

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5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

—アスパルテーム定量法の改良に関する検討—

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、定量値の正確性の向上、国際調和等の観点より、米国食品規格集（Food Chemicals Codex: FCC）12などを参考に、現在の電位差滴定法から HPLC 法への定量法の改良に向けた検討を行った。その結果、アスパルテームの正確な定量における FCC 法の問題点が明確となるとともに、アスパルテーム定量法に対する提案法を見いだした。また、この提案法は、アスパルテーム製品中の不純物である L- $\alpha$ -アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル（L, D-APM）及び 5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸（DKP）の同時分析が可能であることを明らかにした。

A. 研究目的

アスパルテームは、図1に示すように L-アスパラギン酸と L-フェニルアラニンからなるジペプチドのメチルエステル（L- $\alpha$ -アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル）である。これは 1965 年に J.D.Schlatter が発見した化合物であり、甘味度は砂糖の 200 倍、さわやかな自然な甘さを特徴とする甘味料として使用が認められている食品添加物である<sup>1</sup>。このアスパルテームについて、日本ではその品質や安全性を担保するために、食品添加物公定書<sup>2</sup>において、①製品中のアスパルテーム含量、②原料由来又は製造の際に生じる副産物等（鉛、ヒ素、5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジ

ン酢酸（DKP）、L- $\alpha$ -アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル（L, D-APM）（図1）の含量の上限、③製品中の有効成分や不純物等の定量法、純度試験などが「成分規格」として定められている。このうち、アスパルテームの含量を測定する際に使用する定量法では、電位差滴定法が規定されているが、定量値の正確性の向上、国際調和等の観点から、HPLC 法への変更が期待されている。

そこで、本研究では、アスパルテームの成分規格の更なる向上に向けた検討の一環として、米国食品規格集（Food Chemicals Codex: FCC）12<sup>3</sup>などを参考に、現在の電位差滴定法から HPLC 法

への定量法の改良に向けた検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 試薬

アスパルテームは、富士フイルム和光純薬（株）製（食品添加物試験用，Cat.No.016-11331）を用いた。L- $\alpha$ -アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル（L, D-APM）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 ALFA Chemistry 製（TFA 塩，Cat. No ACM22839652）を用いた。5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸（DKP）は、Sigma-Aldrich 製（Code 1003321393，表示純度：97%）を用いた。1,4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン（1,4-BTMSB- $d_4$ ）認証標準物質は、富士フイルム和光純薬（株）製（Code No. 024-17031）を用いた。重メタノールは関東化学（株）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

分析用 HPLC ポンプ：LC-20AD（低圧グラジエントユニット内蔵），オートサンプラ：SIL-20A，カラム恒温槽：CTO-10AS<sub>VP</sub>，紫外可視分光検出器：SPD-10A<sub>VP</sub>，システムコントローラ：CBM-20A，分析データ処理システム：LabSolutions（以上（株）島津製作所製），脱気装置：AG-34（（株）フロム製）。

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）

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）

### 3) アスパルテーム分析法の検証

3-1) <sup>1</sup>H-qNMR によるアスパルテーム及び L- $\alpha$ -アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル（L, D-APM）含量の測定

アスパルテーム又は L, D-APM 約 25 mg 及び 1,4-BTMSB- $d_4$  約 5 mg をそれぞれ精密に量り，MeOH- $d_4$  5 mL を加えてこれらを溶解した。この溶液約 600  $\mu$ L 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- $d_4$  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, D-APM 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<sub>SA</sub>= 測定対象物質のシグナル面積強度

H<sub>SA</sub>= 測定対象物質の定量シグナルの水素数

M<sub>SA</sub>= 測定対象物質の分子量（アスパルテーム，L, D-APM：ともに 294.3）

M<sub>IC</sub>= 内標準物質の分子量（1,4-BTMSB- $d_4$ : 226.50）

C<sub>SA</sub>= 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, D-APM 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。

### 3-3) HPLC 用アスパルテーム標準溶液の調製 (1)

${}^1\text{H-qNMR}$  に基づく純度を基に、FCC12 で定めてある調製法に従い標準溶液を調製した。すなわち、アスパルテーム標準品約 10~11 mg を精密に量り、10%メタノールに溶解し 10 mL に定容したものをアスパルテーム標準原液とした。調製した標準原液 1 mL を正確に採り、10%メタノールで 10 mL に定容したものをアスパルテーム標準溶液① (濃度 : 100

$\mu\text{g/mL}$ ) とした。これを公比 2 で希釈して調製したものをアスパルテーム標準溶液② (濃度 : 50  $\mu\text{g/mL}$ ) とした。

### 3-4) HPLC 用アスパルテーム標準溶液の調製 (2)

${}^1\text{H-qNMR}$  に基づく純度を基に、3-1-1 の調製手順のうち、希釈溶媒として使用した 10%メタノールを「メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = (18/82)」に変更した。すなわち、アスパルテーム標準品約 10~11 mg を精密に量り、メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = (18/82) に溶解し 10 mL に定容したものをアスパルテーム標準原液とした。調製した標準原液 1 mL を正確に採り、メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = (18/82) で 10 mL に定容したものをアスパルテーム標準溶液③ (濃度 : 100  $\mu\text{g/mL}$ ) とした。これを公比 2 で希釈して調製したものをアスパルテーム標準溶液④ (濃度 : 50  $\mu\text{g/mL}$ ) とした。

### 3-5) HPLC 用 5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸 (DKP) 標準溶液の調製

DKP 約 10~11 mg を精密に量り、メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = (18/82) に溶解し 10 mL に定容したものを DKP 標準原液とした。調製した標準原液 1 mL を正確に採り、メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = (18/82) で 10 mL に定容したものを DKP 標準溶液① (濃度 : 100  $\mu\text{g/mL}$ ) とした。これを

公比 2 で希釈して調製したものを DKP 標準溶液② (濃度 : 50 µg/mL) とした.

### 3-6) HPLC 用アスパルテーム及び L-α-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (L, D-APM) 混合標準溶液の調製

<sup>1</sup>H-qNMR に基づく純度を基に, L, D-APM を精密に量り, メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = (18/82) に溶解し 5 mL に定容したものを L, D-APM 標準溶液① (100 µg/mL) とした. これを公比 2 で希釈して調製したものを L, D-APM 標準溶液② (濃度 : 50 µg/mL) とした. 本項の 3-4 で調製したアスパルテーム標準溶液④ (濃度 : 50 µg/mL) 及び L, D-APM 標準溶液② (濃度 : 50 µg/mL) を 1 : 1 となるように混合した溶液をアスパルテーム及び L, D-APM 混合標準溶液 (各化合物の濃度 : 25 µg/mL) とした.

