

Fig.6 フルジオキソニルの¹H NMR スペクトル
*フルジオキソニル由来のシグナル

Table 6 qNMR法によるフルジオキソニル含量

Sample No.	Content(%)	RSD(%)
1	99.3	0.1
2	99.2	0.1
3	99.2	0.1
4	98.9	0.1
Total mean	99.2	0.1

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
平成 22 年度分担研究報告書

食品添加物の規格基準向上のための赤外スペクトルに関する調査研究

研究分担者 北村陽二 国立大学法人金沢大学学際科学実験センター准教授

研究要旨

簡便で確実な確認試験法である赤外スペクトル（IR）法は、諸外国でも食品添加物等の確認試験に汎用されている。そこで、我が国の食品の安全性確保のために、種々の測定法で得られる IR を比較検討することとした。また、公定書には規定されていないが、近年普及しつつある ATR 測定法も調査の対象に含め、それぞれの測定法の IR に差が生じる原因の解明を試みるとともに、ATR 法による IR の、確認試験への利用の可能性を検討した。本研究では、これまでに従来の測定（透過）法で検討したネオテームを取り上げ、透過法と ATR（反射）法による IR とを比較・検討し、ATR 法で得られたスペクトルの取り扱いについて基礎的な考察を加えた。その結果、ATR 法で得られた IR は、従来の透過法による IR とは異なるため、両者を併用した確認試験には問題があることが分かった。一方で、ATR 法は簡便な操作で定性的な分析が可能であるという利点を有しているため、この利点を活用できる利用法を、ATR 装置が普及する前に、十分に検討や模索をすべきであると考えられる。

A. 研究目的

赤外スペクトル（以下 IR と略する）法は、その簡便性と確実性から、有機・無機化合物を問わず、物質の確認試験として、世界的にも各種化合物の確認に広く活用されている。さらに、IR 測定用機器の普及が進み、波数再現性のよいフーリエ変換型（FT）分光器等も安価に市販され、4000～600 cm^{-1} あるいは 4000～400 cm^{-1} の領域の IR を簡便に測定できるようになっている。一方、IR 法は、ほとんど試薬を必要としないため、有機溶媒等を多用する化学的な確認試験法に比べ、有機溶媒等の廃棄量も少なく、自然環境に影響を与えない優れた確認試験法であると考えられる。このような状況を考えれば、IR 法が各種品目

の確認試験に多用され、食の安全に寄与していることは明かである。そこで、本研究では、食品添加物等の国内規格の向上等を目的にして、種々の測定法で得られる IR を比較検討することを計画した。固体試料の IR の測定法は、透過法と反射法に大別される。透過法としては、ペースト法、臭化カリウム錠剤法（KBr 法）及び薄膜法等多くの測定法が知られているにもかかわらず、我が国においては、KBr 法が適用されることが多い。一方、15th Ed. Food Chemical Codex（以下 FCC と略する）や Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives（以下 JECFA と略する）においては、多くの場合、流動パラフィンを用いるペースト法（ヌジョール法、Nujol 法）

が用いられている。これは、以前より指摘されているように、KBr 法では、試料と KBr との相互作用、KBr に含まれる水分や加圧等の影響によって、有機化合物でも、しばしば異常スペクトルが観測されることによるためである。なお、通常固体状態の IR は、その固体について結晶形等を含め固有の情報として扱われているため、ここでは、「本来の試料のスペクトルとは異なるスペクトル」を「異常スペクトル」という表現で使用している。

また、本研究では、公定書には規定されていないが、近年普及しつつある減衰全反射法 (Attenuated Total Reflection ; ATR 法) も調査の対象に含め、それぞれの測定法の IR に差が生じる原因の解明を試みるとともに、ATR 法による IR の、確認試験への利用の可能性を検討することとした。そこで、本研究では、これまでに従来測定 (透過) 法で検討したネオテームを取り上げ、ネオテームの透過法での IR 測定条件を定め、透過法と ATR (反射) 法による IR とを比較・検討した。

B. 研究方法

ネオテームは国立医薬品食品衛生研究所から提供を受けた The Nutrasweet Co.社製の食品添加物製品、及び United States Pharmacopeial Convention Inc.社製のネオテーム一水和物市販品を用いた。これらの試料について、ペースト法や KBr 法によって得られた IR と、減衰全反射法 (ATR 法) により得られた IR とを比較検討した。

本研究で測定に用いた装置は、JASCO FT/IR-4100 (日本分光社製) である。測定は、分解能 4 cm^{-1} (32 回繰り返し)、測定領域 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ で行なった。ペースト法の測定には、原則として、大きさ $30\sim 35\text{ mm}\times 30\sim 35\text{ mm}$ 、厚さ 5 mm の KBr 板を窓板として使用

した。なお、対照にはこの KBr 板 1 枚を使用した。また、流動パラフィン、メルク社製の赤外用 Nujol® を使用した。KBr 法については、原則として現行第 8 版食品添加物公定書の記載に従って、KBr 錠剤 (直径 10 mm) を作成し、測定時の対照には KBr のみの錠剤を使用した。なお、KBr 法では、日本分光社製の赤外用 KBr ブロックを用いた。ATR 法の測定には、前述の赤外分光光度計に、ダイヤモンドプリズム一回反射 ATR 装置 (日本分光社製) を装着した装置を用い、分解能 4 cm^{-1} (積算回数 96 回)、測定領域 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ で測定を行なった。ATR 法で得られたスペクトルは、必要に応じて、スペクトルマネージャ Ver.2 (日本分光社製) の ATR 補正機能、演算機能、ベースライン補正機能を用いて補正を行った。

C. 研究結果

1) 透過法 (ペースト法と KBr 法) によるネオテーム測定の検討

従来の測定法 (透過法) での測定条件を定めるため、まず、提供されたネオテーム (食品添加物製品) について、試料の乾燥 (45°C 、五酸化ニリン存在下、減圧乾燥) 前後に、ペースト法で IR の測定を行った。その結果を、図 1 と図 2 に示す。両者の IR は明らかに異なっており、この結果は、提供ネオテームが水和物であることを示唆している。図 1 に示される、ペースト法で測定した乾燥前の提供ネオテームの IR が、ペースト法で測定した市販ネオテーム一水和物の IR (図 3) と一致していることも、提供ネオテームが水和物であることを支持している。

一方、乾燥した提供ネオテームの IR を KBr 法で測定したところ、図 4 の矢印で示されるようなピークが観察され、明らかな異常スペクトルを示した。また、乾燥前の提供ネオテ

ームの IR を KBr 法で測定した場合も、図 5 及び図 6 の矢印で示されるショルダーが観察され、異常スペクトルとなった。さらに、試料調製に時間の掛かった図 6 の IR では、○印で囲んだ $3300\sim 3600\text{ cm}^{-1}$ 付近のピークの相対強度が図 5 と異なっていたことから、KBr 法では、試料の調製時間によりスペクトルが変化し、再現性が得にくいことが分かった。

次に、ネオテームの乾燥条件を定めるため、ネオテームを常温、五酸化二リン存在下で減圧乾燥し、ペースト法で測定した。その結果、図 7 の矢印で示されるように、 1750 cm^{-1} 付近にショルダーが観察された。したがって、ネオテームの乾燥には加熱が必要であり、ネオテームの融点が $80\sim 85^{\circ}\text{C}$ 程度であることを考慮すると、 $40\sim 50^{\circ}\text{C}$ 程度に加熱するのが適当であると考えられる。実際に、 45°C で減圧乾燥させたネオテームをペースト法で測定すると、再現性のよい IR を得ることができた。

以上の結果より、ネオテームの測定は、 $40\sim 50^{\circ}\text{C}$ 程度で五酸化二リン存在下、減圧乾燥し、ペースト法で測定するのが適当と考えられた。

