

赤外スペクトル測定法に関する調査研究

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 食品添加物の規格基準の向上を目的として、食品添加物の確認試験に国際的に多用されている赤外スペクトル（IR）法について、近年普及著しいATR法の確認試験への利用の可能性を検討した。その結果、確認試験にATR法を取り入れる場合は、標準品との比較を行うか、プリズムの種類や反射回数などの条件を規定した上で、測定試料毎に参照スペクトルとの比較、或いは波数規定を定めていく必要があると考えられた。

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、国際的にも各種化合物の確認試験に汎用されている。また、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）分光器なども安価に市販され、4000～600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。さらに、IR法はほとんど試薬を必要としないため、有機溶媒などを多用する化学的な確認試験法に比べ、有機溶媒などの廃棄量も少なく、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。このような背景のもと、IR法が各種食品添加物の確認試験にも多用され、食の安全に寄与している。一方、減衰全反射法（Attenuated Total Reflection；ATR法）は、現在では日本の食品添加物公定書には規定されていないが、その測定の簡便

さと再現性の良さから、近年急速に普及しつつあり、海外では公定書に規定され、また、第17改正日本薬局方でも規定されている。そこで、本研究では、食品添加物等の国内規格の向上などを目的にして、ATR法によるIRの確認試験への利用の可能性を検討した。固体の測定試料として、波数や強度の指標となるポリスチレンを用いて基礎的な検討を行った。次に、液体試料として、屈折率の低い試料として、屈折率が1.38であるプロピオン酸エチル、次に屈折率の低い試料として、屈折率が1.41であるヘキサン酸エチル、屈折率の比較的高い試料として、屈折率が1.50である酢酸フェネチル、屈折率の高い試料として、屈折率が1.58であるN-メチルアントラニル酸メチルを取り上げ、それぞれについて1回反射と5回反射ATR法によるIR測定法を比較検討した。

B．研究方法

固体試料のポリスチレンは、波数校正用の市販品(日立製作所製)を用いた。液体試料は、国立医薬品食品衛生研究所より提供を受けた食品添加物試料(香料)を用いた。この試料について、ATR法によりIRを測定した。反射回数による違いを検討するため、1回反射、または5回反射ATRモジュールを装着した装置で測定し、また、1回反射ATRにおいては、プリズムの違いを検討する目的で、ダイヤモンドプリズム、ZnSeプリズムでの測定を行った。5回反射ATRではダイヤモンドプリズムは製造が非常に困難であり、販売されていないため、ZnSeプリズムのみでの測定を行った。

本研究でのATR法の測定には、一回反射ATR装置(入射角 45°)または5回反射ATR装置(中央での入射角 45°)を装着したJASCO FT/IR-4100(日本分光社製)を用い、分解能 4 cm^{-1} (96回繰り返し)、測定領域は $4000\sim 600\text{ cm}^{-1}$ で測定を行なった。

C、研究結果

1. 固体試料を用いた検討

測定に用いるATR装置のプリズム、及び反射回数による違いを検討するため、固体試料としてポリスチレンを用い、1回反射ATRではダイヤモンドプリズム及びZnSeプリズム、また、5回反射ATR装置でZnSeプリズムを用いて測定した。

その結果、1回反射ATRでは、ダイヤモンドプリズムとZnSeプリズム間で、顕著な差はないものの、低波数側では違いが認められた(図1)。一方、同じZnSeプリズムを用いた場合、5回反射のピーク強度

は1回反射よりも大きく、ピーク強度の増加は基本的に低波数側が大きく、波長依存性を示した(図2)。一方、5回反射では、測定毎にピーク強度が異なる傾向を示した(図3)。以上より、同じ1回反射で、ほぼ同じ屈折率を持つダイヤモンドプリズムとZnSeプリズムでは顕著な差は認められなかったが、低波数側では違いが認められた。また、プリズムをZnSeに統一し、反射回数の異なるATR装置を用いた場合、ピーク強度は反射回数を反映し、反射回数が多い方が測定毎の変動が認められた。

2. 液体試料を用いた検討

次に、試料の屈折率の違いと反射回数との関連を検討するため、1回反射ATRではダイヤモンドプリズム及びZnSeプリズム、5回反射ATRではZnSeプリズムで液体試料の測定を行った。

2-1. プロピオン酸エチルに関する検討

屈折率の低い試料として、屈折率が1.38であるプロピオン酸エチルを取り上げ、1回反射、及び5回反射ATR法による測定を行った。その結果、1回反射ATRでは、ダイヤモンドプリズムとZnSeプリズムで違いはほぼ見られなかった(図4)。一方、同じZnSeプリズムを用いた場合、5回反射のピーク強度は1回反射よりも大きかったが、ピーク強度の増加の程度は、明確な波長依存性を示さなかった(図5)。

2-2. ヘキサン酸エチルに関する検討

次に屈折率の低い試料として、屈折率が1.41であるヘキサン酸エチルを取り上げ、1回反射、及び5回反射ATR法に

よる測定を行った。その結果、1回反射ATRでは、ダイヤモンドプリズムとZnSeプリズムで違いはほぼ見られなかった(図6)。一方、同じZnSeプリズムを用いた場合、5回反射のピーク強度は1回反射よりも大きかったが、ピーク強度の増加の程度は、明確な波長依存性を示さなかった(図7)。

2-3. 酢酸フェネチルに関する検討

次に屈折率の比較的高い試料として、屈折率が1.50である酢酸フェネチルを取り上げ、1回反射、及び5回反射ATR法による測定を行った。その結果、1回反射ATRでは、ダイヤモンドプリズムとZnSeプリズムで違いはほぼ見られなかった(図8)。一方、同じZnSeプリズムを用いた場合、5回反射のピーク強度は1回反射よりも大きかったが、ピーク強度の増加の程度は、明確な波長依存性を示さなかった(図9)。

2-4. N-メチルアントラニル酸メチルに関する検討

次に屈折率の高い試料として、屈折率が1.58であるN-メチルアントラニル酸メチルを取り上げ、1回反射、及び5回反射ATR法による測定を行った。その結果、1回反射ATRでは、ダイヤモンドプリズムとZnSeプリズムで違いはほぼ見られなかった(図10)。一方、同じZnSeプリズムを用いた場合、5回反射のピーク強度は1回反射よりも大きかったが、ピーク強度の増加の程度は、明確な波長依存性を示さなかった(図11)。

