
トピックス

還元型酸化グラフェンをセンサーとした新たなビタミン C 定量法の開発**Development of a novel vitamin C quantification method using reduced graphene oxide as a sensor**

ビタミン C (VC) は、水溶性ビタミンのひとつであり、抗酸化作用¹⁾、コラーゲン合成の促進作用²⁾、鉄イオン吸収促進作用³⁾など多様な作用を示す健康維持に欠かせない物質である。しかし、我々は L-グルクロン酸を酸化してアスコルビン酸を生成するための酵素である L-グルクロン酸オキシダーゼを欠損しているため VC を合成することができず⁴⁾、VC を食品から摂取しなければならない。VC の欠乏は、壊血病、貧血、神経障害などを引き起こすことが知られている⁵⁾。そのため、食品から VC の継続的な摂取は我々の健康維持に不可欠であり、食品サンプル中の VC 量の測定法は大きな注目を集めている。これまでに、様々な VC 量の測定法が開発されてきた。例えば 1940 年代に Roe らによって、VC の比色定量法として 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法が報告されている⁶⁾⁷⁾。この定量法は、酸化型 VC と 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの反応により生じたオキサゾンの特異的な吸光度を測定し、VC 量を定量する方法である。また、HPLC を用いた VC の定量法が開発されており、これらは VC を直接分析する方法と誘導体化して分析する方法の大きく 2 つに分けられる。VC を直接分析する方法では、Fontannaz らによって開発された HPLC 法がある⁸⁾。これは、還元剤入りの酸性抽出液で抽出したサンプルをイオンペアクロマトグラフィーに供し、分離された VC を UV 検出することで、食品中の VC 量を測定する方法である。VC を誘導体化して分析する方法では、Vanderslice らによって開発された HPLC 法がある⁹⁾。これは、食品中の VC をメタリン酸で抽出し、そこに *o*-フェニレンジアミンを反応させ、それにより生じた蛍光キノキサリン誘導体を HPLC で分離、蛍光検出を行う。この分析方法は、食品中の VC 量を蛍光検出することでより高感度に測定できる。これまでに述べた方法以外にも、酸化還元滴定を利用して VC を定量する方法もある¹⁰⁾¹¹⁾。近年では、電気化学的方法のひとつであるアンペロメトリック法を用いた VC の定量が注目されている。アンペロメトリック法では、分析物

が電極表面で酸化または還元されることで生じる電流を測定する。この電流の大きさは反応に関与する物質の濃度に比例するため、アンペロメトリック法はそれを測定することで分析物を定量できる方法である。そして、分析物を測定するためによく用いられている電極は、グラファイト電極、金電極、プラチナ電極などが挙げられる。また 2010 年以降では、還元型酸化グラフェン (RGO) を電極として用いた研究が多数行われている。RGO は酸化グラフェンを還元することによって得られ、高い導電性、安定性、応用性などの様々な利点を有している。本稿では、新たな VC 量の測定方法としてその RGO を電極としたアンペロメトリック法に関する報告を紹介する¹²⁾。

RGO を電極としたアンペロメトリック法を開発するにあたり、RGO 電極とグラファイト電極を用いたサイクリックボルタンメトリーにおける VC の電気化学的挙動が調査された。その結果、RGO 電極はグラファイト電極に比べて 2 倍の電流増加がみられた。これは、RGO 電極が VC の酸化に対して高感度な電極触媒としての効果を有することを示唆している。また、多サンプルの迅速分析を目指して、サンプル注入やデータ処理の自動化が可能であるフローインジェクション分析 (FIA) 法も検討された。つまり、RGO をセンサーとしたアンペロメトリック法 (高感度で定量が可能な電気化学的方法) と FIA 法 (簡便で連続分析が可能である方法) を組み合わせることにより、高感度かつ迅速な VC 量の測定ができると考えられた。

まず、アンペロメトリック-FIA 法におけるアンペロメトリック法部分の測定条件が検討された。広域緩衝液である Britton-Robinson buffer を用いて pH 2.0 ~ 10.0 の範囲でサイクリックボルタンメトリーによる VC の酸化に対する pH の影響が調査された。その結果、分析信号は pH 2.0 ~ 7.0 の範囲では一定で高い値を示し、pH 8.0 ~ 10.0 の範囲での分析信号は低い値を示した。また、pH に依存して酸化電位のシフトが生じており、pH 7.0 付近で一定のピーク電位を示したことから、測

