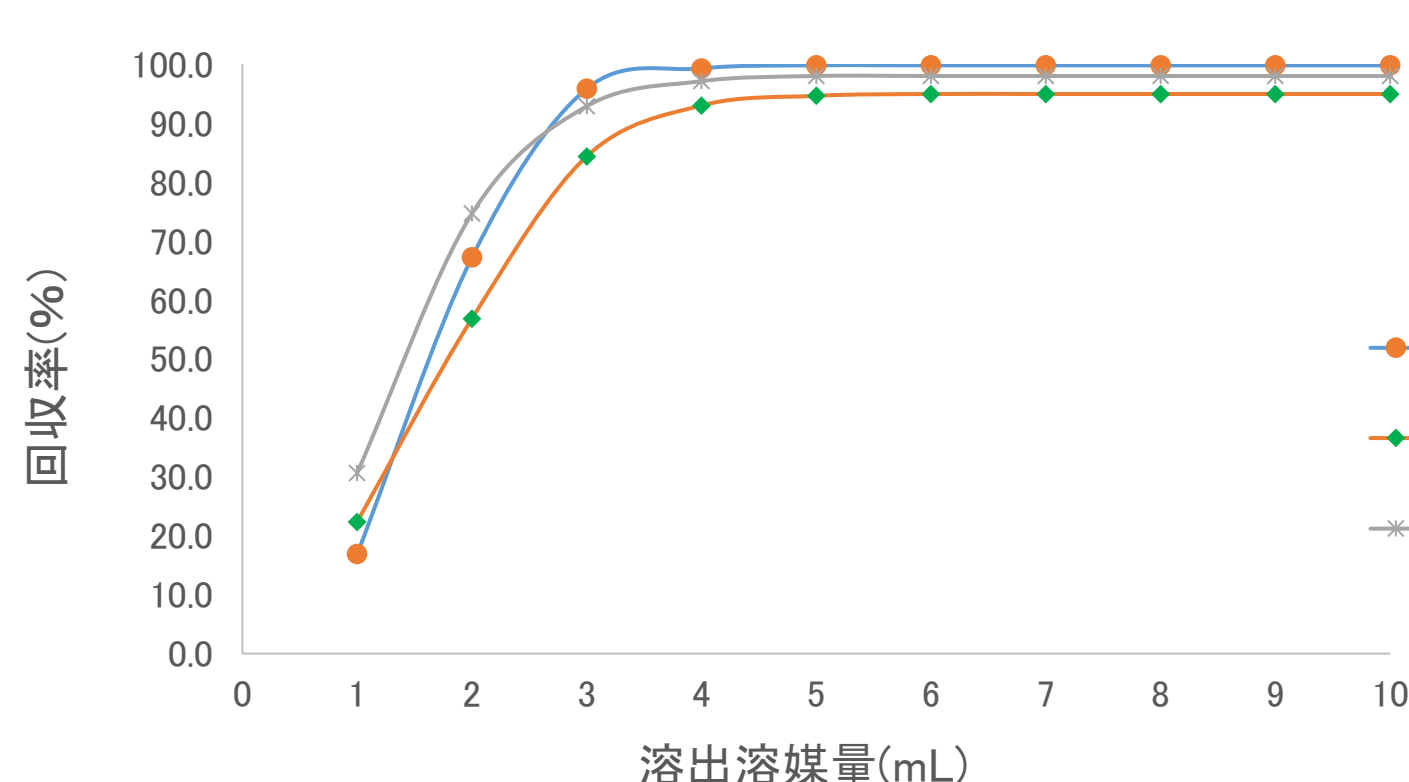


図3：各固相カラムにおけるアスパルテーム溶出挙動

溶出挙動を確認した結果、使用した全ての固相において5 mLの溶出量で、アスパルテームが溶出できることが確認された。そのため、溶出溶媒量は5 mLに設定した。試験法では溶出溶媒量を9 mL、水で10 mLに定容したものを最終分析用試料液とし、試料負荷量と同じとなるように設計されている。本検討においては最終分析用試料液を5 mLとすることができたため、試料負荷量も5 mLに変更し、以後の検討を行うことにした。

