

## 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に資する研究

#### 令和3年度分担研究報告書

#### 赤外スペクトル測定法に関する研究

研究分担者 北村 陽二 国立大学法人金沢大学疾患モデル総合研究センター准教授

#### 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法について、普及著しい減衰全反射法（ATR法）について、規格設定に関わる調査、検討を行った。その結果、確認試験にATR法を取り入れる場合は、同一条件での測定を前提とした標準品との比較を行う必要があると考えられた。以上の結果をふまえ、食品添加物公定書一般試験法 赤外吸収スペクトル測定法にATR法を取り入れる場合の改正案を提案した。

#### 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  $\text{cm}^{-1}$  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。また、減衰全反射法（Attenuated Total Reflection ; ATR

法）は、現在では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る。そこで、本研究では、我が国での食品添加物等の規格基準の向上を目的として、ATR 法について、規格設定に関わる調査、検討を行った。

#### B. 研究方法

測定試料は、市販品を用いた。本研究で測定に用いた赤外分光光度計は、JASCO FT/IR-4100（日本分光社製）である。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  $\text{cm}^{-1}$ （積算回数 96 回）、測定領域 4000～600  $\text{cm}^{-1}$  で測定を行った。

(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. 研究結果及び考察

参考となる規格基準として、第十八改正日本薬局方 (JP18) (JP18 解説書、JP18 技術情報 (JPTI2021) を含む)、USP Food Chemical Codex 12th edition (FCC 12th)、European Pharmacopoeia 10th edition (EP 10th) を調査した結果、透過法である既存の測定法と、反射法である ATR 法を特に区別せずに規定しているものがある一方で、EP 10th では、両者を明確に区別しており、確認方法も標準品との比較であった。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スペクトルとは異なるため、透過法によるスペクトルとの比較による確認は問題がある。実際に、試料としてキシリトールを取り上げて比較検討を行った。その結果、キシリトール標準品を ATR 法で測定したスペクトル (図 2) と、透過法である錠剤法 (KBr) で測定された参照スペクトル (第 9 版食品添加物公定書掲載; 図 1) とを比較すると、ATR 法で得られたスペクトルは、錠剤法 (KBr) で測定された参照スペクトルとは異なっていたことから、確認試験において ATR 法で得られたスペクトルと、透過法で得られた既存の参照スペクトルの比較による確認は問題があると考えられた。また、キシリトールを用いて、測定前の処理に関して検討を行った。第 9 版食品添加物公定書のキシリトールの確認試験の (2) として、「本品を減圧下、酸化リン (V) デ

シケータ中で 24 時間乾燥し、赤外吸収スペクトル測定法中の錠剤法により測定し、本品のスペクトルをキシリトール標準品のスペクトル又は参照スペクトルと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収を認める。」と規定されている。参照スペクトルは錠剤法で測定されているため、前述の通り、ATR 法でのスペクトルとの比較はできないため、ATR 法を用いる場合は、標準品との比較となる。そこで、A 社キシリトールを乾燥せずに ATR 法で測定したスペクトル (図 3) と、乾燥したキシリトール標準品のスペクトル (図 2) を比較した結果、 $3100\sim 3400\text{cm}^{-1}$  付近のスペクトル形状が異なっていたが、A 社キシリトールを乾燥した後に測定したスペクトル (図 4) は、乾燥したキシリトール標準品のスペクトル (図 2) と合致した。なお、キシリトール標準品を乾燥せずに測定した場合のスペクトル (図 5) は、乾燥して得られたスペクトル (図 2) とは異なっていた。従って、ATR 法での測定を規定する場合でも、測定条件 (測定前の処理を含む) を規定することが必要であり、標準品も、同様の測定条件で測定する必要があると考えられた。今後、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あり、確認試験に ATR 法を取り入れる場合、同一条件での測定を前提とした標準品との比較を行う必要があると考えられた。以上の結果をふまえ、食品添加物公定書 一般試験法 赤外吸収スペクトル測定法に ATR 法を取り入れる場合の改正案を別紙に提案した。