### 3-7) HPLC 用アスパルテーム, L, D-APM 及び DKP 混合標準溶液の調製

本項の 3-4 で調製したアスパルテーム標準溶液③ (濃度 : 100 µg/mL), 3-5 で調製した DKP 標準溶液① (濃度 : 100 µg/mL) 及び 3-6 で調製した L, D-APM 標準溶液① (100 µg/mL) を 1 : 1 : 1 となるように混合した溶液をアスパルテーム, L, D-APM 及び DKP 混合標準溶液 (各化合物の濃度 : 33.3 µg/mL) とした.

### 3-8) L-α-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (L, D-APM) 含有アスパルテーム試験溶液の調製

<sup>1</sup>H-qNMR に基づく純度を基に, L, D-APM 標準品 7~8 mg を精密に量り, メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = (18/82) で 50 mL に定容したものを L, D-APM 標準溶液③ (100 µg/mL) を調製した. L, D-APM 標準溶液③ (100 µg/mL) 400 µL 及び別途精密に量り取っていたアスパルテーム標準品 100 mg をそれぞれ同じ 20 mL 容メスフラスコへ入れ, 既報に従い 4) 10 % メタノールで定容したものを 0.04 % L, D-APM 添加アスパルテーム試験溶液とした. なお, これは 3 セット調製した. 一方で, L, D-APM 標準溶液③ (100 µg/mL) 400 µL 及び別途精密に量り取っていたアスパルテーム標準品 100 mg をそれぞれ同じ 20 mL 容メスフラスコへ入れ, 既報<sup>4)</sup>に従い 10 % メタノールで定容したものを 0.02 % L, D-APM 添加アスパルテーム溶液とした. なお, これも 3 セット調製した.

### 3-9) HPLC 条件

#### ① FCC 法

カラム : InertSustain C<sub>18</sub> (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm), L-column2 ODS (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm), COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm), Mightysil RP-18 GP II (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm), カラム温度 : 40 °C, 流速 : 1.5 又は 2.0 mL/min, 注入量 : 20 µL, 移動相 : メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = 18/82 又は 10/90, 検出波長 : 220 nm

#### ② 提案法<sup>4</sup>

InertSustain C<sub>18</sub> (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm), L-column2 ODS (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm), COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm), Mightysil RP-18 GP II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm), カラム温度: 40 °C, 流速: 0.8 mL/min, 注入量: 10 μL, 移動相 A: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム: 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウム = 1:1, B: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム: 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウム: アセトニトリル = 4:4:2, グラジエント条件: 0 min (65 %B) → 25 min (65 %B) → 25.01 min (100 %B) → 40 min (100 %B) → 40.01 min (65 %B) → 50 min (65 %B), 検出波長: 220 nm

(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) <sup>1</sup>H-qNMR によるアスパルテーム及び L-α-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (L, D-APM) 含量の測定  
標品として用いるアスパルテーム及び L, D-APM・TFA 塩の試薬の正確な純度を明らかにするため、<sup>1</sup>H-qNMR 測定を行った。両化合物の <sup>1</sup>H-qNMR スペクトル (図 2 及び図 3) を比較し、アスパルテームでは、δ 2.74 ppm のシグナル、L, D-APM では δ 2.28 ppm を定量用シグナルとして選択し、これらから含量を算出した。その結果、アスパルテームは 91.2% (RSD: 3.5%, n=3), L, D-APM は 69.8% (n=1) であることが判明した。

2) アスパルテーム規格試験法における FCC 法の適用性の検証

FCC12 におけるアスパルテーム (L, L-APM) の分析では、カラム担体として ODS を使用するなど B. 研究方法の 3-9 ① (FCC 法) で示した HPLC 条件 (ただし、流速は 2.0 mL/min) が規定されている。この条件に従い、カラムとして InertSustain C<sub>18</sub> (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm) を用いてアスパルテーム標準溶液を分析したところ、ポンプの圧力がカラムの耐圧上限である 20 MPa を超過することが判明した。そこで、流速を 1.5 mL/min に変更し再度分析を行ったところ、ポンプ圧はカラムの耐圧を下回る (14.4 MPa) ことが確認された。従って、この分析では流速を 1.5 mL/min に変更する必要があると考えられた。そこで、流速を変更した HPLC 条件 (カラム: InertSustain C<sub>18</sub>, Mightysil RP-18 GP II 及び COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II) を用いてアスパルテーム標準溶液②を分析した結果、図 4~図 6 に示すクロマトグラムが得られ、すべてのカラムにおいて、アスパルテームと試薬に内在する DKP はこの HPLC 条件により良好なベースライン分離が得られることが判明した。この内在性の DKP は、別途標品との直接比較により定性した。

なお、アスパルテーム標準溶液②を調製した翌日 (1 日後) に再度分析したところ (カラム: Mightysil RP-18 GP II), 図 7 に示すようにアスパルテームの面積値は減少し DKP の面積値が増加することが確認された。一般に、アスパルテーム pH3~5 の範囲で安定であることが知られている<sup>5</sup>。今回の標準溶液の調製は

10 %メタノールで行ったが、pH の調整は行っていない。このため、時間の経過によりアスパルテームが分解し、一部はDKPに変換されたものと推察された。そこで、アスパルテームを調製する際の溶媒として、10 %メタノールからメタノール/0.05 mol/L リン酸カリウム緩衝溶液に変更し、アスパルテーム標準溶液④を調製し分析を行った（カラム：InertSustain C<sub>18</sub>）。その結果、図 8 及び図 9 に示すように、標準溶液④の調製当日と調製 1 日後では、標準溶液中のアスパルテームやDKP の面積値に大きな違いは認められなかった。したがって、標準溶液の調製では、「メタノール/0.05 mol/L リン酸カリウム緩衝溶液(pH4.3)」を使用するなど、アスパルテームが安定な pH 領域となる溶媒の使用が必要であることが確認された。なお、FCC12 に記載の HPLC 条件では、ODS カラムを用いて分析を行うことが条件とされている。そこで L-column2 ODS を用いて、アスパルテーム標準溶液④を用いて分析したところ、図 10 に示すように、これまで検討した 3 種のカラムと同様、L、L-APM 及び DKP は良好に分析可能であることが明らかとなった。