表2：各溶出分画液中におけるアスパルテームの回収率(%)

分画	MCX	MCX FF	MPC
Fr1	16.9	22.3	30.6
Fr2	50.3	34.5	44.0
Fr3	28.6	27.5	18.2
Fr4	3.4	8.6	4.3
Fr5	0.5	1.6	0.9
Fr6	0.0	0.3	0.0
Fr7	0.0	0.0	0.0
Fr8	0.0	0.0	0.0
Fr9	0.0	0.0	0.0
Fr10	0.0	0.0	0.0

結果② 固相の選定と透析外液中のアスパルテームの回収率の確認

表1に示した3種の固相を使い、ヨーグルトと醤油の透析外液中の添加回収試験を行った。その結果、ヨーグルトでは検討した固相カラム全てで高い回収率が得られた。しかし、醤油の場合、MCXとMCX FFの回収率は良好だったが、MPCでの回収率は低かった。また、試料負荷後の固相を確認すると、MCX FFよりMCXのほうがマトリックス成分の吸着バントが細かった(図4)ことから、溶出時の夾雑成分の影響も加味し、固相はInertSep MCXにした。

表3 各固相における試料透析外液中のアスパルテーム回収率(%)

固相カラム	ヨーグルト	醤油
InertSep MPC	95.6	64.0
InertSep MCX	97.4	93.8
InertSep MCX FF	94.5	94.3

(試料中 0.1 g/kg 相当, n=3)

