

การศึกษาความเสถียรและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของแอสพานทาม

โดยใช้เทคนิคเอพีไอ-เอ็มเอส

นาย ชัชพล สารชานะกิจ



สถาบันวิทยบริการ
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-634-994-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**STUDY OF ASPARTAME STABILITY AND ITS DEGRADATION PRODUCTS
BY API-MS TECHNIQUE**



Mr. Chatchapol Sanchavanakit

สถาบันวิทยบริการ

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science**

Department of Chemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-634-994-5

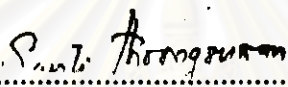
Thesis Title **STUDY OF ASPARTAME STABILITY AND ITS
DEGRADATION PRODUCTS BY API-MS TECHNIQUE**

By **Mr. Chatchapol Sanchavanakit**

Department **Chemistry**

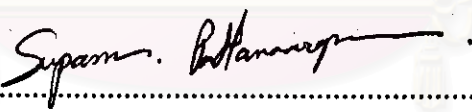
Thesis Advisor **Miss Supason Pattanaargson, Ph.D.**

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree



..... **Dean of Graduate School**
(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee


..... **Chairman**
(Associate Professor Siri Varothai, Ph.D.)


..... **Thesis Advisor**
(Miss Supason Pattanaargson, Ph.D.)


..... **Member**
(Associate Professor Sophon Roengsumran, Ph.D.)


..... **Member**
(Assistant Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ชัชพล สารชวณะกิจ : การศึกษาความเสถียรและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ
แอสพาทามโดยใช้เทคนิคเอพีไอ-เอ็มเอส (STUDY OF ASPARTAME STABILITY
AND ITS DEGRADATION PRODUCTS BY API-MS TECHNIQUE)


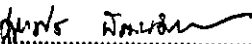
อ.ที่ปรึกษา : อ.ดร.ศุภศร พัฒนอักษร, 134 หน้า. ISBN 974-634-994-5

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาความเสถียรของแอสพาทาม (แอสพาทิล ฟีนิลอะลานีน เมซิลเอสเทอร์) ที่พีเอชของสารละลาย, เวลาและอุณหภูมิในการเก็บสารละลายต่าง ๆ กัน งานนี้ยังได้ศึกษาเส้นทางการสลายตัวของแอสพาทามด้วย การวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้อิเล็กโตรสเปย์-แมสสเปคโตรเมตรีในการทำคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์แอสพาทามและสารที่เกิดจากการสลายตัวของแอสพาทามเป็นครั้งแรก ตัวแปรต่าง ๆ ได้ถูกปรับเพื่อให้ได้ความไวสูงสุดในการวิเคราะห์แอสพาทาม (ขีดจำกัดของการตรวจวัด 0.2 ส่วนในล้านส่วน) วิธีนี้ยังสามารถวิเคราะห์สารที่เกิดจากการสลายตัวของแอสพาทาม (กรดแอสพาทิก, แอสพาทิล ฟีนิลอะลานีน, ไตคติโดพิเพอราซีน, ฟีนิลอะลานีนและฟีนิลอะลานีน เมซิลเอสเทอร์) ได้พร้อมกันอีกด้วย ผลการทดลองพบว่าแอสพาทามในสารละลายที่พีเอชต่าง ๆ สลายตัวในเส้นทางต่าง ๆ กัน

จากการวิเคราะห์เครื่องต้มที่ผสมแอสพาทามที่มีขายในกรุงเทพฯ พบว่า แอสพาทามสลายตัวไปบางส่วน โดยเมื่อเก็บไว้นาน 8 เดือนแอสพาทาม 80 เปอร์เซ็นต์จะสลายตัวให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นไตคติโดพิเพอราซีน ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ามีเมฆานอลเกิดขึ้นมาพร้อมกันด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาเคมี.....
สาขาวิชาเคมี.....
ปีการศึกษา2539.....

ลายมือชื่อนิสิต 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -
.....

** C725155 : MAJOR CHEMISTRY
KEY WORD: ASPARTAME / API-MS / ELECTROSPRAY / LC-MS / SOFT DRINKS

CHATCHAPOL SANCHAVANAKIT : STUDY OF ASPARTAME STABILITY
AND ITS DEGRADATION PRODUCTS BY API-MS TECHNIQUE.

