

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
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 6 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 アスパルテームの規格試験法の改良および精度向上を目指した研究の一環として、昨年度確立した提案法を基に¹H核による定量NMR(¹H-qNMR)に基づく相対モル感度(Relative Molar Sensitivity: RMS)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(L, D-APM)および5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸(DKP)分析法の確立について検討を行った。その結果、基準物質(アスパルテーム)に対するL, D-APMおよびDKPの各RMSが明らかとなり、これらのRMSの正確性はモデル溶液を用いた実験により実証された。以上の結果より、今回明らかとなったRMS及び基準物質を用いることでアスパルテームから、L, D-APM及びDKPの定量が可能となり、アスパルテームを含め計3種の測定対象物質の効率的かつ信頼性の高い分析法が確立された。

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-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の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¹。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²において、①製品中のアスパルテーム含量、②原料由来または製造の際に生じる副生成物等(鉛、ヒ素、5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸(DKP)、L-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。昨年度は、米国食品規格集(FCC)12³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い、流速や移動相の変更、グラジエント条件を最適化したアスパルテーム、L, D-APM、DKPの同時定量が可能な方法(提案法)を確立した。今年度は、提案法のさらなる改良並びに分析法全体の効率化や精度向上を目的に、¹H核による定量NMR(¹H-qNMR)に基づく相対モル感度(Relative Molar Sensitivity: RMS)を用いたHPLC法(RMS法)^{4,6}に着目し検討を進めることとした。このRMS法は、測定対象物質および測定対象物質とは異なる基準物質(代替定量用標品)との正確なRMSを明らかにすることにより、「基準物質」、「RMS」および「測定対象と基準物質の分子量比」から測定対象物質の定量を可能とする方法である。また、RMSは、計量学的に正確な定量が可能である¹H-qNMRに基づき算出されているため、この方法により得られる定量値の信頼性も高いと言える。

本研究では、これらの背景を踏まえ、基準物質としてアスパルテームを用いた RMS 法による L, D-APM 及び DKP 分析法の確立について検討した。

B. 研究方法

1) 試薬

アスパルテームは、関東化学株式会社製を用いた。L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル(L, D-APM)は、富士フイルム和光純薬株式会社製を用いた。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製を用いた。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

LM1010 高速液体クロマトグラフ(評価機)((株)日立ハイテクサイエンス製)。

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 及び AP125WD((株)島津製作所製)

遠心分離機：5220(久保田商事(株)製)及び MiniSpin (エッペンドルフ製)

3) ¹H-qNMR に基づく RMS を用いたアスパルテーム、L, D-APM、DKP 分析法の確立

3-1) ¹H-qNMR によるアスパルテーム L, D-APM 及び DKP 試薬の含量測定

アスパルテーム約 25 mg、L, D-APM 及び DKP 約 5 mg を精密に量りとり、個々のサンプル管に各測定対象物質を移した後、約 5 mg を精密に量り取った 1,4-BTMSB-*d*₄ 約 5 mg を各測定対象物質が入ったサンプル管へそれぞれ移し、重メタノール 5 mL をそれぞれ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、¹H-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、L, D-APM 又は DKP 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_{SA}(%))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-D-APM：ともに 294.3、DKP：262.26)

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}=¹H-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) ¹H-qNMR 測定条件及びデータの解析

¹H-qNMR 測定の基本条件を表 1 に示した。なお、¹H-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(δ 0)とし、δ 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、L, D-APM 又は DKP 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) 基準物質(アスパルテーム)に対する L, D-

APM 及び DKP の RMS の算出

アスパルテーム, L, D-APM 及び DKP について, ^1H -qNMR により算出された純度値に基づき正確に量りとり, メタノール/0.05 mol/L リン酸(カリウム)緩衝溶液(pH=4.3)を加え調製したものを各測定対象物質の標準原液とした(アスパルテーム: 約 1500 $\mu\text{mol/L}$, L, D-APM 及び DKP: 約 500 $\mu\text{mol/L}$). その後, メタノール/0.05 mol/L リン酸(カリウム)緩衝溶液(pH=4.3)を用いて適宜希釈し, 各測定対象物質の標準溶液を調製した. 各標準溶液の濃度範囲はアスパルテーム及び DKP は約 3~60 $\mu\text{mol/L}$ (5 点濃度), L, D-APM は約 3~40 $\mu\text{mol/L}$ (5 点濃度)である.