表 各食品サンプル中の VC 量の測定結果

| サンプル | アンペロメトリック-FIA (mg/L) | UFLC (mg/L) |
|------------|----------------------|--------------|
| 発酵乳 | 17.3 ± 0.9 | 15.8 ± 0.8 |
| チョコレートミルク① | 45.5 ± 1.3 | 40.0 ± 3.1 |
| チョコレートミルク② | 86.8 ± 2.0 | 88.3 ± 4.4 |
| チョコレートミルク③ | 29.4 ± 0.3 | 27.7 ± 2.5 |
| チョコレートミルク④ | 34.1 ± 0.3 | 28.0 ± 4.8 |
| チョコレートミルク⑤ | 11.4 ± 0.2 | 9.4 ± 1.2 |
| ミルク① | 60.3 ± 5.5 | 60.7 ± 0.7 |
| ミルク② | 56.3 ± 1.1 | 50.2 ± 3.6 |
| ミルク③ | 42.1 ± 2.4 | 43.0 ± 8.1 |
| マルチビタミン① | 341.7 ± 6.1 | 357.8 ± 11.2 |
| マルチビタミン② | 445.6 ± 14.4 | 470.1 ± 6.7 |

定における pH は 7.0 に決定された。次に、VC の酸化電位が 0.0 ~ 0.8 V の範囲で調査された。分析信号は 0 ~ 0.3 V にかけて増加し、0.4 V でピークとなりそれ以降の電位では精度が低下したため、酸化電位は 0.4 V に決定された。続いてアンペロメトリック-FIA 法における FIA 法部分の流速最適化のために 1.0 ~ 2.6 mL/min の流速が検討された。その結果、分析信号は 1.0 ~ 1.8 mL/min の範囲にかけて増加していたが、1.8 mL/min 以降において分析応答の著しい向上が見られなかった。よって、流速は 1.8 mL/min となった。最後に、FIA 法部分のサンプル添加量の検討が 50 ~ 200 μ L の範囲で行われた。その結果、分析信号は 50 ~ 150 μ L まで添加量依存的に増加し、150 μ L をピークにそれ以上では低下した。さらに、サンプル添加量 150 μ L 以上では分析精度も低下した。そこで、適切な分析信号と十分な再現性が得られる 100 μ L のサンプル添加量が選択された。以上の結果から、アンペロメトリック-FIA 法を用いた測定における条件は pH 7.0、酸化電位 0.4 V、流速 1.8 mL/min、サンプル添加量 100 μ L となった。これらの条件をもとに、20 μ M と 40 μ M の 2 つの濃度の VC 標準液を用いてアンペロメトリック-FIA 法の再現性 (n = 10) の調査が行われた。その結果、それぞれの相対標準偏差は 5% と 7% であり、連続した VC の添加後も RGO 電極表面の汚染がなく、測定の精度が十分であることが示唆された。また、検出限界及び定量限界は、それぞれ 4.7 μ M と 10 μ M であった。次に、開発された方法の精度を評価するため、マルチビタミン飲料、牛乳、発酵乳、チョコレートミルクの各サンプルに 30 μ M の VC 標準液を添加し、それらの回収率が調査された。その結果、各サンプルにおける VC の回収率は 90~110% の範囲内に収まることが分かった。

これは、本分析法が食品サンプル中の他の物質の影響を受けないことを示唆している。さらに、アンペロメトリック-FIA 法は 1 時間当たり約 96 回という高頻度での分析を実現した。よって、アンペロメトリック-FIA 法は食品サンプル中の VC 量を迅速に測定することが可能であることを示している。