D. 考察

本研究では、食品添加物等の国内規格基準の向上などを目的にして、ATR法によるIRの確認試験への利用の可能性を検討した。ATR法の原理として、プリズムと試料の境界で光が全反射する際に、光が波長に比例した深さだけ試料にもぐり込み、その際のもぐり込み深さはプリズムの屈折率、試料の屈折率、入射光の波長と入射角に依存し、ピーク強度やピークシフトは、もぐり込み深さに依存する。そこで、プリズムの種類による差、反射回数の影響、測定試料の屈折率の影響について検討した。測定試料として、固体試料はポリスチレンを、液体試料は香料化合物を取り上げた。液体試料である香料化合物としては、それぞれ屈折率の異なる、プロピオン酸エチル、ヘキサン酸エチル、酢酸フェネチル、N-メチルアントラニル酸メチルを取り上げ、1回反射ATRでのプリズム間の差、及び、プリズムをZnSeプリズムに固定し、1回反射と5回反射での反射回数によるスペクトルを比較した。

固体試料としてのポリスチレンでの検討において、1回反射ATRで、ダイヤモンドプリズムとZnSeプリズム間で顕著な違いは見られなかった。この結果は、ダイヤモンド、ZnSeプリズムの屈折率がいずれも約2.4とほぼ同じ値であることから、ATRの原理を反映した妥当な結果であると考えた。しかしながら、低波数側で差が生じたのは、ダイヤモンドとZnSeプリズムの屈折率が完全に同一ではないためである可能性が考えられる。また、1回反射と5回反射の比較では、5回反射の

ピーク強度は1回反射よりも大きく、ピーク強度の増加は基本的に低波数側が大きく、波長依存性を示した。この結果も、ATR法の原理を反映した妥当な結果であると考えた。一方、5回反射の場合、ピーク強度が測定毎に変動する傾向が認められた。この結果は、5回反射の場合、プリズムと試料の接地面積が大きいため、特に固体試料では、押さえつけの強度の違いがピーク強度に影響を与え、変動の要因となった可能性があると考えた。今回は測定数が少ないためスペクトルを記載しなかったが、常温で粉末であるモンテルカストナトリウム(日局17掲載医薬品)では、ピーク強度の変動がより大きい傾向を示したことも、前述の可能性を支持するものと考えている。固体試料での変動に関しては、今後、測定数を増やし、検討する必要があると考えられる。

液体試料としての香料化合物での検討においては、いずれの化合物も、1回反射ATRでの、ダイヤモンドプリズムとZnSeプリズムで違いはほぼ見られなかった。この結果は、ダイヤモンド、ZnSeプリズムの屈折率がいずれも約2.4とほぼ同じ値であることから、ATRの原理を反映した妥当な結果であると考えた。一方、同じZnSeプリズムを用いた場合、5回反射のピーク強度は1回反射よりも大きかったが、ピーク強度の増加の程度は、明確な波長依存性を示さなかった。この結果は、今回検討した化合物では、5回反射の場合、ピーク強度が全体に大きくなり、吸光度が高い、すなわち、透過率が低く、透過率を縦軸にとるとピークがつぶれた状態になり(図12)、定量性が低下して

いるピークの割合が多くなったためと考えた。そのため、5回反射の場合で、今回検討した化合物では、測定試料の屈折率の違いとピーク強度変化との関連性を考察することが出来なかった。

国内外の公定書で確認試験の1つとしてIR測定法が規定されており、近年、ATR法を適用する例も増加しつつあるが、ATR法の測定方法に関する具体的な記載は見られない。本研究で得られた結果より、食品添加物の測定法をATR法で規定する際には、確認法として参照スペクトルとの比較、或いは波数規定を行う場合は、プリズムの種類や反射回数などの条件を規定する必要があると考えられた。条件の規定を行わない場合は、同一条件で測定することを前提として標準品との比較が妥当であると考えられた。今後も引き続き条件検討を行い例数を重ねるとともに、入射角可変型の装置も市販されているため、今後、これらの装置の可否も含め、規定の具体的な内容を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

食品添加物の規格基準の向上を目的として、食品添加物の確認試験に国際的に多用されている赤外スペクトル(IR)法について、近年普及しつつあるATR法の確認試験への利用の可能性を検討した。その結果、プリズムの種類、反射回数、試料の種類や、着目するピークの波数など、種々の要因が、ピーク強度、すなわちスペクトル形状に影響を与える可能性があることを示した。以上より、食品添加物

の確認試験に、ATR法を積極的に取り入れていくべきではあるが、確認試験にATR法を取り入れる場合は、測定試料毎に、同一条件での測定を前提とした標準品との比較を行うか、プリズムの種類や反射回数などの条件を規定した上で、参照スペクトルとの比較、或いは波数規定を定めていく必要があると考えられた。

G . 研究発表

学会発表

北村 陽二, 佐藤 恭子, 多田 敦子, 小川 数馬, 小阪 孝史, 中島 美由紀, 茂野 泰貴, 高橋 茉衣夏, 小澤 梓, 上出 茉歩, 濱本 萌凧, 吉田 楓, 斎藤 寛, 柴 和弘, 食品添加物確認試験の赤外スペクトル測定におけるATR法の適用に関する検討, 日本薬学会 第138年会, 石川県, 2018年 3月26日