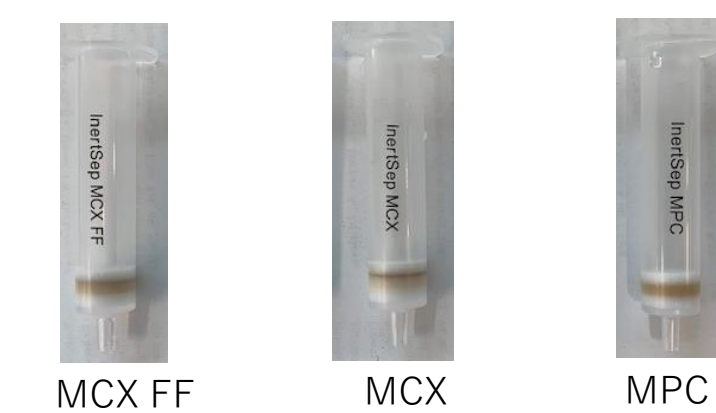


図4 醤油抽出液処理後の固相カラム写真

InertSep MCXを用いて、5種類の試料の透析外液の添加回収試験を行った。その結果、どの試料に対しても添加回収率は90%以上となり、良好であった(表4)。

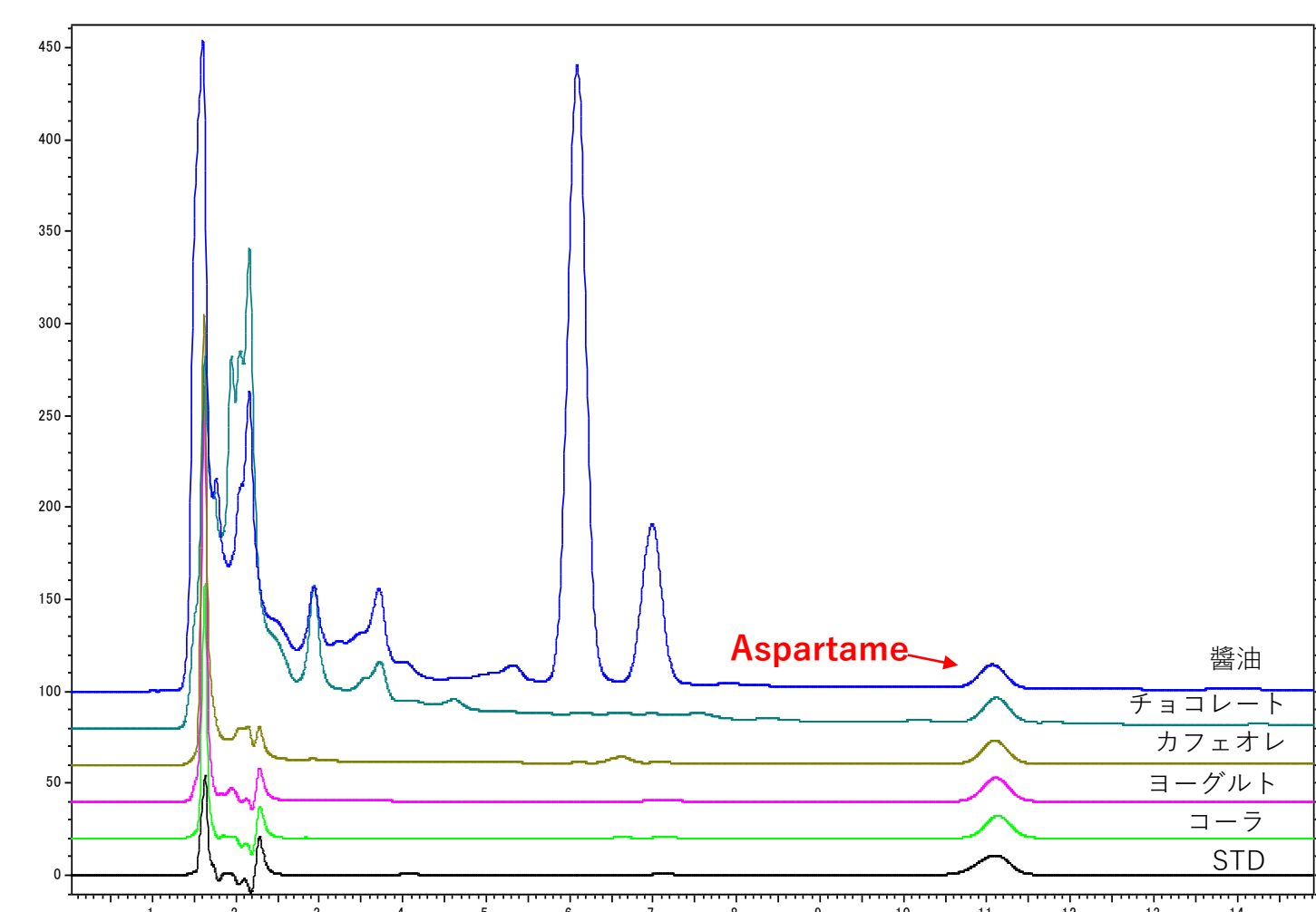


図5 各種透析外液の固相処理液のクロマトグラム

ここで、醤油やチョコレートにおいて、クロマトグラム上に妨害成分が多く検出されていた(図5)ことから、固相の洗浄行程を見直すことにした。

結果③ 洗浄液の検討

洗浄液として、試験法で使用されているメタノールのほか、アセトニトリル、アセトニトリルと水の混合液で洗浄効果の比較を行った結果を図6に示した。その結果、アセトニトリルと水混合溶液が一番洗浄効果が高いことがわかった。