これら各種濃度の標準溶液については, 各化合物 3 セットずつ調製し, 次の測定条件によりそれぞれ分析した.

■ 測定条件

カラム: L-column2 ODS (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm), カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$, 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

分析後, 各溶液のモル濃度を X 軸に, 検出器の応答値(ピーク面積値)を Y 軸にプロットし, Excel を用いて原点を通る(X: 0, Y: 0)回帰直線を作成し, これを検量線とした. なお, 各溶液におけるクロマトグラム上のピークの S/N が 10 以上となる濃度範囲で検量線を作成した. その後, 得られた測定対象物質及び基準物質の検量線の検量線式の傾きの比(測定対象物質/基準物質)から基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出した.

3-4) RMS の正確性の評価

L, D-APM 濃度約 11 $\mu\text{g/mL}$ のモデル溶液 A 及び DKP 濃度約 11 $\mu\text{g/mL}$ のモデル溶液 B をそれぞれ調製し, RMS の正確性の評価に使用した.

(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) ^1H -qNMR によるアスパルテーム, L, D-APM 及び DKP 試薬の含量測定

RMS の算出にあたり, 使用する標準溶液の濃度の正確性を担保するためには, 試薬の正確な含量(純度)をあらかじめ把握することが重要である. そこで, 各試薬の含量については, ^1H -qNMR 法により求めることとした. ^1H -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, 測定対象物質の含量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は高い方法と言える. そこで, 測定対象物質であるアスパルテーム, アスパルテーム, L, D-APM 及び DKP について ^1H -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, 認証標準物質として 1,4-BTMSB- d_4 を用いて試薬中の各含量を算出した. 各化合物の ^1H -qNMR スペクトルを図 2 から図 4 に示す. これらのプロファイルから, アスパルテームでは δ 2.49 ppm, L, D-APM では δ 2.06 ppm, DKP では δ 2.04 ppm のシグナルを定量用シグナルとして選択し, これらのシグナルから, 各試薬の含量(純度)を各試薬 2 併行のデータの平均値より算出した. その結果, 各含量は, アスパルテームで 91.9%, L, D-APM で 85.2%, DKP で 99.1%であることが明らかとなった.

2) 基準物質(アスパルテーム)に対する L, D-APM 及び DKP の RMS の算出

次に、基準物質(アスパルテーム)に対する L, D-APM 及び DKP の RMS を算出するため、¹H-qNMR による含量に基づいて調製された各測定対象物質及び基準物質の標準溶液について、(B-3-2 項に示した測定条件により紫外可視分光検出器が接続された HPLC で分析した(図 5)。その後、得られたデータに基づき原点を通る各検量線を作成し、その検量線式の傾きの比(測定対象/基準物質)から基準物質に対する測定対象の RMS を算出した。まず、各検量線の直線性を評価したところ、L, D-APM, DKP 及びアスパルテームの検量線の決定係数は 0.996~0.9999 と良好であることが確認された。各測定対象物質及び基準物質の代表的な検量線を図 6 に示す。測定対象物質及び基準物質ごとに 3 併行の検量線の傾きの平均値を算出したところ、L, D-APM は 1319, DKP は 1555, アスパルテームは 1583 であることが判明した。これらの検量線の傾きの相対標準偏差は 1.5~6.6% であり、検量線の決定係数(直線性)とあわせて評価すると、これらの検量線の傾きは RMS の算出に適用可能であることが明らかとなった。そこで、得られたこれらのデータより、基準物質(アスパルテーム)に対する測定対象物質の RMS を算出したところ、表 2 に示す値であることが明らかとなった。