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

赤外吸収スペクトル

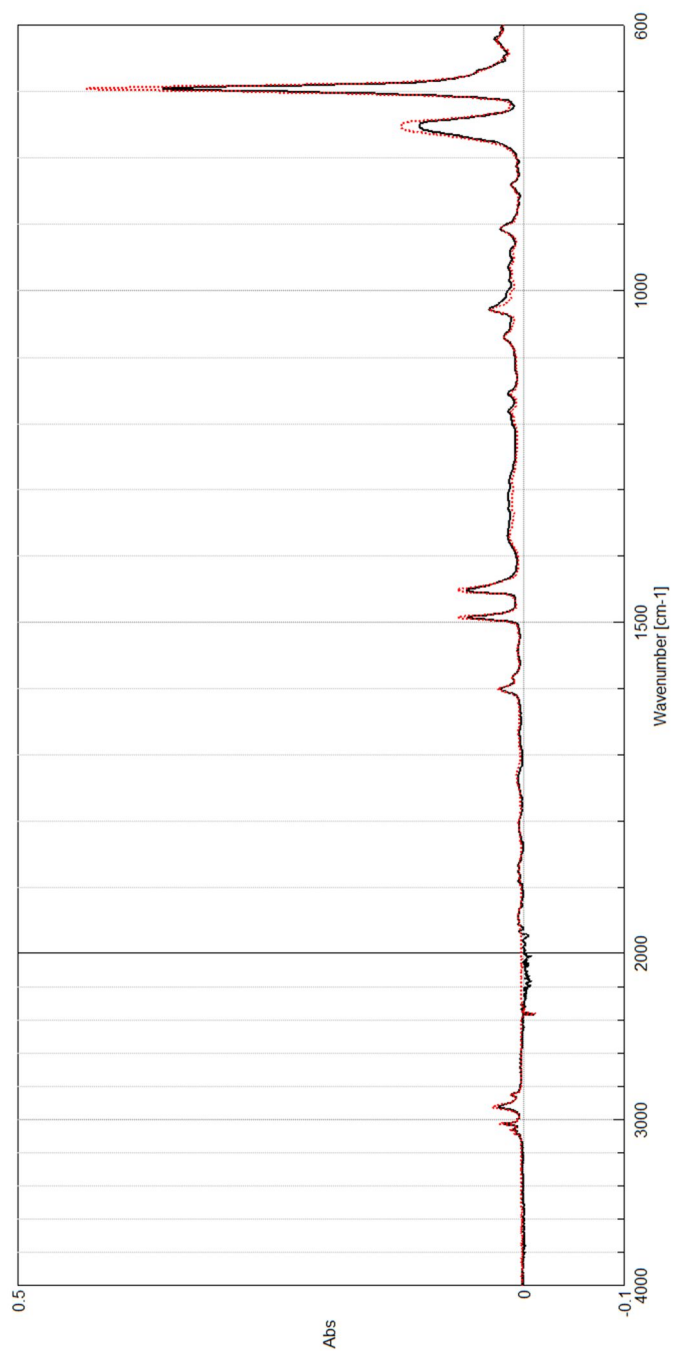


図1. ポリスチレン 1 回反射 ATR (直線：ダイヤモンドプリズム、破線：ZnSe プリズム)

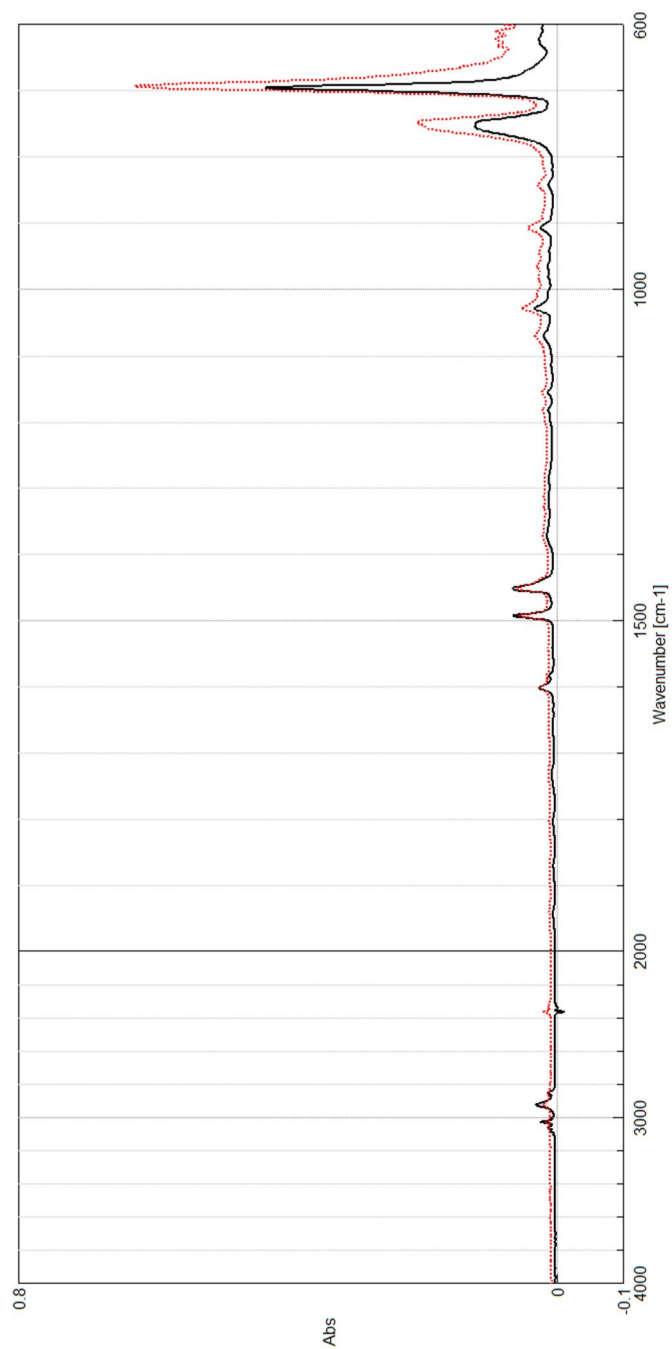


図2. ポリスチレン ZnSeプリズム (直線: 1回反射 ATR、破線: 5回反射 ATR)