### 3) FCC 法における L, D-APM 分析の可否の検証

FCC12 における測定対象は L, L-APM と DKP である。しかし、食品添加物公定書では、アスパルテーム添加物製品中の不純物として L- $\alpha$ -アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (L, D-APM) が規定され、その分析法が明示されている。そこで、前項の 2 で検討し

た分析方法を用いて、L, D-APM の測定が可能か検証を行った。B. 研究方法の 3-6 で示したアスパルテーム及び L, D-APM 混合標準溶液（各化合物の濃度：25  $\mu$ g/mL）を試料とし、カラムとして L-column2 ODS を用いて分析したところ、図 11 に示すように両化合物の分離は不十分であった。また、その他のカラム（InertSustain C<sub>18</sub>, Mightysil RP-18 GP II 及び COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II）においても、各カラムにおけるアスパルテームの保持時間を考慮すると、L-column2 ODS と同様に両化合物の分離は不十分となることが予想された。そこで、移動相（メタノール/0.05 mol/L リン酸（カリウム）緩衝溶液（pH 4.3）=18/82）の組成比を 10/90 に変更し、カラムとして L-column2 ODS を用いて分析したところ、図 12 に示すように両化合物は完全に分離した（分離度 2.3）。しかし、この分析条件では、両化合物の溶出に 60 分程度必要であり、分離の効率性に課題が残った。

### 4) アスパルテーム規格試験法における提案法の適用性の検証

アスパルテームと L, D-APM の良好な分離が示されている既報<sup>4</sup>に従い、B. 研究方法の 3-9 ②（提案法）で示した条件を用いてアスパルテーム及び L, D-APM 混合標準溶液（各化合物の濃度：25  $\mu$ g/mL）を分析した。その結果、図 13 に示すように、両化合物は 20 分以内に溶出し、そのベースライン分離も良好であった。したがって、当該測定条件を用いることで、L, D-APM の不分離による過大なアスパ

ルテーム含量の算出は防止できると考えられた。

次に、この条件における測定対象物質 3 種 (アスパルテーム, L, D-APM, DKP) を対象とした 3 種のカラム (L-column2 ODS, Mightysil RP-18 GP II 及び COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II) における分離度を B. 研究方法の 3-7 で示したアスパルテーム, L, D-APM 及び DKP 混合標準溶液を用いて評価した。その結果, 図 14~16 に示すように, すべてのカラムにおいてアスパルテームと L, D-APM の分離度は 2.5 以上であり, 日本薬局方で完全分離と規定される 1.5 以上であることが確認された。また, これら 2 種と DKP もすべてのカラムにおいて良好な分離を示した。

#### 5) 提案法における L, D-APM を添加したアスパルテーム試料の分析

食品添加物公定書では, アスパルテーム添加物製品中の L, D-APM の残留上限値が 0.02 %と規定されている。そこで, B. 研究方法の 3-8 に示すように, 上限値の 0.02%及び, その 2 倍量である 0.04% の L, D-APM が添加されたアスパルテーム試料について提案法を用いて分析を行い, アスパルテーム及び L, D-APM の分離度及び L, D-APM の S/N を評価した。その結果, 図 17 及び図 18 に示すように, すべての試料においてアスパルテーム及び L, D-APM の分離度は 1.92 以上であり, L, D-APM の S/N は 0.04 %添加試料で 213.32 以上, 0.02 %では 104.7 以上であることが確認された。以上のアスパルテームと L, D-APM の分離度並びに L, D-

APM の S/N から, 残留上限付近の L, D-APM の定量において, 提案法は有用と考えられた。

#### D. 結論

本研究では, アスパルテームの成分規格の更なる向上に向けた検討の一環として, 米国食品規格集 (FCC) 12 で示されている方法を参考に, HPLC によるアスパルテーム確認試験法の確立に関する検討を行った。その結果, FCC 法では, カラム圧やアスパルテームと不純物である L, D-APM の分離度, 分析時間などに問題があることが判明した。そこで種々の検討を繰り返した結果, 流速を 0.8 mL/min, 移動相を 2 種の溶液 (移動相 A: 0.05 mol/L リン酸二水素ナトリウム: 0.05 mol/L リン酸水素二ナトリウム=1: 1, 移動相 B: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム: 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウム: アセトニトリル=4: 4: 2) のグラジエント分析を用いる提案法により, FCC 法における問題点を解決できることが判明し, アスパルテーム, L, D-APM, DKP の 3 種の成分が良好に分析可能であることが明らかとなった。なお, この提案法は, 2024 年 2 月 9 日に公表された第 10 版食品添加物公定書における L, D-APM の純度試験に採用されている。本検討において, 提案法はアスパルテームの定量も可能であり, 現在の電位差滴定法の代替法としても有用と考えられた。また, DKP を含めたアスパルテーム, L, D-APM, DKP の同時定量も可能であることから, 各化合物の定量法, 確認試験法における分析法の統一など, 本法は規格試験法の効率性や実

用性の向上にも貢献できると思われる。

## E. 研究発表

### 1. 学会発表等

1) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, <sup>1</sup>H-定量 NMR に基づいた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニン定量について, 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会 (2023.12)

2) 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, 食品科学工学会第 70 回大会 (2023.8)

3) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 相対モル感度 (RMS) を用いた Single-reference HPLC による健康食品中のアントシアニン定量法の開発, AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会 (2023.7)

4) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 健康食品中のアントシアニン定量における相対モル感度 (RMS) を用いた Single-reference HPLC 法の適用について, 日本食品化学学会 第 29 回学術大会 (2023.5)

### 2. 論文発表等

1) Fuji Y, Uchida K, Akashi T, Ohtsuki T, Matsufuji H, Hirai Y M, Molecular Identification of UDP-Sugar-Dependent Glycosyltransferase and Acyltransferase Involved in the Phenylethanoid Glycoside Biosynthesis Induced by Methyl Jasmonate in *Sesamum indicum* L. *Plant and Cell Physiology*, **64**, 716-728 (2023)

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## G. 参考文献

1) Idris M, Varshney KM, Sudhakar P, Shukla SK, Baggi TR. HPLC determination of aspartame in tabletop sweeteners by precolumn derivatization using 2, 4-dinitrofluorobenzene. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**, 522-527 (2012)

2) 第 10 版食品添加物公定書, 厚生労働省, 消費者庁 (2024)

[https://www.caa.go.jp/policies/policy/standards\\_evaluation/food\\_additives/official\\_documents\\_002](https://www.caa.go.jp/policies/policy/standards_evaluation/food_additives/official_documents_002)

3) Food Chemical Codex (FCC) Twelfth Edition, The United States Pharmacopeia (USP) (2020)

4) Ohtsuki T, Nakamura R, Kubo S, Otabe A, Oobayashi Y, Suzuki S, Yoshida M, Yoshida M, Tatebe C, Sato K, Akiyama H. Development of an HPLC Method with an ODS Column to Determine Low Levels of Aspartame Diastereomers in Aspartame. *PLoS One*. 2016 Mar 25;11(3):e0152174. doi: 10.1371/journal.pone.0152174.