3) RMS の正確性の評価

得られた RMS の正確性を評価するため、L, D-APM を含むモデル溶液 A(濃度約 11 µg/mL)及び DKP を含むモデル溶液 B(濃度約 11 µg/mL)を各 3 セットずつ調製し、HPLC に供し(図 7)、RMS 法及び従来法の 1 つである測定対象物質を定量用標品として用いる絶対検量線法により得られる定量値を比較した。その結果、表 3 に示すように、RMS 法と絶対検量線法により得られた定量値はほぼ同等であった。また RSD は最大で 4.3% と精度も良好であった。以上の結果より、基準物質及びそれに対応する RMS は正確であり、RMS 法によりアスパルテームから L, D-APM 及び DKP の精確な定量が可能であることが明らかとなった。

D. 結論

本研究では、アスパルテームの規格試験法の改良および精度向上を目指した研究の一環として、昨年度確立した提案法を基に¹H-qNMR に基づく RMS を用いた L, D-APM および DKP 分析法の確立について検討した。その結果、正確な標準溶液の濃度に基づいて作成した各検量線式の傾きの比(測定対象物質の傾き/基準物質の傾き)より、基準物質(アスパルテーム)に対する測定対象物質 2 種の各 RMS を明らかにした。これらの RMS の正確性はモデル溶液を用いた検証により実証され、アスパルテームから測定対象物質 2 種の効率的かつ高精度な定量を可能とすることが明らかとなった。本研究で確立した分析法は、アスパルテームの規格試験における実用的な手法としての活用が期待される。

E. 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
- 3) Food Chemical Codex (FCC) Twelfth Edition, The United States Pharmacopeia (USP)(2020).
- 4) Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Araho D, Murakami T, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on ¹H-qNMR for khellactone esters from *Peucedanum japonicum* root extract. *Food Chem.*, 427, 136647 (2023)

- 5) Takahashi M, Morimoto K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Study on the Synthesis of methylated reference and their application in the quantity of curcuminoids using single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *Chem. Pharm. Bull.*, 70, 25-31 (2022)
- 6) Koyama K, Sasako H, Higashi Y, Ichikawa H, Nagoya A, Hirao T: Quantitative analysis of bisacurone in turmeric by HPLC using relative molar sensitivity. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 63, 202-209 (2022).

F. 研究発表

F-1) 論文発表

F-1-1) 論文等

- 1) Ohtsuki T, Huang Y, Kamiya A, Nakayama Y, Matsushita M, Morikawa S, Matsufuji H: Development of an HPLC method using relative molar sensitivity for the measurement of blood concentrations of nine pharmaceutical compounds. *J. Pharm. Health Care Sci.*, 2024; 10: 35.

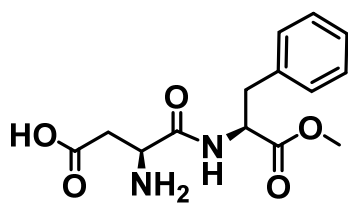
F-2) 学会発表

F-2-1) 学会等

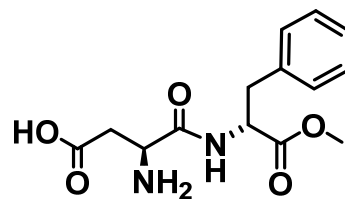
- 1) 大槻崇, 神谷彩音, 中山優希, 黄奕, 松下美由紀, 森川悟, 松藤寛: TDM 対象薬など医薬品 6 種の血中濃度測定における相対モル感度に基づくシングルリファレンス HPLC 法の応用. 第 6 回日本定量 NMR 研究会年会(2024.12) (東京)
- 2) 大槻崇, 馬場萌加, 二見櫻子, 黄奕, 遠藤悠平, 金子剣伸, 松藤寛: ^1H -qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いた大豆イソフラボン類分析法の確立. 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会(2024.5) (東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