## D. 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 IR 法について、ATR 法も含め、規格設定に関わる調査、検討を行った。参考となる規格基準を調査した結果、透過法である既存の測定法と、反射法である ATR 法を特に区別せずに規定しているものがある一方で、EP 10th では、両者を明確に区別していた。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スペクトルとは異なるため、透過法によるスペクトルとの比較による確認は問題がある。実際に、試料としてキシリトールを取り上げて比較検討を行った結果、キシリトール標準品を ATR 法で測定したスペクトルと、透過法である錠剤法 (KBr) で測定された第 9 版食品添加物公定書の参照スペクトルとを比較すると、ATR 法で得られたスペクトルは、参照スペクトルとは異なっていたことから、確認試験において ATR 法で得られたスペクトルと、透過法で得られた既存の参照スペクトルの比較による確認は問題があると考えられた。また、キシリトールを用いて、測定前の処理に関して検討を行ったところ、乾燥せずに測定した場合のスペクトルは、乾燥して得られたスペクトルとは異なって

いた。従って、ATR 法での測定を規定する場合でも、測定条件（測定前の処理を含む）を規定することが必要であり、標準品も、同様の測定条件で測定する必要があると考えられた。今後、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あり、確認試験に ATR 法を取り入れる場合、同一条件での測定を前提とした標準品との比較を行う必要があると考えられた。以上の結果をふまえ、食品添加物公定書 一般試験法 赤外吸収スペクトル測定法に ATR 法を取り入れる場合の改正案を提案した。この赤外スペクトル測定法案は、第 10 版食品添加物公定書検討会において議論され、合意が得られた。

## E. 研究発表

1) Kitamura Y, Tada A, Kubota H, Tatebe C, Shiba K, Sato K, Basic study on the application of ATR for the measurement of infrared absorption spectrum of food additives identification tests, Food Hygiene and Safety Science (投稿準備中)

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 赤外スペクトル

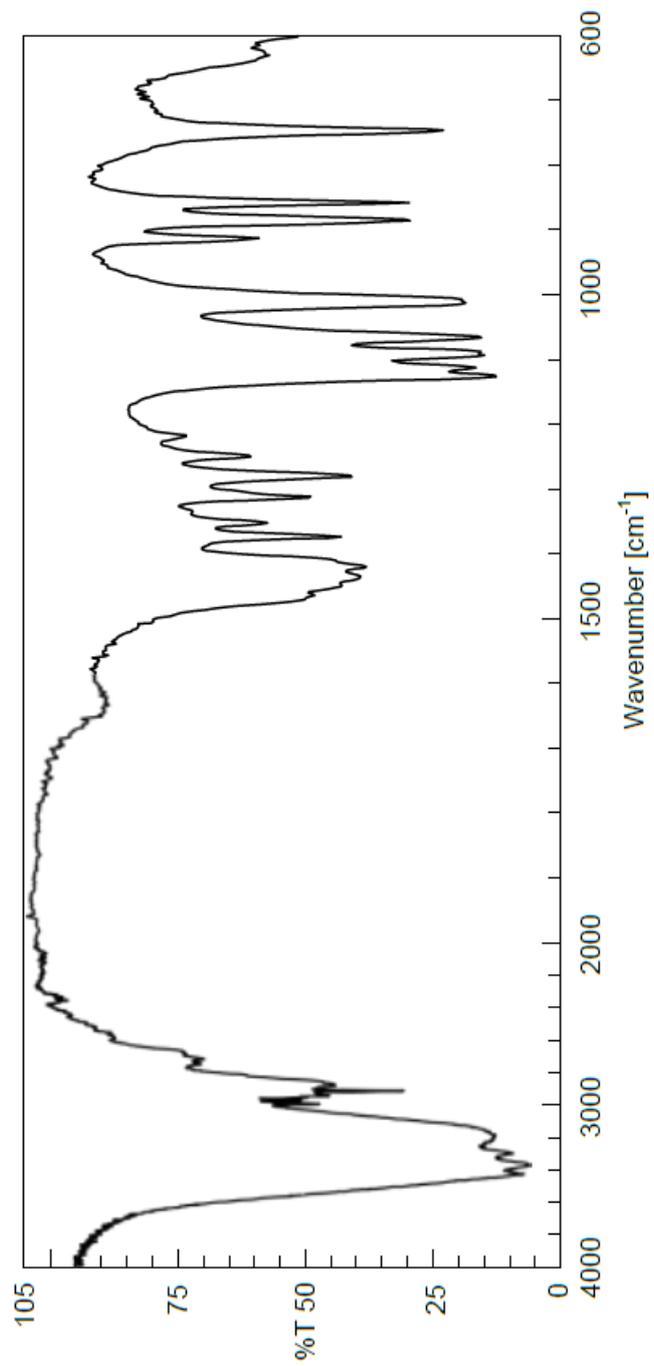


図 1. キシリトール参照スペクトル (KBr 錠剤法)

