

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
食品添加物の試験法の検討及び摂取量に基づく安全性確保に向けた研究  
令和4年度分担研究報告書

食品添加物の規格試験法の改良に関する調査研究

—アスパルテーム及びその異性体の純度測定における<sup>1</sup>H-qNMRの適用に関する検討—

研究分担者 大槻 崇 日本大学生物資源科学部 食品開発学科 准教授

研究要旨

食品添加物の規格試験法の改良や精度向上を目指した研究の一環として、国際単位系へのトレーサビリティが確保された絶対定量法である<sup>1</sup>H-qNMRを用いたアスパルテーム及びL-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの定量分析に関する検討を行った。その結果、当該化合物の定量における適切な定量用シグナルが見出され、本法のアスパルテーム及びL-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル定量用試薬の含量分析への適用性が明らかとなった。

A. 研究目的

日本では食品添加物の安全性や品質を確保する目的で、食品添加物の性状、含量（純度）などの成分規格や食品添加物を使用できる食品の種類、使用量などの使用基準等が設定され、第9版食品添加物公定書に記載されている。この食品添加物の成分規格には、原則として含量とその分析法が定められており、同分析ではLC等が使用されることが多い。このような分析では測定対象化合物と同一かつ純度が正確な標準物質が必要であるが、計量学的に妥当な手順によって純度が算出された認証標準物質は非常に少ない<sup>1)</sup>。このため、LC等の相対定量法では、試薬メーカーの定量用標品（試薬）が一般的に利用されている。しかし、この純度、含量は自社規格により保証され

たもの、すなわち計量学的に正確とは言えず、結果として定量値の信頼性が損なわれる可能性を否定できない。特に、食品添加物の場合、定量用標品の含量（純度）の正確性を担保するための分析法の確立は、食品添加物の安全性、製品の品質の保証の観点から重要であり、ひいては、信頼性の高い規格試験法の確立につながることを期待される。

近年、国際単位系（SI）へのトレーサビリティが確保された絶対定量法として定量NMR（quantitative NMR；qNMR）が注目を集めている<sup>2, 3)</sup>。qNMRのうち、<sup>1</sup>H NMRを利用したqNMR（<sup>1</sup>H-qNMR）は、定量性が確保された測定条件を用いる事で、2つの化合物間のシグナル面積強度比が「各化合物のモル濃度×各置換基上の水素数」に比例する原理を利用した定

量法である。NMRは原子核を対象に測定を行っているため、これら2つの化合物は同一の化学構造である必要はない。従って、計量学的に正確な純度が付与された認証標準物質のようなSIへのトレーサビリティが確保された標品を内標準物質として用いることにより、内標準物質と測定対象のシグナル面積強度比、水素数、秤量濃度の関係から、様々な測定対象化合物の含量や純度を求めることが可能である。このような定量値の計量計測トレーサビリティを確保した<sup>1</sup>H-qNMRは、AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal reference material) と呼ばれ、残留農薬試験用標品や日本薬局方試薬などの純度分析<sup>4,5,6)</sup>、生薬や既存添加物中の主要成分の含量分析<sup>7,8,9)</sup>へ利用されている。

そこで、本研究では<sup>1</sup>H-qNMRの有用性を明らかにするために、アスパルテームの規格試験法で使用されるアスパルテーム(L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル)及びその異性体であるL-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル(図1)を対象に検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 試薬

アスパルテームは、富士フィルム和光純薬株式会社製(食品添加物試験用、Cat.No.016-11331)を用いた。L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル2種は、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部よりご供与いただいた(Lot 1: ECP4791、Lot 2: 220627)。1,4-

ビス(トリメチルシリル)ベンゼン(1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>)認証標準物質は、富士フィルム和光純薬製(Code No. 024-17031)を用いた。重メタノールは関東化学株式会社製を用いた。その他の試薬はすべて市販の試薬特級品を用いた。

### 2) 装置

核磁気共鳴装置(NMR): JNM-ECA500 (<sup>1</sup>H共鳴周波数: 500 MHz)(日本電子(株)製)。

マイクロ天秤: BM-20 ((株)エー・アンド・デイ製)

