

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）

食品添加物の安全性確保のための研究

平成30年度分担研究報告書

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、測定試料の物性も考慮し、品目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 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。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。液体試料として、屈折率の低い試料として、屈折率が1.40であるイソ吉草酸エチル、屈折率が1.40である酪酸、屈折率の比較的高い試料として、屈折率が1.54であるベンジルアルコール、屈折率の高い試料として、屈折率が1.56であるケイ皮酸エチルを取り上げ、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。また、固体の測定試料として、バニリンを用いて同様に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

測定試料は、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。

（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. 研究結果

1. 液体試料を用いた検討

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。

1-1. イソ吉草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1.40であるイソ吉草酸エチル、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

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2）。

1-2. 酪酸に関する検討

次に屈折率の低い試料として、屈折率が1.40である酪酸を取り上げ、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3）。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4）。

1-3. ベンジルアルコールに関する検討

次に屈折率の比較的高い試料として、屈折率が1.54であるベンジルアルコールを取り上げ、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5）。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、ピーク強度の増加の程度は、波長依存性の傾向を示した（図6）。

1-4. ケイ皮酸エチルに関する検討

次に屈折率の高い試料として、屈折率が1.56であるケイ皮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7)。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8)。

2. 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、固体試料としてバニリンを用い、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、スペクトルに僅かな違いが認められた(図10)。また、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回反射よりも小さくなった(図11)。これらは、バニリンの結晶が粗いため、プリズムへの密着が悪いことが原因と考えた。そこで、バニリンをメノウ乳鉢ですりつぶすことにより、結晶粒子を小さくして5回反射 ATR で測定を行った。その結果、すりつぶす前よりも、ピーク強度は大きくなったものの(図12)、1回反射よりは小さかった。以上より、結晶が粗い試料においては、プリズム面積が広い試料との密着の難しい5回反射 ATR が、1回反射よりもピーク強度が弱くなる場合があることが分かった。

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、液体試料は香料化合物を、固体試料はバニリンを取り上げた。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、イソ吉草酸エチル、酪酸、ベンジルアルコール、ケイ皮酸エチルを取り上げ、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。

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、ベンジルアルコールを除き、明確な波長依存性を示さなかった。この結果は、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、透過率を縦軸に取るとピークがつぶれた状態になり（図9）、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。ベンジルアルコールは、他の化合物に比べ、弱い吸収のピークが多いため、波長依存性の傾向を示したと考えられる。

固体試料としてのバニリ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、スペクトルに僅かな違いが認められた。また、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回反射よりも小さくなり、バニリンをメノウ乳鉢ですりつぶすことにより、結晶粒子を小さくして5回反射ATRで測定を行った場合でも、すりつぶし前よりはピーク強度が強くなったものの、1回反射よりも弱かった。これらの結果は、結晶が粗い試料においては、プリズムとの密着が悪く、プリズム面積が広く試料との密着が難しい5回反射ATRでは、密着性の悪さが増幅されたためと考えられ、試料の結晶の状態によっては、5回反射の方が1回反射よりもピーク強度が弱くなる場合があることを示している。

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法で規定する際においては、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、測定試料の物性も考慮し、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。

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、試料の物性など、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 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, 高橋茉衣夏, 上出茉歩, 濱本萌風, 吉田楓, 池田朝海, 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へのATR法の

適用に関する検討, 日本薬学会 第139年
会, 千葉, (2019.3.21)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