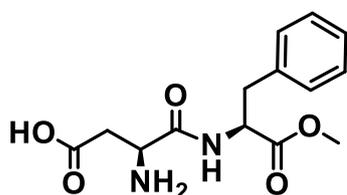
5) 衛生試験法・注解 2020, 日本薬学会編, 金原出版 (2020)

## H. 健康危機情報

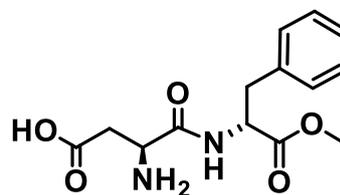
特になし。

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 (TFA 塩) の含量測定における  $^1\text{H}$ -qNMR 条件

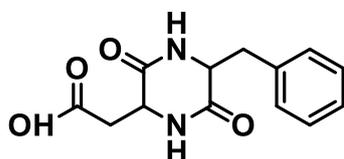
装置	JEOL ECA 500 spectrometer
スペクトル幅	20 ppm (-5-15 ppm)
データポイント数	65536
オートフィルター	on (eight times)
取り込み期間	6.55 秒
フリップ角	90°
取り込み待ち時間	60 秒
スキャン回数	8
スピニング	off
$^{13}\text{C}$ デカップリング	Multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)



アスパルテーム  
(L, L-APM)



L, D- APM



DKP

図1 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 (L, D-APM) 及び5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸 (DKP) の化学構造

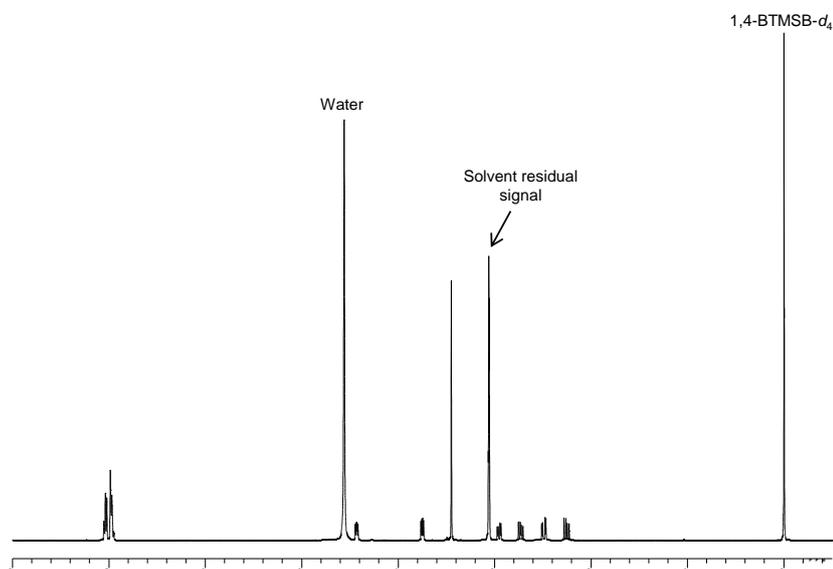


図 2 アスパルテームの  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル

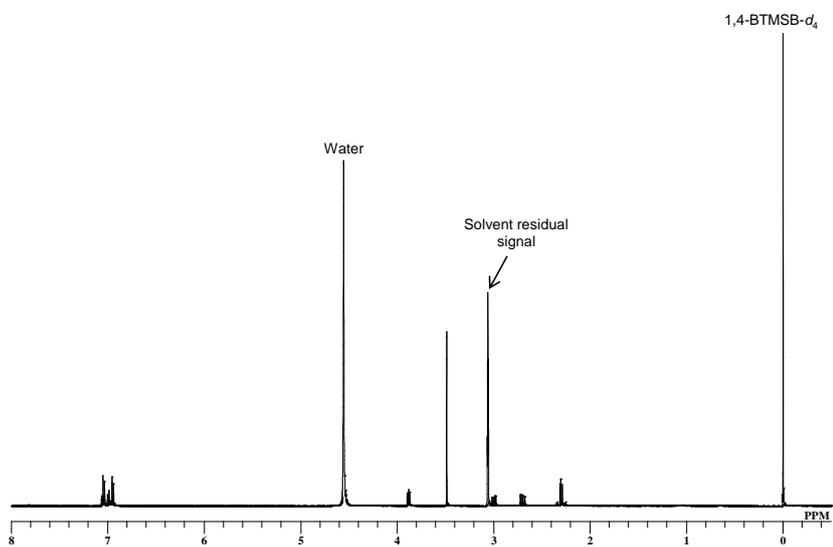


図 3 L- $\alpha$ -アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (TFA 塩) の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル

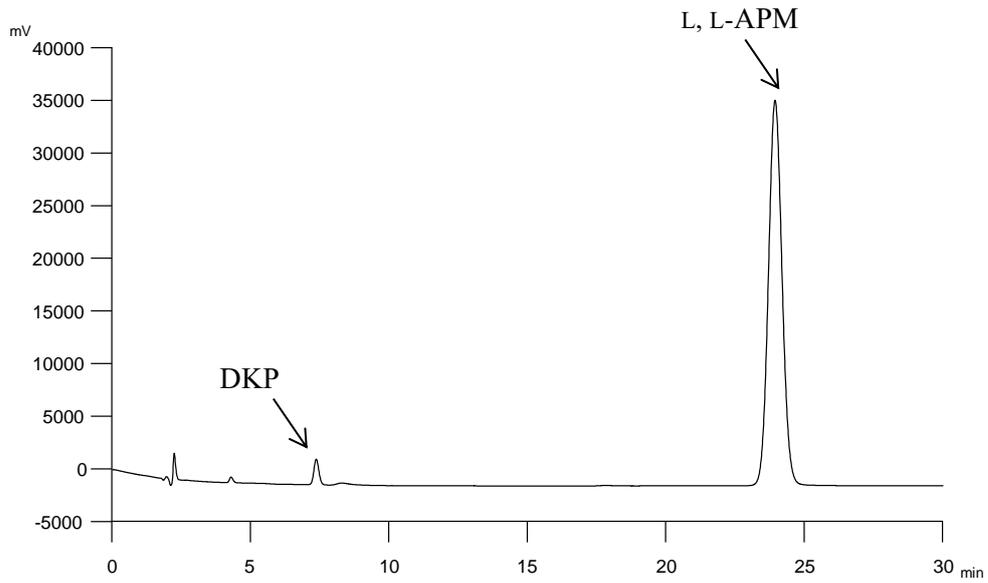


図 4 アスパルテーム (L, L-APM) 標準溶液② (50 µg/mL) のクロマトグラム  
 カラム : InertSustain C<sub>18</sub> (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm)  
 移動相 : メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = 18/82