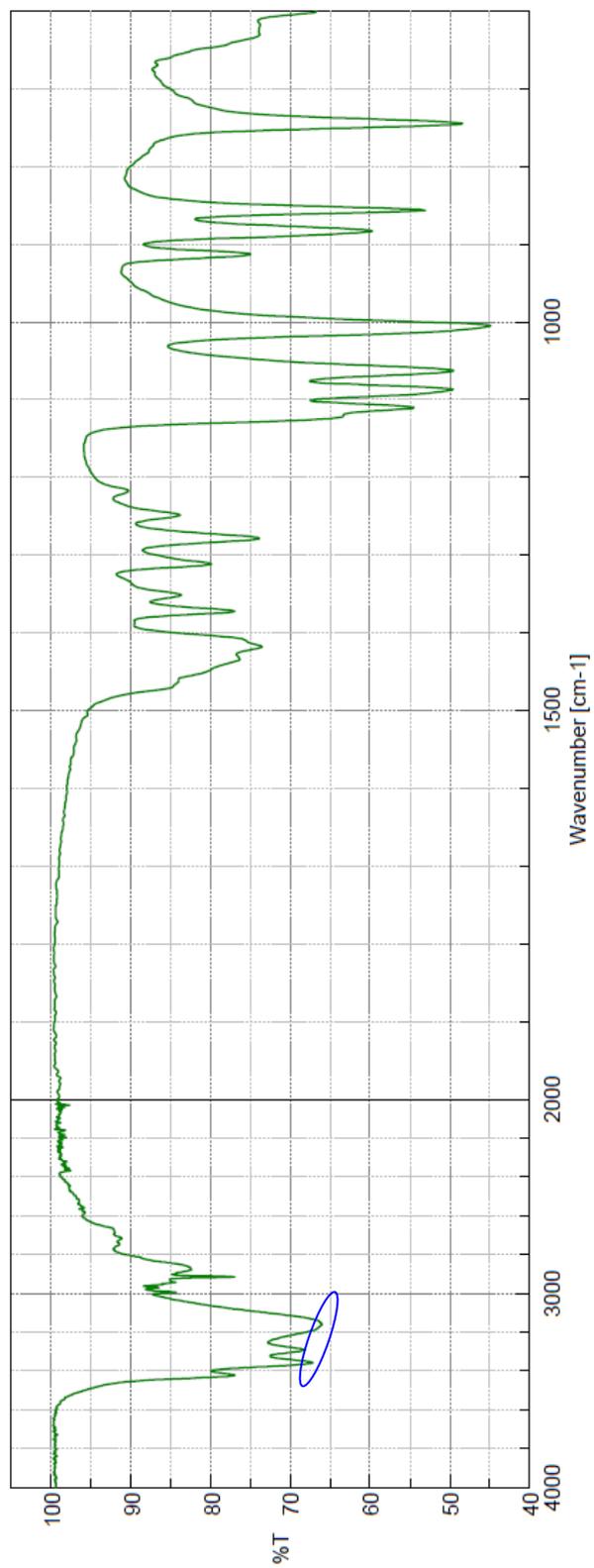


図2. キシリトール標準品 (減圧乾燥 : ATR 法)

