



## FT-NIR分光法を用いたビタミンCの定量

### 著者

Gabriela Budinova, PhD, Quintiles  
GesmbH, Czech Republic, Europe  
Ivor Dominak, PhD, NICODOM  
Ltd, Czech Republic, Europe  
Todd Strother, PhD, Thermo Fisher  
Scientific, Madison,  
WI, USA

### イントロダクション

アスコルビン酸（ビタミンC）は、最も人気のある栄養補助食品の1つで、壊血病の予防に使われることで知られています。また、抗酸化作用があることから、免疫力向上にも役立つとされ、その認知度がますます高まっています。そして、アスコルビン酸は、缶詰や冷凍果物の褐変を防ぐために食品産業で広く使用されています。さらに、プラスチック製造では、重合プロセスの補助や化学処理水中のヨウ素を中和するために使用されることもあります。

従来、アスコルビン酸は、充填剤や結合剤として機能するデンプンなどの賦形剤と混合して利用され、流動特性を高める効果もあります。このような混合物中のアスコルビン酸の分析および定量は、複雑な滴定や抽出と蛍光測定を組み合わせる必要があり、時間がかかるものでした。これらの方法は、複雑な装置や腐食性または毒性のある化学物質の利用、あるいはトレーニングを受けた分析者による操作を必要とします。

フーリエ変換近赤外分光法（FT-NIR）は、よりシンプルで迅速なアスコルビン酸の分析法であり、従来の技術に伴う欠点を回避し、高精度かつ信頼性の高いデータを提供します。近赤外分光法は、可視領域と赤外領域の間の波長（約4,000～10,000  $\text{cm}^{-1}$ ）を利用した分光分析法です。ほぼ全ての複雑な有機分子は、この領域に特徴的な振動倍音と結合音を示します。近赤外アナライザーの光源エネルギーは、試料と相互作用して、これらの特徴的な分子振動に対して吸収され、スペクトルとして表示されます。

FT-NIRは分光分析技術の中でもユニークな分析法で、多くの場合、サンプリングが不要で、混合物の複数の成分を定量的に測定できるため、熟練した操作は不要です。本アプリケーションノートでは、Thermo Scientific™ Antaris™ II 近赤外アナライザーを使用して、デンプン中のアスコルビン酸混合物を測定しました。

## 実験

アスコルビン酸とデンプン (Sigma-Aldrich社、St.Louis、Missouri) を混合して10種類の検量線作成用スタンダードサンプルを作製しました。表1は、スタンダード (検量線作成用) の混合物および、バリデーション (検量線検証用) の混合物の構成です。サンプルをガラスバイアル瓶に入れ、Thermo Scientific™ SabIR™ 拡散反射ファイバープローブを用いて瓶の底面から測定しました (図1)。各サンプルは4,000~10,000 cm<sup>-1</sup>の近赤外領域において、8 cm<sup>-1</sup>の分解能で110回のスキャンを行い、それぞれ3回測定しました。また、各測定の前に、サンプルの均一性を確保するためにボトルの中身を混合しました。各サンプルの3回の測定値を平均化し、ケモメトリックモデル (多変量解析) で合成スペクトルとして利用しました。典型的な混合物のスペクトルを図2に示します。

サンプル	アスコルビン酸 (mg/g)	
	スタンダード	バリデーション
1	53.30	
2	100.90	100.90
3	149.40	150.10
4	199.75	200.45
5	249.75	249.95
6	299.65	300.05
7	349.60	350.05
8	397.05	400.20
9	449.95	450.25
10	500.00	

表1. 材料1 gあたりのアスコルビン酸の量を示すサンプル調製

ケモメトリックモデルを作成するために、スタンダードを調製し、モデルの定量予測能力を検証するために、バリデーションサンプルを別途調製しました。



図1. SabIR Probeを搭載したAntaris MDSアナライザー  
サンプルはガラスバイアル瓶に入れ、SabIR プローブを使用して瓶の底面から光を当てて測定しました。