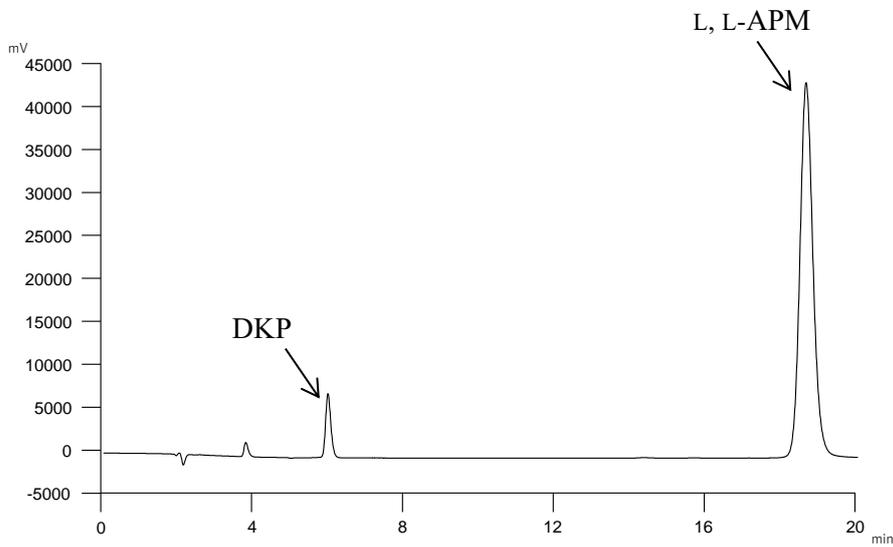


図 5 アスパルテーム (L, L-APM) ② (50 µg/mL) のクロマトグラム  
 カラム : Mightysil RP-18 GP II (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm)  
 移動相 : メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = 18/82

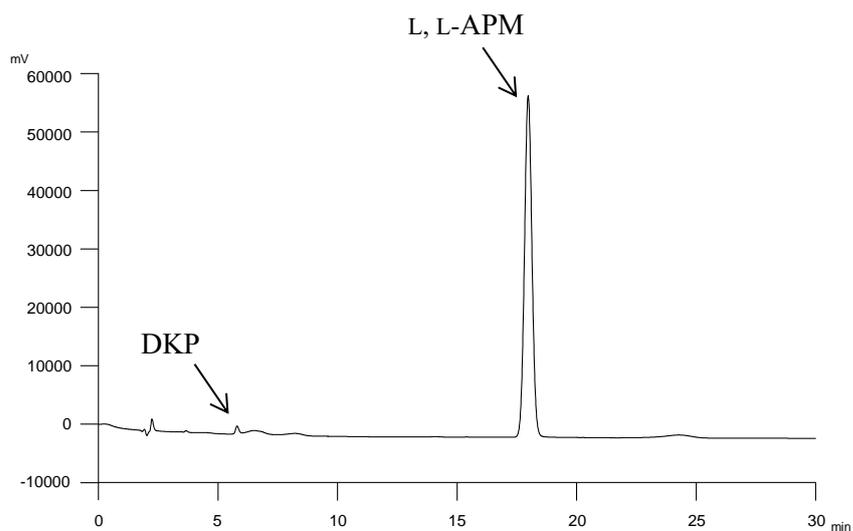


図 6 アスパルテーム (L, L-APM) ② (50 µg/mL) のクロマトグラム  
 カラム : COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm)  
 移動相 : メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = 18/82

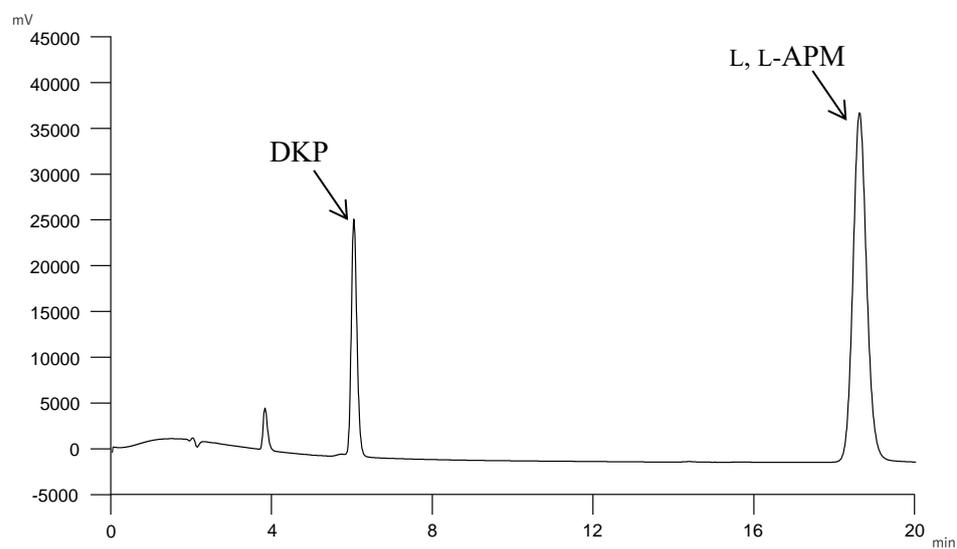


図 7 調製 1 日後のアスパルテーム標準溶液② (50 µg/mL) のクロマトグラム  
 カラム : Mightysil RP-18 GP II (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm)  
 移動相 : メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) = 18/82