2) ATR 法による IR の確認試験への利用の可能性に関する検討

2-1) ポリスチレンフィルムの吸光度での透過 IR と ATR の比較検討

まず、透過法での IR と、ATR (反射) 法について基礎的に検討するために、波数校正用のポリスチレンフィルムを用いて、吸光度を比較検討した。透過 IR スペクトル (図 8) では、実線の矢印で示されるピークは点線の矢印で示されるピークよりも顕著に大きい。それに対し、ATR 補正を行っていない ATR 法でのスペクトル (図 9) では、実線の矢印

で示されるピークは点線の矢印で示されるピークよりも小さく観測され、透過 IR スペクトルと相対強度が逆転した、全く異なったスペクトルとなった。さらに、ATR 補正を行った ATR スペクトル (図 10) でも、実線の矢印で示されるピークは点線の矢印で示されるピークよりも小さく観測され、相対強度の逆転は補正されたものの、相対強度比は、透過 IR スペクトルと大きく異なっていた。これらの結果は、ATR の原理通り、短波長 (長波数) 側ほどもぐり込み深さ (セル長に相当) が短く、長波長 (短波数) 側に比べ吸光度は小さく観測されることを示す結果であり、また、ATR 補正機能での補正を行っても、透過 IR スペクトルとは一致せず、異なったスペクトルであることを示している。

2-2) ネオテームを用いたペースト法と ATR 法の比較検討

次に、実際の食品添加物試料を用いて検討を行った。試料として、ネオテーム (食品添加物製品) を取り上げ、従来のペースト法や KBr 法と、ATR 法を比較検討した。まず、1) で定めた条件に従って乾燥したネオテーム (45°C 、五酸化二リン存在下、減圧乾燥) の IR スペクトルを、ATR 法で測定した。なお、ATR 法での測定においては、乾燥ネオテームを、ATR 法で測定し (図 11)、ATR 補正を行った (図 12)。さらに縦軸を吸光度 (Abs) に変換し (図 13)、演算機能で、吸光度を 5~6 倍に演算し (図 14)、再び縦軸を透過率 (%T) に変換した後 (図 15)、ベースライン補正を行った (図 16)。こうして得られた ATR 法での IR スペクトルと、ペースト法での IR スペクトルを比較した結果を図 17 に示す。両者は比較的類似していたが、図 17 に示された、点線の○印で囲まれたピークの相対強度は、ペースト法の IR スペクトルと、ATR

法の IR スペクトルとで異なっていた。従って、乾燥ネオテームの測定においては、ATR 法での IR スペクトルは、ペースト法の IR スペクトルとは異なるスペクトルであることが分かった。

さらに、乾燥前のネオテーム（ネオテーム一水和物）についても、同様に、ペースト法と、ATR 法で測定した IR スペクトルを比較した（図 18）。その結果、ATR 法で測定したスペクトル（図 18 下段）は、ペースト法で測定したスペクトル（図 18 上段）とは、点線の○印で囲まれたピークの相対強度が異なっており、比較的類似しているものの、ペースト法の IR スペクトルとは異なることが分かった。

以上の結果より、ペースト法で測定した IR と ATR 法で測定した IR を比較することはできず、試料の確認に利用することもできないと考えられる。

一方、ATR 法で得られた乾燥ネオテーム（図 17 下段）と、ネオテーム一水和物（図 18 下段）の IR スペクトルは異なっていた。この結果は、ネオテームの場合、ATR 法でのスペクトル同士を比較することで、無水物と水和物の区別が可能であることを示している。

2-3) ネオテームを用いた KBr 法と ATR 法の比較検討

さらに、ATR 法による乾燥ネオテームの IR スペクトルと、KBr 法で測定した乾燥ネオテームの IR スペクトルとの比較も行った（図 19）。両者を比較すると、図 19 下段の矢印で示される、KBr 法での異常スペクトルは、ATR 法（図 19 上段）では認められなかった。この原因としては、ATR 法は、KBr 法のような、試料と KBr との混合、加圧を必要としないため、KBr 法でしばしば認められる異常スペクトルを生じにくいと考えられる。

従って、ATR との比較により、KBr 法の異常スペクトルを検出できる可能性があると考えられる。

D. 考察

IR 法は、その簡便性、確実性から、確認試験として世界的に用いられている。本研究では、食品添加物の規格基準の向上を目的として、種々の測定法で得られる IR を比較検討した。まず、ネオテームについて、従来の測定法（透過法）であるペースト法と KBr 法により、乾燥前後のネオテームの IR を測定し、得られた IR を比較検討した。さらに、乾燥条件についても検討を加えた。その結果、ネオテームは、40～50℃程度で、五酸化ニリン存在下で減圧乾燥し、ペースト法で測定するのが適当であると考えられた。

さらに、近年普及しつつある ATR 測定法について、ATR 法による IR の確認試験への利用の可能性を検討した。まず、ポリスチレンフィルムを用いて、透過 IR スペクトルと、ATR 法による IR スペクトルを比較検討した。さらに、実際の食品添加物として、ネオテームを用い、従来のペースト法や KBr 法と、ATR 法を比較検討した。その結果、以下に示すような問題点があることが分かった。まず、ATR 法は、原理的に波長依存性があり、基本的に透過法による IR スペクトルとは異なるため、透過法による IR スペクトルとの比較による確認は不可能である。実際に、試料としてネオテームを用いた場合、従来の測定（透過）法であるペースト法と ATR 法とを比較すると、ATR 法で得られた IR は、ペースト法による IR とは異なるため、両者を併用した確認試験には問題がある。また、ATR 法において、ATR 補正を行うと、機器メーカーによって ATR 補正機能（補正法）が異なる可能性があり、さらに、演算やベースライン補正

等コンピューターによる種々の加工を行うため、測定者の恣意的な補正が行われる危険性も考えられる。加えて、ATR 装置は、比較的規模の大きな事業所では普及しつつあるものの、未だ一般的に普及していないという実情も考慮すべきである。これらの問題点を鑑みると、公定書への ATR 法の採用は、現時点では問題があるといえる。

一方で、ネオテームを用いた検討において、ATR 法によるスペクトルでも、ネオテームの水和物と無水物の区別が可能であったことや、ATR 法との比較で、KBr 法での異常スペクトルを検出可能であったことから、ATR 法は簡便な操作で定性的な分析が可能であるという利点を有していると考えられる。従って、この利点を活用できる利用法を、ATR 装置が普及する前に、十分に検討や模索をすべきであると考えられる。

E. 結論

食品添加物の規格基準の向上を目的として、国際的に食品添加物の確認試験に多用されている赤外スペクトル (IR) 法について、検討を行った。近年普及しつつある ATR 測

定装置を用い、ATR 法による IR の確認試験への利用の可能性を検討した。その結果、試料としてネオテームを用いた場合、従来の測定 (透過) 法と ATR (反射) 法とを比較すると、ATR 法で得られた IR は、従来の透過法による IR とは異なるため、両者を併用した確認試験には問題があることが分かった。一方で、ATR 法は簡便な操作で定性的な分析が可能であるという利点を有しているため、この利点を活用できる利用法を、ATR 装置が普及する前に、十分に検討や模索をすべきであると結論した。

F. 研究発表

学会発表

北村 陽二, 佐藤 恭子, 小阪 孝史,
小川 数馬, 鶴野 いずみ, 太田 朱音,
小川 結加, 柴 和弘: 食品添加物ネオ
テームの赤外スペクトルの測定法に関する
検討, 日本薬学会 第131年会, 静岡
(2011.3).