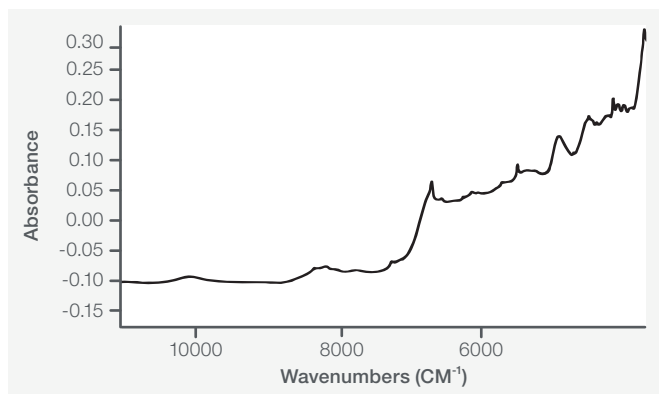


図2. スタンダードとして使用したアスコルビン酸-デンプン混合物の代表的なスペクトル

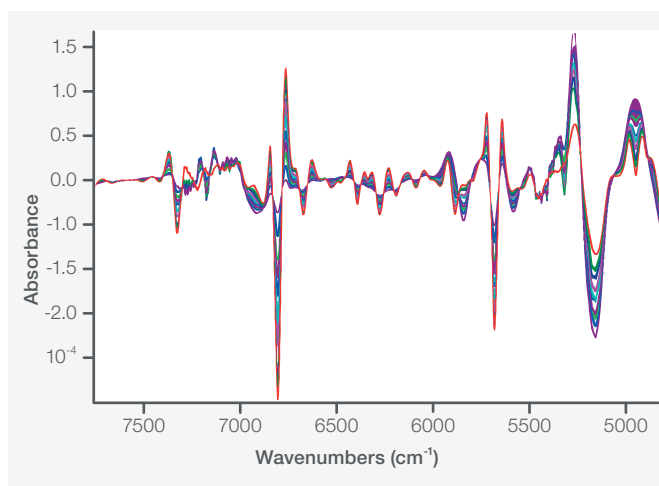


図3. ケモメトリックモデル構築に使用したスタンダードの二次微分スペクトル

4,800~7,600 cm<sup>-1</sup>の範囲で、スタンダード間の濃度変化が明確に表れています。

## ケモメトリックスによる定量

Thermo Scientific™ TQ Analyst™ ソフトウェアを使用して、二次微分スペクトルのキャリブレーションに部分最小二乗 (PLS) 回帰モデルを使用しました。4,800~7,600 cm<sup>-1</sup> (図3) の領域に対して、多重散乱補正 (MSC) 光路長オプションを使用しました。予測残差平方和 (PRESS) プロットから、これらのパラメータを用いたキャリブレーション (検量線作成) には1つの因子が必要であることが示唆されました。このモデルの相関係数は0.99841、キャリブレーションの二乗平均平方根誤差 (RMSEC) は8.05であることがわかりました。クロスバリデーション解析の結果、相関係数は0.99692、クロスバリデーションの二乗平均平方根誤差 (RMSECV) は11.4となりました。

次にバリデーション用混合物を使用して、アスコルビン酸の比率を予測するとともに、開発したケモメトリックモデルを検証しました。オリジナルのキャリブレーションブレンドと同様の方法で、8つの新しいサンプルを調製しました。これらの新しいサンプルを、近赤外アナライザーで測定し、TQ Analystソフトウェアで作成したモデルで計算したところ、予測値の二乗平均平方根誤差 (RMSEP) は11.2であることが判明しました。図4は、キャリブレーション用標準試料 (○) とバリデーション用試験試料 (+) の検量線と残差プロットを示し、開発したケモメトリックモデルの適合度を表しています。

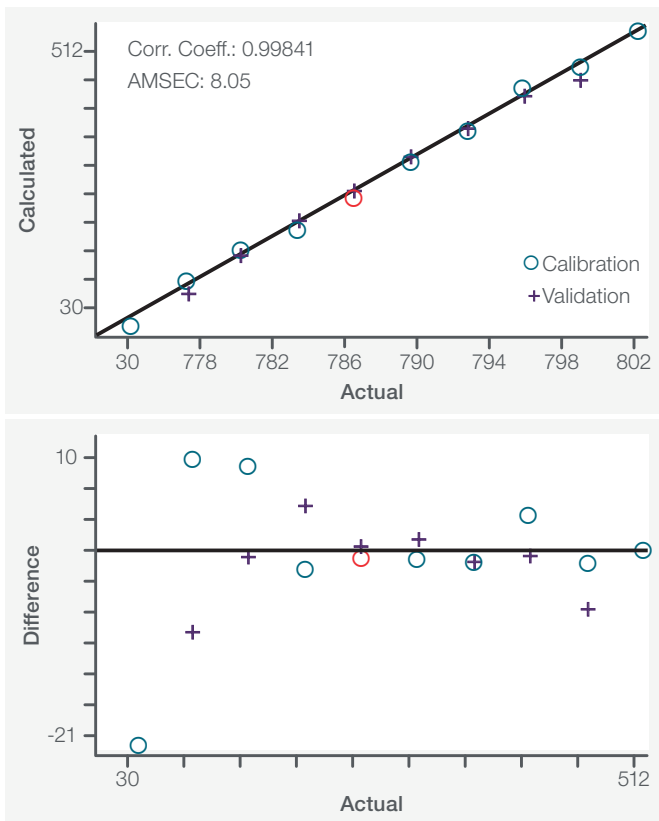


図4. ケモメトリックモデルの優れた性能を示すキャリブレーションプロット(上)および残差プロット(下)

スタンダード試料 (○) は、モデルの開発とキャリブレーションに使用されました。またバリデーション試料 (+) は開発したモデルの検証に用いられました。

### まとめ

FT-NIRを用いて、アスコルビン酸-デンプン混合物の正確な分析に成功しました。デンプン中のアスコルビン酸において、53~500 mg/gの範囲の校正用スタンダードを使用して、PLSケモメトリック分析モデルを開発しました。このモデルは、高い相関係数と小さな誤差で優れた統計的結果をもたらし、さらに、このケモメトリックモデルを用いて検証サンプルを分析(バリデーション)したところ、デンプンマトリックス中のアスコルビン酸の濃度を決定する際に高い予測性を持つことが示されました。

詳細はこちらをご覧ください [thermofisher.com/nirfood](https://thermofisher.com/nirfood)

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。  
 © 2023 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.  
 All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.  
 実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。  
 価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。  
 標準販売条件はこちらをご覧ください。 [thermofisher.com/jp-tc](https://thermofisher.com/jp-tc) FTIR204-A2309OB

### サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

thermofisher.com