最後に、アンペロメトリック-FIA 法と一般的な VC 定量法のひとつである超高速液体クロマトグラフィー (UFLC) 法によって食品サンプル中の VC を定量して、その VC 量を比較ことにより、アンペロメトリック-FIA 法が食品サンプル中の VC を十分な精度で定量可能かどうか調査された。分析に用いた食品サンプルは発酵乳、チョコレートミルク、ミルク、マルチビタミンである。チョコレートミルク、ミルク、マルチビタミンは複数の製品サンプルを用いており、チョコレートミルク (①~⑤)、ミルク (①~③)、マルチビタミン (①, ②) と表されている。この時使用したアンペロメトリック-FIA 法の検量線の濃度範囲は 10 μ M から 80 μ M であった。それぞれの食品サンプルの分析結果は表の通りである。表より、アンペロメトリック-FIA 法と UFLC 法の測定結果に有意な差は認められなかったため、アンペロメトリック-FIA 法は UFLC 法と同等の精度を示すと考えられた。つまり、アンペロメトリック-FIA 法は UFLC 法に変わる新たな VC 定量法になると考えられた。また、今回用いた UFLC 法では、測定までに塩酸の添加、抽出、洗浄、pH 調製、フィルターろ過、希釈といった様々な操作を経て測定するのに対し、アンペロメトリック-FIA 法は、サンプル注入やデータ処理などをシステムによって自動化されているため、サンプル希釈を行うだけで測定が可能であった。これらのことから、アンペロメトリック-FIA

法は UFLC 法と同等の精度を持ちながら、測定が迅速かつ簡便な定量法であることが明らかとなった。以上のことから、アンペロメトリック-FIA 法は日常的に行われる食品サンプル中の VC の分析に適していると考えられる。

現在までに様々な VC 定量法が開発されてきた。今回開発された RGO をセンサーとしたアンペロメトリック-FIA 法は、試薬調製の簡易性、多サンプルの自動連続分析、高感度、低コストといった様々な利点を有しており、その信頼性も証明されている。したがって、この方法は、食品サンプル中に含まれる VC の品質管理のための分析ツールとして有用であり、健康維持に注視される社会において大いに役立つと考えられる。

Key words: vitamin C, quantification, reduced graphene oxide, flow injection analysis, food samples

¹Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Tokushima University, 770-8513, Japan

²Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University, 770-8513, Japan

Yugo Ito¹, Takeru Koga², Akihiro Tai²

¹ 徳島大学大学院創成科学研究科

² 徳島大学大学院社会産業理工学研究部

伊藤 勇悟¹, 古賀 武尊², 田井 章博²

(2025.2.3 受付)

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- 1) Rose RC, Bode AM (1993) Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J* **7**, 1135–1142
- 2) Tajima S, Pinnell SR (1982) Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. Ascorbic acid increases type I procollagen mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **106**, 632–637
- 3) Sayers MH, Lynch SR, Jacobs P, Charlton RW, Bothwell TH, Walker RB, Mayet F (1973) The effects of ascorbic acid supplementation on the absorption of iron in maize, wheat and soya. *Br J Haematol* **24**, 209–218
- 4) Packer L, Fuchs J (1997) Vitamin C in Health and Disease. Marcel Dekker, Inc., NY, USA
- 5) Chambial S, Dwivedi S, Shukla KK, John PJ, Sharma P (2013) Vitamin C in disease prevention and cure: an overview. *Indian J Clin Biochem* **28**, 314–328
- 6) Roe JH, Kuether CA (1943) The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* **147**, 399–407
- 7) Roe JH, Mills MB, Oesterling J, Damron CM (1948) The determination of diketo-*l*-gulonic acid, dehydro-*l*-ascorbic acid, and *l*-ascorbic acid in the same tissue extract by the 2,4-dinitrophenylhydrazine method. *J Biol Chem* **174**, 201–208
- 8) Fontannaz P, Kilinc T, Heudi O (2005) HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chem* **94**, 626–631
- 9) Vanderslice JT, Higgs DJ (1993) Quantitative determination of ascorbic, dehydroascorbic, isoascorbic, and dehydroisoascorbic acids by HPLC in foods and other matrices. *J Nutr Biochem* **4**, 184–190
- 10) 平岡栄一 (1957) ミネラルを含むビタミン製剤中のビタミン C 定量法. *ビタミン* **12**, 272–275
- 11) Srinivasan M (1937) The enzymic determination of ascorbic acid. *Biochem J* **31**, 1524–1529
- 12) de Faria LV, Lisboa TP, de Farias DM, Araujo FM, Machado MM, de Sousa RA, Matos MAC, Muñoz RAA, Matos RC (2020) Direct analysis of ascorbic acid in food beverage samples by flow injection analysis using reduced graphene oxide sensor. *Food Chem* **319**, 126509