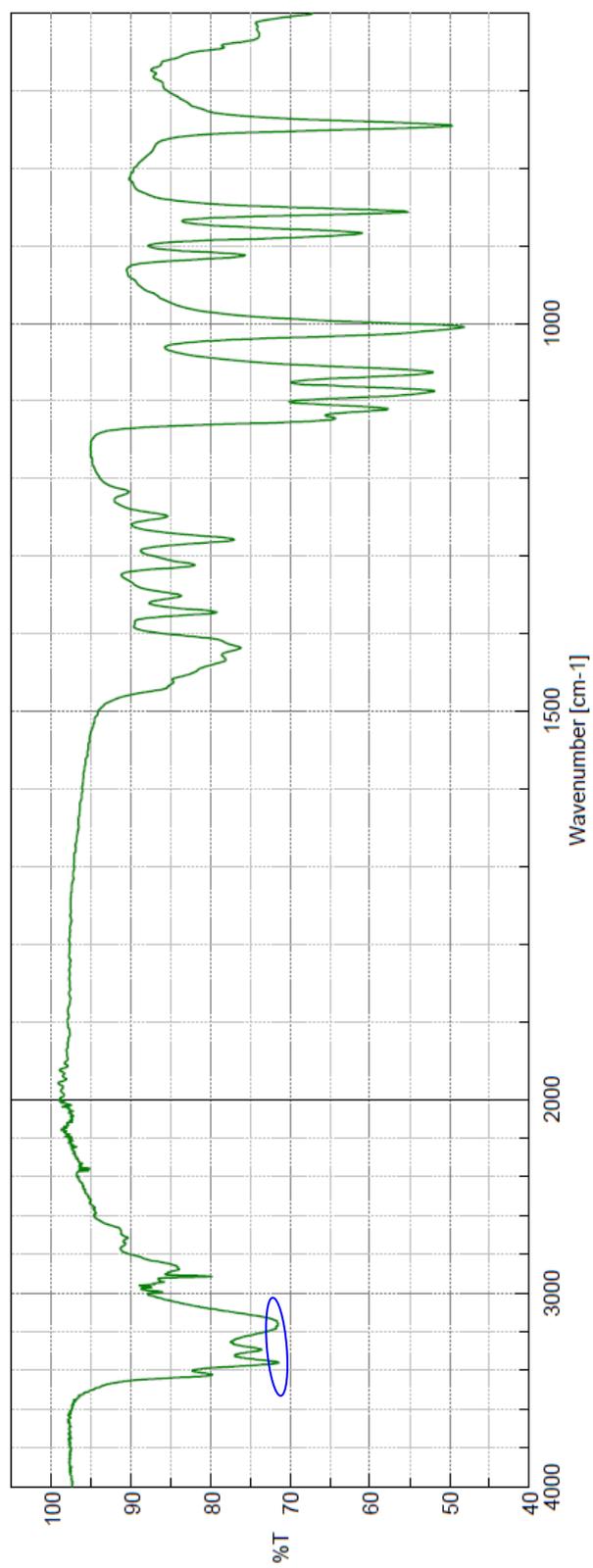


図3.キシリトリール(A社) (乾燥無し：ATR法)