G. 知的財産権の出願・登録

なし

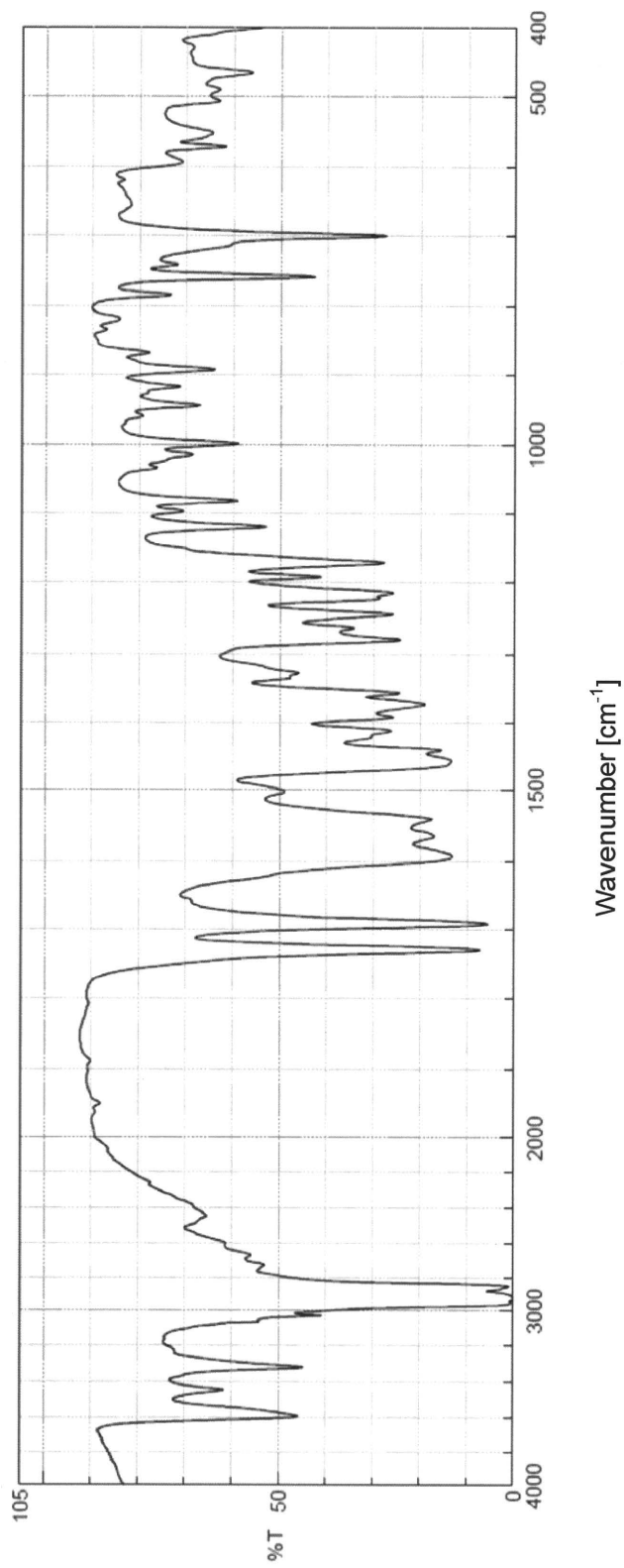


図 1. ネオテーム (食品添加物製品) のスペクトル (ペースト法)

