

# 甘味料ネオテームおよびアドバンテームの同時分析法の改良ならびに 市販加工食品の調査

大野藍莉, 原田利栄<sup>1)</sup>, 林千恵子<sup>2)</sup>, 本郷猛<sup>3)</sup>, 中里みさ子, 坂倉智子, 相田康一, 須賀正美

Improvement of Simultaneous Analysis Methods for  
Sweeteners Neotame and Advantame and Survey in Processed Foods on the market.

Airi OHNO, Rie HARADA, Chieko HAYASHI, Takeshi HONGO, Misako NAKAZATO,  
Tomoko SAKAKURA, Koichi AIDA, Masami SUGA

キーワード：甘味料、ネオテーム、アドバンテーム、LC-MS/MS

Keywords : sweetener, neotame, advantame, LC-MS/MS

(令和4年8月2日受付 令和4年9月30日受理)

## はじめに

高甘味度甘味料は砂糖の数十から数万倍の甘さを持つ物質であり、砂糖に比べ少量で甘みを付与できることから、主に菓子やカロリーオフ食品等の加工食品に使用されている。このうちネオテームは、アスパルテームをN-アルキル化することにより得られたジペプチドメチルエステル誘導体の甘味料であり、砂糖の7,000~13,000倍、アスパルテームの約30~60倍の甘みを持つ<sup>1)</sup>。また、アドバンテームは、アスパルテームと3-ヒドロキシ-4-メトキシ-フェニルプロピオンアルデヒドとの還元アルキル化反応により合成されるジペプチドメチルエステル誘導体の甘味料であり、砂糖の14,000~48,000倍、アスパルテームの約90~120倍甘いとされている<sup>2)</sup>。これらネオテームおよびアドバンテームは、菓子やカロリーオフ食品等の加工食品に使用されているが、その甘味度の高さから低濃度での使用が想定されるため、高感度な分析法の開発が必要となる。しかし、当所で実施していたネオテームおよびアドバンテーム分析の既存透析法は、試料中に共存する妨害成分の影響が大きく、加工食品の種類によって回収率が大きくばらつくという欠点があった。

そこで今回、田原ら<sup>3)</sup>、小林ら<sup>4)</sup>および鶴田ら<sup>5)</sup>の方法を参考にして試験溶液の調製法を改良し、様々な市販加工食品の測定に対応可能なLC-MS/MSを用いた高感度分析法の検討を行った。さらに本法を用いて市販加工食品の調査を行ったので報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

1) ネオテーム、アドバンテーム等の表示がある食品  
2021年6月から11月にかけて千葉市内で購入した原材料名にネオテーム、アドバンテームまたは香料の表示がある清涼飲料水、清涼菓子2種類、ガム、つゆ、米菓、氷菓、ビスケット、カレー、カップラーメン、ハム2種類、ベーコンの13試料を用いた。

### 2) 添加回収用食品

あらかじめネオテームおよびアドバンテームが含まれていないことを確認した清涼飲料水、清涼菓子、米菓、氷菓、カレー、カップラーメン、ベーコンの7試料を用いた。

### 2. 標準品・試薬等

1) 標準原液：Sigma-Aldrich社製ネオテーム(HPLC用)、Sigma-Aldrich社製アドバンテーム(HPLC用)をそれぞれ20mg精秤し、メタノールに溶解して全量を20mLとした(1,000µg/mL)。

2) 混合標準液：ネオテーム標準原液、アドバンテーム標準原液を各1mL分取し、メタノールで100mLとした(10µg/mL)。

3) 透析膜：Viskase社製セルロースチューブ36/32(平面幅44mm 直径28mm 膜厚0.0203mm)