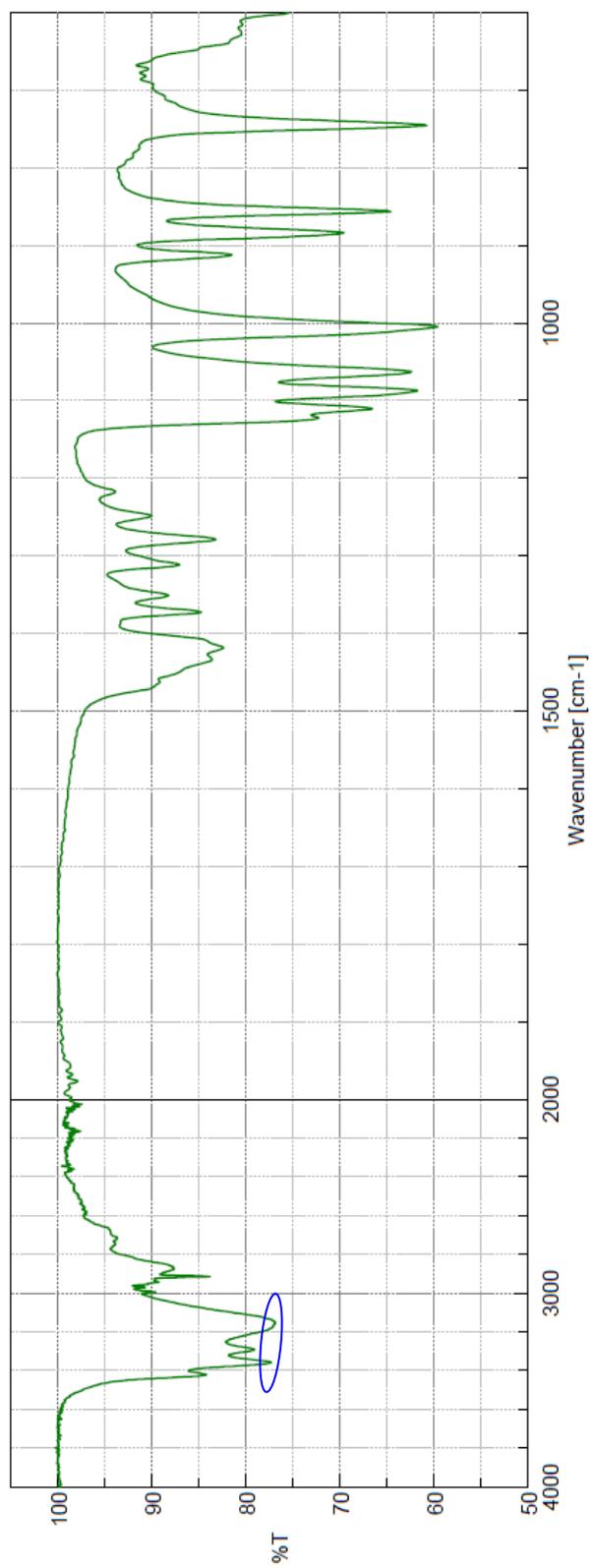


図 4. キシリトール(A社) (減圧乾燥 : ATR 法)