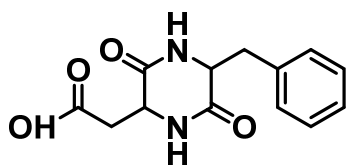
なし



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)および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

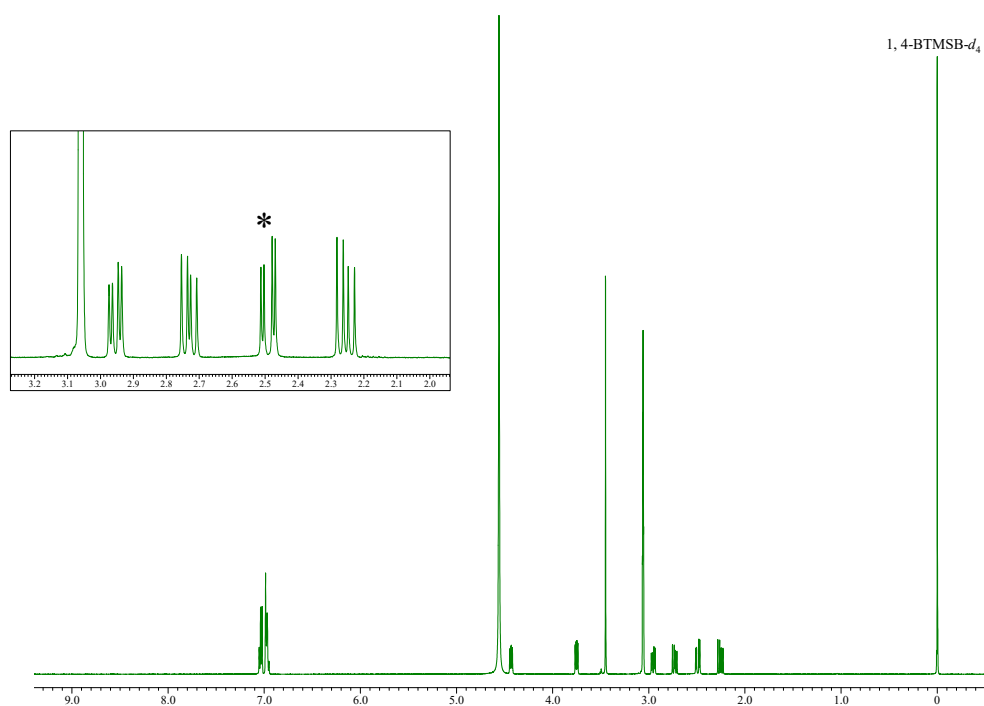


図2 アスパルテームの ^1H -qNMR スペクトル

* : 定量用シグナル

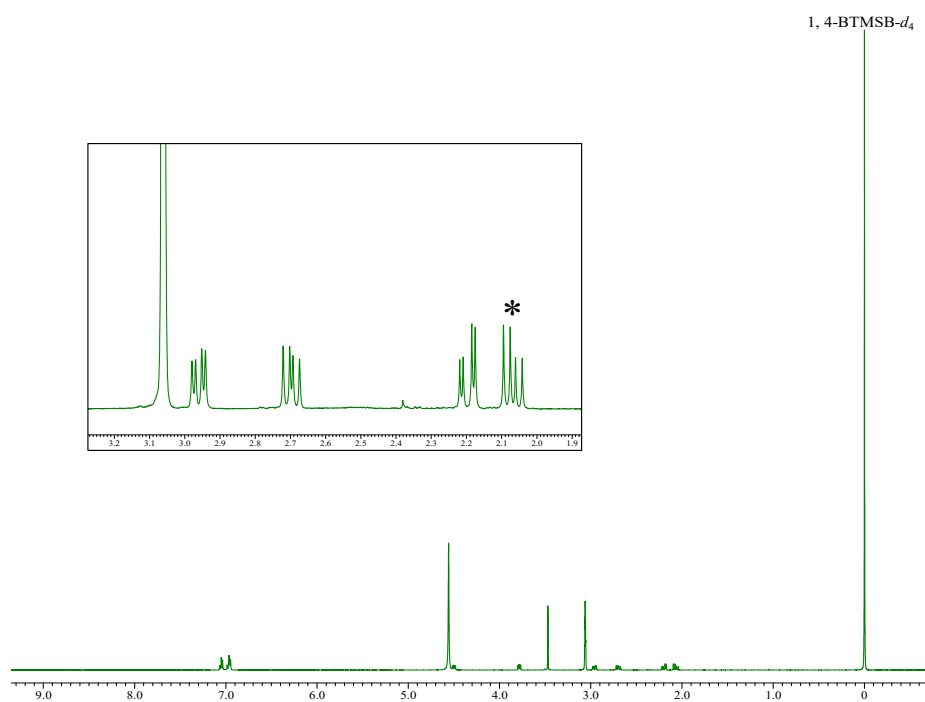


図 3 L, D-APM の ^1H -qNMR スペクトル

* : 定量用シグナル

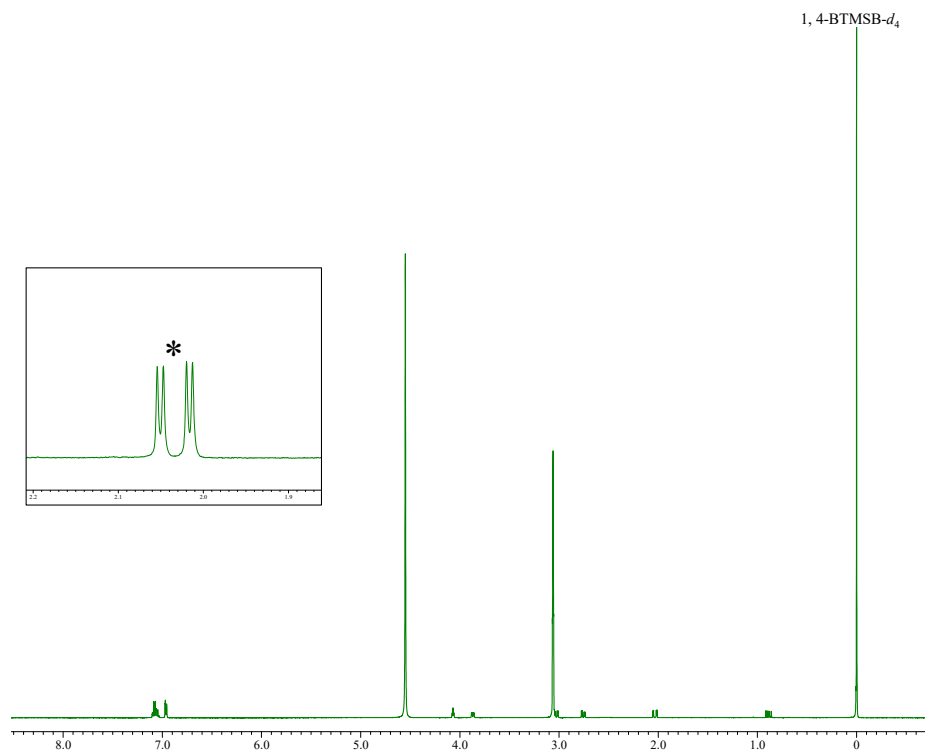


図 4 DKP の ^1H -qNMR スペクトル

* : 定量用シグナル

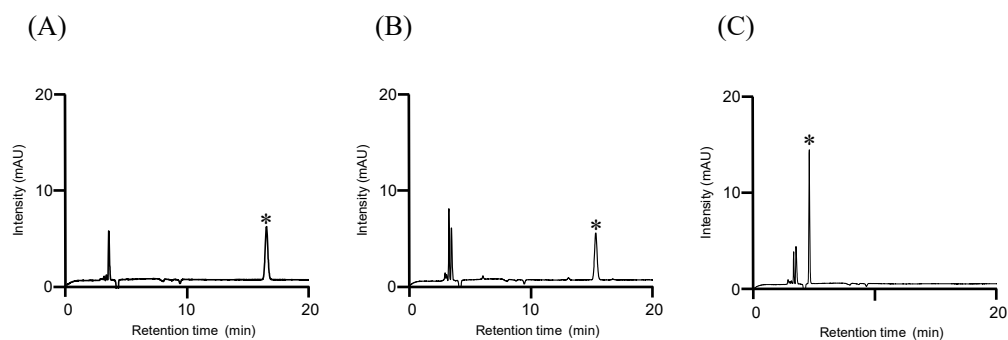