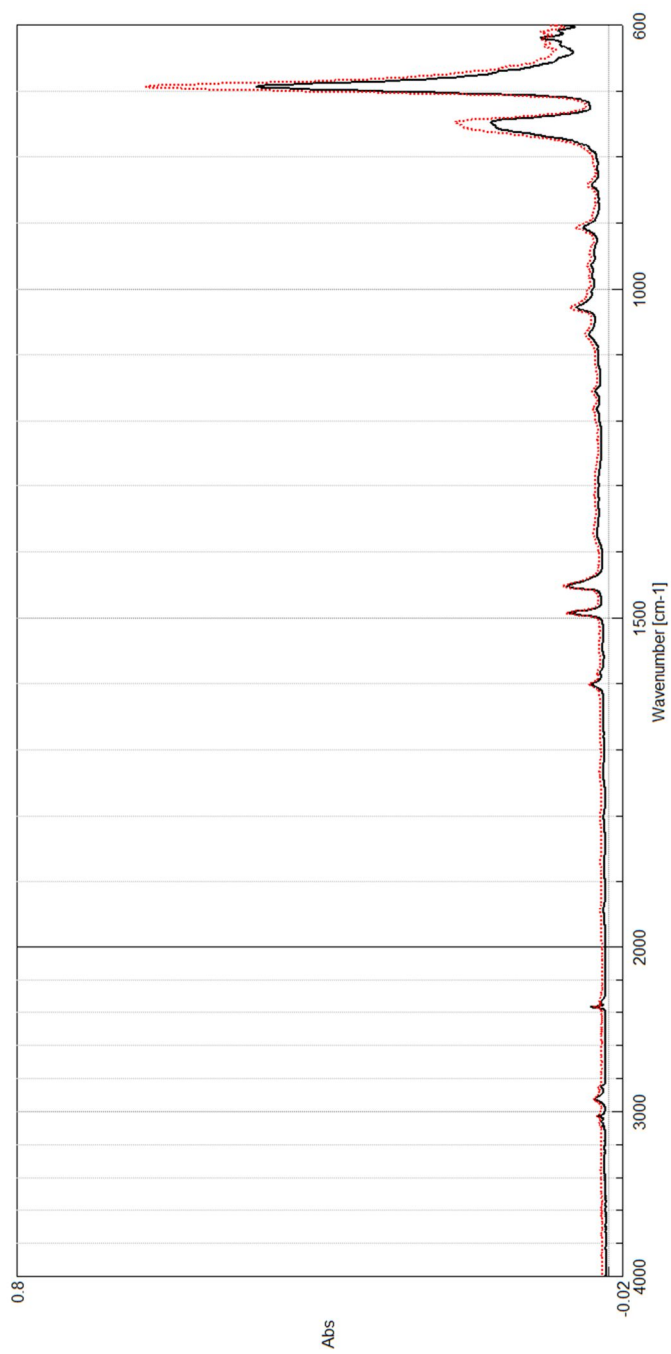


図 3. ポリスチレン ZnSe プリズム (直線 : 5 回反射 ATR、破線 : 5 回反射 ATR(別測定))

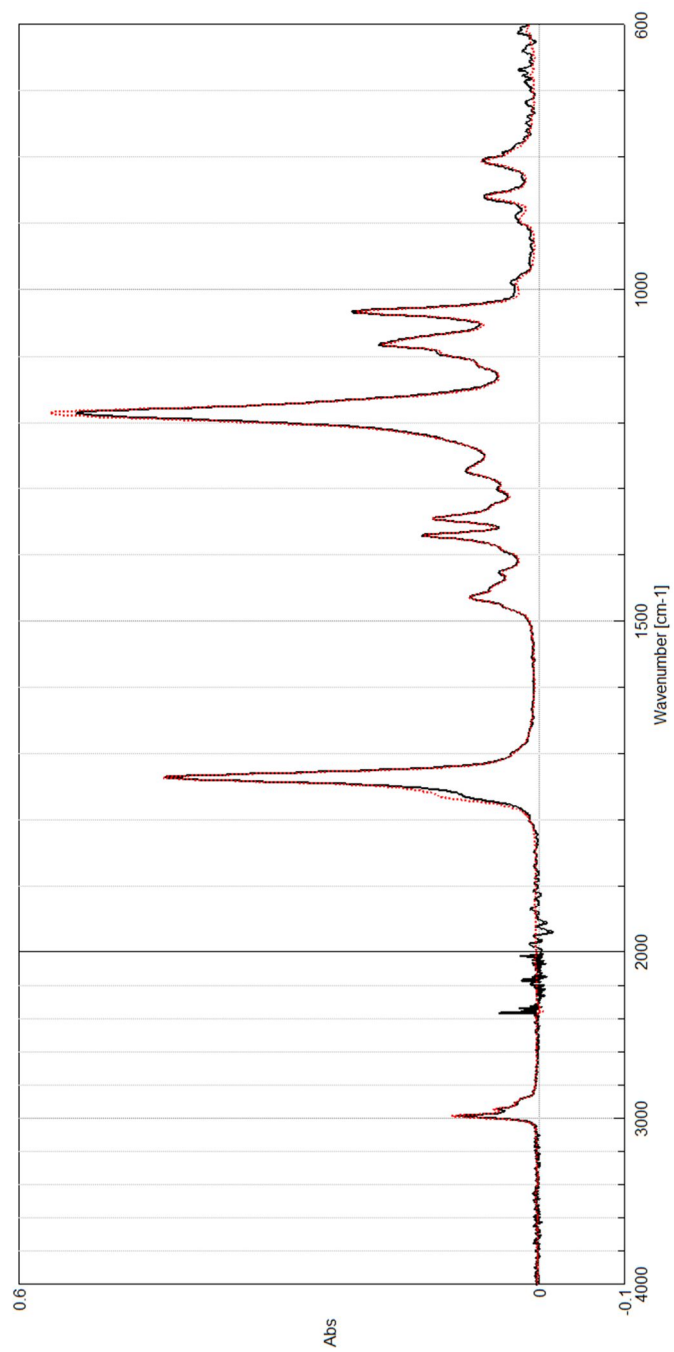


図 4. プロピオン酸エチル 1 回反射 ATR (直線 : ダイヤモンドプリズム、破線 : ZnSe プリズム)