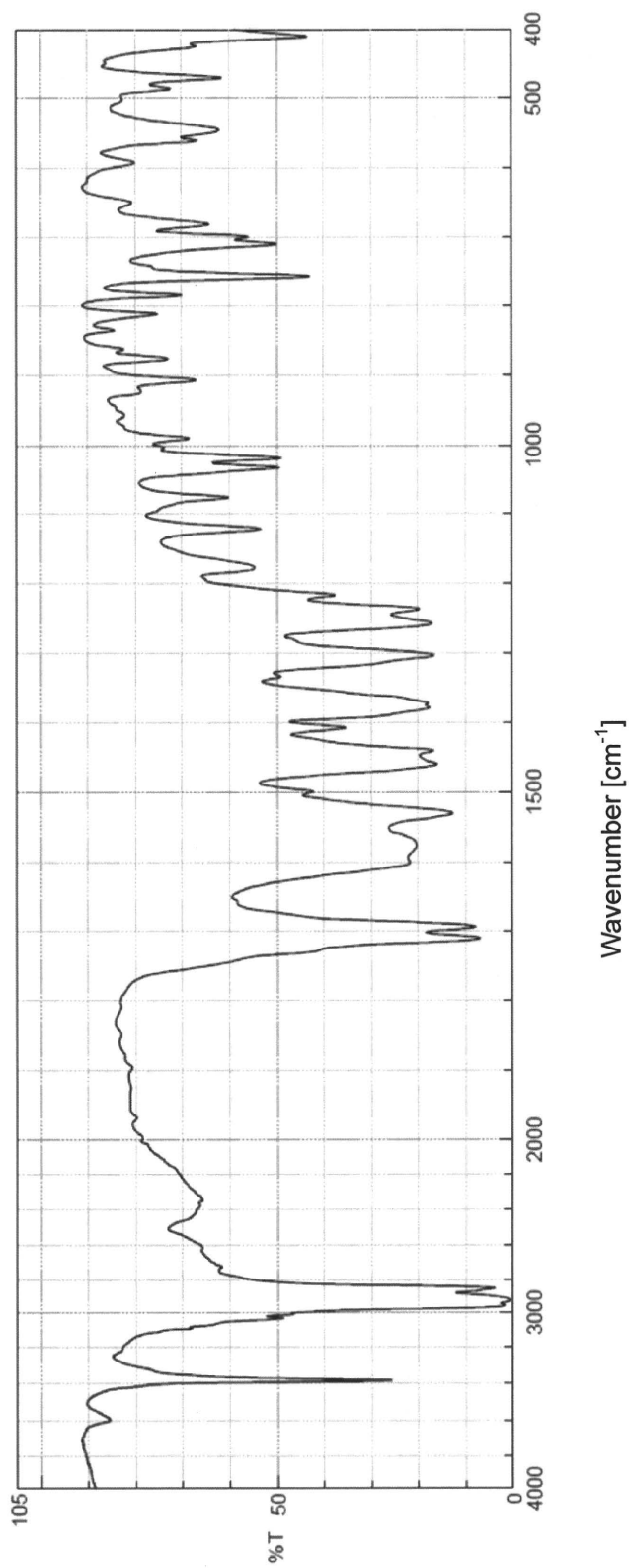


図2. 乾燥ネオテーム（食品添加物製品）のスペクトル（ペースト法）

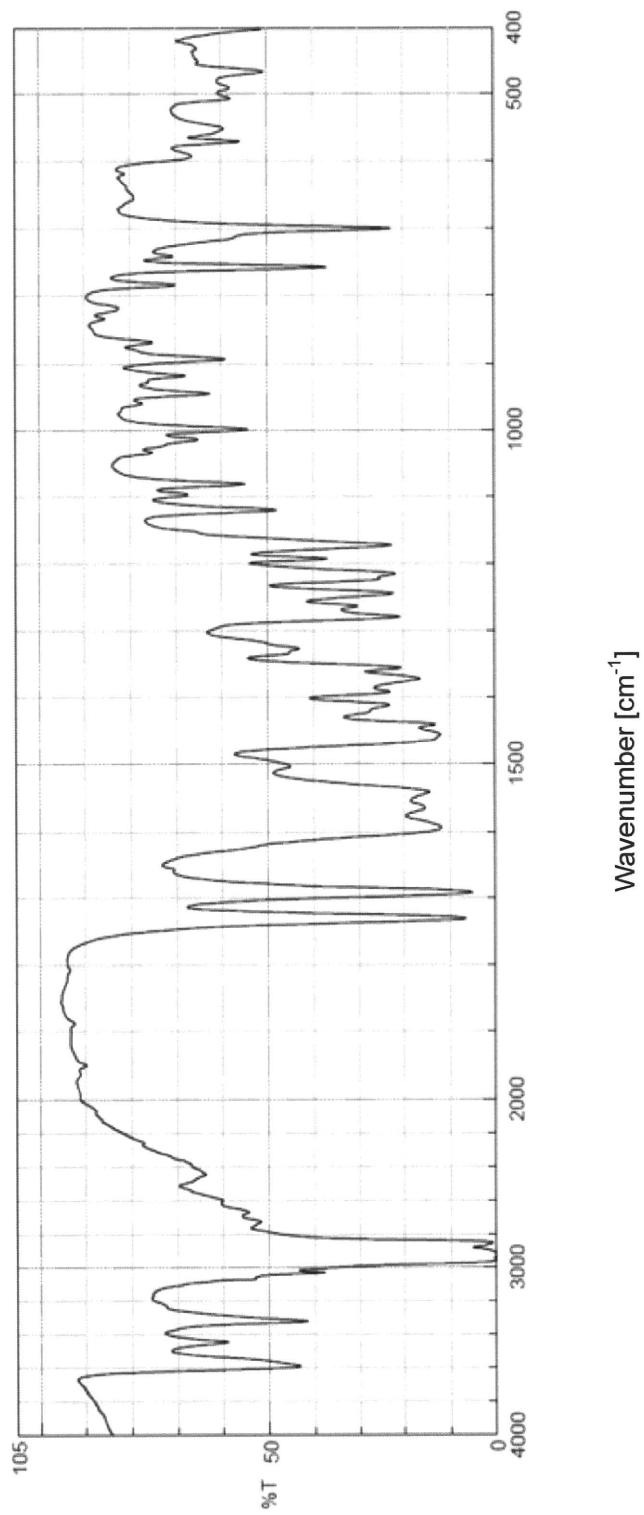


図 3. ネオテーム水和物（市販品）のスペクトル（ペーセント法）

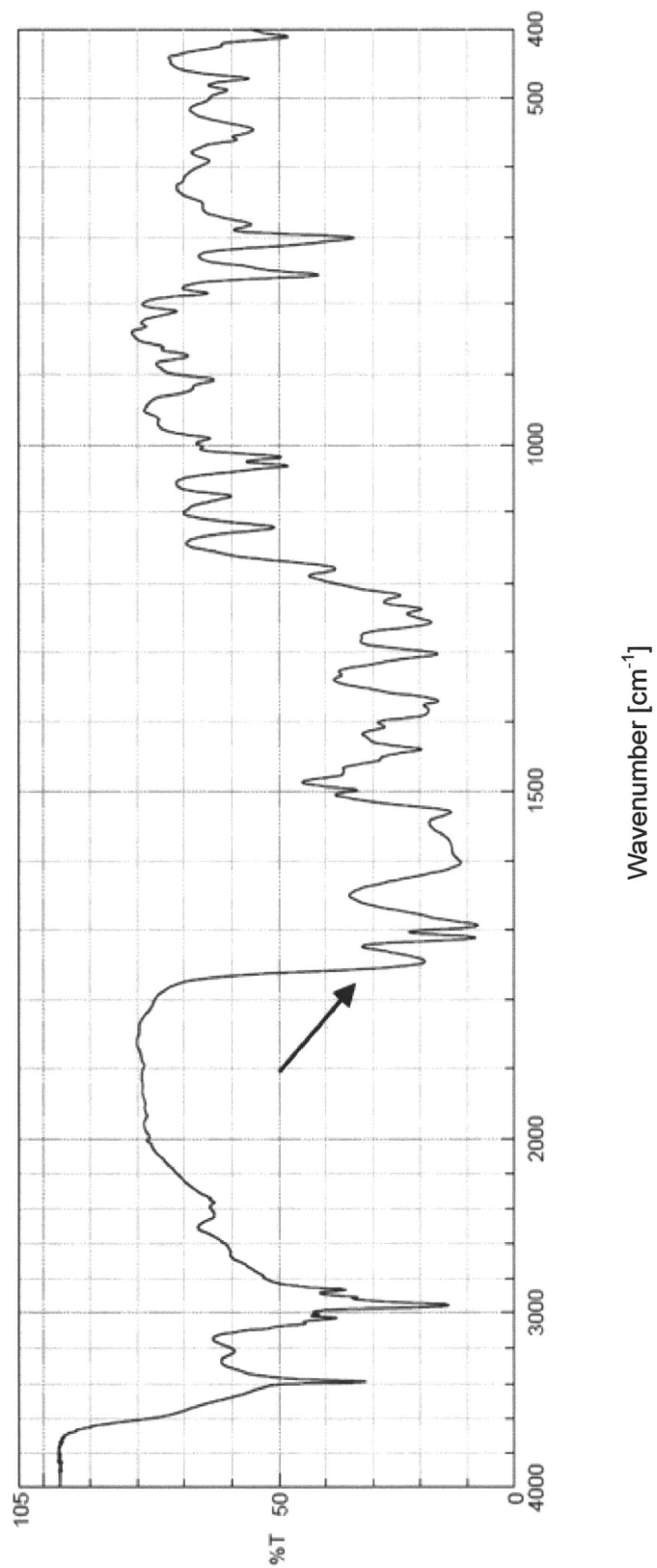


図 4. 乾燥ネオテーム (食品添加物製品) のスペクトル (KBr 法)

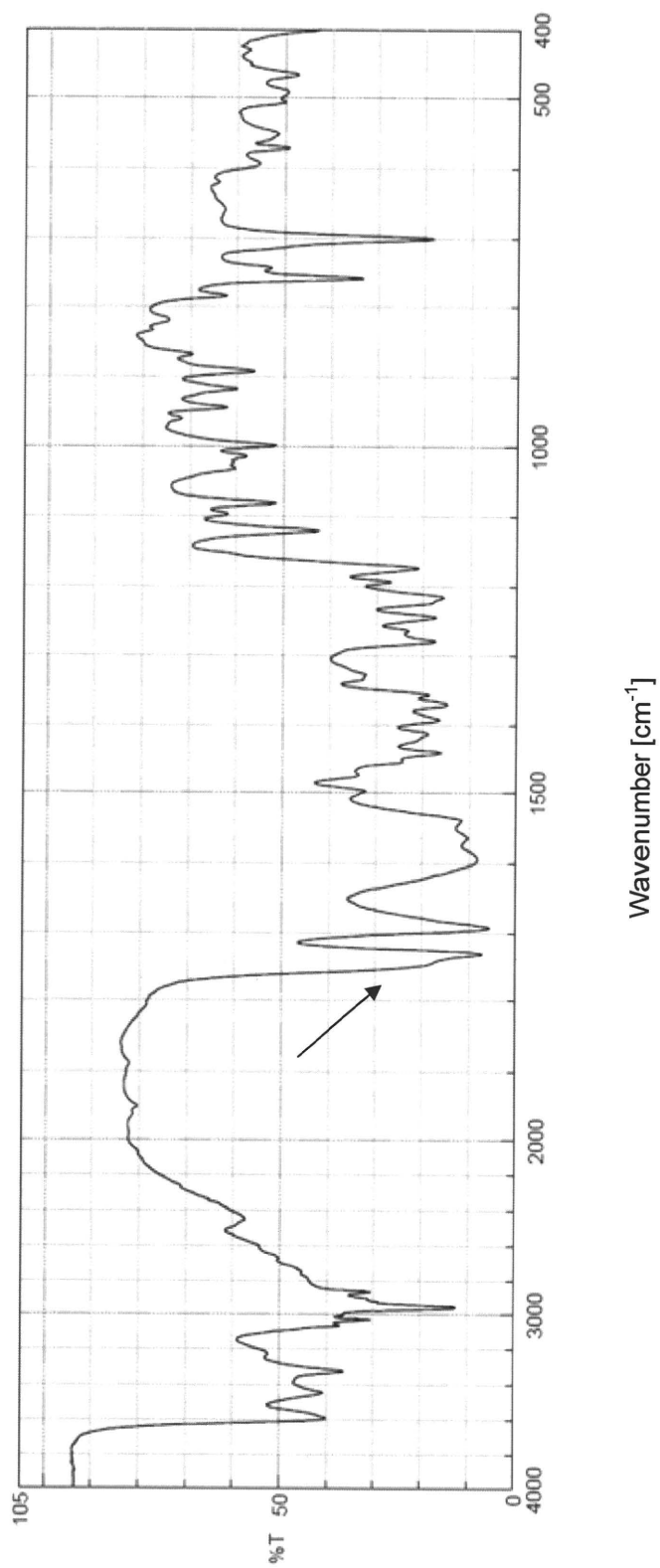


図 5. ネオテーム (食品添加物製品) のスペクトル (KBr 法)