図 5 アスパルテーム(A), L, D-APM(B), DKP(C)のクロマトグラム

* : 測定対象物質のピーク, 標準溶液の濃度(15 $\mu\text{g/mL}$)

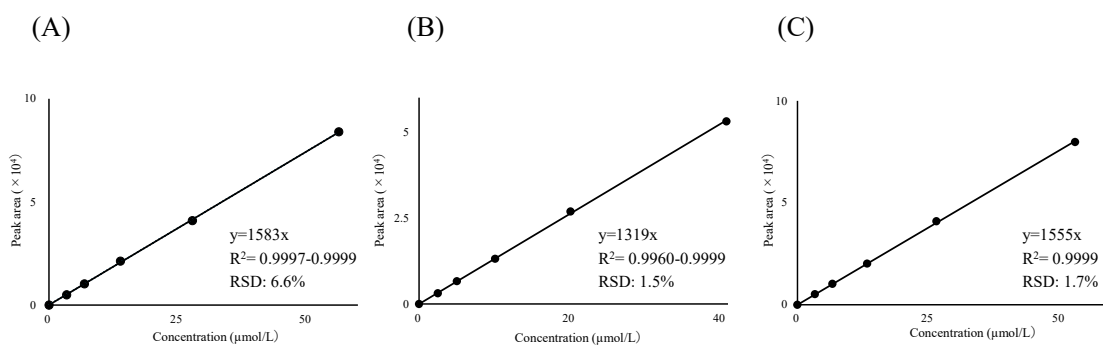


図 6 アスパルテーム(A), L, D-APM(B), DKP(C)の検量線

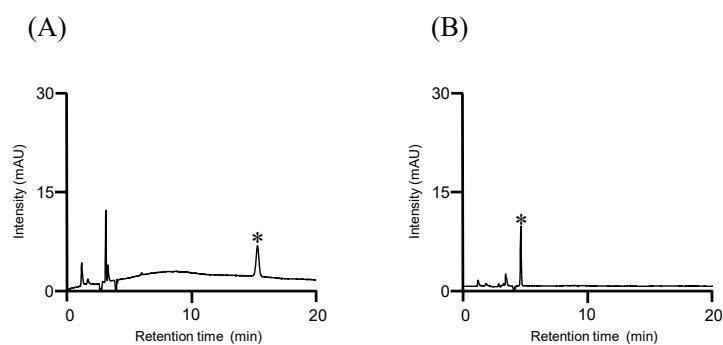


図 7 モデル溶液 A(A)及びモデル溶液 B(B)のクロマトグラム

* : 測定対象物質のピーク

表 1 ^1H -qNMR 測定条件

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}C デカップリング	Multi-pulse decoupling with phase and frequency switching(MPF-8)

表 2 基準物質に対する測定対象物質の相対モル感度(RMS)

		Calibrant
		Aspartame ($y=1583x$)
Analyte	L, D-APM ($y=1319x$)	0.83
	DKP ($y=1555x$)	0.98

表 3 RMS 法と従来法(絶対検量線法)によるモデル溶液 A および B の測定対象物質の含量の比較(n=3)

	RMS method		Conventional method	
	Content ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	Content ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
Model solution A	11.5	4.3	11.4	4.3
Model solution B	11.2	0.6	11.1	0.6

モデル溶液 A の L, D-APM 濃度：約 11 $\mu\text{g/mL}$, モデル溶液 B の DKP 濃度：約 11 $\mu\text{g/mL}$