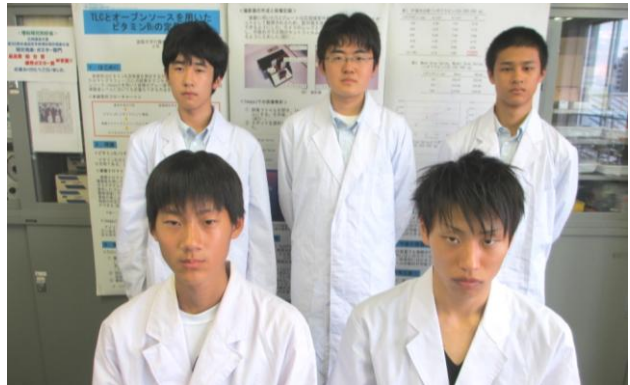


# ビタミン B<sub>2</sub> 定量法の検討

— Hakuryo method の確立 —

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 市原 裕也  
1年 木戸 博哉 齋藤 稔之  
大江 拓人 星澤 翼



## 【はじめに】

柏稜高校理科研究部は、身近な食品や飲料が研究の対象にならないかと考え、食品成分分析について文献を調べた。その過程で、紫外線を照射すると蛍光を示すという特殊な性質を持つビタミン B<sub>2</sub> (リボフラビン C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) の存在を知り、興味を持った。ビタミン B<sub>2</sub> 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り、その構造はイソアロキサジン核の 10 位の N にリビトールが結合したものである (図 1)。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・粘膜・成長に必要となる栄養素である。発育ビタミンや美容ビタミンともいわれ、体内のエネルギー代謝に関与している物質であり、私達が口にしている様々な食品に含まれていることがわかった。その後、身近な食品や飲料中にビタミン B<sub>2</sub> がどれだけ含まれているか調査できないかと考えたが、高校実験室レベルにおいてその手段が無いため定量法の検討を始めた。

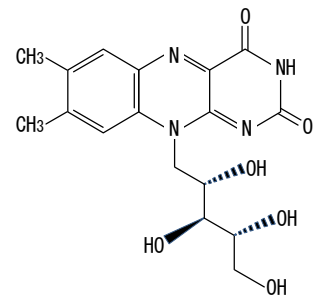
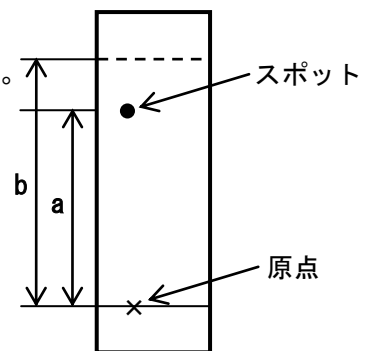


図 1. リボフラビンの構造式

そこで本研究部が着目したのは薄層クロマトグラフィー (TLC) とオープンソース (ImageJ) である。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。試料をスポットし展開溶媒に下部を浸すことで、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。物質の同定は移動率 (rate of flow) R<sub>f</sub> 値で行い、以下のように求めることができる (図 2)。



$$R_f \text{ 値} = \frac{a(\text{原点から試料スポットまでの距離}) \text{ cm}}{b(\text{原点から溶媒前線までの距離}) \text{ cm}}$$

図 2. TLC の a, b について

また、ImageJ は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画像加工に加えて RGB 分解や 2 値化後、様々な画像解析ができる。主に、医用や生化学の分野で活用されている。http://imagej.nih.gov/ij/よりダウンロードすることができる。

本研究部は昨年度、TLC と ImageJ を用いた方法で 125~500 ng の範囲におけるビタミン B<sub>2</sub> 標準検量線を得ることに成功した<sup>1)</sup>。本研究では、成分が表記されている飲料を試料として用いた実験を行うことで、この検量線の精度を再検証し、高校実験室レベルにおいても可能な食品及び飲料に含まれるビタミン B<sub>2</sub> 定量法 (Hakuryo method) の確立を目指した。

## 【実験方法】

### I. ビタミン B<sub>2</sub> 標準検量線の作成

標準検量線の作成は、昨年度発表した TLC とオープンソース (ImageJ) のグレー値を用いる方法で行った。

- (1) アセトン:メタノール=1:1 の混合溶液を展開溶媒とし TLC を行った。展開槽として用いたデシケーターの内部は、展開溶媒の蒸気で十分に飽和させた。
- (2) 実験に用いた TLC プレートは広領域紫外線 (λ=250~400 nm) の照射により、有色スポットとして観測されるため、紫外線監視器を改造しデジタルカメラで撮影できるようにした。さらに市販のガラス用 UV カットフィルムを用いてクリアな画像が得られるように工夫した。TLC の展開終了後、暗幕で覆い外光の影響を受けない環境で速やかに撮影を行った。その後、TLC プレートの a, b cm を測定し、R<sub>f</sub> 値を求めた。