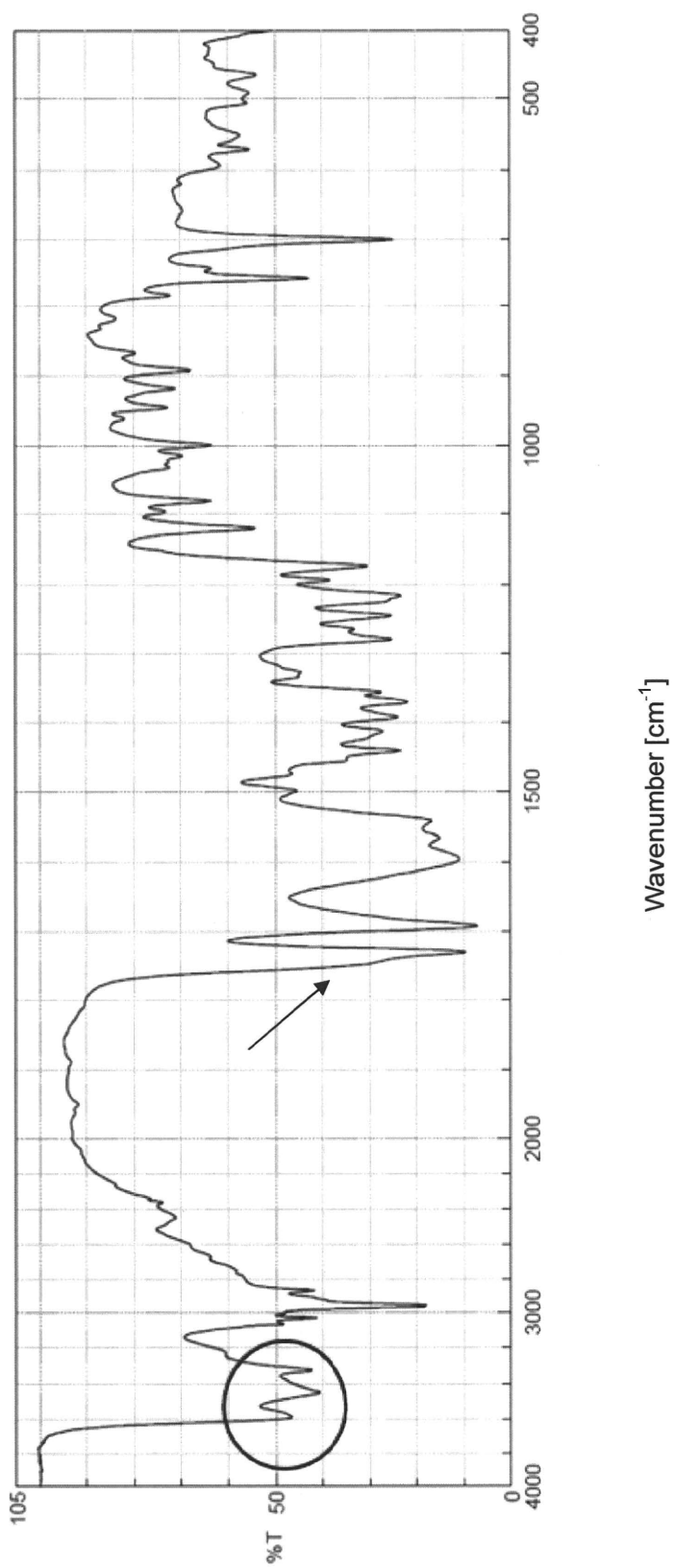


図 6. ネオテーム (食品添加物製品) のスペクトル (KBr 法 : 長時間試料調製)