4) 透析外液：0.01mol/L塩酸；水に5mol/L塩酸2mLを加え、1,000mLとした。

5) 透析内液：10%塩化ナトリウム-0.01mol/L塩酸溶液；塩化ナトリウム15gに0.01mol/L塩酸を加え、150mLとした。

1) 君津保健所 2) 松戸保健所 3) がんセンター

- 6) 富士フィルム和光純薬(株)製 1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液 (HPLC 用)
- 7) 富士フィルム和光純薬(株)製メタノールおよびアセトニトリル (LC/MS 用)
- 8) 15%アセトニトリル水溶液
- 9) 80%メタノール水溶液
- 10) メタノール：アセトニトリル：水=1：9：10 溶液
- 11) 移動相：5 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液；1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液 5 mL を水で 1,000 mL とした。
- 12) 固相抽出カラム：Waters 社製 Sep-Pak® C18 Plus (360 mg/0.7 mL) あらかじめメタノールおよび水各 5 mL で順次コンディショニングして使用した。
- 13) Diversified Biotech 社製 DURA SEAL DS4-500 (横幅 100 mm、長さ 152 mm)
- 14) その他の試薬：富士フィルム和光純薬(株)製超純水 (LC/MS 用)、その他は富士フィルム和光純薬(株)製試薬特級を使用した。

### 3. 装置

LC：(株)島津製作所製 Prominence LC-20AD

MS/MS：ABSCIEX 社製 3200QTRAP

### 4. 測定条件

#### 1) LC 条件

カラム：Waters 社製 ACQUITY UPLC® HSS T3 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 1.8 μm)、移動相 A 液：5 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液、移動相 B 液：メタノール、グラジエント条件：0 min B 5%→3 min B 70%→5 min B 70%→6 min B 99%→9 min B 99%→9.1 min B 5%→15 min B 5%、流速：0.4 mL/min、注入量：2 μL、カラム温度：40℃

#### 2) MS/MS 条件

イオン化モード：ESI (+)、測定モード：MRM  
Curtain Gas：10 psi、Ion Spray Voltage：5500 V、  
Temperature：700℃、Source Gas1：60 psi、Source Gas2：60 psi、Interface Heater：ON、Collision Gas：5、Collision Cell Exit Potential：4 V

測定イオンおよび測定条件

測定イオンおよび測定条件を Table 1 に示した。

Table 1. 測定イオンおよび測定条件

			DP	EP	CEP	CE
ネオテーム	定量イオン	379>172	46	10	16	31
	定性イオン	379>85	46	10	16	51
アドバンテーム	定量イオン	459>102	56	9.5	20	35
	定性イオン	459>84	56	9.5	20	53

DP：Declustering Potential、EP：Entrance Potential、

CEP：Collision Cell Ent.Potential、CE：Collision Energy

### 5. 試料の調製

固体試料については、細切後重量を量り、等量の水を添加してフードプロセッサーで均一化した。液体試料については、全量を等量の水と混合した。

### 6. 試験溶液の調製

田原ら<sup>3)</sup>、小林ら<sup>4)</sup> および鶴田ら<sup>5)</sup>の方法を参考にして既存法を改良した。

#### 1) 透析法

試料 20 g を透析内液 20 mL とともに一方を結び閉じた長さ 65 cm の透析チューブに充填した。空気を残さないようもう一方を結び閉じ、両端の結びしろを除去して透析チューブの長さ(有効長)を 55 cm とした。内容物を全体に行き渡らせた後、緩く 4 つに畳んで 500 mL メスシリンダーに入れ、外液を加えて全量を 200 mL にした。メスシリンダーの上部を DURA SEAL で蓋し、その上をパラフィルムで巻き、室温下で透析を開始した。混和は、転倒混和を 30 分ごとに行い、透析時間は 4 時間とした。精製は、透析外液 25 mL を Sep-Pak® C18 Plus に負荷し、15%アセトニトリル水溶液 5 mL で洗浄した。メタノール：アセトニトリル：水=1：9：10 溶液 5 mL で溶出後、5 mL に定容し、0.2 μm メンブランフィルターを用いてろ過したものを試験溶液とした。