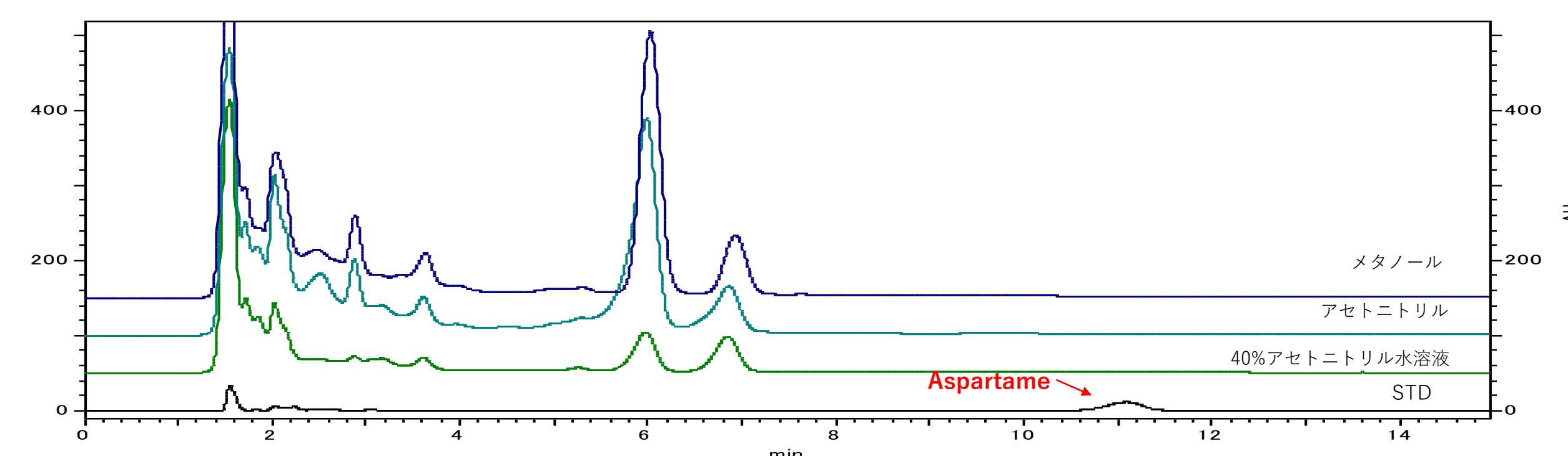


図6：3種の固相洗浄液で洗浄操作を行い溶出させた場合のクロマトグラム(醤油)