THESIS ADVISOR : MISS SUPASON PATTANAARGSON,
Ph.D. 134 pp. ISBN 974-634-994-5

In this study the stability of aspartame (aspartyl phenylalanine methyl ester) under various pH condition, time and temperature were determined. Study of aspartame degradation chemistry was also included. In order to perform these studies, new analytical method for aspartame- and its degradation products-analyses was also developed. Here, electrospray-mass spectrometry was firstly applied for aspartame analysis quantitatively and qualitatively. The method was optimized to give the best sensitivity of aspartame (detection limit 0.2 ppm) and to simultaneously analyze various degradation products (aspartic acid, aspartyl phenylalanine, diketopiperazine, phenylalanine and phenylalanine methyl ester). The study of aspartame stability under various pH conditions revealed that aspartame degraded into various degradation products via different pathways under different pH conditions.

Softdrinks sweetened with aspartame sold in Bangkok were tested and the results showed that the aspartame was partly degraded. If kept for more than 8 months 80 % of aspartame was degraded and diketopiperazine was the major degradation products. The result implies the release of methanol upon the degradation.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....เคมี.....

ลายมือชื่อนิสิต..... *[Signature]*.....

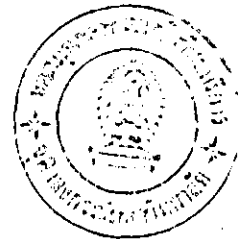
สาขาวิชา.....เคมี.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *[Signature]*.....

ปีการศึกษา.....2539.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... -.....

Acknowledgements



First of all, I would like to dedicate this work to my parents with all my love.

Secondly, I would like to thank my thesis advisor, Dr. Supason Pattanaargson, for all her patience and guidance through this graduate research.

I would like to extend my sincere thanks to my friends and faculty members in the Department of Chemistry. In particular, special thanks go to Dr. Sophon Roengsumran and Dr. Amorn Petsom for their generosity and to Dr. Siri Varothai for his helpful advices.

Finally, I would like to express my gratitude to Mr. Polkit Sangvanich and Dr. Tirayut Vilaivan with their supports either physically, or mentally, problems can always be handled more easily.

สถาบันวิทยบริการ

Chatchapol Sanchavanakit

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Contents

	Page
Abstract (in Thai).....	iv
Abstract (in English)	v
Acknowledgements.....	vi
List of Tables.....	viii
List of Figures.....	x
List of Abbreviations.....	xvii
Chapter	
I Introduction.....	1
II Experiments.....	18
III Results and Discussions.....	25
IV Conclusion.....	126
References.....	128
Appendix.....	130
Vita.....	134

List of Tables

Table	Page
3.1	Fragmented ions present in APCI mass spectrum of aspartame.....38
3.2	Fragmented ions present in APCI mass spectrum of aspartic acid.....47
3.3	Fragmented ions present in APCI mass spectrum of aspartyl phenylalanine.....48
3.4	Fragmented ions present in APCI mass spectrum of diketopiperazine.51
3.5	Fragmented ions present in APCI mass spectrum of methanol.....52
3.6	Fragmented ions present in APCI mass spectrum of phenylalanine.....53
3.7	Fragmented ions present in APCI mass spectrum of phenylalanine methyl ester.....54
3.8	Fragment ions from the ionization of aspartame by ESI.....66
3.9	Some fragment ions from the ionization of aspartic acid by ESI.....67
3.10	Some fragment ions from the ionization of aspartyl phenylalanine by ESI.....68
3.11	Fragment ions from the ionization of phenylalanine by ESI.....68
3.12	Detection limit of aspartame and its degradation products by APCI..90
3.13	Detection limit of aspartame and its degradation products by ESI....91
3.14	Reproducibility of peak of aspartame molecular peak obtained by ESI.....93

Table	Page
3.15 Reproducibility of peak of aspartame molecular peak obtained by APCI.....	94
3.16 Comparison between ESI and APCI for the analysis of aspartame and its degradation products.....	96
3.17 Correction factor of 6 standards.....	99
3.18 Concentration of aspartame and its degradation products in Softdrinks kept for certain period at room temperature.....	122
3.19 Concentration of aspartame and its degradation products in dry products.....	124