#### 2) 溶媒抽出法

試料 5 g を 100 mL のポリプロピレン製遠沈管に量り採り、80%メタノール 50 mL を加えて 1 分間ホモジナイズした。室温、3,000 rpm (1,650 × g) で 5 分間遠心分離を行い、上清を分取した。残渣に 80%メタノール 40 mL を加えて 1 分間ホモジナイズした。さらに、室温にて 3,000 rpm (1,650 × g) で 5 分間遠心分離を行い、上清を分取した。上清を合わせ、80%メタノールで 100 mL に定容したものを抽出液とした。精製は、50 mL のポリプロピレン製遠沈管に抽出液 10 mL を分取し、そこに水 20 mL を加え混和したものを Sep-Pak® C18 Plus に負荷し、15%アセトニトリル水溶液 5 mL で洗浄した。メタノール：アセトニトリル：水=1：9：10 溶液 5 mL で溶出後、5 mL に定容し、0.2 μm メンブランフィルターを用いてろ過したものを試験溶液とした。

### 7. 検量線の作成

混合標準液をメタノール：アセトニトリル：水=1：9：10 溶液で希釈し、0.005~0.05 μg/mL の範囲で検量線用標準液を調製した。検量線は各対象物質の濃度範囲において、クロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により作成した。

## 結果及び考察

### 1. LC の条件検討

移動相とカラムの分析条件について Table 2 のとおり検討した。

Table 2. 既存法および改良法の分析条件

	既存法	改良法
移動相A	0.1% ギ酸水溶液	5 mmol/Lギ酸アンモニウム水溶液
移動相B	メタノール/アセトニトリル (4:1)	メタノール
グラジエント	0 min B 10% → 7.5 min B 70% → 10.5 min B 70% → 10.6 min B 10% → 18 min B 10%	0 min B 5% → 3 min B 70% → 5 min B 70% → 6 min B 99% → 9 min B 99% → 9.1 min B 5% → 15 min B 5%
流速 (mL/min)	0.4	0.4
注入量 (μL)	5	2
分離	メーカー 型式	メーカー 型式
カラム	Waters社製 XBridge BEH C18	Waters社製 ACQUITY UPLC® HSS T3
ム	粒子径 (μm) 内径×長さ(mm) カラム温度(°C)	粒子径 (μm) 内径×長さ(mm) カラム温度(°C)
	3.5 2.1×150 40	1.8 2.1×150 40