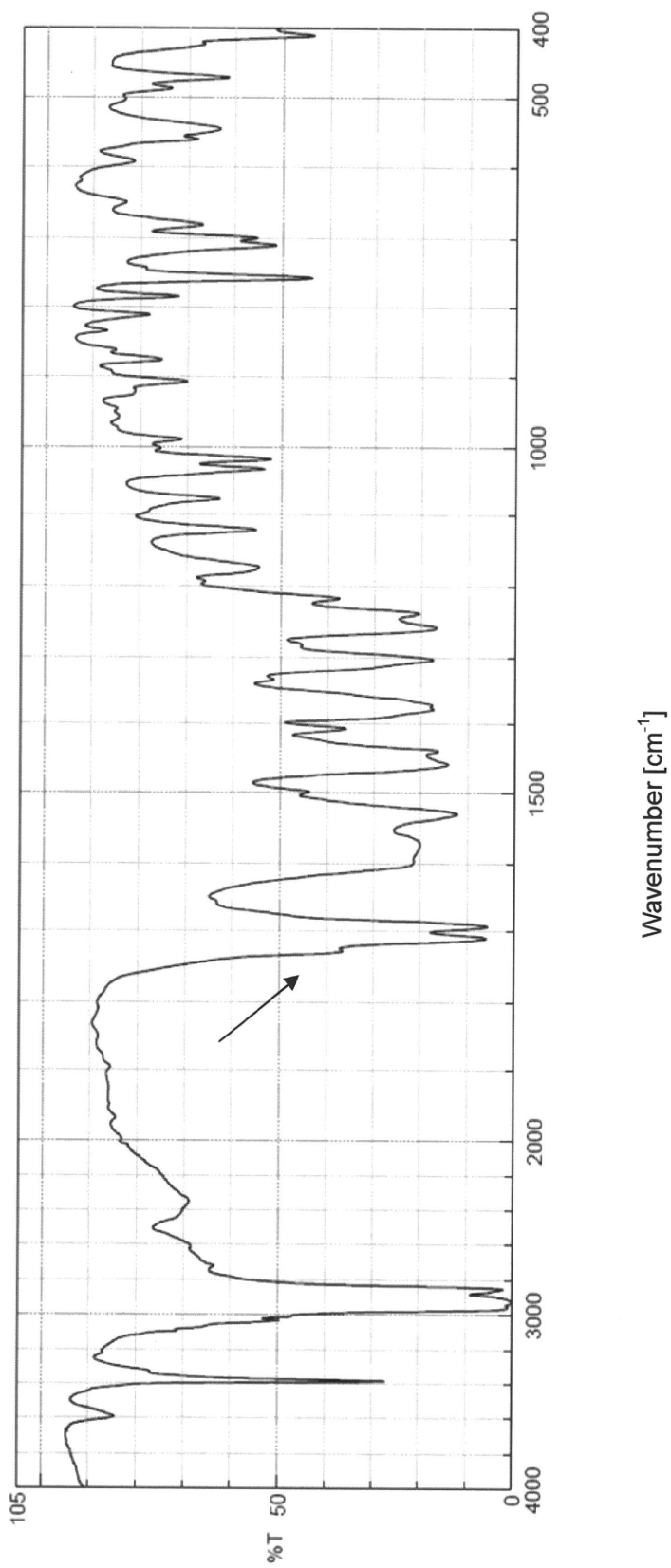


図 7. 常温乾燥ポリエーテルム（食品添加物製品）のスペクトル（ペーセント法）

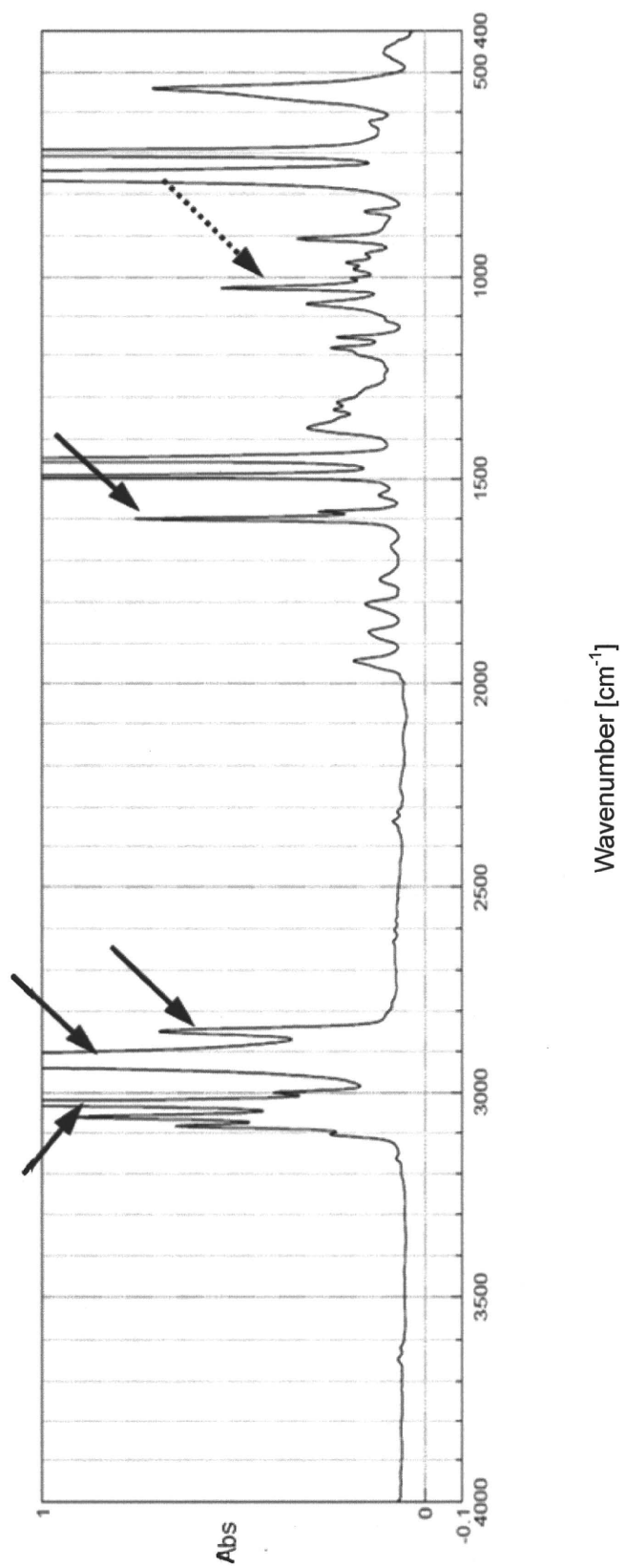
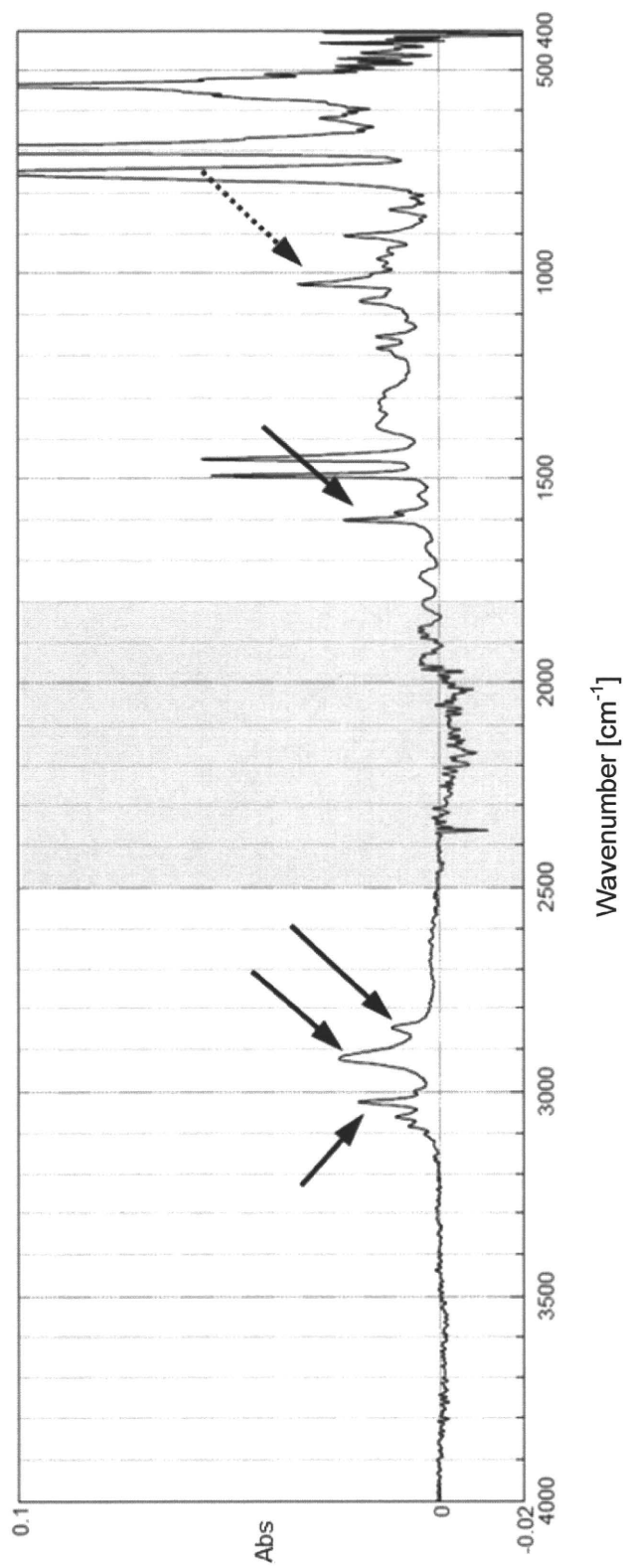
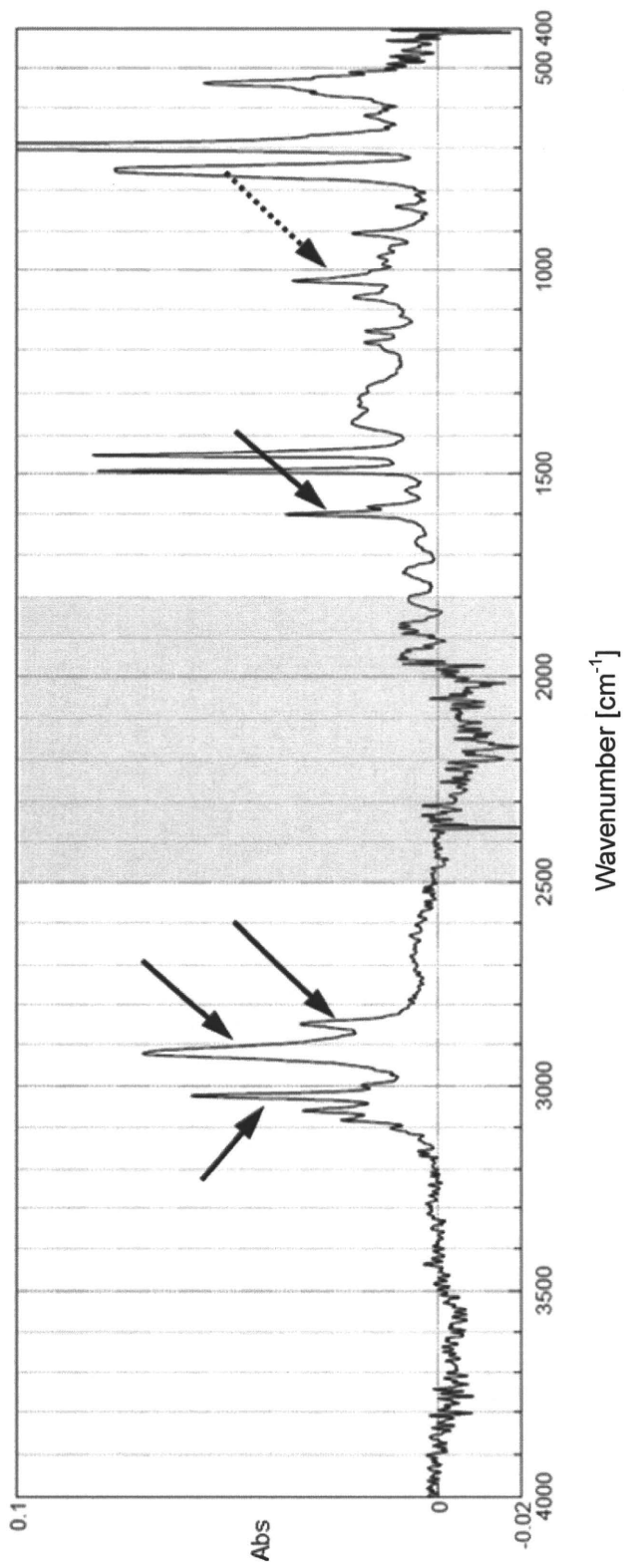