(3) ImageJで撮影した画像ファイルをグレースケールにした後(図3)、Image>Adjust>Thresholdで画像調整し、解析できる環境を整えた(図4)。

(4) スポットを選択し、Analyze>Measureでグレー値を解析した。昨年度の研究よりMin Gray Level(最小グレー値)の解析が最も有効であることがわかっており、得られた125~500 ngの範囲におけるビタミンB<sub>2</sub>標準検量線を定量時に用いた(図5)。

なお、TLCに関しては、実験時の温度や湿度などの外的要因が結果に影響を与えることが考えられるため、実験を10回繰り返し平均化したデータを数値として用いた(n=10)。

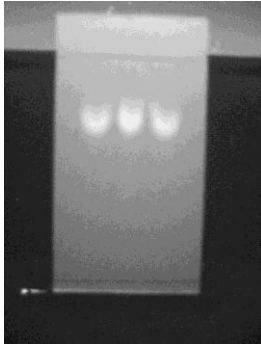


図3. グレースケール画像  
(リボフラビン 250 ng)

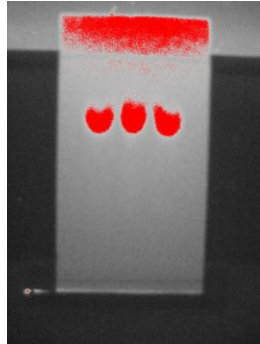


図4. 調整した画像  
(リボフラビン 250 ng)

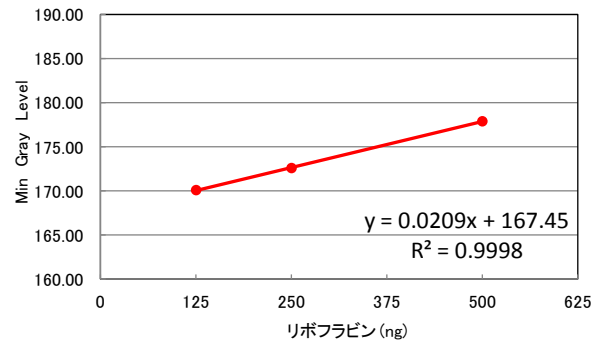


図5. Min Gray Levelとリボフラビンの関係  
によるビタミンB<sub>2</sub>標準検量線 (n=10)  
(125~500 ng)

## II. 試料の検討

昨年度の研究で得られたビタミンB<sub>2</sub>標準検量線の範囲は125~500 ngであった。よって、TLCのスポット量として適当な2~10 μL中に125~500 ngのビタミンB<sub>2</sub>を含む食品のリストアップを行った。その結果、多くのビタミン群を含み栄養補給を目的としているタイプの飲料が候補に挙がり、オロナミンC(大塚製薬)、リポビタミンD(大正製薬)、アスパラドリンク(田辺製薬)、グロンサン内服液(ライオン)、アリナミンV(武田薬品工業)の5種に関してTLCを行うことにした。当初、我々は食品において含まれるビタミンB<sub>2</sub>は全てリポフラビン単体で含まれていると考えていたが、リポビタミンD、アスパラドリンク、グロンサン内服液はリポフラビンをリン酸化させた後、含有させていることがわかった。TLCにおけるスポットを観察したところ、拡散しテーリングも見られていたため、純粋なリポフラビンを抽出しなければ定量化ができないと判断し試料候補から除いた。また、オロナミンCは炭酸飲料のため気泡が毛細管現象を妨げ、開封後すぐにキャピラリーを用いたスポットティングができなかった。炭酸を抜くために放置する必要があるため、その間に成分が変化してしまう可能性が考えられたため、これも同様に除いた。

これらの結果より、純粋なリポフラビンを含み、良好なスポットが観測されるアリナミンVを試料とすることにした。アリナミンVに含まれるリポフラビンは2 mg/50 mLであり、希釈等の操作をせずに実験に用いることができる。スポットティングは5, 10 μLのキャピラリーで行った(リポフラビンの質量は、200, 400 ng)。