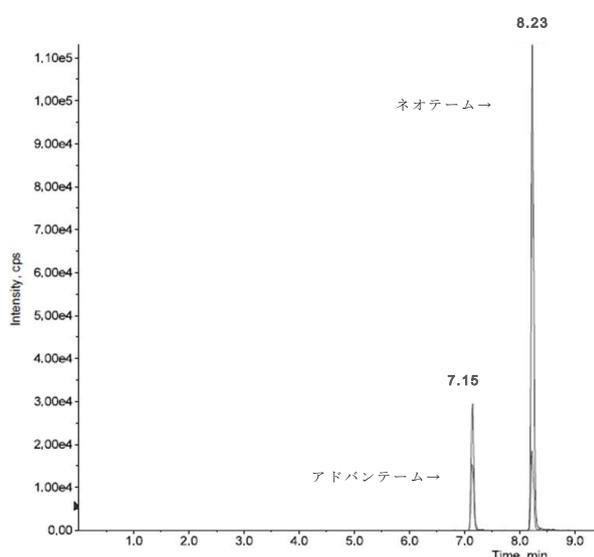


Fig.1-1. 既存法のピーク形状

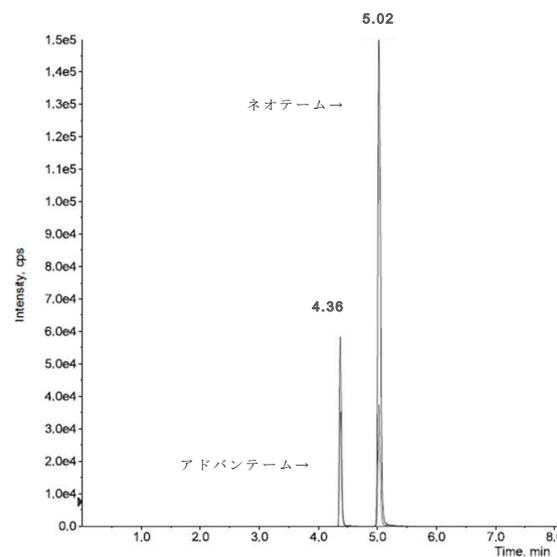


Fig.1-2. 改良法のピーク形状

カラムの粒子径を 3.5 μm から 1.8 μm、移動相をギ酸-メタノール/アセトニトリルからギ酸アンモニウム-メタノールに変更した。その結果、ピークの形状は良好で強度が増加し、S/N 比の確保が容易となった (Fig. 1-1 および 1-2)。また、分析カラムの粒子径の変更によって LC-MS/MS への注入量を 5 μL から 2 μL に減少させることができた。ネオテームの保持時間は 8.23 分から 5.02 分に、アドバンテームは 7.15 分から 4.36 分にそれぞれ短縮し、分析時間も 3 分短縮することが可能となった。

## 2. 透析容器の検討

既存透析法では、250 mL 広口の DURAN 瓶 (外径 70 mm × 高さ 138 mm) に透析膜を入れて透析後 DURAN 瓶の目盛りで 200 mL に定容を行っていたことから、目盛りの不確かさが測定精度に及ぼす影響が懸念された。

そこで、500 mL メスシリンダー (外径 55 mm × 全高 360 mm) に透析膜を入れ外液を加えて 200 mL に

Table 3. 固相抽出カラムへの負荷量および定容量ならびに回収率

濃縮倍率	負荷量 (mL)	定容量 (mL)	回収率 (%)	
			ネオテーム	アドバンテーム
10	50	5	124.0	148.0
5	25	5	91.2	96.7
2.5	25	10	86.1	86.2
1	10	10	73.6	80.9

添加量: 0.1 g/kg

定容することとした。メスシリンダーの上部を DURA SEAL で蓋し、透析外液が漏れないようにその上からパラフィルムを巻いて転倒混和を行った。容器の容積を大きくしたことで、容器内で透析膜が動きやすくなり、効率よく透析を行うことが可能となった。

## 3. 精製条件の検討

固相抽出カラム精製の負荷量と定容量の検討を行

Table 4. 7種類の加工食品の添加回収試験

試料	添加量 (g/kg)	透析法			
		ネオテーム		アドバンテーム	
		回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
清涼飲料水	0.1	101.1	6.61	104.9	5.60
清涼菓子	0.1	91.3	2.24	74.2	2.56
米菓	0.1	91.0	2.04	43.7	4.41
氷菓	0.1	106.1	4.60	103.0	3.67
カレー	0.1	95.2	3.32	91.1	2.37
カップラーメン	0.1	95.4	1.65	73.0	1.43
ベーコン	0.1	94.4	2.14	83.1	4.47

n=5

った。

既存透析法では、透析外液 50 mL を固相に負荷し、5 mL で溶出・定容していた（10 倍濃縮）。しかし、この方法ではイオン化促進効果によるピークの増大が見られ回収率がネオテーム 124.0%、アドバンテーム 148.0%と増加したため、溶出液の濃縮について検討した。濃縮倍率 1、2.5、5、10 倍について比較したところ 5 倍濃縮では回収率はネオテーム 91.2%、アドバンテーム 96.7%と改善した。その結果を Table 3 に示す。