より適切なアセトニトリルと水の混合比率を検討するため、アセトニトリルと水の混合比率を変更して、洗浄効果及び回収率の確認を行った。

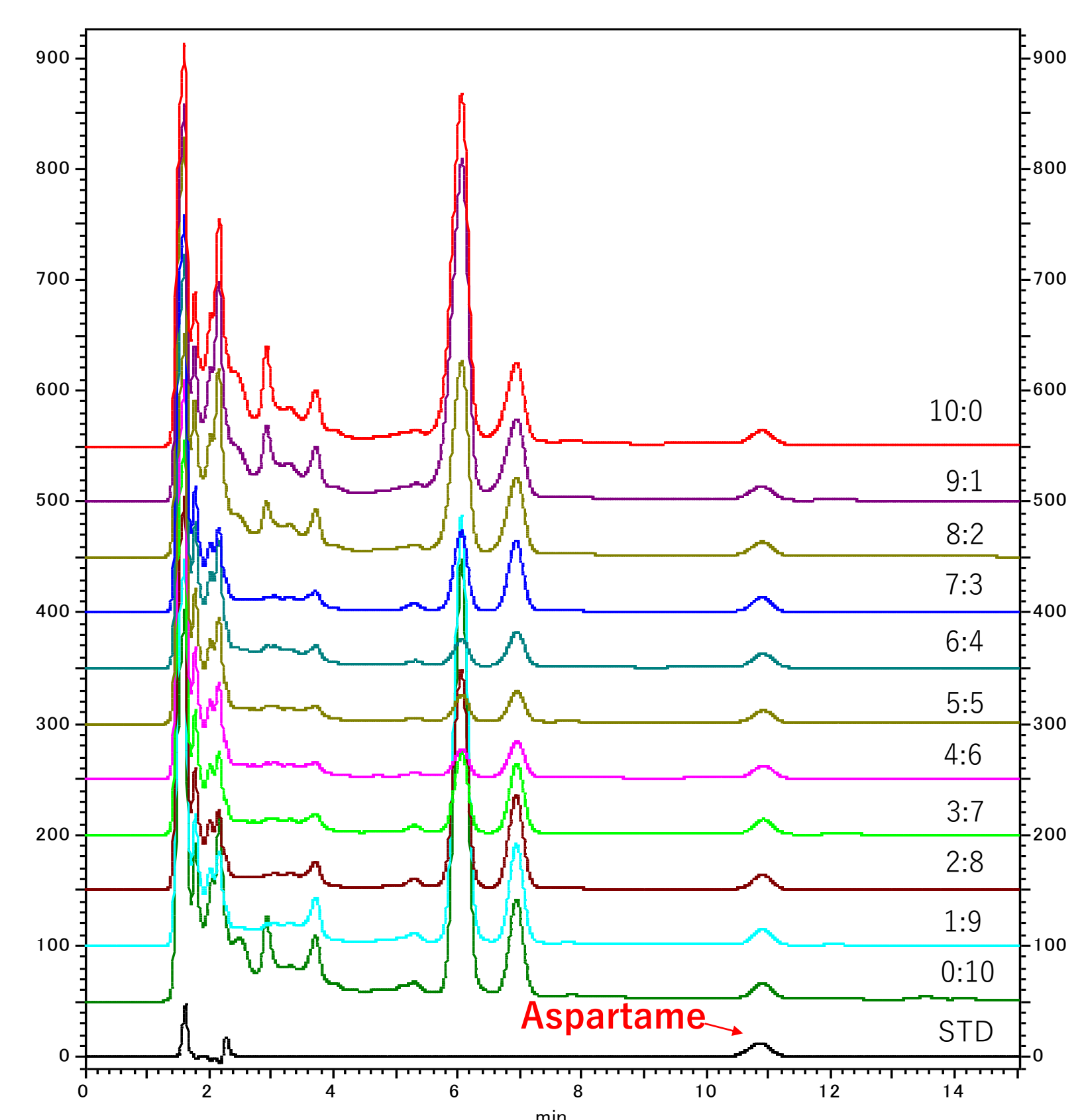


図7：各洗浄液による処理液のクロマトグラム

表5：混合比に異なる洗浄液によるアスパルテームの回収率

アセトニトリル/水	回収率(%)
10:0	91.6
9:1	94.6
8:2	92.9
7:3	90.4
6:4	88.0
5:5	77.4
4:6	82.1
3:7	90.9
2:8	90.0
1:9	94.1
0:10	97.4

表6：アセトニトリル/水(2:8)洗浄による醤油中アスパルテームの回収率

回収率(%)	RSD(%)
94.0	2.8

(試料中 0.1 g/kg 相当, n=2, 3day)

各種洗浄液の洗浄効果を比較した結果、アセトニトリル/水(5:5)の洗浄効果が一番高かった(図7)。しかし、アスパルテームの回収率は一番低かったことから(表5)、比較的洗浄効果が高く、アスパルテームの回収率が安定するアセトニトリル/水(2:8)を洗浄液に用いることとした。再度醤油の透析外液の添加回収試験を行ったところ、回収率の結果は良好であった(表6)。

【結論】

- 溶出溶媒量の設定と試料通液量について
分画試験において検討したすべての固相において、5 mLの溶出液でアスパルテームを溶出することができたため、溶出液の量は5 mLに設定した。それに伴い試料負荷量も5 mLに変更した。
- 固相カラムについて
固相カラムは比較的保持が強く少ない溶媒量で溶出できるInertSep MCXを選択した。
- 洗浄操作について
醤油のような夾雑成分が多い試料では、アセトニトリル/水(2:8)を用いることで比較的高い洗浄効果が得られた。
- アスパルテームの回収率について
検討した食品透析外液中のアスパルテームの回収率は90%以上であった。