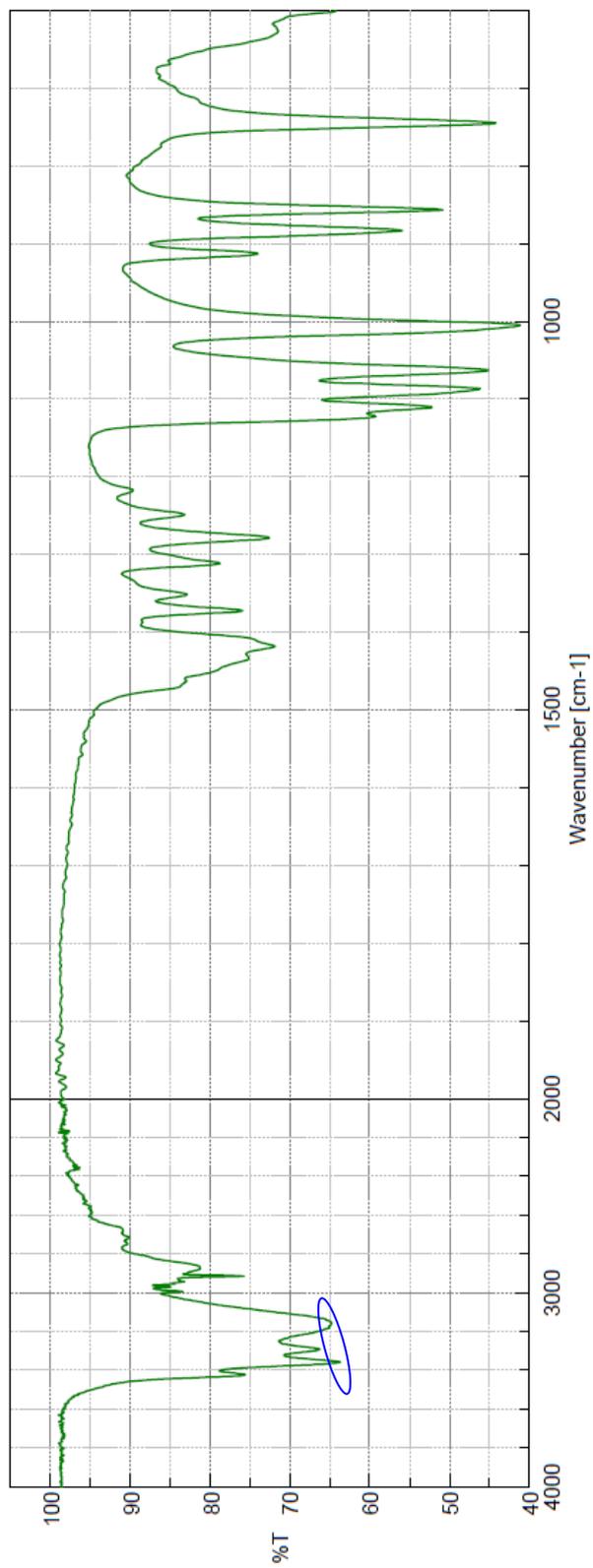


図5.キシリリトール標準品 (乾燥無し：ATR法)

別紙 食品添加物公定書一般試験法 赤外吸収スペクトル測定法 (案)

(下線部は、第9版食品添加物公定書より変更又は追記した部分)

### 赤外吸収スペクトル測定法 (案)

赤外吸収スペクトル測定法は、赤外線を試料に照射して得られる吸収スペクトルにより物質の確認を行う方法である。赤外吸収スペクトルは、通例、横軸に波数 ( $\text{cm}^{-1}$ ) を、縦軸に透過率 (%) 又は吸光度をとったグラフで示される。

#### 装置及び調整法

分散型赤外分光光度計又はフーリエ変換赤外分光光度計を用いる。

あらかじめ分光光度計を調整した後、分解能、透過率の再現性及び波数の再現性が、以下の試験に適合することを確認する。厚さ約0.04mmのポリスチレン膜の吸収スペクトルを測定するとき、得られた吸収スペクトルの $2870\text{cm}^{-1}$ 付近の極小と $2850\text{cm}^{-1}$ 付近の極大における透過率 (%) の差は18%以上である。また、 $1589\text{cm}^{-1}$ 付近の極小と $1583\text{cm}^{-1}$ 付近の極大の透過率 (%) の差は12%以上である。波数目盛りは、通例、ポリスチレン膜の下記の特性吸収波数 ( $\text{cm}^{-1}$ ) のうち、いくつかを用いて補正する。なお、( ) 内の数値は、これらの値の許容範囲を表す。

3060.0 ( $\pm 1.5$ )	2849.5 ( $\pm 1.5$ )	1942.9 ( $\pm 1.5$ )	1601.2 ( $\pm 1.0$ )
1583.0 ( $\pm 1.0$ )	1154.5 ( $\pm 1.0$ )	1028.3 ( $\pm 1.0$ )	

ただし、分散型装置を用いる場合の許容範囲は、 $1601.2\text{cm}^{-1}$ における吸収波数が  $1601.2 \pm 2.0\text{cm}^{-1}$ 、 $1028.3\text{cm}^{-1}$ における吸収波数が  $1028.3 \pm 2.0\text{cm}^{-1}$  の範囲内にあることとする。

透過率及び波数の再現性は、ポリスチレン膜の  $3000 \sim 1000\text{cm}^{-1}$  における数点の吸収を2回繰り返し測定するとき、透過率の差は 0.5%以内とし、波数の差は、 $3000\text{cm}^{-1}$  付近で  $5\text{cm}^{-1}$  以内、 $1000\text{cm}^{-1}$  付近で  $1\text{cm}^{-1}$  以内とする。

#### 測定用試料の調製及び測定

試料は別に規定するもののほか、成分規格・保存基準各条に「乾燥し」とあるときは、乾燥減量の項の条件で乾燥したものをを用いる。測定用試料は最も強い吸収帯（ペースト法における流動パラフィン由来の吸収帯を除く。）の透過率が 5~10%の範囲になるように、次のいずれかの方法によって調製する。窓板は臭化カリウム、塩化ナトリウム等を使用する。対照は、通例、複光束型の装置では補償光路側に置かれて試料と同時に測定され、単光束型の装置では試料と同一光路に置かれて別に測定される。対照のとり方は試料調製法により異なり、測定雰囲気バックグラウンド吸収が用いられることもある。