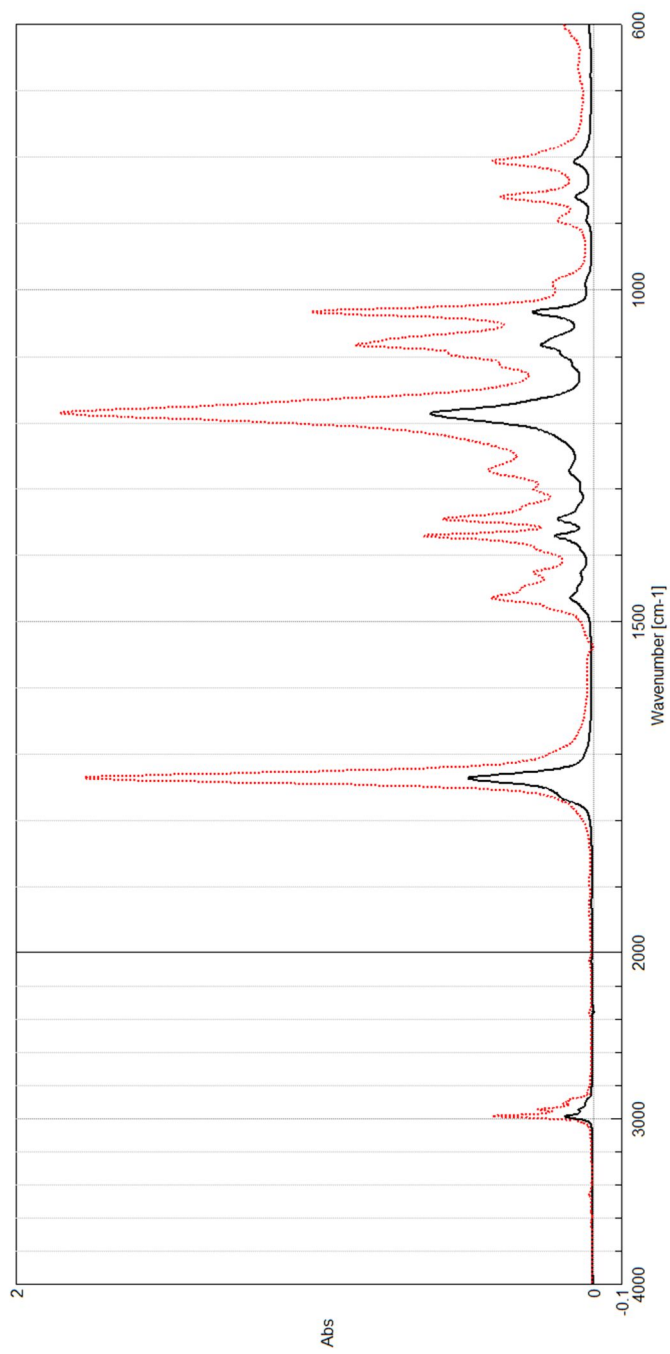


図 5. プロピオン酸エチル ZnSe プリズム (直線 : 1 回反射 ATR、破線 : 5 回反射 ATR)

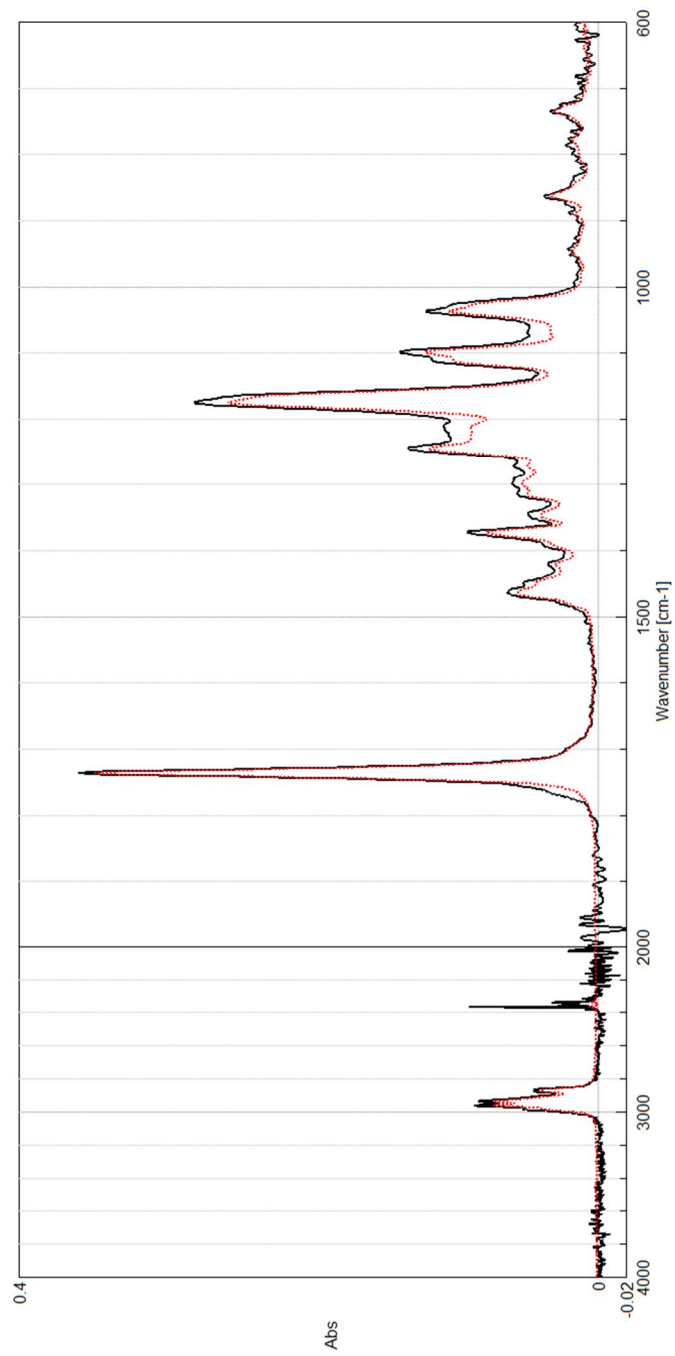


図 6. ヘキサン酸エチル 1 回反射 ATR (直線 : ダイヤモンドプリズム、破線 : ZnSe プリズム)

