

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向上及び摂取量に基づく安全性確保に関する研究
令和 7 年度分担研究報告書

定量 NMR を応用した規格試験法の改良に関する研究
—ネオ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及び精度向上を目的とした研究の一環として、国際単位系（SI）にトレーサブルな絶対定量法である ^1H -qNMR を用いたネオテーム及び *N*-(3,3-ジメチルブチル)- L - α -アスパルチル- L -フェニルアラニンの含量分析に関する検討を行った。その結果、両化合物について定量に適した定量用シグナルが選定され、 ^1H -qNMR 法がネオテーム及び *N*-(3,3-ジメチルブチル)- L - α -アスパルチル- L -フェニルアラニンの定量用試薬の含量分析への適用に有用であることが明らかとなった。以上より、本法は食品添加物の定量用標品の信頼性向上に資する分析法となり得ることが示された。

A. 研究目的

日本においては、食品添加物の安全性や品質を確保する観点から、食品添加物の性状、含量（純度）等に関する成分規格並びに使用可能な食品の範囲及び使用量等に関する使用基準などが定められており、第 10 版食品添加物公定書に収載されている。これらの規格及び基準は、食品添加物の適正な製造、流通及び使用を担保し、食品の安全性及び品質の維持に資するものである。食品添加物の成分規格においては、原則として主要成分や不純物の含量並びにその分析法が規定されており、これらの定量には液体クロマトグラフィー（LC）が使用されることが多い。このような相対定量法において

は、測定対象物質と同一であり、かつ純度値が適切に付与された標準物質を必要とするが、計量学的に妥当な手順に基づいて純度が値付けされた認証標準物質は極めて限られている。このため、実務上は試薬メーカーが供給する定量用標品が広く用いられているものの、これらに付与された純度又は含量は自社規格に基づくものであり、計量学的に正確とは言えない。すなわち、付与された純度の正確性の問題が、定量結果の信頼性に影響を及ぼす可能性は否定できない。ゆえに、食品添加物の定量用標品について、含量（純度）を高い信頼性で評価し得る分析法を確立することは、食品添加物の安全性及び製品品質の保証の観点から重

要である。

近年、このような課題に対する有力な手法として、国際単位系（SI）へのトレーサビリティ（計量トレーサビリティ）を有する絶対定量法である定量 NMR（quantitative NMR; qNMR）が注目されている^{2,3)}。特に、¹H-NMR を用いる ¹H-qNMR は、定量性が担保された測定条件下において、2 種の化合物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 種の化合物は同一の化学構造を有している必要はない。従って、計量学的に正確な純度値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物質のシグナル面積強度比、水素数、秤量値の関係から、多様な測定対象物質の含量又は純度を求めることが可能となる。このように、定量値の計量トレーサビリティを確保し得る ¹H-qNMR は、AQARI (Accurate Quantitative NMR Internal reference substance) と称され、残留農薬試験用標品や日本薬局方試薬などの純度分析⁴⁾、生薬の主要成分の含量分析⁷⁾へ利用されている。また、¹H-qNMR は、既存添加物中の主要成分の含量分析や食品添加物の定量用標品の純度分析など、食品添加物分野においても既に応用例が報告されている^{8,9)}。特に、食品添加物の規格試験においては、主成分のみならず不純物などの関連化合物をも対象として定量用標品の品質を適切に把握することが、定

量結果の信頼性の向上に重要である。従って、食品添加物及びその関連化合物を対象として、¹H-qNMR の適用性を具体的に検証することには意義があると言える。

そこで、本研究では ¹H-qNMR の有用性を明らかにすることを目的として、アスパルテームを基盤として開発された高甘味度甘味料であるネオテームの規格試験法で使用されるネオテーム (Methyl *N*-(3,3-dimethylbutyl)-*L*-α-aspartyl-*L*-phenylalaninate) 及びその脱メチル化体である *N*-(3,3-ジメチルブチル)-*L*-α-アスパルチル-*L*-フェニルアラニン (*N*-(3,3-dimethylbutyl)-*L*-α-aspartyl-*L*-phenylalanine) (図 1) を対象に検討を行った。