赤外吸収スペクトル

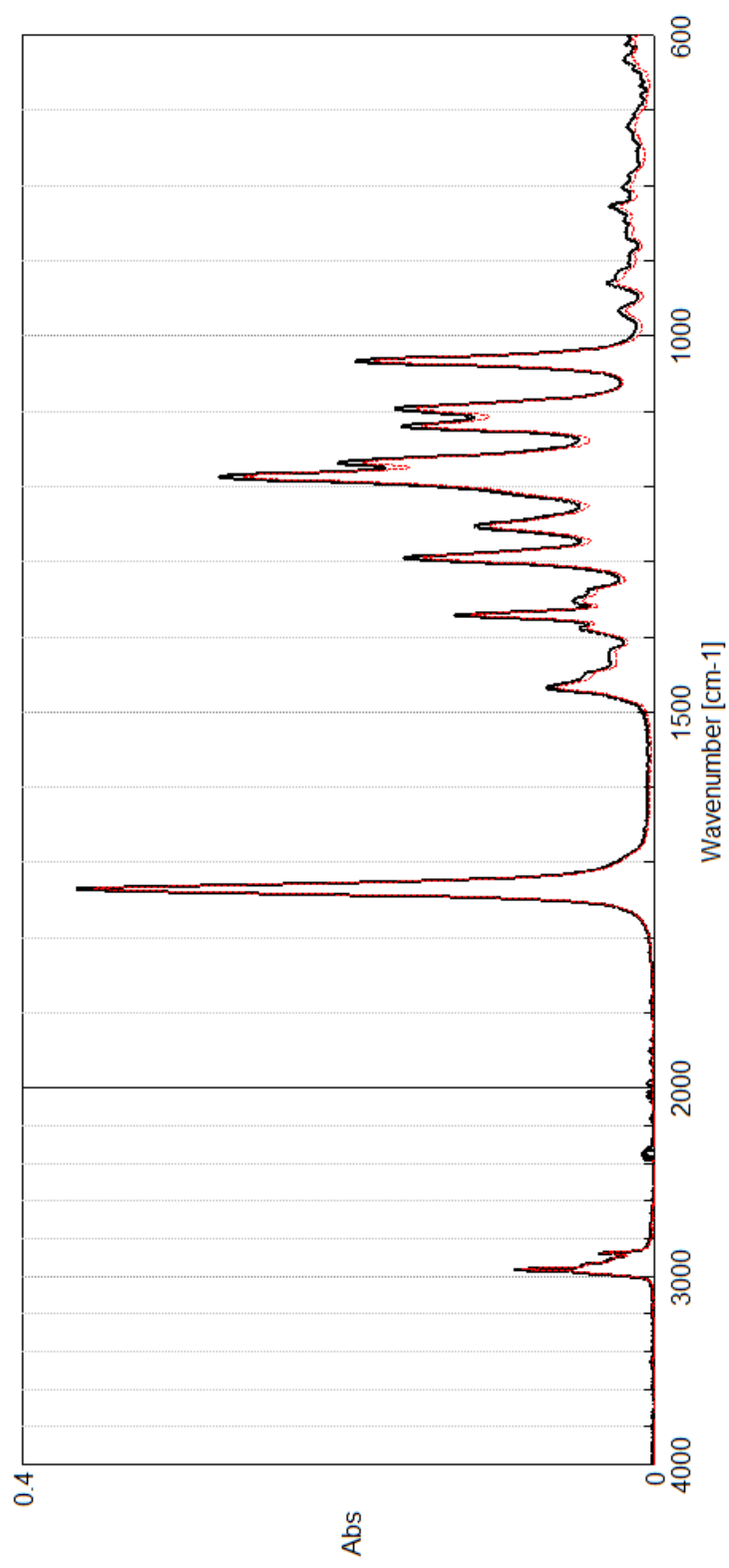


図 1. イソ草酸エチル 1 回反射 ATR (直線：ダイヤモンドプリズム、破線：ZnSe プリズム)

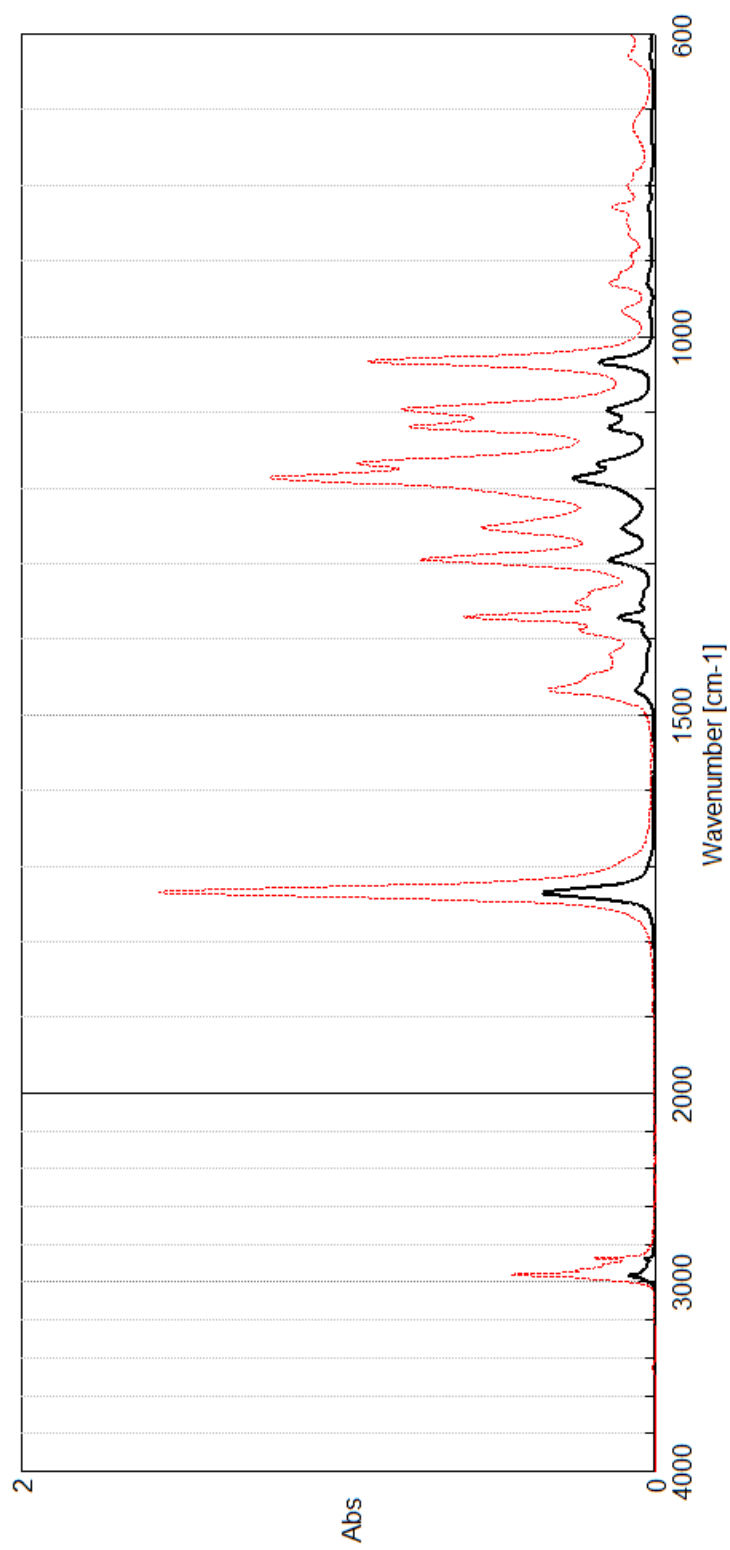


図 2. イソ草酸エチル ZnSe プリズム (直線 : 1 回反射 ATR、破線 : 5 回反射 ATR)