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figure	Page
1.1 Structure of aspartame and its degradation products.....	2
1.2 Mass spectrometer components.....	9
1.3 Schematic of liquid interface and mass spectrometer.....	11
1.4 Ion evaporation mechanism.....	12
1.5 Schematic representation of electrospray source.....	13
1.6 Megaflow inlet.....	14
1.7 APCI ion generation mechanism.....	15
1.8 Schematic representation of APCI source.....	16
3.1 Fragmentation Pattern of aspartame at different cone voltage by APCI.....	27
3.2 SIR signal (at $M/Z = 295$) of 100 ppm aspartame at various cone voltages under APCI.....	28
3.3 SIR signal (at $M/Z = 295$) of 100 ppm aspartame at various APCI discharge needle voltages obtained under APCI.....	30
3.4 SIR signal (at $M/Z = 295$) of 100 ppm aspartame at various counter electrode voltages obtained under APCI.....	31
3.5 SIR signal (at $M/Z = 295$) of 100 ppm aspartame at various lens 2 voltages obtained under APCI.....	32

Figure	Page
3.6 SIR signal (at $M/Z = 295$) of 100 ppm aspartame at various lens 3 voltages obtained under APCI.....	33
3.7 SIR signal (at $M/Z = 295$) of 100 ppm aspartame at various source temperatures obtained under APCI.....	34
3.8 SIR signal (at $M/Z = 295$) of 100 ppm aspartame obtained under various mobile phase components.....	35
3.9 APCI mass spectrum of a) 1000 ppm aspartame and b) mobile phase under optimal condition.....	36
3.10 APCI mass spectrum of a) 850 ppm aspartic acid and b) mobile phase under optimal condition.....	41
3.11 APCI mass spectrum of a) 290 ppm aspartyl phenylalanine and b) mobile phase under optimal condition.....	42
3.12 APCI mass spectrum of a) 320 ppm diketopiperazine and b) mobile phase under optimal condition.....	43
3.13 APCI mass spectrum of a) absolute methanol and b) mobile phase under optimal condition.....	44
3.14 APCI mass spectrum of a) 1000 ppm phenylalanine and b) mobile phase under optimal condition.....	45
3.15 APCI mass spectrum of a) 940 ppm phenylalanine methyl ester and b) mobile phase under optimal condition.....	46

Figure	Page
3.16 Fragmentation Pattern of aspartame at different cone voltage by ESI.....	56
3.17 SIR signal (at M/Z = 295) of 100 ppm aspartame at various cone voltages obtained under ESI.....	57
3.18 SIR signal (at M/Z = 295) of 100 ppm aspartame at various capillary tip voltages obtained under ESI.....	58
3.19 SIR signal (at M/Z = 295) of 100 ppm aspartame at various counter electrode voltages obtained under ESI.....	59
3.20 SIR signal (at M/Z = 295) of 100 ppm aspartame at various lens 2 voltages obtained under ESI.....	60
3.21 SIR signal (at M/Z = 295) of 100 ppm aspartame at various lens 3 voltages obtained under ESI.....	61
3.22 SIR signal (at M/Z = 295) of 100 ppm aspartame at various source temperature voltages obtained under ESI.....	62
3.23 SIR signal (at M/Z = 295) of 100 ppm aspartame obtained under various mobile phase components.....	64
3.24 ESI mass spectrum of a) 1000 ppm aspartame and b) mobile phase under optimal condition.....	65
3.25 ESI mass spectrum of a) 1000 ppm aspartic acid and b) mobile phase under optimal condition.....	69