B. 研究方法

1) 試薬

ネオテームは、東京化成工業（株）製を用いた。*N*-(3,3-ジメチルブチル)-*L*-α-アスパルチル-*L*-フェニルアラニンは ChemCruz 社製を用いた。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（株）製（Code No. 024-17031）を用いた。重水素化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

核磁気共鳴装置（NMR）： JNM-ECZL500（¹H 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：AP125WD ((株) 島津製作所製)

3) ^1H -qNMR 法によるネオテーム及び N -(3,3-ジメチルブチル)- L - α -アスパルチル- L -フェニルアラニンの定量

3-1) ネオテーム及び N -(3,3-ジメチルブチル)- L - α -アスパルチル- L -フェニルアラニン 含量の測定

ネオテームまたは N -(3,3-ジメチルブチル)- L - α -アスパルチル- L -フェニルアラニン約 5 mg 及び 1,4-BTMSB- d_4 約 5 mg をそれぞれ精密に量り、重水素化メタノール 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、 ^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 としたときのネオテームまたは N -(3,3-ジメチルブチル)- L - α -アスパルチル- L -フェニルアラニン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。

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

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 (ネオテーム：378.46、 N -(3,3-ジメチルブチル)- L - α -

アスパルチル- L -フェニルアラニン：364.44)

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/mL)

C_{IC} = ^1H -qNMR 用内標準物質 (1,4-BTMSB- d_4) の濃度 (mg/mL) (認証濃度)

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

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 ($\delta 0$) 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 としたときのネオテームまたは N -(3,3-ジメチルブチル)- L - α -アスパルチル- L -フェニルアラニン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

本研究では、 ^1H -qNMR 法を用いてネオテームおよび *N*-(3,3-ジメチルブチル)-*L*- α -アスパルチル-*L*-フェニルアラニンの含量評価を行った。 ^1H -qNMR 法は、NMR スペクトル上に観察される基準物質（標準物質）及び測定対象物質のシグナル面積強度（積分値）が、それぞれの物質質量（モル数）及びシグナルに寄与するプロトン数に比例することに基づき、測定対象物質を絶対定量することが可能である。また、SI トレーサビリティを有する認証標準物質を基準物質として用いることにより、得られる定量値の計量学的な信頼性を確保することができる。さらに、本法は測定対象物質と同一の定量用標品を必ずしも必要としないことから、定量用標品の純度値に依存する誤差要因の低減にも有用である。本検討では、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 を基準物質として用い、各試料中のネオテーム又は *N*-(3,3-ジメチルブチル)-*L*- α -アスパルチル-*L*-フェニルアラニンの含量を算出した。その結果、ネオテームについては、図 2 に示したように、 δ_{H} 0.65（水素数 9）、 δ_{H} 1.20-1.35（水素数 2）、 δ_{H} 2.24（水素数 1）、 δ_{H} 2.37-2.54（水素数 3）、 δ_{H} 2.64（水素数 1）、 δ_{H} 3.48（水素数 3）、 δ_{H} 3.65（水素数 1）、 δ_{H} 4.50（水素数 1）、 δ_{H} 6.93-7.10（水素数 5）にネオテームに由来するシグナルがそれぞれ観察された。一方、*N*-(3,3-ジメチルブチル)-*L*- α -アスパルチル-*L*-フェニルアラニンでは、図 3 に示したように、 δ_{H} 0.63（水素数 9）、 δ_{H} 1.07-1.27（水素数 2）、 δ_{H} 2.01（水素数 1）、 δ_{H} 2.20-2.35（水素数 3）、 δ_{H} 2.74（水素数 1）、

δ_{H} 2.95（水素数 1）、 δ_{H} 4.23（水素数 1）、 δ_{H} 6.85-6.99（水素数 5）に *N*-(3,3-ジメチルブチル)-*L*- α -アスパルチル-*L*-フェニルアラニンに由来するシグナルがそれぞれ観察された。