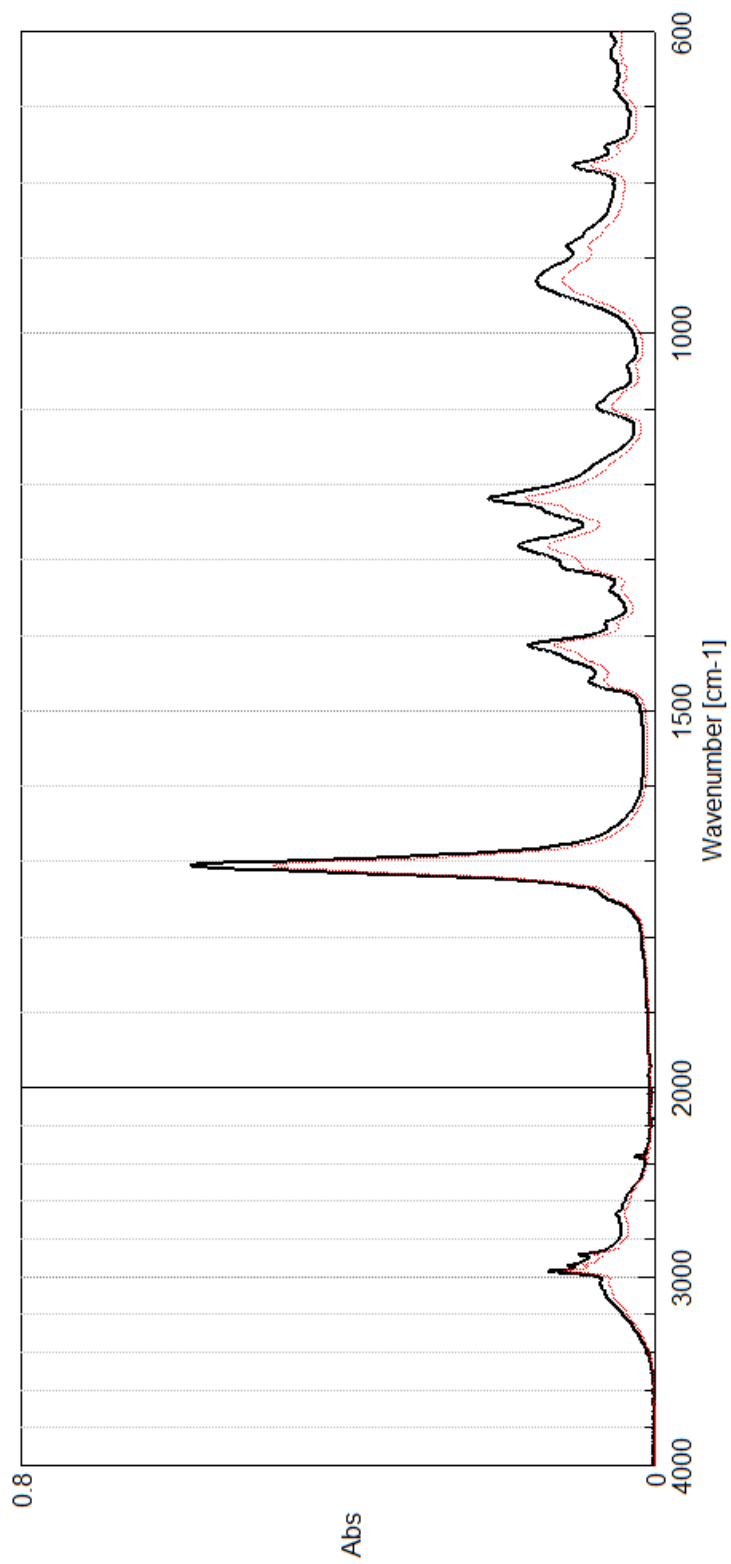


図 3. 酪酸 1 回反射 ATR (直線 : ダイヤモンドプリズム、破線 : ZnSe プリズム)

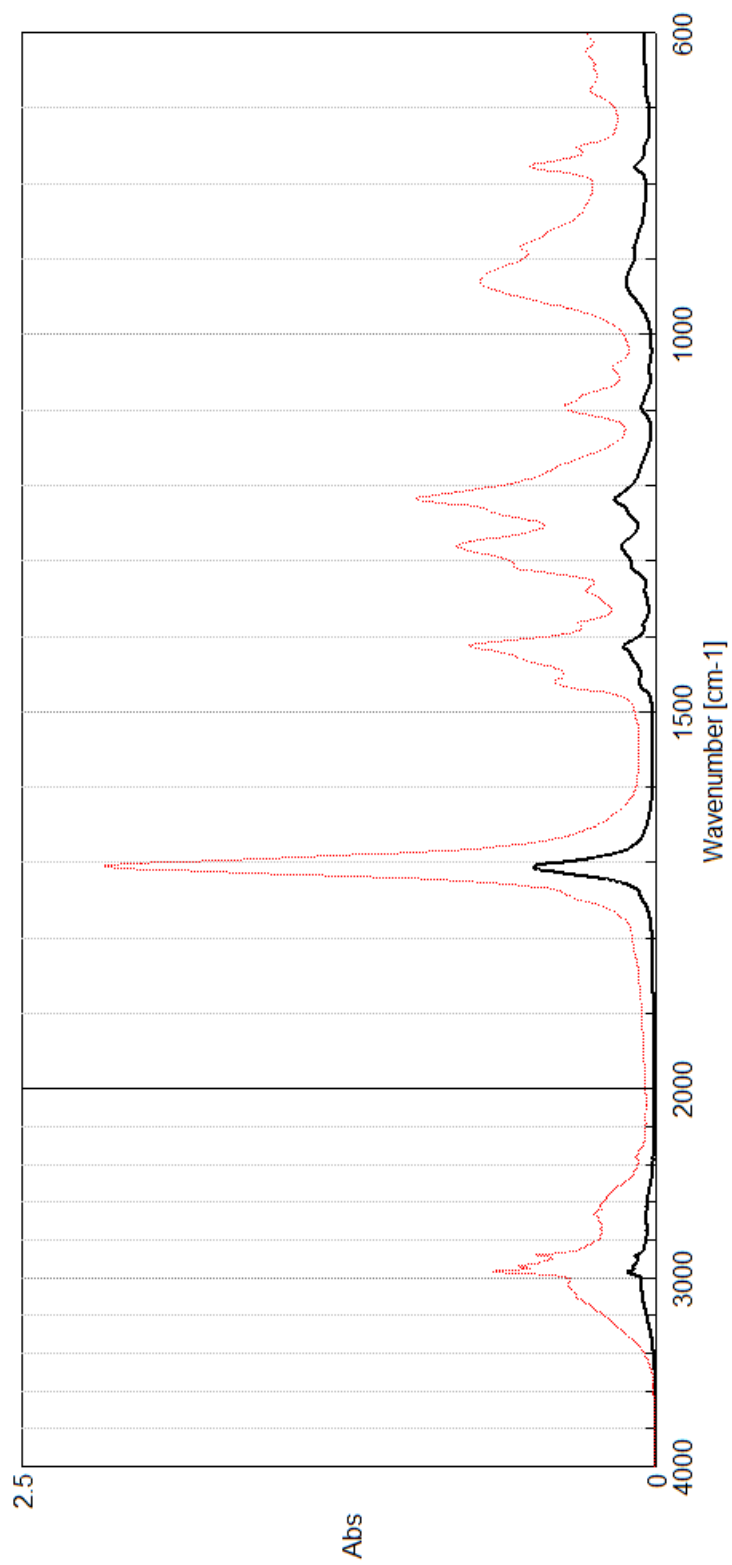


図 4. 酢酸 ZnSe プリズム (直線 : 1 回反射 ATR、破線 : 5 回反射 ATR)