セミマイクロ天秤: AUW220D ((株)島津製作所製)

### 3) <sup>1</sup>H-qNMR法によるアスパルテーム及びL-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの定量

#### 3-1) アスパルテーム及びL-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル含量の測定

アスパルテーム又はL-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル約25 mg及び1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>約5 mgをそれぞれ精密に量り、MeOH-*d*<sub>4</sub> 5 mLを加えてこれらを溶解した。この溶液約600 µLを外径5 mmのNMR試料管に入れ、密閉し、<sup>1</sup>H-qNMR測定を行った。1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>のシグナル面積強度を18.00としたときのアスパルテーム又はL-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルに由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、各含量(C<sub>SA</sub>(%))を算出した。

$$C_{SA}(\%) = \frac{I_{SA}/H_{SA}}{I_{IC}/H_{IC}} \times \frac{M_{SA}/C_{SA}}{M_{IC}/C_{IC}} \times P_{IC} \times 100$$

$I_{SA}$  = 測定対象物質のシグナル面積強度

$H_{SA}$  = 測定対象物質の定量シグナルの水素数

$M_{SA}$  = 測定対象物質の分子量 (アスパルテーム、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル：ともに 294.3)

$M_{IC}$  = 内標準物質の分子量 (1,4-BTMSB- $d_4$ : 226.50)

$C_{SA}$  = 試験溶液中の測定対象物質の濃度 (mg/g)

$C_{IC}$  =  $^1\text{H}$ -qNMR 用内標準物質 (1,4-BTMSB- $d_4$ ) の濃度 (mg/g)

$I_{IC}$  = 内標準物質の定量に用いたシグナルの面積強度

$H_{IC}$  = 内標準物質の定量に用いたシグナルの水素数

$P_{IC}$  = 内標準物質の認証純度

### 3-2) $^1\text{H}$ -qNMR 測定条件及びデータの解析

$^1\text{H}$ -qNMR 測定の基本条件を表 1 に示した。なお、 $^1\text{H}$ -qNMR の化学シフト値は、1,4-BTMSB- $d_4$  の水素シグナルを基準シグナル ( $\delta 0$ ) とし、 $\delta$  値を ppm 単位で表した。得られた FID データは、フーリエ変換及び位相補正を行った。1,4-BTMSB- $d_4$  及び定量シグナルの積分範囲を設定した後、1,4-BTMSB- $d_4$  のシグナル面積強度を 18.00 としたときのアスパルテーム又は L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルに由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度等を 3-1) で示し

た計算式に代入し、それぞれの含量を算出した。なお、データの解析は、Delta (日本電子 (株) 製) により行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

## C. 結果及び考察

$^1\text{H}$ -qNMR 法は、スペクトル上に観察される標準物質と測定対象物質のシグナル面積強度 (積分値) とモル濃度の関係から、測定対象化合物の濃度を絶対定量することが可能である。また、SI にトレーサブルな標準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が大幅に向上した方法と言える。そこで、本法の食品添加物分析への適用性を明らかにするため、アスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルについて  $^1\text{H}$ -qNMR 測定を行った。なお、本法により得られた定量値の SI トレーサビリティを確保するため、認証標準物質である 1,4-BTMSB- $d_4$  を用いて試薬中のアスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル含量を算出した。

その結果、アスパルテームについては、図 2 に示したように、 $\delta_{\text{H}} 2.25$  (水素数 1)、 $\delta_{\text{H}} 2.48$  (水素数 1)、 $\delta_{\text{H}} 2.74$  (水素数 1)、 $\delta_{\text{H}} 2.95$  (水素数 1)、 $\delta_{\text{H}} 3.75$  (水素数 1)、 $\delta_{\text{H}} 4.41$  (水素数 1)、 $\delta_{\text{H}} 7.15$ - $7.35$  (水素数 5) にアスパルテームに由来するシグナルがそれぞれ観察された。一方、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルでは、図 3 及び図 4 に示した、 $\delta_{\text{H}} 2.06$  (水素数 1)、 $\delta_{\text{H}} 2.20$  (水素数 1)、 $\delta_{\text{H}} 2.70$  (水素数 1)、 $\delta_{\text{H}} 2.96$  (水