N-(3,3-ジメチルブチル)-*L*- α -アスパルチル-*L*-フェニルアラニンは、ネオテーム中の主な不純物であり、かつ製造工程や保存中の分解生成物であることが報告されている¹⁰⁾。また、食品添加物公定書では、当該化合物の純度試験が規定されていることを考慮すると、 ^1H -qNMR を用いてネオテームの含量を算出する場合、*N*-(3,3-ジメチルブチル)-*L*- α -アスパルチル-*L*-フェニルアラニン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、ネオテームと *N*-(3,3-ジメチルブチル)-*L*- α -アスパルチル-*L*-フェニルアラニンの ^1H -qNMR スペクトルを比較すると、両化合物は脂肪族領域および芳香族領域にケミカルシフトが若干異なるものの、複数の共通するシグナルを示したが、ネオテームに特有のメトキシ基由来のシグナル（ δ_{H} 3.48・水素数 3）は、他の分子内のシグナルと比較してシグナルノイズ比も高く、かつ、シングレットのシグナルであること、さらに近傍に他のシグナルも観察されなかった（図 2 及び図 3）。従って、積分範囲を適切に設定でき、定量用シグナルとしての適用性が高いと判断された。これらの点を総合的に考慮し、ネオテームでは、定量用シグナルとして δ_{H} 3.48 を用いることが適切と考えられた。

同様に、*N*-(3,3-ジメチルブチル)-*L*- α -ア

スパルチル-L-フェニルアラニンについても、ネオ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、当該化合物を、良好な精度でかつ正確に定量できると考えられた。両化合物を比較すると、 δ_H 4.23 (水素数 1) に観察されたシグナルは、ネオテームに由来するシグナルとは重複せず、多重度の小さいシグナルであるため、定量用シグナルの候補の 1 つであるが、 δ_H 4.6 付近に水のシグナルが観察されることから、積分範囲には注意が必要である (図 3)。一方、近傍にネオテームや不純物に由来するシグナルが観察されない場合には、シグナルノイズ比およびシグナル形状を考慮すると、 δ_H 0.63 (水素数 9) も定量用シグナルとして利用可能と考えられた (図 3)。すなわち、*N*-(3,3-ジメチルブチル)-L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニンについては、測定条件および試料中共存成分の影響を踏まえ、両定量用シグナルを使い分け得ることが可能と考えられた。

以上に基づき選択した各定量用シグナルより含量を算出したところ、ネオテームは、 $90.0 \pm 1.4\%$ (Mean $\pm$ SD、 $n=3$) と算出された。また、*N*-(3,3-ジメチルブチル)-L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニンの含量は、それぞれ $80.7 \pm 0.1\%$ (Mean $\pm$ SD、 $n=3$ 、 δ_H 0.63 を定量用シグナルとして利用した場合) 及び $79.6 \pm 1.1\%$ (Mean $\pm$ SD、 $n=3$ 、 δ_H 4.23 を定量用シグナルとして利用した場合) と算出されて、両シグナルから得られた含量値は近接しており、選択した定量用シグナルの妥当性が支持された。以上の結果より、ネオテームおよび *N*-(3,3-ジメチルブチル)-L- α -アスパル

チル-L-フェニルアラニンに対して、 1H -qNMR 法は定量用シグナルを適切に選択することにより、定量用標品の含量評価に適用可能であることが示された。

D. 結論

本研究では、食品添加物の規格試験法の改良及び精度の向上を目的として、 1H -qNMR によるネオテーム及び *N*-(3,3-ジメチルブチル)-L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニンの定量に関する検討を行った。その結果、両化合物について適切な定量用シグナルが選定され、 1H -qNMR がネオテーム及び *N*-(3,3-ジメチルブチル)-L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニンの含量分析に適用可能であることが明らかとなった。本結果は、 1H -qNMR の特性を活用することにより、ネオテーム及び *N*-(3,3-ジメチルブチル)-L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニンの定量用標品の含量分析の信頼性を向上させ得ることを示すものであり、将来的な定量用標品の分析法への応用に資する基礎的知見を提供するものと考えられた。

