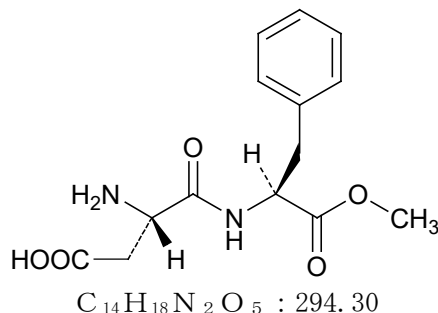


甘味料

アスパルテーム

Aspartame

別名：L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル



1. 分析法の概要

食品中のアスパルテームは、透析法により抽出した後、強陽イオン交換-逆相ミックスマード固相抽出カラムで精製し、液体クロマトグラフィーにより定量する¹⁾。(2023年改正)

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

① 透析

試料約 20 g²⁾を精密に量る³⁾。次に約 20 mL⁴⁾の透析内液と混和して流動状とし、少量の透析内液を用いて透析膜チューブ内に移した後、空気を追い出してからチューブの上端を密封し、200 mL 容の目盛り付き容器⁵⁾に入れる。次いでこの目盛り付き容器に透析外液を加えて全量⁶⁾を正確に 200 mL とする。時々、密栓又はフィルム等で覆って目盛り付き容器内を転倒混和しながら室温で 24~48 時間透析し⁷⁾、透析終了後の透析外液を抽出液とする⁸⁾。

② カラムによる精製

抽出液 10 mL を正確にとり、強陽イオン交換-逆相ミックスマード固相抽出カラム⁹⁾に負荷し、水 5 mL 及びメタノール 5 mL を順次通して洗浄した後、0.5 mol/L 塩化アンモニウム溶液/アセトニトリル混液 (3 : 2) 9 mL で溶出する。溶出液を水で正確に 10 mL とし¹⁰⁾、メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過したものを試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製¹¹⁾

アスパルテーム 0.100 g を量り、メタノール/水混液 (1 : 1) を加えて正確に 100 mL とする。その 10 mL を正確にとり、水を加えて正確に 100 mL としたものを標準溶液とする (濃度 100 μ g/mL)。標準溶液 1、2、4、6、10 及び 20 mL を正確にとり、水を加えてそれぞれ正確に 100 mL とし、検量線用標準溶液とする (濃度 1~20 μ g/mL)。用時調製する。

(4) 測定法

① 測定条件¹²⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフにより、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 5 μ m)

カラム管：内径 4.6 mm、長さ 150~250 mm

カラム温度：40°C

移動相¹³⁾：リン酸緩衝液 (0.02 mol/L、pH 4.0) / メタノール混液 (3 : 1)

流速：1.0mL/分

測定波長：210nm

注入量：20μL

② 検量線

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量^{14、15)}

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試験溶液中のアスパルテーム濃度(μg/mL)を求め、次式によって試料中のアスパルテーム含量(g/kg)を計算する。

$$\text{アスパルテーム含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200 \times 10}{W \times 10 \times 1000}$$

C：試験溶液中のアスパルテーム濃度(μg/mL)

W：試料の採取量(g)