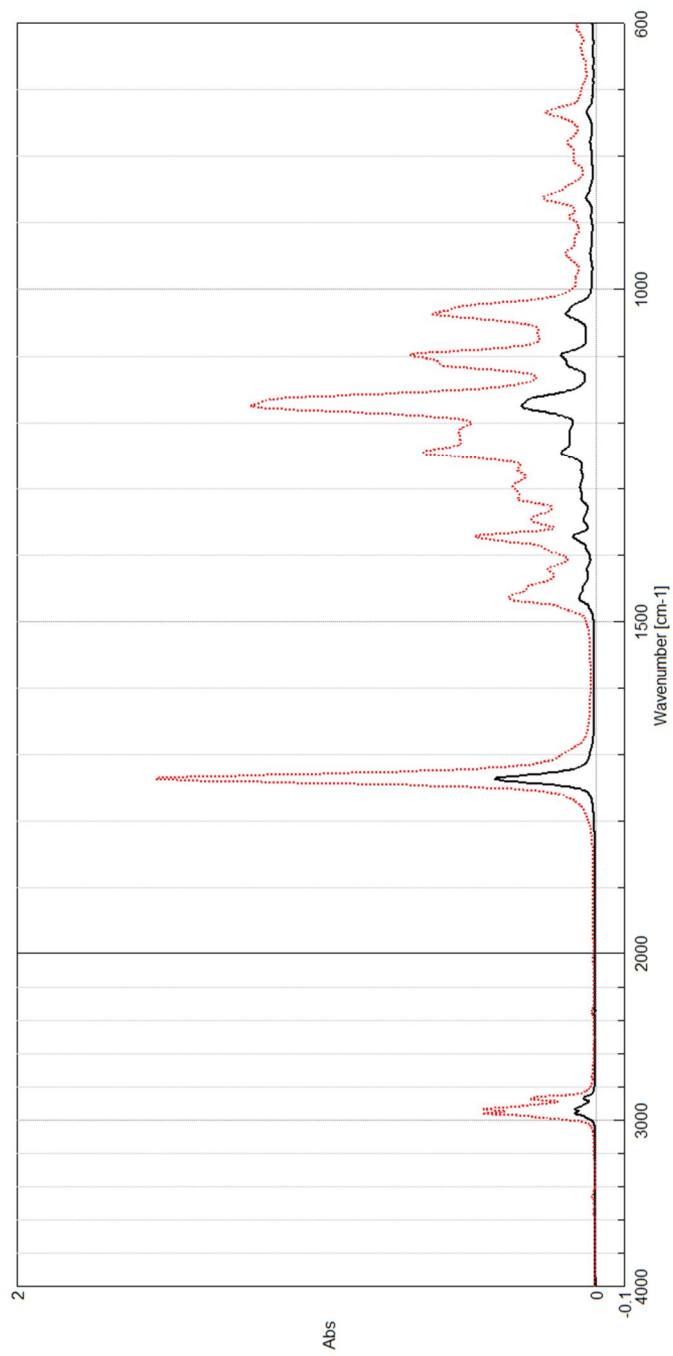


図7. ヘキサミン酸エチル ZnSe プリズム (直線 : 1 回反射 ATR、破線 : 5 回反射 ATR)

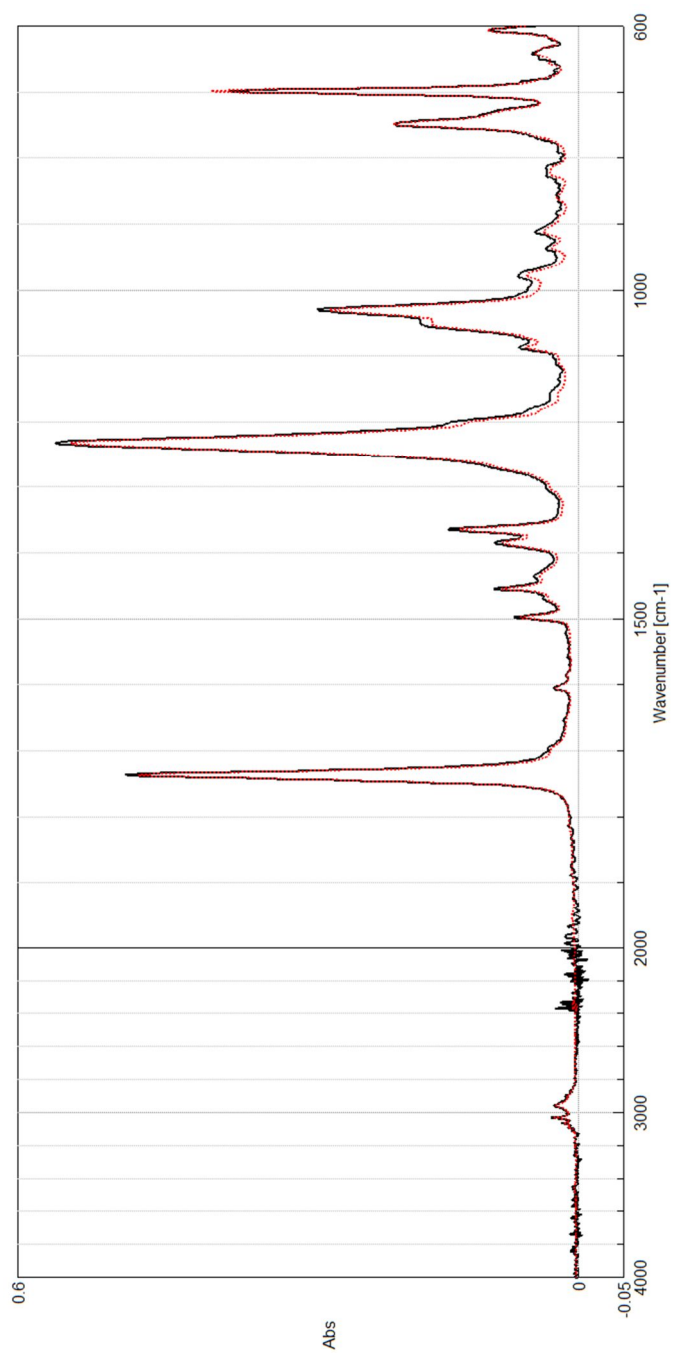


図 8. 酢酸フェネチル 1 回反射 ATR (直線: ダイヤモンドプリズム、破線: ZnSe プリズム)