E. 文献

1. Zeleny R, Schimmel H: Influence of the approach to calibration on the accuracy and the traceability of certified values in certified reference materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2012; 33: 107-116.
2. Saito T, Ihara T, Koike M, Kinugasa S, Fujimine Y, Nose K, Hirai T: A new traceability scheme for the development of international system-traceable

- persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accreditation and Quality Assurance*, 2009; 14: 79-86.
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)*, 2017; 24: 125-130.
 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: Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, 2009; 16: 28-33.
 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*, 2010; 41: 960-970.
 6. Uchiyama N, Hosoe J, Miura T, Sugimoto N, Ishizuki K, Yamada Y, Iwamoto Y, Suematsu T, Komatsu T, Maruyama T, Igarashi Y, Ihara T, Shimada N, Goda Y: Determination of absolute purities of hygroscopic substances by quantitative NMR analysis for the standardization of quantitative reagents in the Japanese Pharmacopoeia (Part 1). *Yakugaku Zasshi*, 2020; 140: 1063-1069.
 7. Lynn NH, Linn TZ, Cui Y, Shimozu Y, Taniguchi S, Hatano T: ¹H quantitative NMR analyses of β -asarone and related compounds for quality control of *Acorus rhizome* herbal drugs in terms of the effects of their constituents on in vitro acetylcholine esterase activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2019; 83: 892-900.
 8. Sugimoto N, Tada A, Suematsu T, Arifuku K, Saito T, Ihara T, Yoshida Y, Kubota R, Tahara M, Shimizu K, Ito S, Yamazaki T, Kawamura Y, Nishimura T. Absolute quantification of carminic acid in cochineal extract by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2010;51:19-27.
 9. Tada A, Takahashi K, Ishizuki K, Sugimoto N, Suematsu T, Arifuku K, Tahara M, Akiyama T, Ito Y, Yamazaki T, Akiyama H, Kawamura Y. Absolute quantitation of stevioside and rebaudioside A in commercial standards by quantitative NMR. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2013;61:33-38.
 10. EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF); Castle L, Andreassen M, Aquilina G, Bastos ML, Boon P, Fallico B, FitzGerald R, Frutos Fernandez MJ, Grasl-Kraupp B, Gundert-Remy U, Gürtler R, Houdeau E, Kurek M, Louro H, Morales P, Passamonti S, Batke M, Bruzell E,

Chipman J, Crebelli R, Fortes C, Fürst P, Gaffet E, Karlien C, Halldorsson T, Leblanc JC, Lindtner O, Loeschner K, Mast J, Mirat M, Mortensen A, Undas A, Wright M, Barmaz S, Civitella C, Abrahantes JC, Le Gall P, Mazzoli E, Mech A, Rasinger JD, Rincon A, Riolo F, Smeraldi C, Tard A, Zakidou P, Lodi F. Re-evaluation of neotame (E 961) as food additive. EFSA J. 2025 Jul 4;23(7):e9480.

F. 研究発表

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

- 1) 大槻崇, ¹H-qNMR に基づく相対モル感度を用いた食品関連成分分析法の確立, 日本農芸化学会中部支部第203 回例会シンポジウム, 2025 年 11 月(長野)
- 2) 岩崎大剛, 川本広明, 村上敏之, 大槻崇, 松藤寛, ブラックジンジャー由来 PMF の定量: 相対モル感度(RMS 法)の検討, ノビレチン・PMF 研究会第 8 回学術研究会, 2025 年 11 月(神奈川)
- 3) 多田敦子, 内山陽介, 栗田史子, 羽石奈穂子, 林真輝, 杉浦潤, 大槻崇, 河野敏己, 池野恵美, 建部千絵, 高田翔平, 黒原崇, 日置冬子, 久保田浩樹, 佐藤恭子, 杉本直樹, 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討(令和 6 年度), 第 62 回全国衛生化学技術協議会年会, 2025 年 11 月(群馬)
- 4) 山崎太一, Yang Liu, Carlos Amezcua,