図 8. ポリスチレンの透過 IR スペクトル



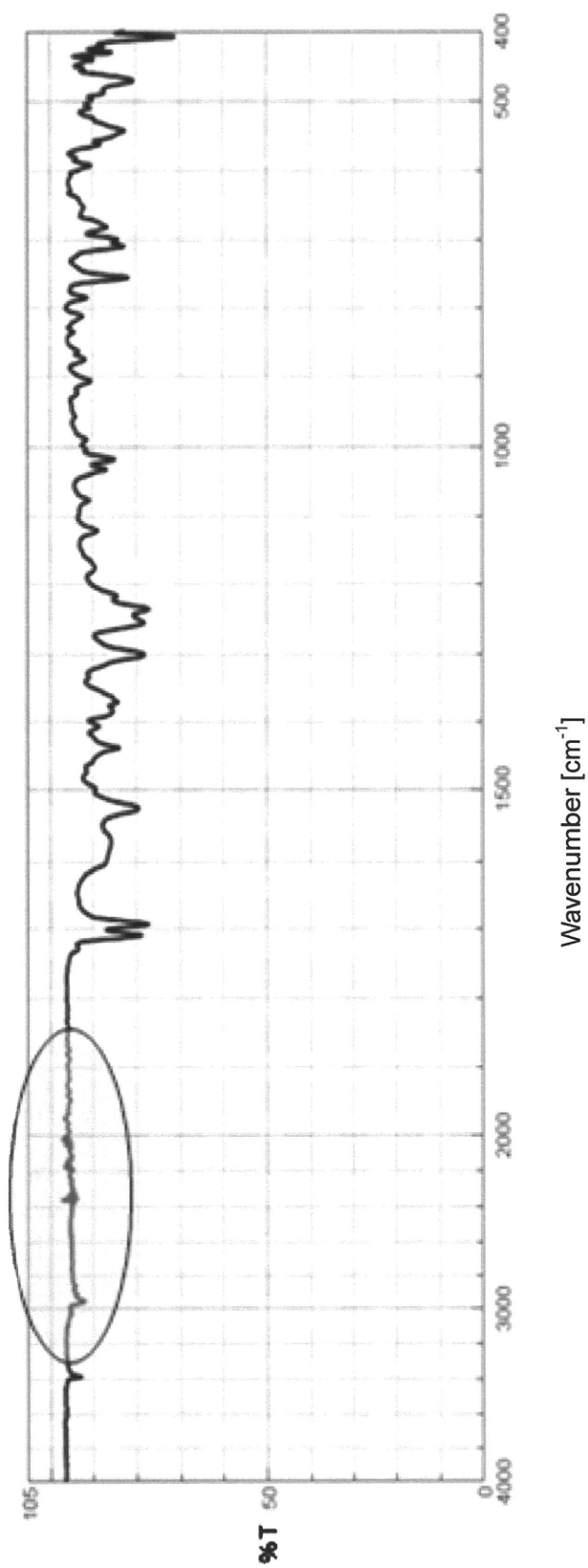
(■) はダイヤモンドの吸収により信頼できない領域)

図9. ATR法によるポリスチレンのIRスペクトル (ATR補正なし)



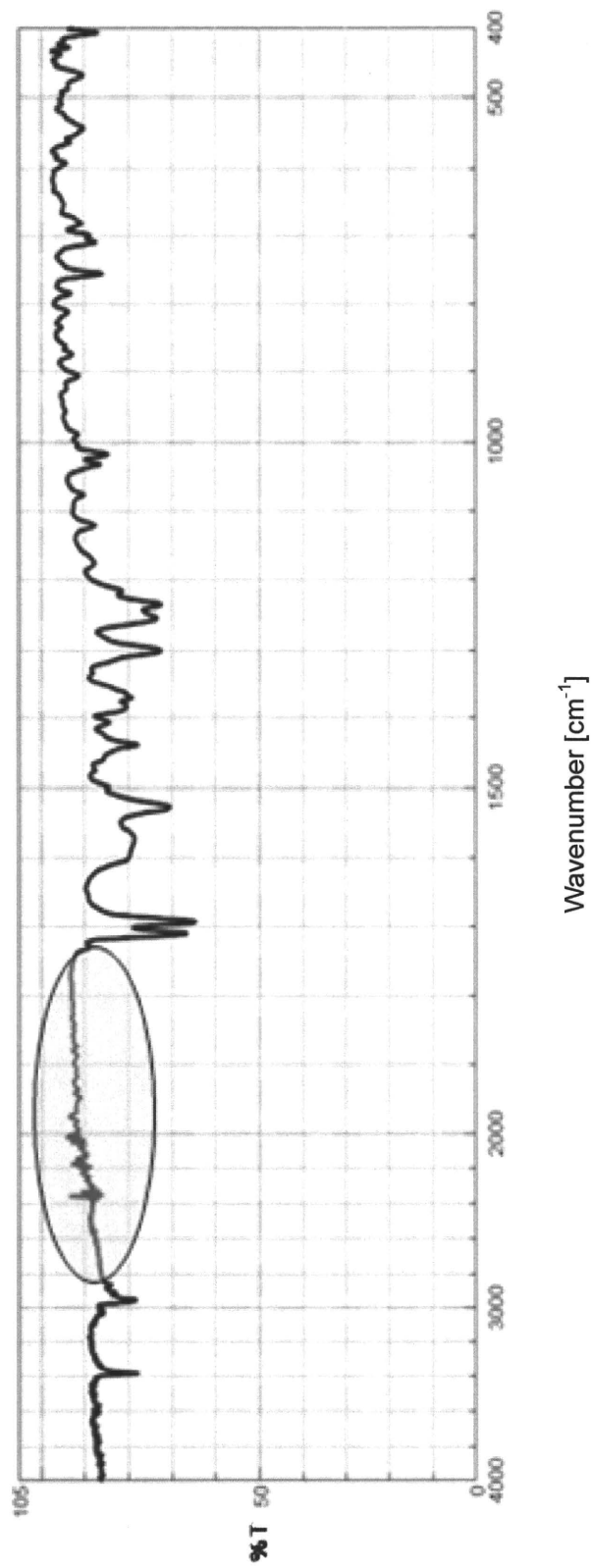
(はダイヤモンドの吸収により信頼できない領域)