素数 1)、 $\delta_H$  3.47 (水素数 3)、 $\delta_H$  3.79 (水素数 1)、 $\delta_H$  4.50 (水素数 1)、 $\delta_H$  6.90-7.10 (水素数 5) に L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルに由来するシグナルがそれぞれ観察された。アスパルテームについては、化学合成など工業的に生産する際、アスパルテームの異性体である  $\alpha$ -D-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル、 $\alpha$ -L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル、 $\alpha$ -D-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステルが副生成物として生じることが予想される<sup>10)</sup>。特に、食品添加物公定書では、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの純度試験が規定されていることを考慮すると、<sup>1</sup>H-qNMR を用いて含量を算出する場合、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルと完全に重複しないシグナルを用いなければ、定量値に大きな誤差を生じる可能性が高いと推測された。そこで、アスパルテームと L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルを比較すると、アスパルテームにおいて  $\delta_H$  2.48 (水素数 1) に観察されたシグナルは、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルに由来するシグナルとは重複せず、形状もシャープで、近傍に他のシグナルは観察されなかった (図 5)。これらの点を考慮し、アスパルテームでは、定量用シグナルとして、 $\delta_H$  2.48 を用いることが適切と考えられた。

同様に、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルから考えた場合、アスパルテームと完全に重複しないシグ

ナルを用いることにより、良好な精度で当該化合物の正確な定量が可能になると考えられた。両化合物を比較すると、 $\delta_H$  2.06 (水素数 1) に観察されたシグナルは、アスパルテームに由来するシグナルとは重複せず、形状等も問題が無いことが確認された (図 5)。従って、これらの点を考慮し、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルでは、定量用シグナルとして、 $\delta_H$  2.06 を用いることが適切と考えられた。

選択した各定量用シグナルより算出されたアスパルテーム含量は、 $93.9 \pm 0.8\%$  (Mean $\pm$ SD、n=3)、L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル 2 種の含量は、それぞれ 83.9% (n=1、Lot 1) 及び 86.1% (n=1、Lot 2) であることが判明した。

#### D. 結論

本研究では、食品添加物の規格試験法の改良、精度の向上を目指して、<sup>1</sup>H-qNMR によるアスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの定量に関する検討を行った。その結果、適切な定量用シグナルが見出され、本法のアスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの含量分析への適用性が明らかとなった。本結果は、<sup>1</sup>H-qNMR の特徴を考慮すると、アスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル試薬の含量分析の信頼性を更に向上させる知見であり、将来的な定量用試薬の分析法への本法の適用へ向けた基礎データが得られたものと考えられる。

## E. 参考文献

1. Zeleny, R.; Schimmel, H. *TrAC*, **33**, 107-116 (2012).
2. Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hira, T. *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79-86 (2009).
3. Uchiyama, N., Masada, S., Hosoe, J., Hakamatsuka, T., Goda, Y.: Determination of absolute purities of commercial agents used for quantification of functional substances by quantitative NMR analysis. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **24**, 125-130 (2017).
4. Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **16**, 28-33 (2009).
5. Hosoe, J., Sugimoto, N., Goda, Y.: Trial study to determine absolute purities of chemical reagents used as reference standards in the Japanese Pharmacopoeia. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **41**, 960-970 (2010).
6. Tada, A., Takahashi, K., Ishizuki, K.; Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Tahara, M., Akiyama, T., Ito, Y., Yamazaki, T., Akiyama, H., Kawamura, Y., *Chem Pharm Bull.*, **61**, 33-38 (2013).
7. Tanaka, R., Hasebe, Y., Nagatsu, A., J. *Nat. Med.*, **68**, 630-635 (2014).
8. Yoshida, T., Terasaka, K., Kato, S., Bai, F., Sugimoto, N., Akiyama, H., Yamazaki, T., Mizukami, H.: Quantitative determination of carthamin in *Carthamus Red* by <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.*, **61**, 1264-1268 (2013).
9. Tada, A., Takahashi, K., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Ishizuki, K., Nishimura, T., Yamazaki, T., Kawamura, Y.: Absolute quantitation of quercetin and the glycosides in natural food additives by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **51**, 205-212 (2010).
10. Jadaud P, Wainer IW. The stereochemical resolution of the enantiomers of aspartame on an immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin HPLC chiral stationary phase: The effect of mobile-phase composition and enzyme activity. *Chirality*, **2**, 32-37 (1990).