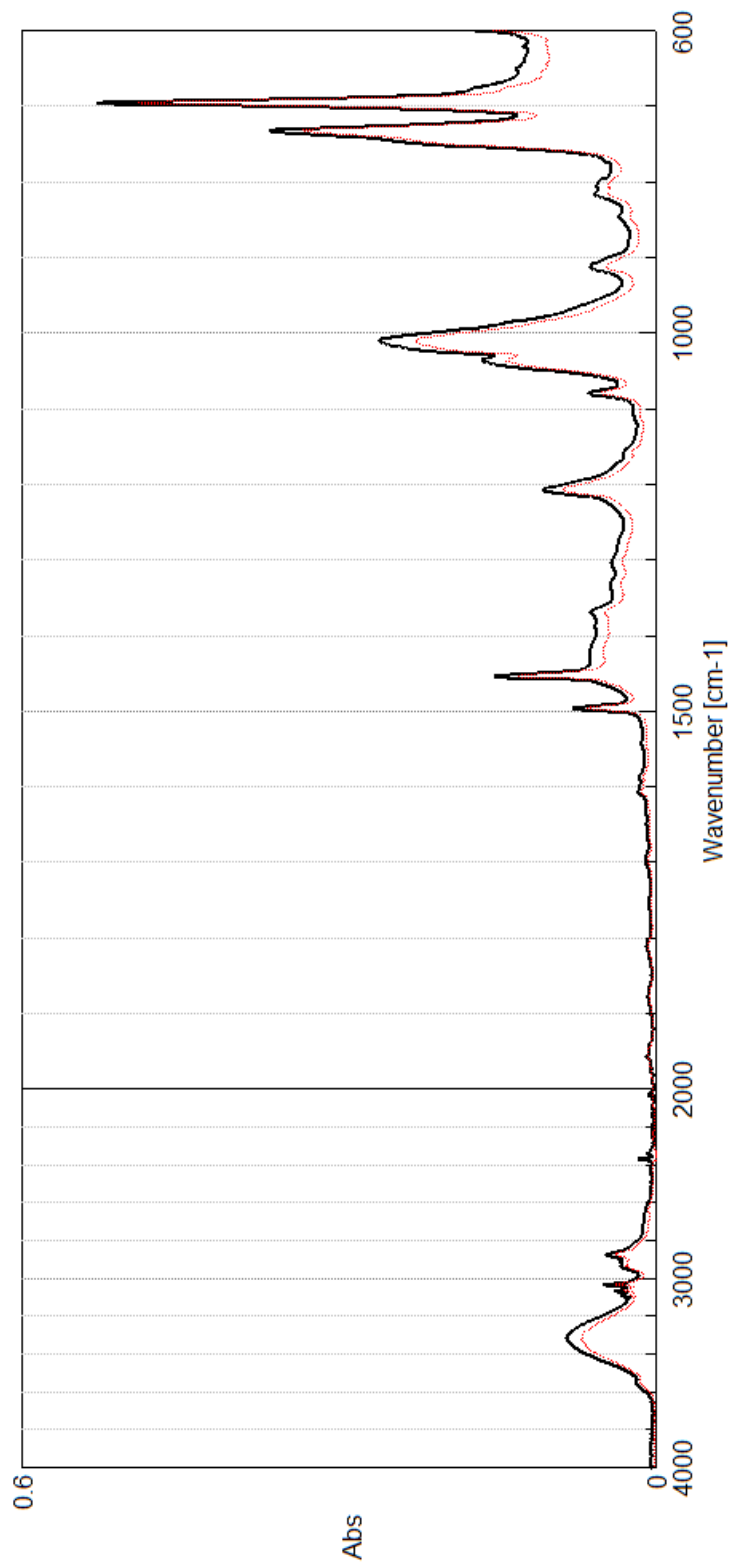


図 5. ベンジルアルコール 1 回反射 ATR (直線 : ダイヤモンドプリズム、破線 : ZnSe プリズム)