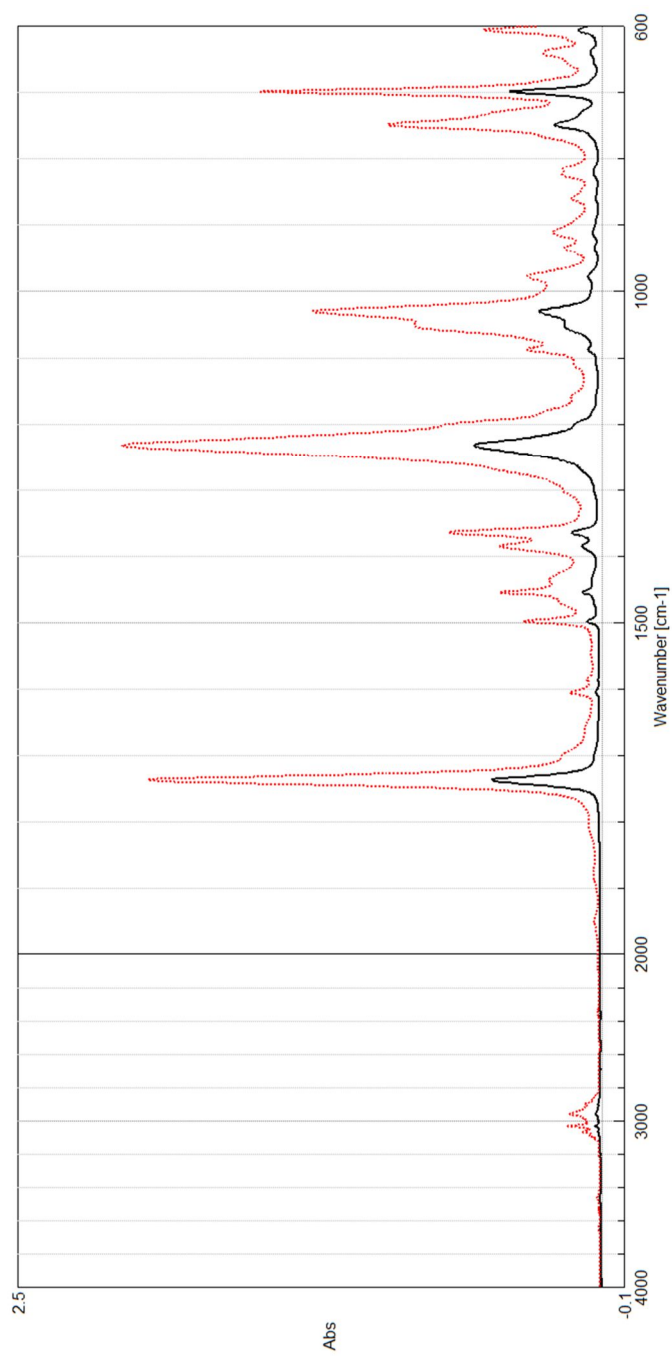


図 9. 酢酸フェネチル ZnSe プリズム (直線：1 回反射 ATR、破線：5 回反射 ATR)

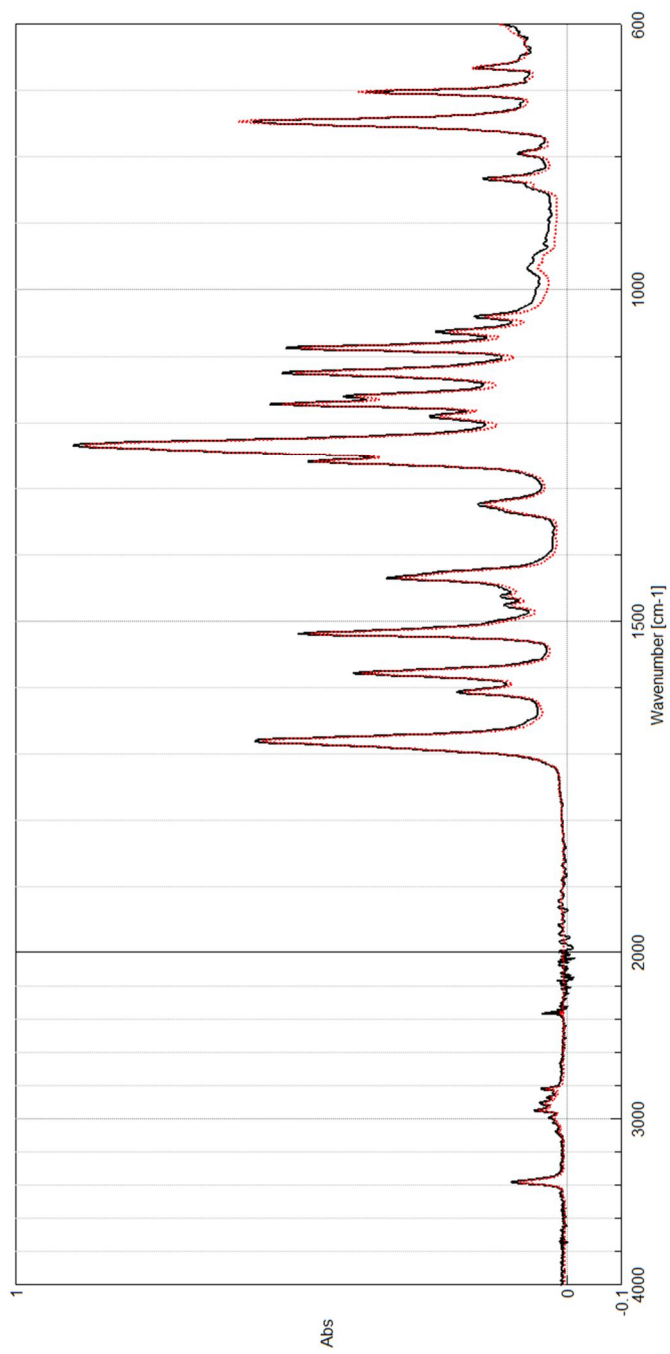


図 10. N-メチルアクリル酸メチル 1 回反射 ATR (直線：ダイヤモンドプリズム、破線：ZnSe プリズム)