成分規格・保存基準各条で特に規定されるもののほか、通例、試料の吸収スペクトルは波数  $4000 \sim 600\text{cm}^{-1}$  の範囲で測定する。なお、吸収スペクトルの測定は装置の分解能、波数目盛り及び波数精度の確認を行ったときと同一の操作条件の下で行う。

- (1) 錠剤法 固体試料 1～2 mg をめのう製の乳鉢で粉末とし、これに、別に規定するもののほか、希釈剤として赤外吸収スペクトル測定用臭化カリウム 0.10～0.20 g を加え、湿気を吸わないように注意し、速やかによくすり混ぜた後、錠剤成形器に入れて加圧製錠する。ただし、必要な場合には、0.67kPa 以下の減圧下に錠剤の単位面積 ( $\text{cm}^2$ ) 当たり 50～100kN (5000～10000kg) の圧力を 5～8 分間加えて透明な錠剤を調製する。通例、希釈剤のみを用いて同様にして調製した錠剤を対照として測定する。
- (2) 溶液法 成分規格・保存基準各条に規定する方法で調製した検液を液体用固定セルに注入し、通例、検液の調製に用いた溶媒を対照として測定する。なお、本法に用いる溶媒としては、試料との相互作用又は化学反応がなく、窓板を侵さないものを用いる。固定セルの厚さは、通例、0.1mm 又は 0.5mm とする。
- (3) ペースト法 固体試料 5～10mg をめのう製の乳鉢で粉末とし、別に規定するもののほか、少量の流動パラフィン、通例、1～2 滴を加えてよく練り合わせ、試料ペーストを調製する。調製した試料ペーストを 1 枚の窓板の中心部に薄く広げた後、空気が入らないように注意しながら、別の窓板で挟み、通例、窓板のみを対照として測定する。
- (4) 液膜法 液体試料 1～2 滴を 2 枚の窓板の間に挟み、窓板の間にできた液層を測定する。液層を厚くする必要がある場合には、アルミニウム箔等を 2 枚の窓板の間に挟み、その中に液体試料がたまるようにする。通例、窓板のみを対照として測定する。
- (5) 薄膜法 試料を薄膜のまま、又は成分規格・保存基準各条に規定する方法によって薄膜を調製した後、通例、窓板のみを対照として測定する。
- (6) 気体試料測定法 排気した 5～10cm の長さの光路をもつ気体セルに、試料を別に規定する圧で導入し、通例、気体セルを減圧 (真空) にしたものを対照として測定する。必要に応じて 1 m 以上の光路をもつ長光路セルを用いることもある。
- (7) ATR 法 (減衰全反射)プリズム面に試料を密着させ、その反射スペクトルを測定する。  
通例、プリズムのみを対照として測定する。

#### 確認方法

試料について成分規格・保存基準各条等に規定する測定法で得られた吸収スペクトルを確認しようとする物質の参照スペクトル又は標準品の吸収スペクトルと比較し、同一波数のところに同様の強度の吸収が認められるとき、互いの同一性が確認される。ただし、固体状態で測定された試料の吸収スペクトルが、参照スペクトル又は標準品の吸収スペクトルと異なった場合の取扱いが、成分規格・保存基準各条に規定されているとき、規定された条件で試料又は試料及び標準品を処理した後、再測定する。

二つのスペクトルを比較するとき、通例、試料の吸収スペクトルと参照スペクトルが測定される装置は異なったものであり、それらの分解能には差がある。分散型赤外分光光度計の分解能の差に基づく波数の変動は  $4000\sim 2000\text{cm}^{-1}$  の波数領域で最大となるが、フーリエ変換赤外分光光度計の分解能は、波数によらず一定であるため、その波数精度は、全波数領域において不変である。

成分規格・保存基準各条において赤外吸収スペクトル測定法による確認試験が規定される各品目については、それぞれの各条内に、波数 4000～600cm<sup>-1</sup>における参照スペクトルが掲載されている。ただし、吸収波数による確認法が規定された品目、及び ATR 法による測定が規定された品目を除く。参照スペクトルについての説明は、試薬・試液等の項の 10. 参照赤外吸収スペクトルに掲載されている。ATR 法においては、別に定められた場合を除き、同じ操作条件により得られる標準品の吸収スペクトルとの比較を行う。