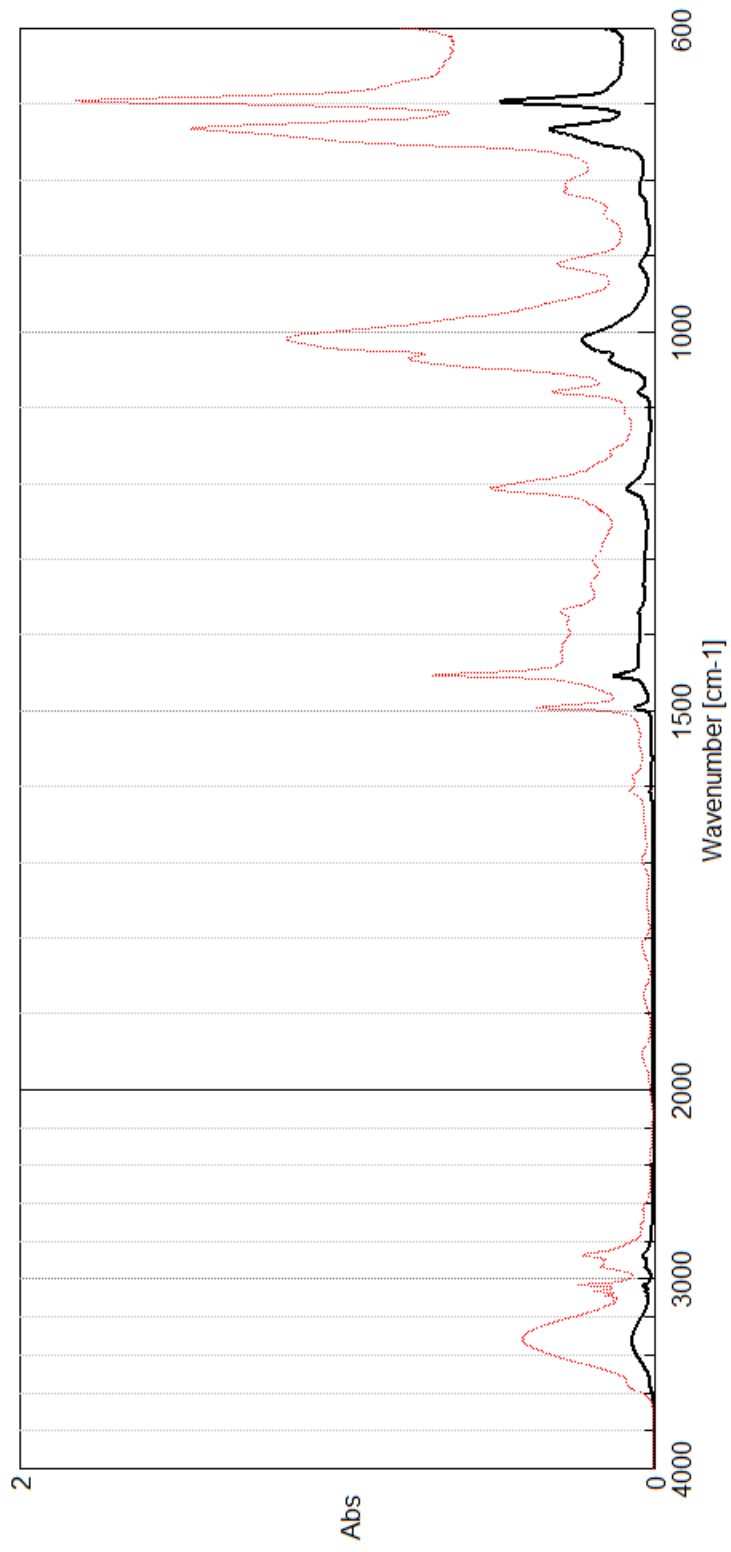


図 6. ベンジルアルコール ZnSe プリズム (直線 : 1 回反射 ATR、破線 : 5 回反射 ATR)

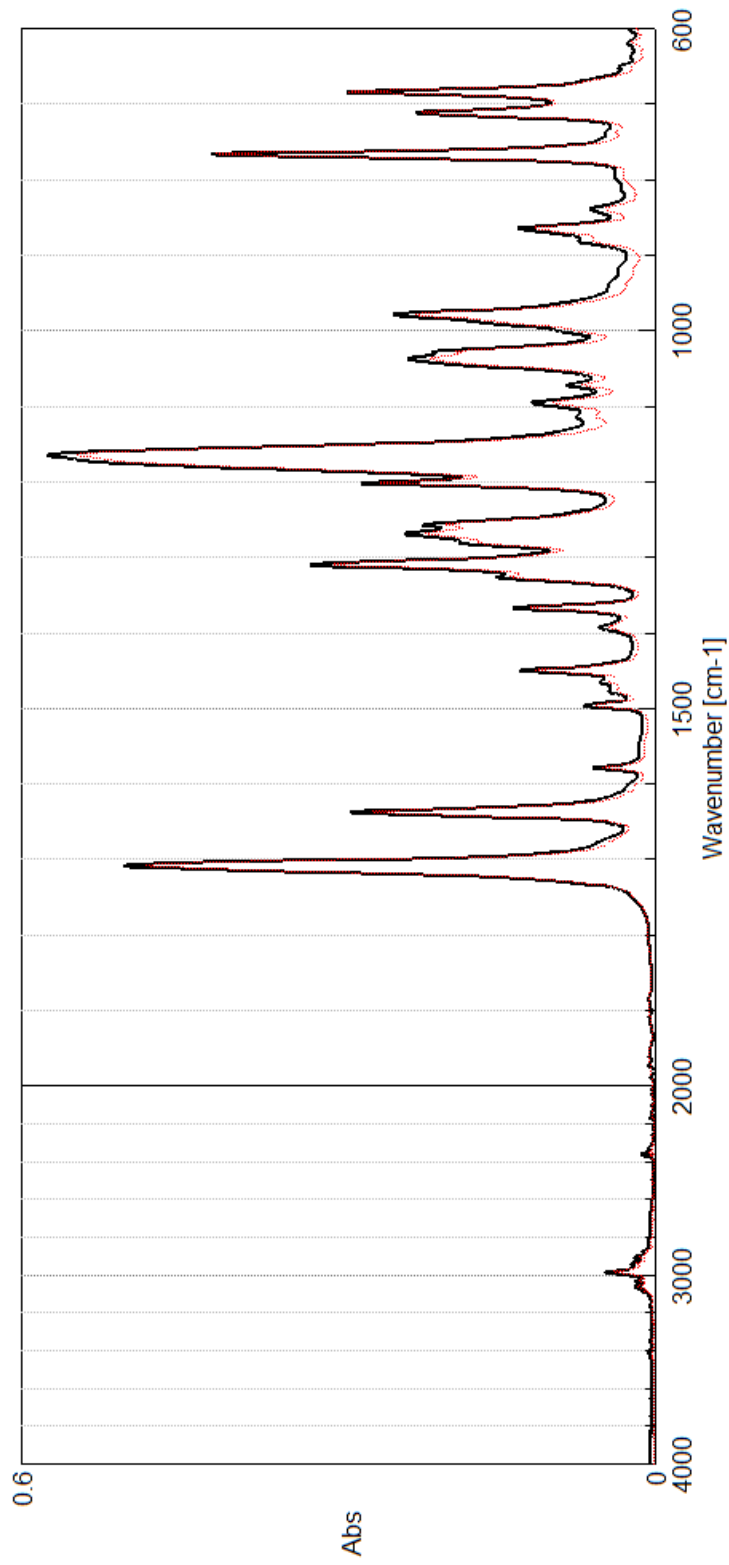


図 7. ケイ皮酸エチル 1 回反射 ATR (直線 : ダイヤモンドプリズム、破線 : ZnSe プリズム)