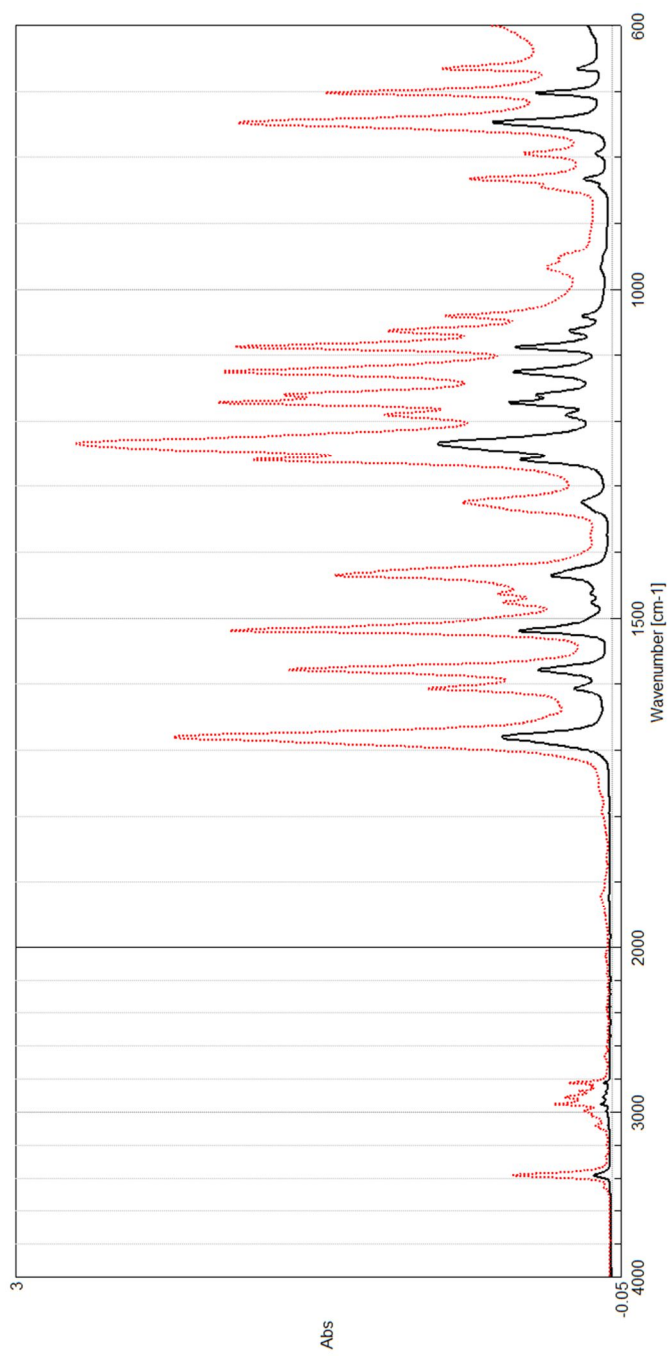


図 11. N-メチルアントラニル酸メチル ZnSe プリズム (直線：1 回反射 ATR、破線：5 回反射 ATR)

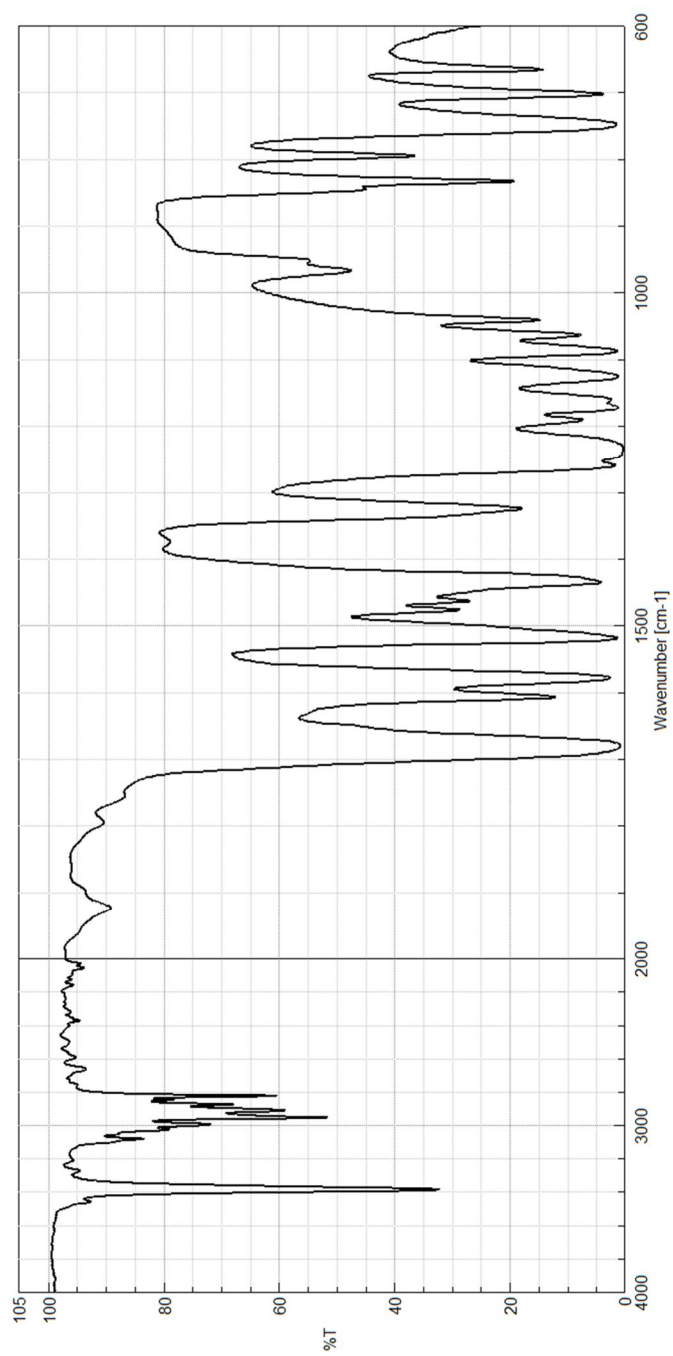


図 12. N-メチルアクリラニル酸メチル (ZnSe プリズム、5 回反射 ATR (縦軸 %T 表示))