④ 定量限界 0.01 g/kg

試薬・試液等

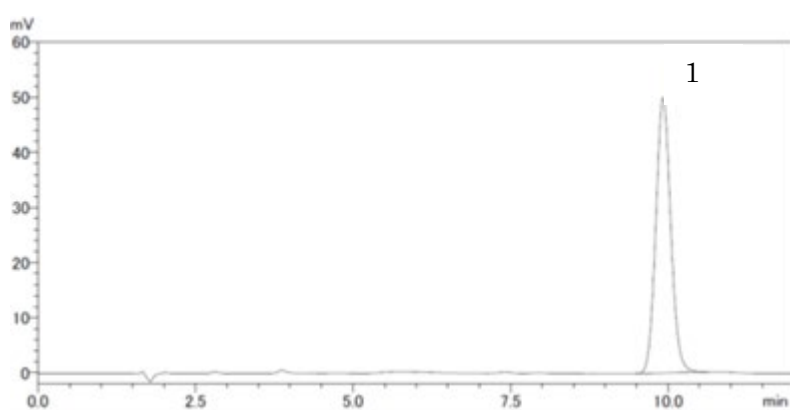
1. アスパルテーム：市販品を用いる¹⁶⁾。
2. 塩化ナトリウム：[特級]
3. 塩酸：[特級]
4. 透析内液¹⁷⁾：塩化ナトリウム 100 g を 0.01mol/L 塩酸に溶解して 1000mL とする。
5. 透析外液¹⁷⁾：0.01mol/L 塩酸
6. 透析膜チューブ：透析用セルロース製チューブ（平面幅 44mm、直径 28mm、膜厚 0.0203mm）を適当な長さに切ったものを水で洗浄して片端を結んで閉じる。
7. 強陽イオン交換-逆相ミックスモード固相抽出カラム：スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体固相抽出カラム(150mg)⁹⁾。あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL を順次通してコンディショニングしたものを用いる。
8. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
9. 塩化アンモニウム：[特級]
10. 0.5mol/L 塩化アンモニウム溶液：塩化アンモニウム 26.7 g に水を加えて 1 L とする。
11. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]
12. リン酸：[85%、特級]
13. リン酸水素二ナトリウム：[特級]
14. リン酸緩衝液(0.02mol/L、pH4.0)：リン酸 23.1 g を量り、水を加えて溶かし、1000mL とし、0.2mol/L リン酸溶液とする。リン酸水素二ナトリウム 28.4 g を量り、水を加えて溶かし、1000mL とし、0.2mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液とする。0.2mol/L リン酸溶液及び 0.2mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液を混和して pH 4.0 に調整したものを水で正確に 10 倍希釈する。
15. 0.1mol/L 塩酸：塩酸 9 mL に水を加えて 1000mL とする。
16. 0.01mol/L 塩酸：0.1mol/L 塩酸 100mL に水を加えて 1000mL とする。

[注]

- 1) 本法を用いた試験溶液をネオテーム及びアリテームの分析に利用することができる^{文献 1)}。また、これらを特定する必要がある場合には、参考に示す分析法を用いることができる。
- 2) 試料のかさが大きい場合や水分を含むと膨張する場合は、試料採取量を 5～10 g に

減らす。

- 3) 炭酸を多く含む試料の場合は、試料の秤量後に、超音波処理によりその大部分を除去する。また、脂肪分を多く含む試料の場合は、試料の秤量後に、ヘキサン約 20mL ずつで 2～3 回洗浄した後、ヘキサン臭がなくなるまで放置又は加温する。ただし、乳化した食品（ピーナッツバター、マヨネーズ等）は脱脂操作を省略できる。
- 4) 試料と混和して流動状にならない場合は、透析内液を適宜追加する。
- 5) 正確に 200mL を量ることができる目盛精度を有する容器。透析チューブの実効長が 15cm の場合は直径（内径）4 cm 以下がよい。
- 6) 試料、透析内液、透析外液の合計量。
- 7) 透析膜チューブの実効長約 15cm の場合、アスパルテームは水分含量の高い食品では 24 時間で十分透析されるが、穀類の調整品や魚介乾製品などの水分含量の低い食品及びはっ酵乳などの乳製品では透析率が低下する傾向があるため、48 時間透析を行う。また、より実効長の長い透析膜チューブを用いる既報^{文献 2)}に記された透析条件を用いることにより、穀類の調製品や魚介乾製品においても 4 時間の透析で、上記方法と同等以上（クッキーにアスパルテームを 0.1 g / kg 添加した時の添加回収率 103% 及び相対標準偏差 1.0% (n = 5)) の透析率が得られる。
- 8) 食品中の夾雑成分による妨害ピーク及びマトリックス効果による保持時間変動等の影響がない場合は、透析による抽出液をメンブランフィルター（0.45 μ m）でろ過したものを試験溶液として用いることができる。また、抽出液の pH を確認し、中性～弱アルカリ性の場合は固相抽出カラムへの保持が弱くなることから、pH 3 以下となるよう調整する。
- 9) メーカーにより溶出条件が異なるため、あらかじめ回収率等を確認する必要がある。
- 10) 試験溶液中のアセトニトリル量がピーク形状に影響するため、水で定容する。
- 11) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。
- 12) 測定条件は例示である。また、分析の際は、アスパルテームのピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。本法でのアスパルテームの液体クロマトグラム例を注図 1 に示す。



1. アスパルテーム
(20 μ g/mL)

保持時間（分）

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μ m）

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

流速：1.0mL/分

検出器：紫外可視吸光度検出器（210nm）

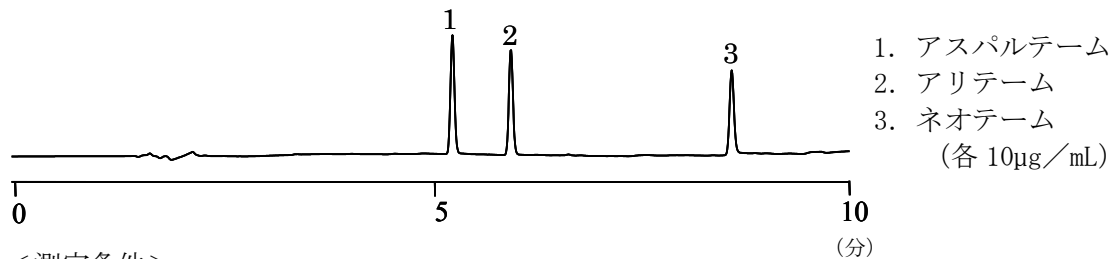
注入量：20 μ L

移動相¹³⁾：リン酸緩衝液（0.02mol/L、pH4.0）/メタノール混液（3：1）

注図 1 アスパルテームの液体クロマトグラム

pH5.0の緩衝液を用いることにより妨害ピークとの分離が可能となる場合もある^{文献3)}

- 13) ヨーグルトドリンク等の乳飲料の場合は、アスパルテームの保持時間付近に夾雑ピークが重なる場合もあるため、移動相をリン酸緩衝液(0.02mol/L、pH4.0)/メタノール混液=90:20とするなど、夾雑ピークが分離する条件で確認を行う。
また、ネオテーム及びアリテームと同時分析する場合はグラジエント条件で行う。
グラジエント条件を用いた場合のアスパルテーム、アリテーム及びネオテームの分離例を注図2^{文献1)}に示す。



<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径5µm)
カラム管：内径4.6mm、長さ150mm カラム温度：40℃
流速：1.0mL/分 検出器：紫外可視吸光度検出器(210nm) 注入量：20µL
移動相：A液 リン酸緩衝液(0.01mol/L、pH4.0)
 B液 アセトニトリル
 グラジエントの条件

分	A(%)	B(%)
0	90	10
10	35	65
10.1	90	10
15	90	10

注図2 グラジエント溶離法によるアスパルテーム、アリテーム及びネオテームの液体クロマトグラム

- 14) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、試料体積を含めて定容し、その定容量を含量計算で乗じている。そのため、固体試料等では透析外液量を乗じた値より数%~10%程度高い定量値となる場合があり、添加回収率が100%を越えて高い場合には、この点が要因の一つとして考えられる。
- 15) アスパルテームをゼリー、ジャム、ヨーグルトドリンク、コーヒー飲料、パイナップル缶詰、漬物、ソース及びクッキーに0.01g/kg及び0.1g/kgとなるように添加したときの添加回収率はそれぞれ86~100%、89~104%であった(n=3)^{文献1)}。別の試験で、アスパルテームを炭酸飲料及び乳飲料、ゼリー、ヨーグルト、漬物、梅干しに0.01g/kg添加した時の24時間透析での添加回収率は、それぞれ94、95、102、88、92及び84%(相対標準偏差はそれぞれ2.9、2.9、2.5、4.3、7.2及び10%)であり、ヨーグルトに0.01g/kg添加した時の48時間透析での添加回収率は89%(相対標準偏差は2.6%)であった(n=5)。
- 16) 市販品に食品添加物試験用(純度98~102%)などがある。
- 17) アスパルテームはpH6以上では不安定であること、pH3以上では微生物が繁殖する可能性があるため、透析液のpHは2~3がよい。本条件下ではアスパルテームは安定であるが、48時間を過ぎるとわずかに減少する傾向が見られる。

[文献]

- 1) 松本ひろ子ら：食衛誌、**49**、31 (2008)
- 2) 田原正一ら：食衛誌、**55**、13 (2014)
- 3) 貞升友紀ら：日食化誌、**15**、32 (2008)

参考

アスパルテーム確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のアスパルテームは、液体クロマトグラフィータンデム質量分析により確認を行う¹⁾。(2023年設定)

2. 分析法(液体クロマトグラフィータンデム質量分析)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

アスパルテーム分析法(2)試験溶液の調製を準用する。ただし、試験溶液は、必要に応じて適宜希釈して用いる。

(3) 標準溶液の調製

アスパルテーム分析法(3)検量線用標準溶液の調製を準用し、定性に適した濃度の標準溶液を調製する。

(4) 測定法

① 測定条件²⁾

液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径1.7 μ m)

カラム管：内径2.1mm、長さ50mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相³⁾：A液 0.1%ギ酸

B液 メタノール/アセトニトリル混液(4:1)

グラジエントの条件

分	A(%)	B(%)
0	90	10
5	30	70
7	30	70
7.1	90	10
12	90	10

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI(+)

検出法：プロダクトイオンスキャン(プリカーサーイオン m/z 295、 m/z 50~400)

主なイオン⁴⁾：プリカーサーイオン m/z 295、プロダクトイオン m/z 119

注入量：1 μ L

② 定性^{5, 6)}

試験溶液及び標準溶液をLC-MS/MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されることを確認する。

試薬・試液等

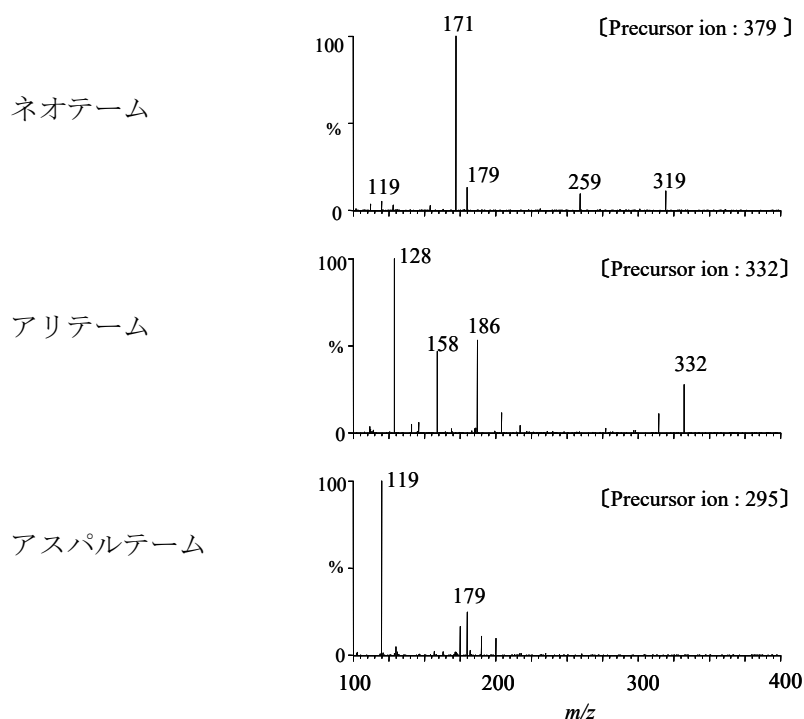
1. アスパルテーム分析法の試薬・試液等を準用する。

2. ギ酸：[98%、特級]

3. 0.1%ギ酸：市販品を用いるか、あるいは、ギ酸1.0gに水を加えて1000mLとする。

[注]

- 1) 本法により、アリテーム、ネオテームも同時に測定できる^{文献1)}。
- 2) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。分析の際は、アスパルテームのピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。その他の測定条件は各測定機器に従い、標準溶液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 3) 濃度勾配の条件は、使用する分析カラムにより適宜変更する。
- 4) 注図1^{文献1)}にアスパルテーム、アリテーム、ネオテームより生成されたプロダクトイオンのマススペクトルを示す。



注図1 LC-MS/MSによるアスパルテーム、アリテーム、ネオテームのマススペクトル

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 1.7 μ m）

カラム管：内径 2.1mm、長さ 50mm カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A液 0.1%ギ酸

B液 メタノール/アセトニトリル混液（4：1）

グラジエントの条件

分	A(%)	B(%)
0	90	10
5	30	70
7	30	70
7.1	90	10
12	90	10

流速：0.2mL/分

注入量：1 μ L

イオン化モード：ESI(+)

検出法：プロダクトイオンスキャン

キャピラリー電圧：3.3kV

脱溶媒温度：350 $^{\circ}$ C

主なイオン (m/z)

アスパルテーム：プリカーサーイオン 295、プロダクトイオン 119

アリテーム：プリカーサーイオン 332、プロダクトイオン 128

ネオテーム：プリカーサーイオン 379、プロダクトイオン 171

- 5) LC-MS/MSを用いて定性確認を行う場合、食品中の夾雑成分によるマトリックス効果により確認を見誤るおそれがあるため、別途、対象試料の試験溶液に標準溶液を添加し、ピークが検出されることを確認する。
- 6) アスパルテームをいちごジャムに0.01 g/kgの濃度で添加した場合において、アスパルテームより生成されたプロダクトイオンのマススペクトルが得られた。

[文献]

- 1) 松本ひろ子ら：食衛誌、**49**、31 (2008)