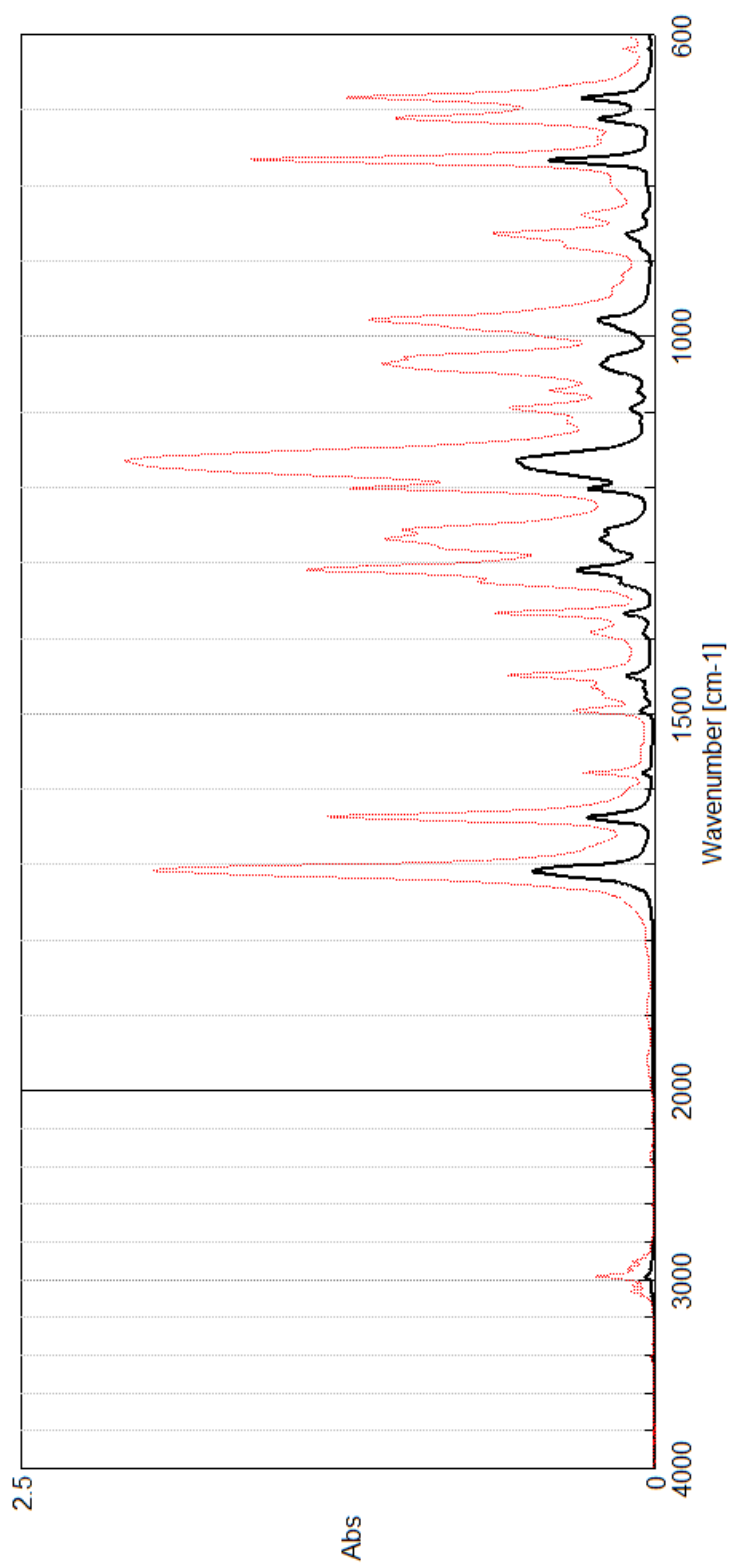


図 8. ケイ皮酸エチル ZnSe プリズム (直線 : 1 回反射 ATR、破線 : 5 回反射 ATR)