## F. 研究発表

### 1. 学会発表等

- 1) 加藤菜帆、大槻崇、松藤寛、定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニンの定量について、日本食品科学工学会第 69 回大会、2022 年 8 月

2) 黄奕、大槻崇、森川悟、松藤寛、治療薬物モニタリング（薬物濃度測定）における相対モル感度に基づくシングルリファレンス HPLC 法の応用、第 4 回日本定量 NMR 研究会年会、2022 年 12 月

3) 岡庭寛昂、池上美音、宮下采佳、大槻崇、松藤寛、長田和実、中西祐輔、高橋恭子、酪酸が腸管上皮バリアへ与える影響、日本農芸化学会 2023 年度大会、2023 年 3 月

2. 論文発表等

なし

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

**H. 健康危機情報**

特になし。

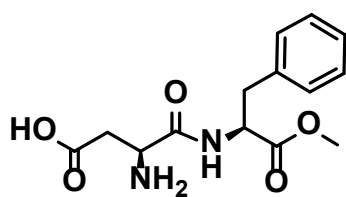
表 1 アスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの

## 含量測定における $^1\text{H}$ -qNMR 条件

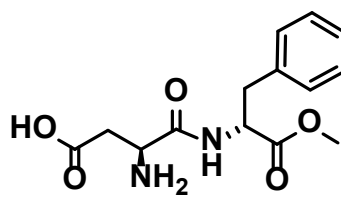
---

装置	JEOL ECA 500 spectrometer
スペクトル幅	20 ppm (-5 – 15 ppm)
データポイント数	65536
オートフィルター	on (eight times)
取り込み期間	6.55 秒
フリップ角	90°
取り込み待ち時間	60 秒
スキャン回数	8
スピニング	off
$^{13}\text{C}$ デカップリング	Multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