Figure	Page
3.26 ESI mass spectrum of a) 200 ppm aspartyl phenylalanine and b) mobile phase under optimal condition.....	70
3.27 ESI mass spectrum of a) 150 ppm diketopiperazine and b) mobile phase under optimal condition.....	71
3.28 ESI mass spectrum of a) Absolute methanol and b) mobile phase under optimal condition.....	72
3.29 ESI mass spectrum of a) 1000 ppm phenylalanine and b) mobile phase under optimal condition.....	73
3.30 ESI mass spectrum of a) 1000 ppm phenylalanine methyl ester and b) mobile phase under optimal condition.....	74
3.31 APCI SIR signal of 50 μ L aspartame solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	76
3.32 APCI SIR signal of 50 μ L aspartic acid solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	77
3.33 APCI SIR signal of 50 μ L aspartyl phenylalanine solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	78
3.34 APCI SIR signal of 50 μ L diketopiperazine solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	79
3.35 APCI SIR signal of 50 μ L absolute methanol of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	80

Figure	Page
3.36 APCI SIR signal of 50 μ L phenylalanine solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	81
3.37 APCI SIR signal of 50 μ L phenylalanine methyl ester solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	82
3.38 ESI SIR signal of 50 μ L aspartame solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	83
3.39 ESI SIR signal of 50 μ L aspartic acid solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	84
3.40 ESI SIR signal of 50 μ L aspartyl phenylalanine solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	85
3.41 ESI SIR signal of 50 μ L diketopiperazine solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	86
3.42 ESI SIR signal of 50 μ L absolute methanol of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	87
3.43 ESI SIR signal of 50 μ L phenylalanine solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	88
3.44 ESI SIR signal of 50 μ L phenylalanine methyl ester solution of the lowest concentration possible to give the signal to noise ratio of ≥ 3	89
3.45 Change of relative abundance in aspartame solution (pH 2).....	101

Figure	Page
3.46 Change of relative abundance in aspartame solution (pH 4).....	102
3.47 Change of relative abundance in aspartame solution (pH 6).....	103
3.48 Change of relative abundance in aspartame solution (pH 7).....	104
3.49 Change of relative abundance in aspartame solution (pH 8).....	105
3.50 Change of relative abundance in aspartame solution (pH 10).....	106
3.51 Degradation pathway of aspartame to phenylalanine methyl ester.....	107
3.52 Degradation pathway of aspartame to aspartyl phenylalanine.....	108
3.53 Degradation Pathway of aspartame to diketopiperazine.....	109
3.54 Summary of degradation pathways.....	110
3.55 Change of relative abundance in 500 ppm aspartame solution (pH 2)..	111
3.56 Change of relative abundance in 500 ppm aspartame solution (pH 4)..	112
3.57 Change of relative abundance in 500 ppm aspartame solution (pH 6)..	113
3.58 Change of relative abundance in 500 ppm aspartame solution (pH 7)..	114
3.59 Change of relative abundance in 500 ppm aspartame solution (pH 8)..	115
3.60 Change of relative abundance in 500 ppm aspartame solution (pH 10)..	116
3.61 Relative abundance of aspartame and its degradation products in standard aspartame solution kept at a) 4 °C b) 30 °C and c) 80 °C....	117
3.62 Calibration curve of aspartame.....	119
3.63 Calibration curve of aspartic acid.....	119
3.64 Calibration curve of aspartyl phenylalanine.....	120
3.65 Calibration curve of diketopiperazine.....	120

- 3.66 Calibration curve of phenylalanine.....121
- 3.67 Calibration curve of phenylalanine methyl ester.....121



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Abbreviations

APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
API	Atmospheric pressure ionization
APM	Aspartame
Asp	Aspartic acid
CI	Chemical ionization
Da/e	Dalton per charge
DKP	Diketopiperazine
EI	Electron impact
ESI	Electrospray ionization
FAB	Fast atom bombardment
GC	Gas chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
i.d.	Inside diameter
kDa	KiloDalton
kJ/g	Kilojoule per gram
kV	Kilovolt
LC	Liquid chromatography
LD	Laser desorption
M	Molar

mg/kg	Milligram per kilogram
min	Minute
mm	Millimeter
MS	Mass spectrometry
M/Z	Mass per charge
nm	Nanometer
Phe	Phenylalanine
PKU	Phenylketonuria
PME	Phenylalanine methyl ester
ppm	Part per million (mg of solute in one litre of solvent)
TSP	Thermospray
UV	Ultraviolet
µg	Microgram
µL	Microlitre
SIR	Selected ion recording
V/V	Volume by volume

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย