

Hakuryo methodにおける可能性の検討

函館大学附属柏稜高等学校 理科研究部
Hakodate Univ. HAKURYO High School Science Club

3年 木戸 博哉 齋藤 稔之
大江 拓人 星澤 翼
磯谷 詩音



【はじめに】

柏稜高校理科研究部は、2011年より身近な食品や飲料中に含まれるビタミン B₂ (リボフラビン C₁₇H₂₀N₄O₆) の定量法について検討している。その中で薄層クロマトグラフィー (TLC) とオープンソース (ImageJ) を用いるオリジナル定量法「Hakuryo method」を確立させることに成功した^{1,2)}。さらに昨年度は「Hakuryo method」をより一般的で万能な方法に発展させるため、安価で製作が容易なオリジナル定量装置の開発に着手した。その結果、カメラと UV ランプを除けば 3000 円程の製作費で、125 ng/5 μL 以下の低濃度試料においても感知する装置を完成させることができた³⁾。

本研究では「Hakuryo method」のさらなる可能性を探るため、このオリジナル定量装置の測定範囲を明らかにし、さらに標準添加法を用いることで市販飲料 (アリナミン V) におけるビタミン B₂ の含有量測定を試みた。

【ビタミン B₂ (リボフラビン C₁₇H₂₀N₄O₆)】

ビタミン B₂ はリボフラビンと呼ばれ、橙黄色の結晶として得られる化合物である。水溶性ビタミンに分類される生理活性物質で、正常な皮膚や粘膜の成長に必要な栄養素である。また、紫外線を照射すると蛍光を示す (図 1)。



図 1. リボフラビンの蛍光

【薄層クロマトグラフィー (TLC)】

薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography : TLC) は、ガラスやアルミニウムシートにシリカゲルを薄く塗布したプレートを用いて行うクロマトグラフィーである。試料をスポットし、プレート下部を展開溶媒に浸すことで、シリカゲルへの吸着能の差により混合物を分離同定する方法である。

【ImageJ】

アメリカ国立衛生研究所 (NIH) で開発されたオープンソースでパブリックドメインの画像処理ソフトウェアである。<http://imagej.nih.gov/ij/>よりダウンロードすることができる。画像処理及び解析機能が豊富であり、主に医用や生化学の分野で活用されている。

【Hakuryo method について (2011~2013)】

①ビタミン B₂ を TLC で展開

アセトン : メタノール = 1 : 1 の混合溶液で展開し、ビタミン B₂ を分離させる。

②スポットの蛍光を画像記録

紫外線監視器を改造し、UV 照射によりスポットの蛍光をカメラで記録できるようにした。

③ImageJ での画像解析

得られた画像データを ImageJ でグレースケール、画像調整後、グレー値を解析した。

④ビタミン B₂ 標準検量線の作成 (25~100 mg/L)

リボフラビン標準溶液 (溶媒:水) を 3 種類 (25、50、100 mg/L) に希釈し、キャピラリーで 5 μL ずつ TLC にスポットし展開した (リボフラビン含有量は 125、250、500 ng/5 μL)。得られた結果をグラフ化し、それを標準検量線とした (決定係数 R²=0.9998)。

⑤検量線の精度を市販飲料（アリナミンV）で検証

アリナミンVを試料とし（32、40、80 mg/L）、TLCを行い、その結果を標準検量線上にプロットした（図2）。合わせて近似直線 $y=0.1043x+167.45$ に $x=32、40、80$ を代入することで理論値を算出し、解析値と比較した。32、40、80 mg/LのAVE（ $n=10$ ）に関するCV（変動係数）は、全て0.03%以内という極めて小さい値が得られその有効性が確かめられた。

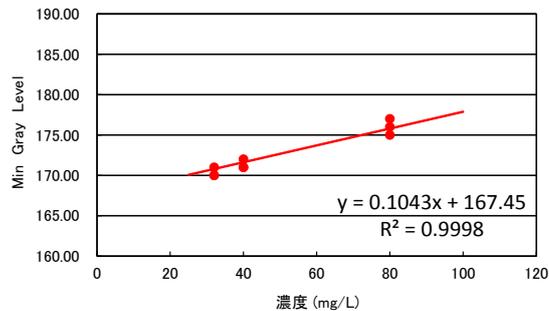


図2. 標準検量線とアリナミンVのMin Gray Level ($n=10$) (リボフラビン濃度 32, 40, 80 mg/L)

⑥オリジナル定量装置の開発

改造した紫外線鑑別器を用いた場合、測定範囲が25~100 mg/Lとリボフラビン濃度としては高領域に限定されるといった課題があった。そのため、低濃度試料の測定が可能で、かつ安価で製作が容易なオリジナル定量装置を開発した（図3, 4）。

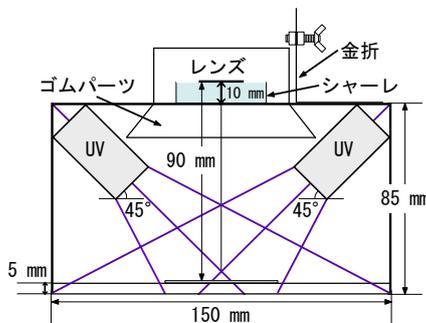


図3. オリジナル定量装置内の構造



図4. オリジナル定量装置

【実験方法】

実験Ⅰ ビタミンB2標準検量線の作成

新たに作成したオリジナル定量装置の測定範囲を確認するため標準検量線を作成した。

- ①リボフラビン標準溶液を2、5、10、50 mg/Lの4種類に希釈し、試料とした。
- ②アセトン:メタノール=1:1の混合溶液を展開溶媒とし、展開槽として用いたデシケーターの底から約5 mmの高さになるように入れ、内部を展開溶媒の蒸気で飽和させた状態にした。TLCプレートの端から15 mmの位置に鉛筆で薄く線を引き、原点とした。原点に各濃度のリボフラビン標準溶液をキャピラリーで5 μ Lずつスポットした（リボフラビン含有量は10、25、50、250 ng/5 μ L）。
- ③オリジナル定量装置を用いてUV照射、画像記録をした。ImageJによって画像ファイルを開き、グレースケールに変換する。その後、Image>Adjust>Thresholdで画像調整し、スポットのグレー値を同条件で解析できるように環境を整え、スポット選択後Analyze>Measureで測定した。昨年度の研究結果より、この定量装置において最も有効なMean Gray Value（選択枠内の平均グレー値）を解析した。

実験Ⅱ 標準添加法を用いた市販飲料（アリナミンV）の定量

市販飲料（アリナミンV）を試料とし、そのビタミンB2含有量を標準添加法によって測定した。アリナミンV中に含まれる成分は多様であり、ビタミンB2以外の成分が測定に影響を与えることが考えられる。そのため、影響を消去する方法として優れている標準添加法を用いた。そこで、アリナミンVに表記されている含有量をもとに8 mg/Lに希釈し、1、2、5、10 mg/Lのリボフラビン標準溶液を添加した。添加しないものを含め5種類の試料を実験Ⅰ②~③と同様の手順でMean Gray Valueを解析した。

【実験結果】

実験Ⅰ ビタミンB2標準検量線の作成

各濃度におけるMean Gray Valueを10回測定し、その平均値をMean AVEとして示した（表1）。また、表にはSD:標準偏差、CV:変動係数の計算結果も合わせて示した。Mean AVEに関するCVが全て1.8%以内という安定したデータが得られた。また、その値を用いて標準検量線を作成し、検量線と解析値のあてはまりの良さを示す決定係数 R^2 を求めたところ0.9909と良好な結果が得られた（図5）。

表1. リボフラビンのMean Gray Value ($n=10$) (2, 5, 10, 50 mg/L)

標準 (mg/L)	2	5	10	50
Mean AVE	169.22	175.12	178.60	207.83
SD	0.97	3.00	2.42	0.71
CV (%)	0.57	1.71	1.35	0.34

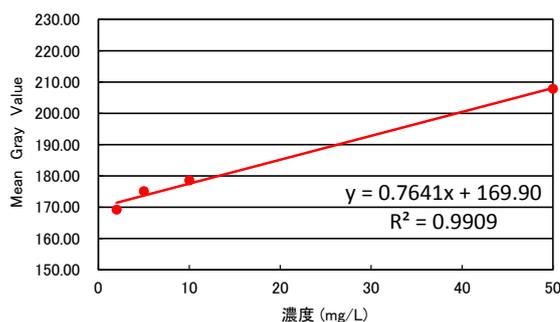


図5. ビタミンB2標準検量線 ($n=10$) (2, 5, 10, 50 mg/L)

実験Ⅱ 標準添加法を用いた市販飲料（アリナミンV）の定量

実験Ⅰと同様に10回測定し、その平均値を Mean AVE とした（表2）。Mean AVE に関する CV は、全て 2.5% 以内に収まっているため他成分の影響は少ないと判断できる。さらに、検量線を作成したが、 $R^2=0.9969$ と良好な直線であることを示している（図6）。

表2. リボフラビンを添加したアリナミンVの Mean Gray Value (n=10) (添加濃度 0, 1, 2, 5, 10 mg/L)

添加 (mg/L)	0	1	2	5	10
Mean AVE	182.37	183.90	185.17	189.52	195.25
SD	4.11	4.50	1.21	2.24	0.95
CV (%)	2.25	2.45	0.65	1.18	0.49

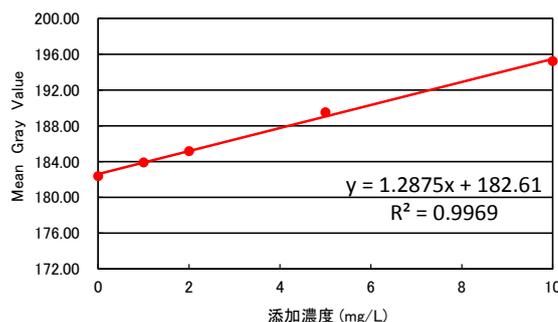


図6. 標準添加法による検量線 (n=10) (添加濃度 0, 1, 2, 5, 10 mg/L)

【考察】

実験Ⅰの結果から、定量装置の開発により限界測定値は以前の 125 ng/5 μ L から 10 ng/5 μ L となり、低濃度測定域が大幅に広がった。これにより、現在までできなかった一般的な食品や飲料の測定が可能になったと考えられる。しかしながら、大部分の身近な食品や飲料中に含まれるビタミン B₂ の含有量は 10 ng/5 μ L 以下であることも想定されるため、ImageJ の画像調整や測定方法を工夫することでさらに低濃度領域を広げる必要がある。

また、実験Ⅰで得られた線形近似関数 $y=0.7641x+169.90$ を用いてブランク (0 mg/L のベース) を算出すると 169.90 となり、そこからアリナミンVに含まれるビタミン B₂ を定量化することが可能になる。標準添加法によって得られた線形近似関数 $y=1.2875x+182.61$ に $y=169.90$ を代入し、x の絶対値を求めれば $|x|=9.87$ mg/L となり、市販飲料におけるビタミン B₂ の定量化に成功した（図7）。算出した値とアリナミンVに表記されている値を比較すると+23%の開きがあるが、厚生労働省や消費者庁が定める栄養表示基準によれば、高速液体クロマトグラフ法またはルミフラビン法で分析した場合においても-20~+80%が許容範囲と認められている⁴⁾。よって、今後さらに溶液調整の際の操作誤差等を無くしていく必要はあるが、Hakuryo method と標準添加法を用いることでビタミン B₂ の定量化が可能であることを実証できたといえる。

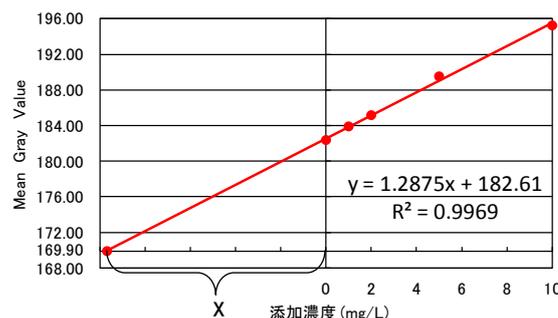


図7. 標準添加法による検量線 (n=10) (添加濃度 0, 1, 2, 5, 10 mg/L)

【結論と展望】

オリジナル定量装置の開発により、限界測定値が 10 ng/5 μ L となり、低濃度測定領域が大幅に広がった。さらに、Hakuryo method と標準添加法を用いることで市販飲料における含有量測定に成功し、高校実験室におけるビタミン B₂ の定量化について可能性を広げることができた。今後は、Hakuryo method によりフィットする ImageJ の使用方法を調査し、多くの身近な食品や飲料中に含まれるビタミン B₂ の定量化を実現させたいと考えている。

【参考文献】

1. 第50回全道高等学校理科研究発表大会 (2011) TLC とオープンソースを用いたビタミン B₂ の定量化
2. 第51回全道高等学校理科研究発表大会 (2012) ビタミン B₂ 定量法の検討 -Hakuryo method の確立-
3. 第52回全道高等学校理科研究発表大会 (2013) Hakuryo method におけるビタミン B₂ 定量装置の開発
4. 栄養表示基準 (消費者庁のページ) <http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin1098.pdf>
5. 及川 剛司 (2005) Umu 試験における Plasmid pSK1002 数と β -Galactosidase 活性
6. 長島 弘三 富田 功 (1985) 分析化学[改訂版], 裳華房
7. 綿抜 邦彦 (2003) 分析化学[新訂版], サイエンス社
8. 科学技術庁資源調査会編 (2000) 五訂 日本食品標準成分表

【受賞にあたって】

この度は日本化学会北海道支部奨励賞という名誉ある賞を頂くことができ、部員一同大変嬉しく思っております。今後もこの受賞を励みに、なお一層研究に邁進していきたいと考えております。有難うございました。