---



アスパルテーム



L-アスパルチル-D-フェニルアラニン  
メチルエステル

図1 アスパルテーム及び L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルの  
化学構造

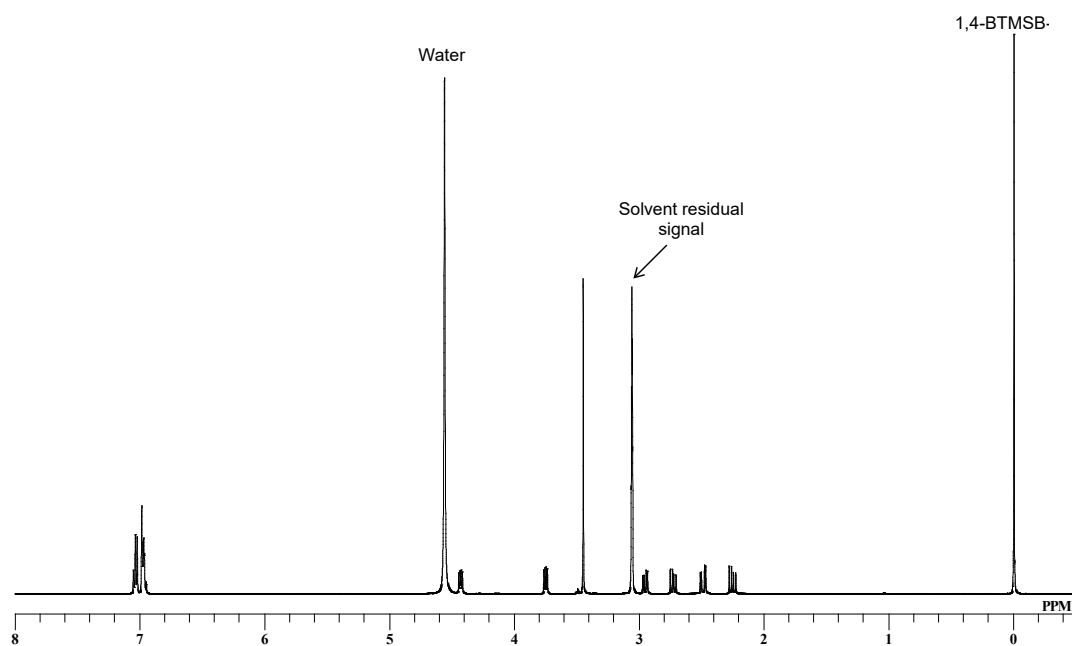


図2 アスパルテームの  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル



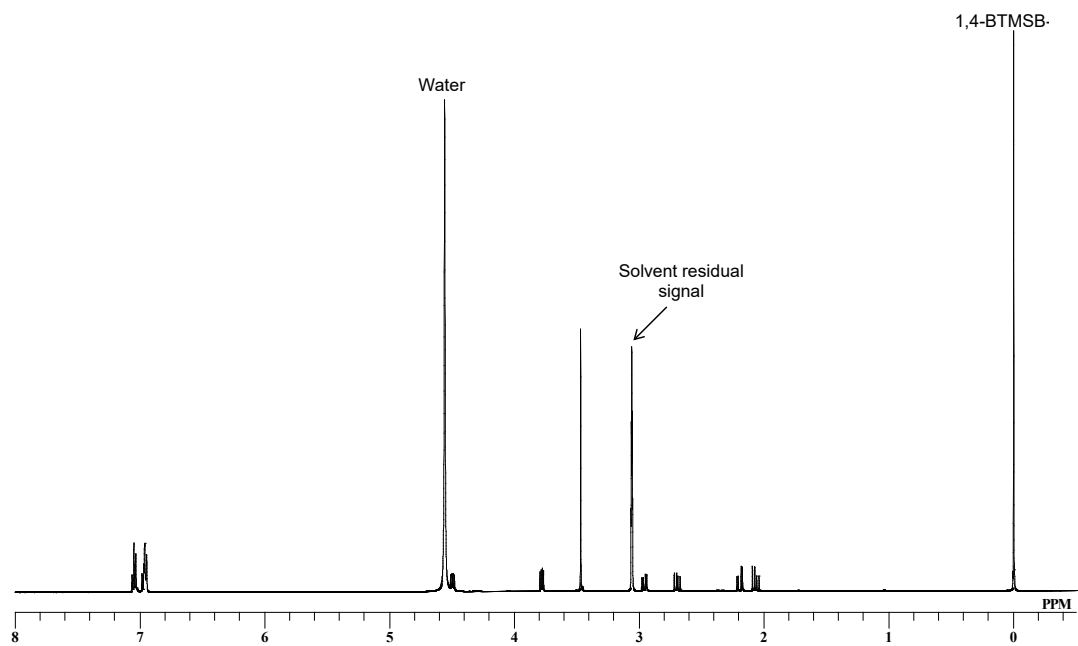


図 3 L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (Lot 1、ECP4791) の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル

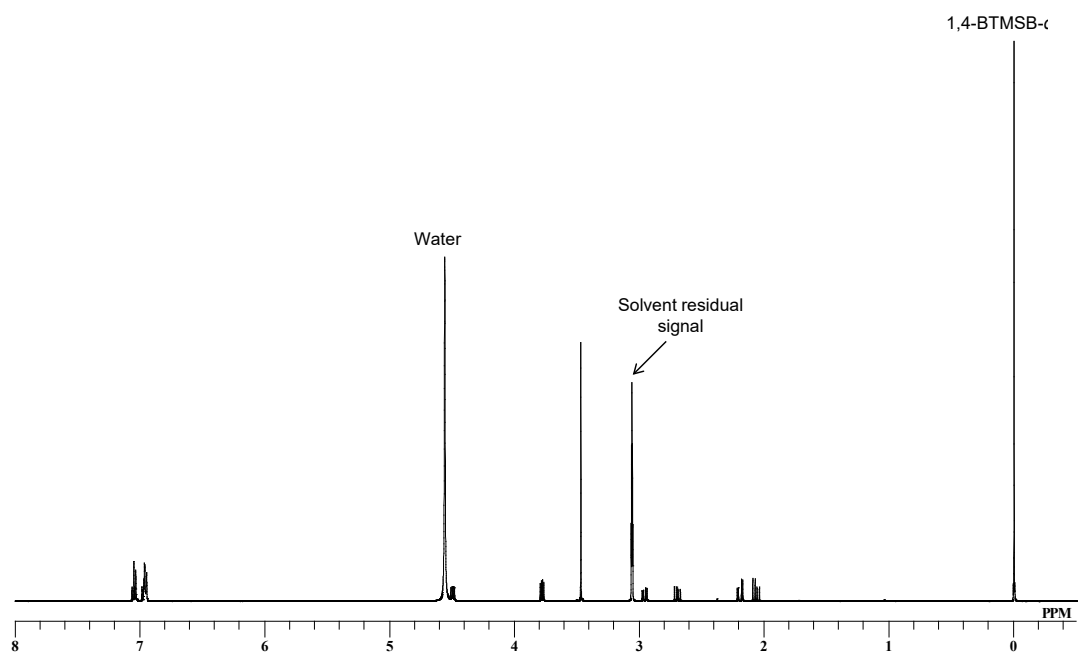


図 4 L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (Lot 2、220627) の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル

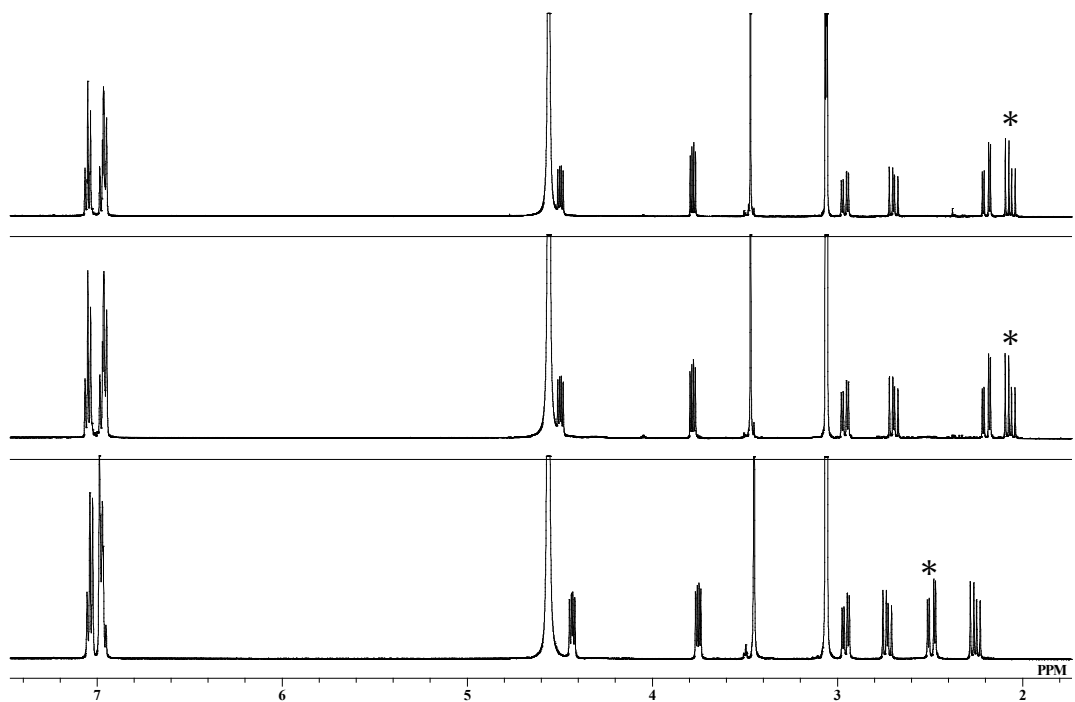


図5 各化合物の<sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの比較 (範囲:  $\delta_{\text{H}}$  1.70-7.50)

上段: L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (Lot 1: ECP4791)、

中段: L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (Lot 2: 220627)、

下段: アスパルテーム

\*: 定量用シグナル