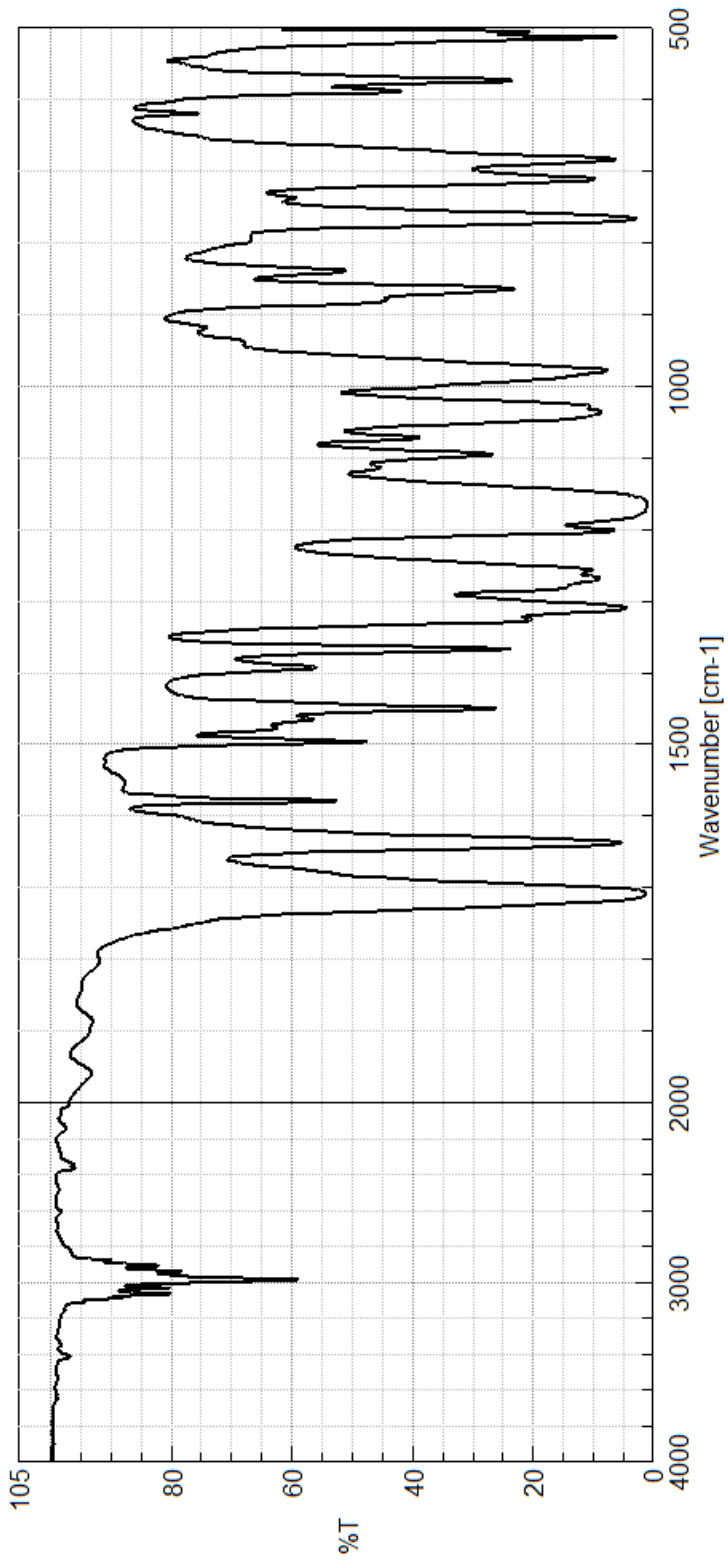


図 9. ケイ皮酸エチル (ZnSe プリズム、5 回反射 ATR (縦軸%T 表示))

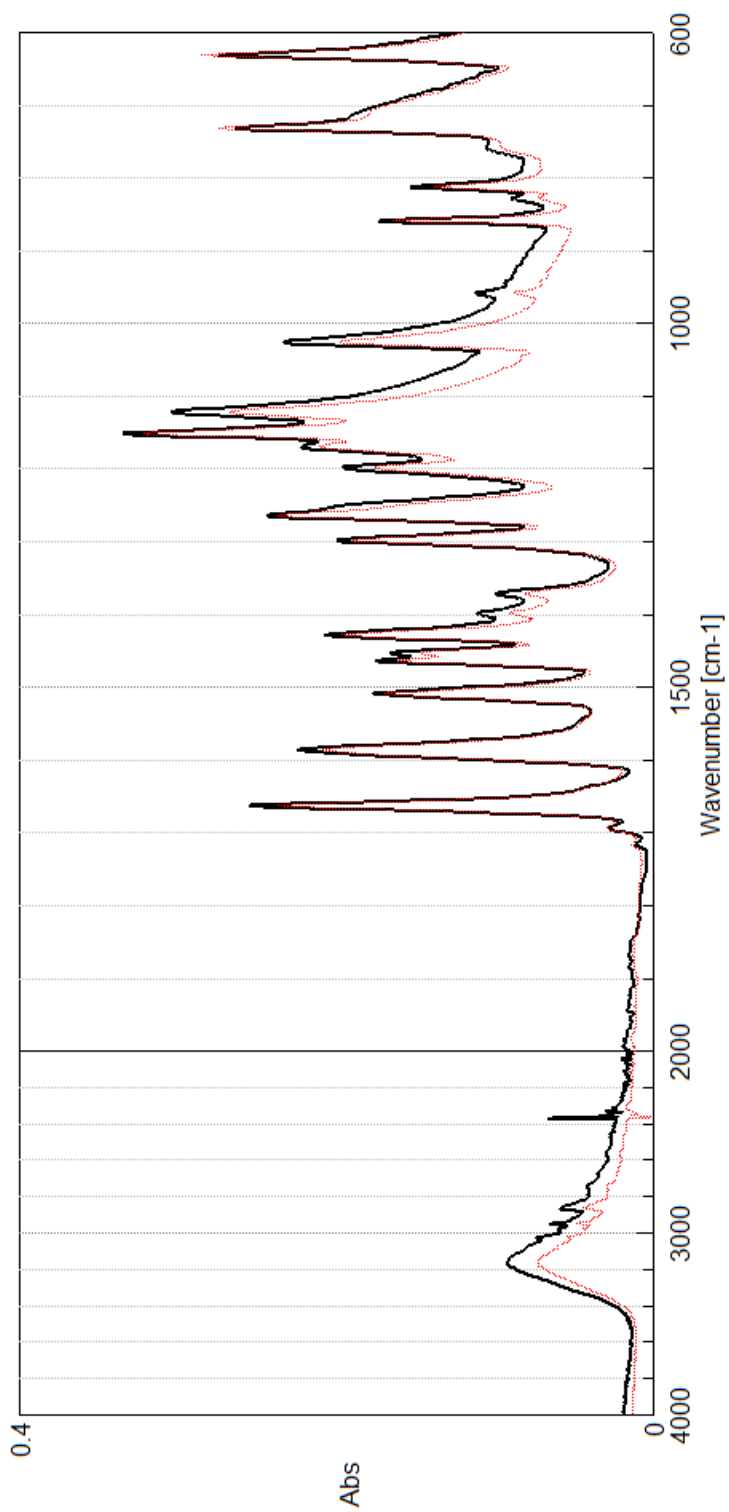


図 10. バニリン 1 回反射 ATR (直線: ダイヤモンドプリズム、破線: ZnSe プリズム)