大槻崇, 加藤毅, 神山和夫, 高岡信也, 水本俊行, 杉本直樹, 相対モル感度(RMS)を用いた定量分析法の国際規格(ISO)化のための国際共同試験, 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会, 2025 年 11 月(埼玉)

- 5) 今岡美史, 高田翔平, 黒原崇, 藤原由美子, 建部千絵, 窪崎敦隆, 大槻崇, 多田敦子, 松藤寛, 杉本直樹, 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会, 2025 年 11 月(埼玉)
- 6) 岩崎大剛, 川本広明, 村上敏之, 大槻崇, 松藤寛, ¹H-qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いたブラックジンジャー由来ポリメトキシフラボンの新規 LC 定量法, 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会, 2025 年 11 月(埼玉)
- 7) 白男川晃成, 佐藤ななみ, 浪川幸己, 森山のん, 藤佑志郎, 山本将之, 大槻崇, 松藤寛, アクテオシドを高生産するゴマ品種及び栽培条件の探索, 第 40 回日本ゴマ科学会大会, 2025 年 10 月(香川)
- 8) 大槻崇, 相対モル感度を用いたシングルリファレンス LC 法による食品関連成分分析法の確立, 日本食品分析学会 令和 7 年度学術集会, 2025 年 09 月(東京)
- 9) 今岡美史, 高田翔平, 黒原崇, 藤原由美子, 建部千絵, 窪崎敦隆, 大槻崇, 多田敦子, 松藤寛, 杉本直樹, 食用タール色素不純物の合成と組成分析による品質評価, 日本食品分析学会 令和 7 年度学術集会, 2025 年 09 月(東京)

10) 黒原崇, 長谷川千紘, 今岡美史, 藤 650-657.

原由美子, 建部千絵, 高田翔平, 窪
崎敦隆, 大槻崇, 松藤寛, 多田敦子,
杉本直樹, タール色素不純物 ESBSA
異性体の同定に向けた合成と分析,
第 11 回次世代を担う若手のための
レギュラトリーサイエンスフォーラ
ム, 2025 年 09 月(埼玉)

11) 白男川晃成, 佐藤ななみ, 浪川幸己,
森山のん, 藤佑志郎, 山本将之, 大
槻崇, 松藤寛, 品種の異なるゴマの
葉中ポリフェノールおよびイリドイ
ドの分析, 日本食品化学学会 第 31
回学術大会, 2025 年 06 月(滋賀)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

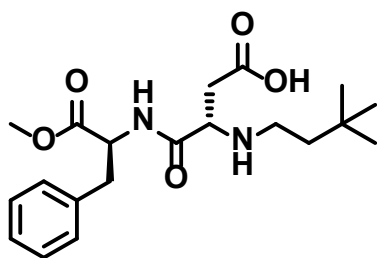
F-2) 論文発表

F-2-1) 論文等

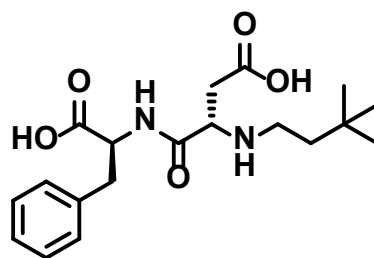
- 1) Miura T, Liu Y, Bzhelyansky A,
Ohtsuki T, Matsufuji H: Development
of ¹H qNMR analytical procedure for
purity determination of Imazosulfuron
and 1,4-BTMSB-*d*₄ for ISO 17034
accreditation. Journal of AOAC
INTERNATIONAL, 2024; qsaf099.
- 2) Masumoto N, Yamazaki T, Miura T,
Nakajima K, Yamamoto K, Kato T,
Minamoto N, Suematsu T, Sato Y,
Nomura A, Akagi M, Ohtsuki T,
Koyama K, Mizumoto T, Miyashita T,
Kawashima S, Saito T, Sugimoto N:
Development of a standard-free
analytical quantitative method based on
liquid chromatography using relative
molar sensitivity for chlorogenic acid
in apple juice. Chemical and
Pharmaceutical Bulletin, 2025; 73:

表1 ネオテーム及び N-(3,3-ジメチルブチル)-L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニンの含量測定における ^1H -qNMR 条件

装置	JEOL ECZL 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)



ネオテーム



N-(3,3-ジメチルブチル)-L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニン

図1 ネオテーム及び N-(3,3-ジメチルブチル)-L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニンの化学構造

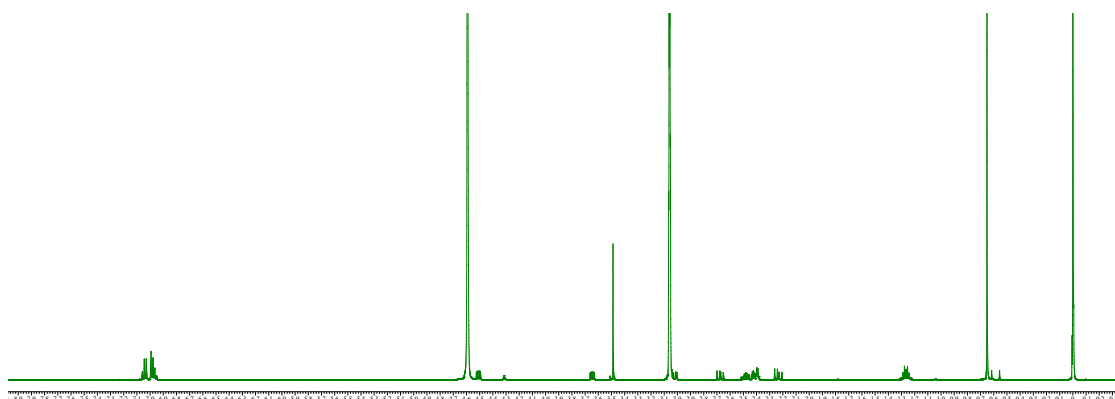


図 2 アスパルテームの ^1H -qNMR スペクトル

* : 定量用シグナル

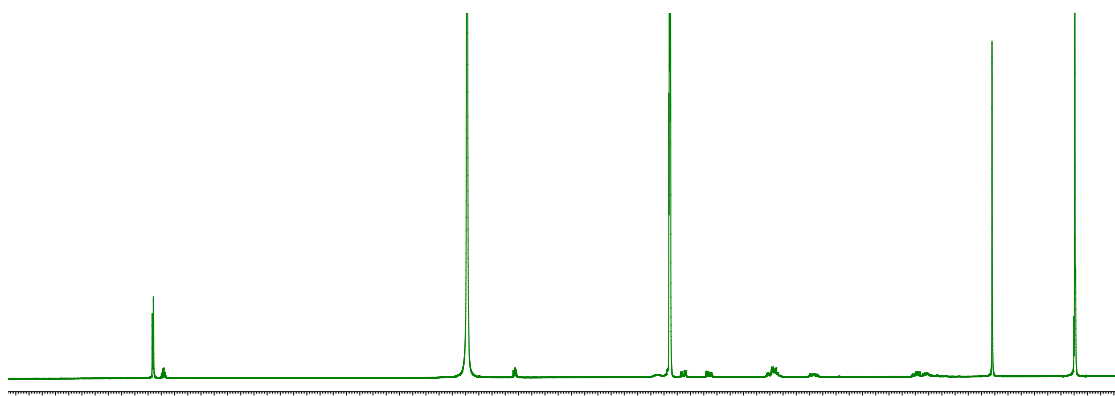


図 3 N-(3,3-ジメチルブチル)-L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニンの ^1H -qNMR スペクトル

* : 定量用シグナル