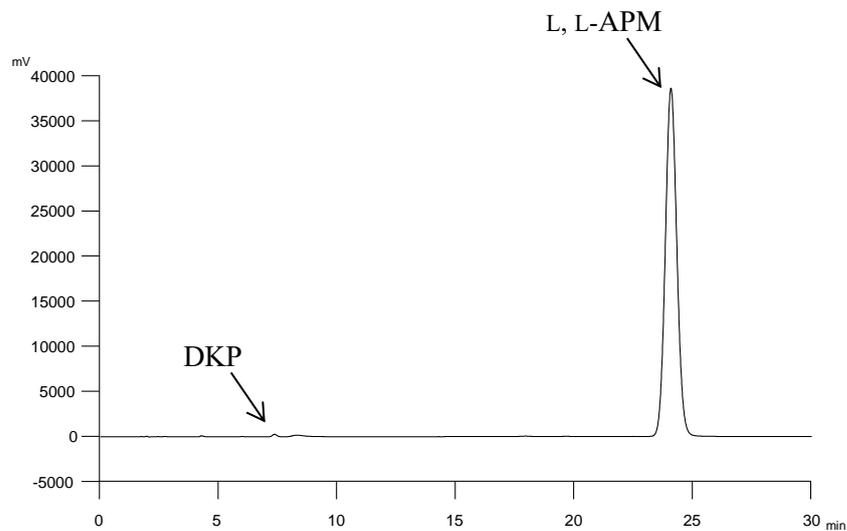


図 8 調製当日のアスパルテーム標準溶液④ (50 µg/mL) のクロマトグラム  
 カラム : InertSustain C<sub>18</sub> (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm)  
 移動相 : メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) =18/82

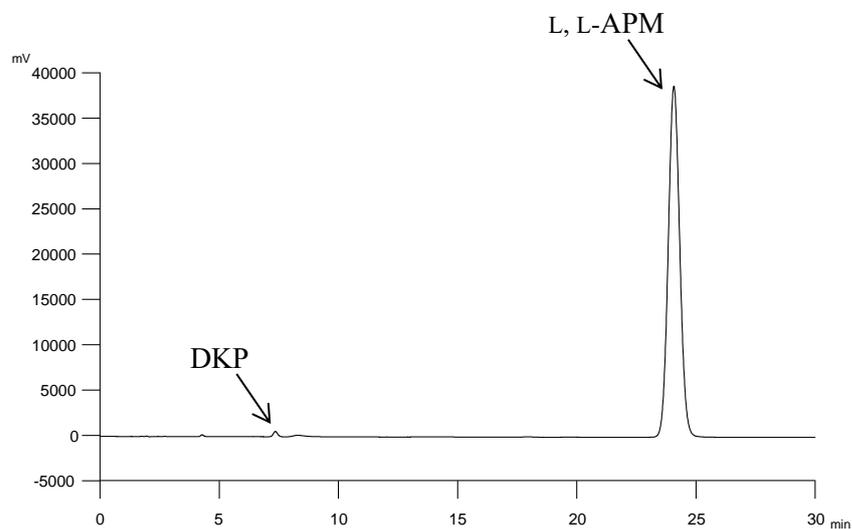


図 9 調製 1 日後のアスパルテーム標準溶液④ (50 µg/mL) のクロマトグラム  
 カラム : InertSustain C<sub>18</sub> (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm)  
 移動相 : メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) =18/82

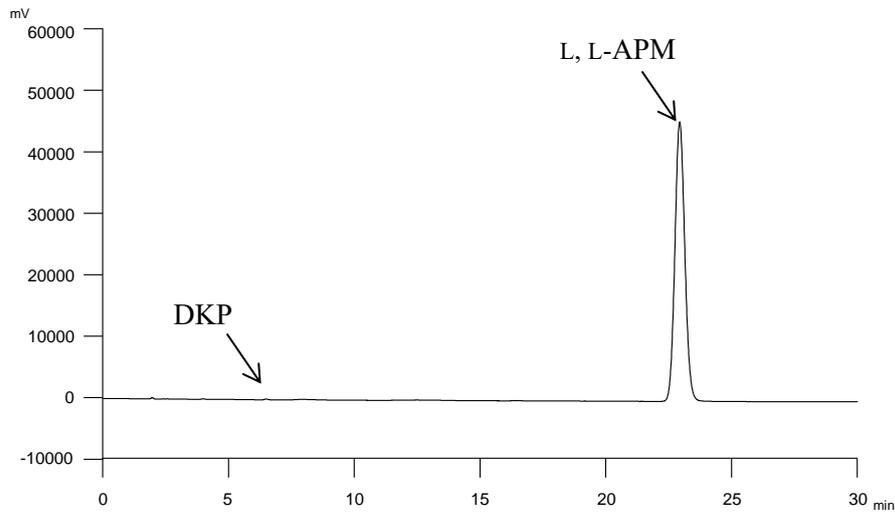


図 10 アスパルテーム標準溶液④ (50 µg/mL) のクロマトグラム  
 カラム : L-column2 ODS (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm)  
 移動相 : メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) =18/82

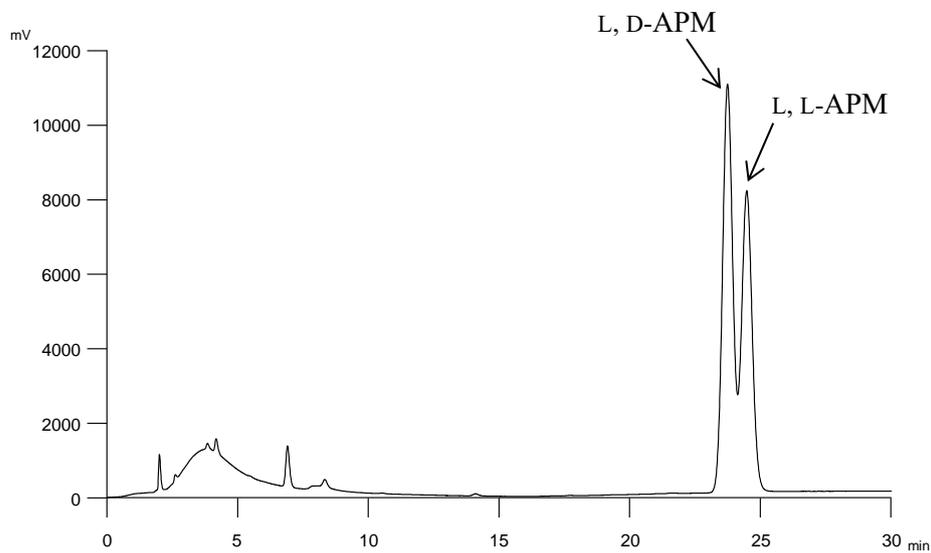


図 11 アスパルテーム及び L, D-APM 混合標準溶液のクロマトグラム  
 各化合物の濃度 : 25 µg/mL  
 カラム : L-column2 ODS (4.6×250 mm, 粒子径 5 µm)  
 移動相 : メタノール/0.05 mol/L リン酸 (カリウム) 緩衝溶液 (pH 4.3) =18/82