また、既存透析法では、透析外液 50 mL を固相に負荷するために 1 時間程度の時間を要した。これを負荷量を半分の 25 mL に減らし、定容量を 5 mL としたところ、負荷に必要な時間を 30 分程度に短縮することができた。5 倍濃縮に変更することによって回収率が改善し、精製時間も短縮したことから、今後は負荷量を 25 mL とし、定容量を 5 mL とすることとした。

#### 4 溶媒抽出法の検討

抽出溶媒についてメタノールとアセトニトリルについて検討した。80%メタノールおよび 80%アセトニトリルでそれぞれ添加回収試験を行った結果、アセトニトリルの回収率が 10%程度であるのに対し、メタノールは 90%程度と回収率が良好であった。

また、ヘキサンによる脱脂工程の追加を検討したが、回収率がネオテーム 74.2%、アドバンテーム 18.0%と低下したことから、抽出に脱脂工程は追加せず、80%メタノールで実施することとした。

#### 5 検量線

検量線は、0.005~0.05  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で、相関係数 0.99 以上の直線性を示した。また、本法による定量限界は、透析法では、ネオテーム 0.0003 g/kg、アドバンテーム 0.0008 g/kg、溶媒抽出法では、ネオテーム 0.002 g/kg、アドバンテーム 0.004 g/kg であった。

#### 6 添加回収試験

7 種類の加工食品に対し、ネオテームおよびアドバンテームを 0.1 g/kg（透析法）または 0.2 g/kg（溶媒抽出法）となるように添加し、30 分間放置後に添加回収試験（n=5）を行った。その結果を Table 4 に

Table 5. 米菓の添加回収試験

試料	添加量 (g/kg)	溶媒抽出法			
		ネオテーム		アドバンテーム	
		回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
米菓	0.2	97.9	1.44	89.9	1.32

n=5

示す。透析法では、ネオテームは回収率が 91.3~106.1%と良好であり、アドバンテームについても米菓以外は 73.0~104.9%であった。米菓に添加したアドバンテームは、回収率が 43.7%と低かった。衛生試験法では穀物を主原料とした加工品の透析時間は 48 時間程度が必要である旨記載<sup>6)</sup>されており、守安らの報告も穀物調製品は 48 時間で透析を行っている<sup>7)</sup>ことから、透析時間を 24 時間および 48 時間に延長して検討した。ネオテームは、24 時間では 92.5%、48 時間では 75.9%、アドバンテームは、それぞれ 31.9%、47.4%となり、透析時間を延長しても、回収率は向上せず、逆にネオテームは低下した。山本らは膨潤しやすい食品について膨潤により流動性が失われたため混和が不十分となり、透析効率が下がったことが回収率の低い原因だと考えられた<sup>8)</sup>旨報告している。今回実施した米菓は、揚げせんべいを試料としており、試料の調製時や内液を加えたことで試料が膨潤し、流動性が失われ混和が不十分となり、透析効率が低下したことから回収率が低くなったと考えられた。

そこで、鶴田ら<sup>5)</sup>の方法を参考にして溶媒抽出法で米菓の添加回収試験を実施したところ、Table 5 に示すとおり回収率はネオテームが 97.9%、アドバンテームが 89.9%に向上した。

#### 7 市販加工食品の調査

原材料名にネオテームの表示がある食品 8 試料、アドバンテームの表示がある食品 4 試料、香料の表示がある食品 1 試料について市販加工食品の調査を行った。その結果を Table 6 に示す。

試験溶液の調製には透析法を用いることとし、添加回収試験で回収率が低かった米菓は溶媒抽出法で調製した。その結果、ネオテームおよびアドバンテームは幅広い濃度範囲（0.017~45.04 g/kg）で検出された。

原材料名にネオテームの記載がなかった清涼菓子 2 を分析したところ、ネオテームが 0.077 g/kg 検出された。原材料名には香料と記載されており、甘味料として使用されていたのではなく、フレーバー増強剤（香料）として使用<sup>1)</sup>されていたと推測される。香料は、物質名を表示する代わりに一括名表示をすることができるため、今後増えてゆく高甘味度甘味料が含まれている可能性があると考えられた。