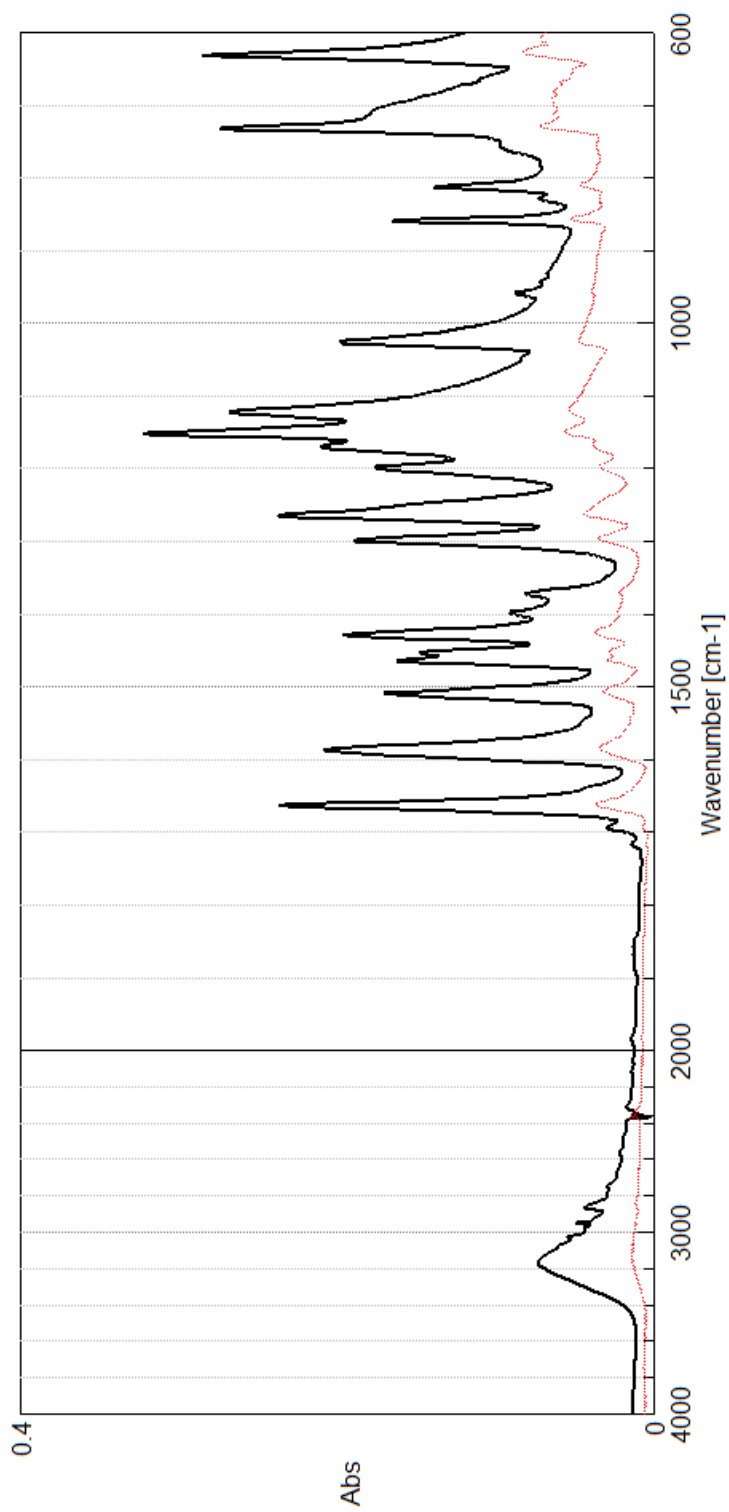


図 11. パニリン ZnSe プリズム (直線: 1 回反射 ATR、破線: 5 回反射 ATR)

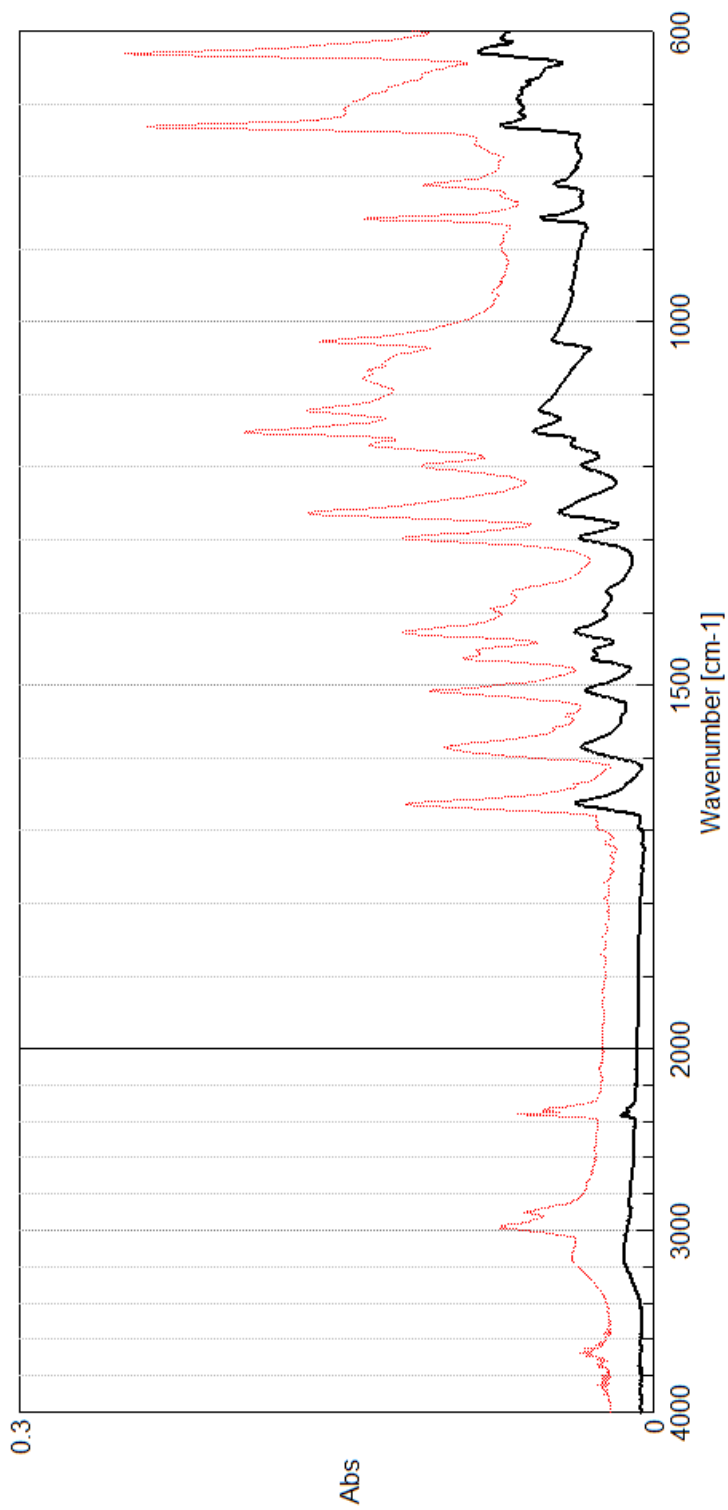


図 12. バニリン ZnSe プリズム (直線 : 5 回反射 ATR、破線 : 5 回反射 ATR(結晶細粒化))