図 10. ATR 法によるポリスチレンの IR スペクトル (ATR 補正あり)



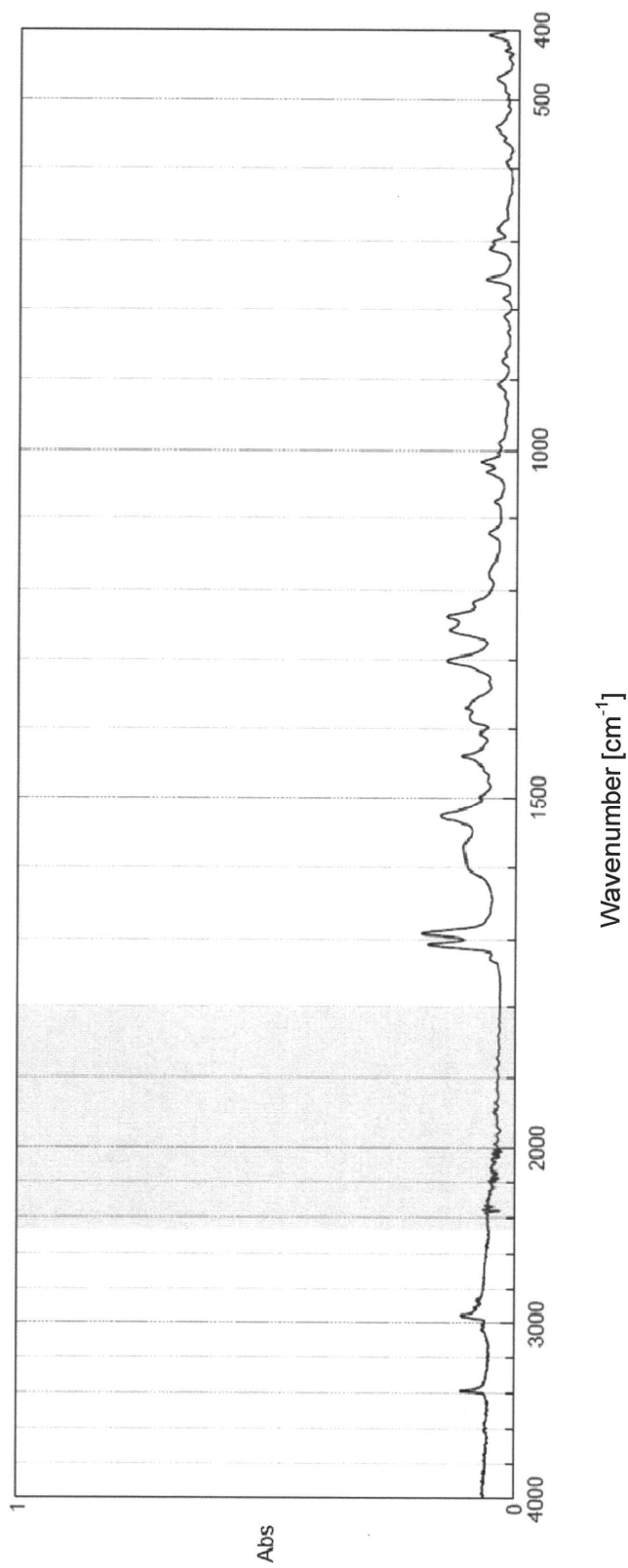
() はダイヤモンドの吸収により信頼できない領域)

図 11. 乾燥ネオテームの ATR 法による IR スペクトル



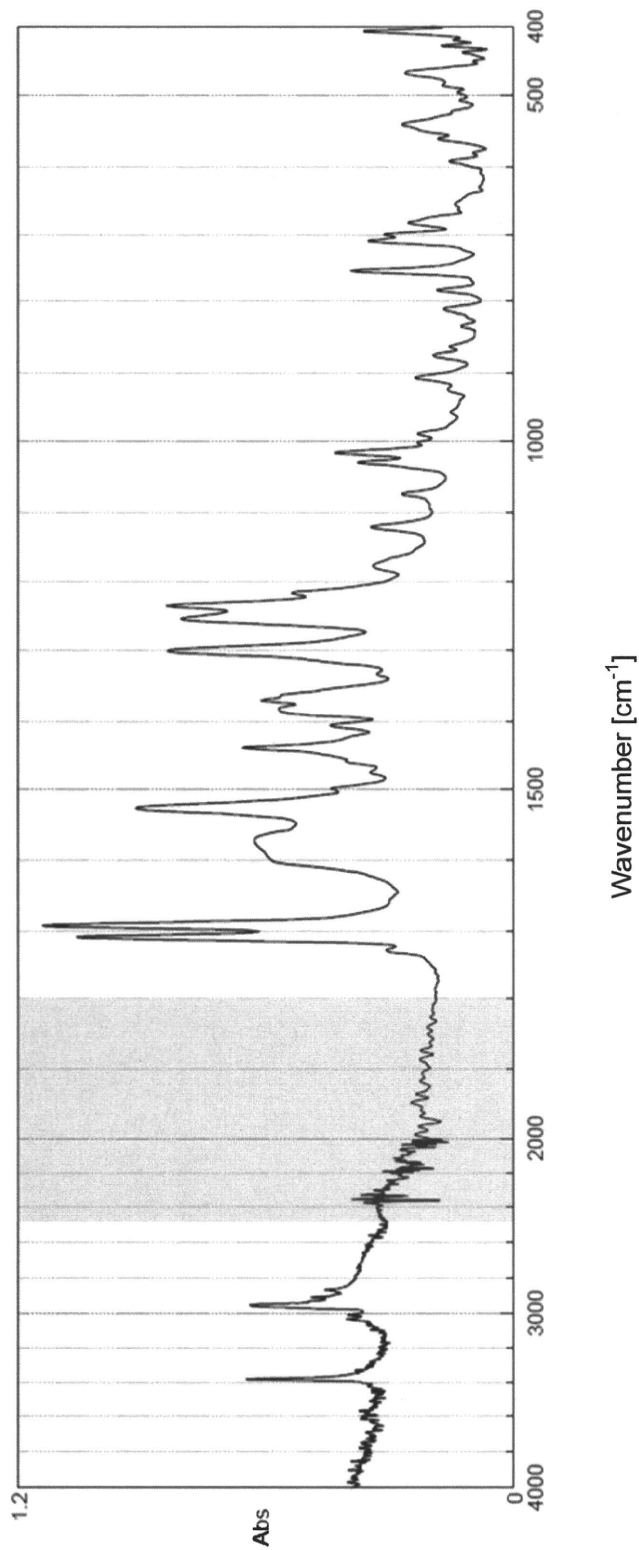
() はダイヤモンドの吸収により信頼できない領域)

図 12. 乾燥ネオテームの ATR 法による IR スペクトル (ATR 補正)



() はダイヤモンドの吸収により信頼できない領域)

図 13. 乾燥酢酸ナトリウムの ATR 法による IR スペクトル (ATR 補正、縦軸 Abs に変換)



() はダイヤモンドの吸収により信頼できない領域)

図 14. 乾燥ネオフェムの ATR 法による IR スペクトル

(ATR 補正、縦軸 Abs に変換、5.5 倍に演算)