Table 6. 市販加工食品調査

検体名	ネオテーム	アドバンテーム
	(g/kg)	(g/kg)
清涼飲料水	ND	0.065
清涼菓子1	45.04	ND
清涼菓子2	0.077	ND
ガム	0.843	ND
つゆ	1.178	ND
米菓	0.200 *	ND *
氷菓	0.945	ND
ビスケット	0.021	ND
カレー	0.305	ND
カップラーメン	ND	0.017
ハム1	1.154	ND
ハム2	ND	0.297
ベーコン	ND	0.200

ND：不検出

\* 溶媒抽出法にて実施

### まとめ

当所で実施していたネオテームおよびアドバンテーム同時分析の透析法は、試料中に共存する妨害成分の影響が大きく、加工食品の種類によっては回収率が大きくばらつくという欠点があったことから、LCの分析条件や試験溶液の調製方法を検討した。カラムの粒子径を3.5 μmから1.8 μmに変更し、移動相をA液0.1%ギ酸から5 mmol/Lギ酸アンモニウムに、B液メタノール/アセトニトリル(4:1)からメタノールに変更したことでピーク形状は良好で強度が増加し、LC-MS/MSへの注入量を2 μLに減少させることが可能となった。また、精製条件を検討し、妨害成分の影響を軽減させることによって、より良好な回収率が得られた。

透析法を用いて7種類の加工食品の添加回収試験を行ったところ、米菓以外の回収率は73.0~106.1%であった。また、アドバンテームの回収率が低かった米菓は、溶媒抽出法を用いて実施したところ、ネオテーム97.9%、アドバンテーム89.9%と良好な結果が得られた。本法を用いて、原材料名にネオテーム、アドバンテーム等の表示がある加工食品13試料の調査を行った。その結果、ネオテームは0.021~45.04 g/kg、アドバンテームは0.017~0.297g/kg検出された。今回香料と表示された加工食品からネオテームが検出されていることから、香料と表示されている場合にも高甘味度甘味料の検出の可能性があると考えられた。

本法は、加工食品の種類に応じて透析法または溶媒抽出法を用いることによって幅広い食品に適用が可能と考えられる。

### 引用文献

- 1) ネオテームの食品添加物の指定に関する添加物部会報告書, 3-14 (2007)
- 2) アドバンテームの食品添加物の指定に関する部会報告書(案), 1-26 (2013)
- 3) 田原正一, 藤原卓士, 安井明子, 早藤千恵子, 小林千種, 植松洋子: 食品中の甘味料分析における迅速な改良透析法の開発, 食品衛生学雑誌, 55, 13-18 (2014)
- 4) 小林美紀, 寺田久屋, 中島正博: HPLCおよびLC-MS/MSによる加工食品中の超高甘味度甘味料アドバンテーム定量法, 食品衛生学雑誌, 56, 14-18(2015)
- 5) 鶴田小百合, 坂本智徳, 赤木浩一: 固相抽出-LC-MS/MS法による食品中の甘味料12種および保存料9種の一斉分析, 食品衛生学雑誌, 54, 204-212(2013)
- 6) 公益社団法人日本薬学会: 衛生試験法・注釈2020, 金原出版, 383-403 (2020)
- 7) 守安貴子, 中里光男, 小林千種, 菊池洋子, 早野公美, 田村行弘: HPLCによる食品中のアセスルファミンK, サッカリン及びアスパルテームの分析法, 食品衛生学雑誌, 37, 91-96 (1996)
- 8) 山本純代, 田原正一, 杉木幹雄, 宮川弘之, 植松洋子, 山嶋裕季子他: 迅速透析を用いた食品中のステビオシドおよびレバウジシドA分析法, 食品衛生学雑誌, 57, 155-159 (2016)