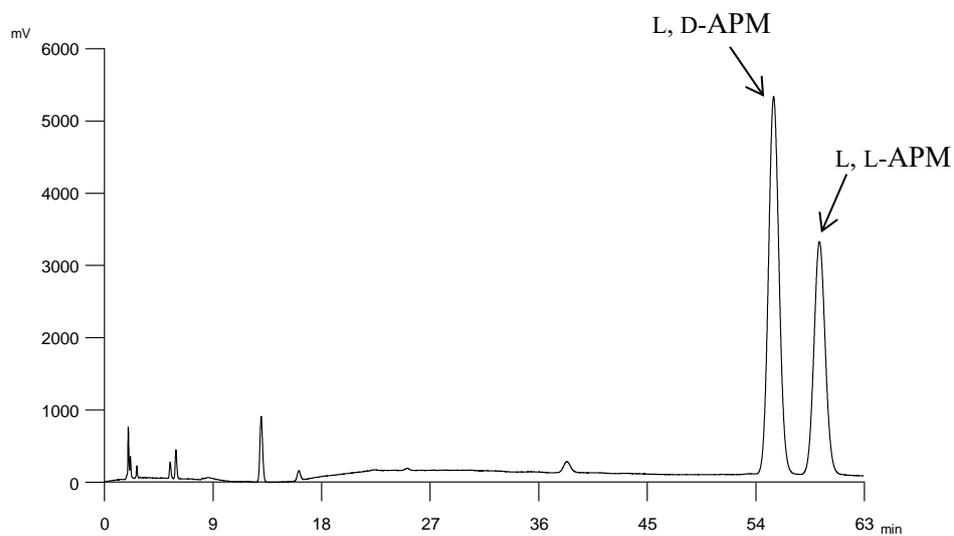


図 12 アスパルテーム及び L, D-APM 混合標準溶液のクロマトグラム

各化合物の濃度：25  $\mu\text{g/mL}$

カラム：L-column2 ODS (4.6 $\times$ 250 mm, 粒子径 5  $\mu\text{m}$ )

移動相：メタノール/0.05 mol/L リン酸（カリウム）緩衝溶液（pH 4.3）=10/90

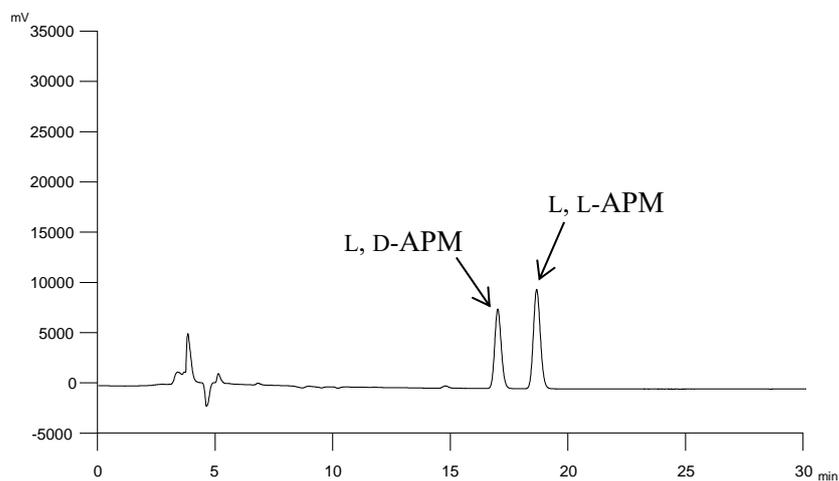


図 13 アスパルテーム及び L, D-APM 混合標準溶液のクロマトグラム

各化合物の濃度：25  $\mu\text{g/mL}$

カラム：L-column2 ODS (4.6 $\times$ 250 mm, 粒子径 5  $\mu\text{m}$ )

移動相：移動相 A: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウム = 1:1, B: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウム : アセトニトリル = 4:4:2, グラジエント分析

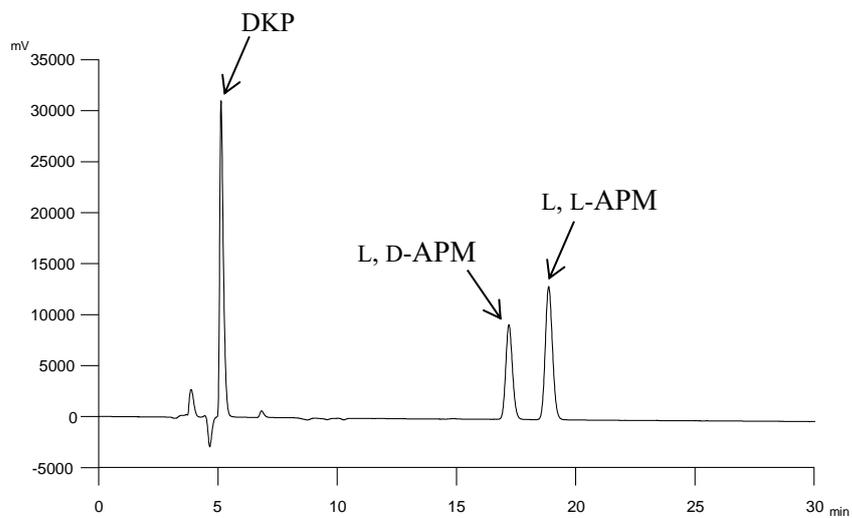


図 14 アスパルテーム、L, D-APM 及び DKP 混合標準溶液のクロマトグラム

各化合物の濃度 : 33.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$

カラム : L-column2 ODS (4.6 $\times$ 250 mm, 粒子径 5  $\mu\text{m}$ )

移動相 : 移動相 A: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウ

ム = 1:1, B: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウ

ム:アセトニトリル=4:4:2, グラジエント分析

L,D-APM と L,L-APM の分離度 : 3.1

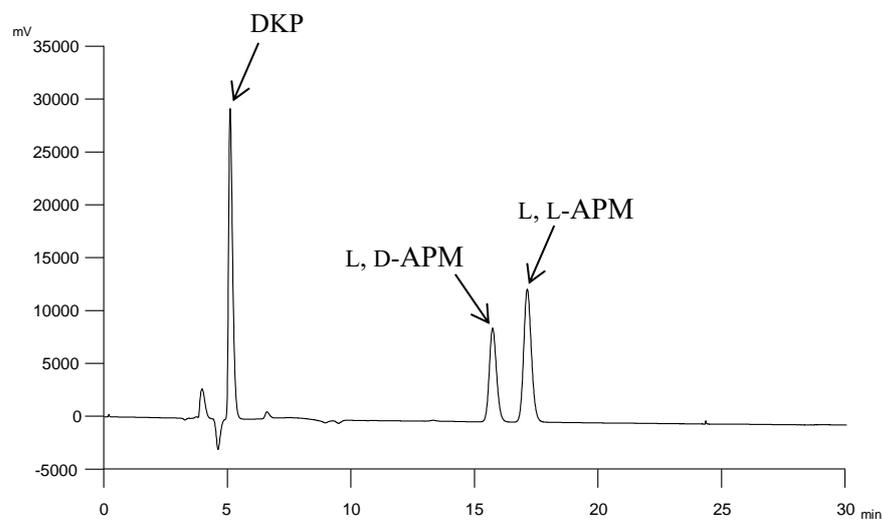


図 15 アスパルテーム、L, D-APM 及び DKP 混合標準溶液のクロマトグラム

各化合物の濃度 : 33.3  $\mu\text{g/mL}$

カラム : Mightysil RP-18 GP II (4.6 $\times$ 250 mm, 粒子径 5  $\mu\text{m}$ )

移動相 : 移動相 A: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウ

ム = 1:1, B: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリ

ウム:アセトニトリル=4:4:2, グラジエント分析

L,D-APM と L,L-APM の分離度 : 2.5

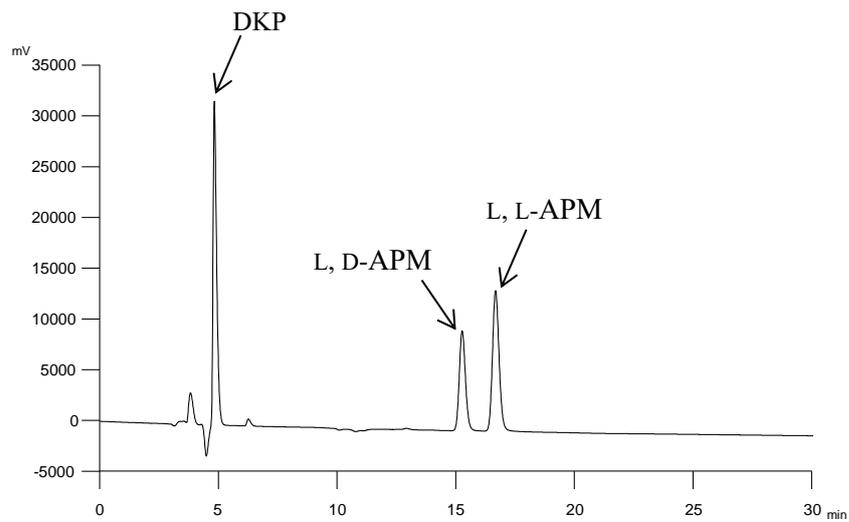


図 16 アスパルテーム、L, D-APM 及び DKP 混合標準溶液のクロマトグラム

各化合物の濃度 : 33.3  $\mu\text{g/mL}$

カラム : COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II (4.6 $\times$ 250 mm, 粒子径 5  $\mu\text{m}$ )

移動相 : 移動相 A: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウ

ム = 1:1, B: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウ

ム:アセトニトリル=4:4:2, グラジエント分析

L,D-APM と L,L-APM の分離度 : 2.9

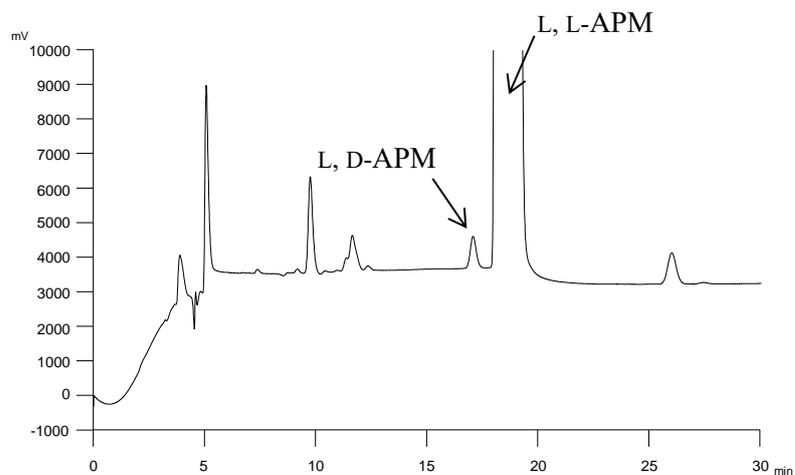


図 17 L, D-APM (濃度 : 0.04%) が添加されたアスパルテームのクロマトグラム

カラム : L-column2 ODS (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm)

移動相 : 移動相 A: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウム = 1:1, B: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウム : アセトニトリル = 4:4:2, グラジエント分析

L,D-APM と L,L-APM の分離度 : 1.93

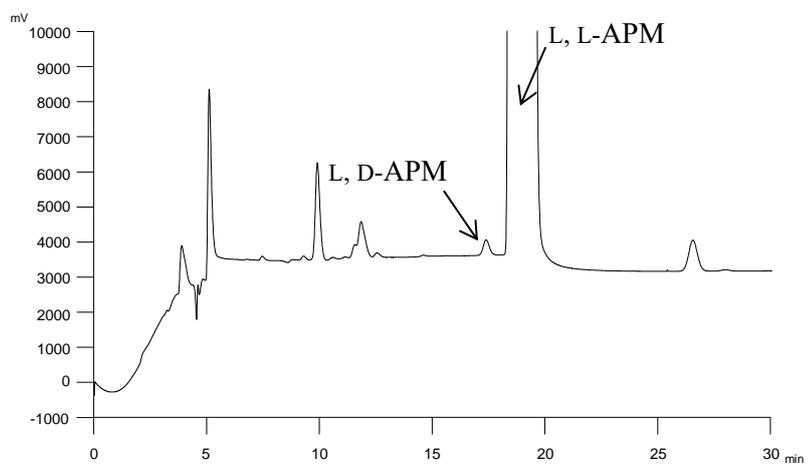


図 18 L, D-APM (濃度 : 0.02%) が添加されたアスパルテームのクロマトグラム

カラム : L-column2 ODS (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm)

移動相 : 移動相 A: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウ

ム = 1:1, B: 0.05 mmol/L リン酸二水素ナトリウム : 0.05 mmol/L リン酸水素二ナトリウ

ム:アセトニトリル=4:4:2, グラジエント分析

L,D-APM と L,L-APM の分離度 : 1.94