## 【実験結果】

### I. TLCによるRf値測定

リポフラビン標準試薬とアリナミンVに含まれるリポフラビンを同量の200 ngにしてTLCを行った(図6)。測定したa, b cmと算出したRf値の結果を示した(表1)。表にはAVE:平均値、SD:標準偏差、CV:変動係数の計算結果も合わせて示した。AVEに関するCVがa, b cm, Rf値全て2.5%以内という安定したデータが得られた。

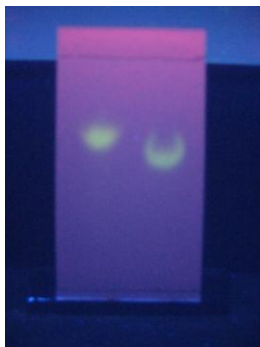


図6. 紫外線照射での画像  
(左リボフラビン, 右アリナミンV リボフラビン 200 ng)

表1. リポフラビンとアリナミンVのRf値比較 (n=10)  
(リポフラビン 200 ng)

	a (cm)	b (cm)	Rf
リポフラビン	5.25	8.02	0.65
アリナミンV	5.02	7.96	0.63
AVE	5.14	7.99	0.64
SD	0.12	0.03	0.01
CV (%)	2.24	0.38	1.56

## II. ImageJでの画像解析

アリナミンVのスポットに含まれるMin Gray Levelを解析した。200, 400 ngともに、AVEに関するCVが0.8%以内という安定したデータが得られた(表2, 3)。

表2. アリナミンVのMin Gray Level (リボフラビン 200 ng)

アリナミンV	Min
A	172
B	172
C	171
D	172
E	171
F	171
G	172
H	171
I	172
J	172
AVE	171.60
SD	0.49
CV (%)	0.29

表3. アリナミンVのMin Gray Level (リボフラビン 400 ng)

アリナミンV	Min
A'	176
B'	175
C'	177
D'	175
E'	177
F'	174
G'	174
H'	175
I'	174
J'	178
AVE	175.50
SD	1.36
CV (%)	0.78

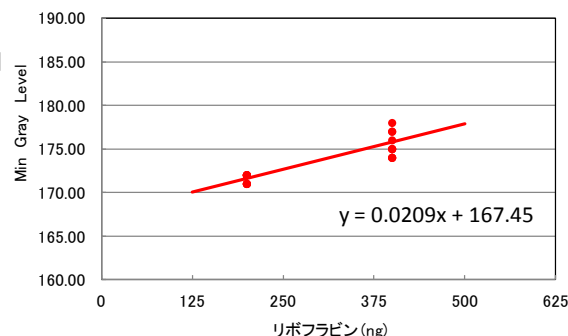


図7. 標準検量線とアリナミンVのMin Gray Level (リボフラビン 200, 400 ng)

表4. アリナミンVのMin Gray Levelと理論値比較 (n=10) (リボフラビン 200, 400 ng)

	200 ng	400 ng
アリナミンV	171.60	175.50
理論値	171.63	175.81
AVE	171.62	175.66
SD	0.02	0.16
CV (%)	0.01	0.09

### 【考察】

TLCより求めたRf値から、アセトン:メタノール=1:1の展開溶媒はアリナミンVに関しても有効であり、成分中のリボフラビンを安定的に測定できることがわかった。これをもとに、ImageJでアリナミンVのスポットに含まれるMin Gray Levelを解析し(表2, 3)、結果をビタミンB<sub>2</sub>標準検量線上にプロットした(図7)。合わせて標準検量線の近似直線 $y=0.0209x+167.45$ に $x=200, 400$ を代入することでMin Gray Levelの理論値を算出し、解析値と比較した(表4)。その結果、200, 400 ngのAVEに関するCVは、それぞれ0.01, 0.09%という極めて小さい値が得られ、アリナミンVから求められた解析値と理論値が非常に近い値であることを示している。

このことから、実際に市販されている飲料に関しても、本研究部のビタミンB<sub>2</sub>標準検量線を用いた定量化は十分可能であり、一定の精度を保証することができたと判断できる。よって、TLCとImageJのグレー値を用いた定量化は、高校実験室レベルにおいても可能な食品及び飲料中に含まれるビタミンB<sub>2</sub>定量法(Hakuryo method)になると考えられる。

### 【結論】

- ・アセトン:メタノール=1:1の展開溶媒は市販されている飲料(アリナミンV)に関しても有効であり、成分中のリボフラビンを安定的に測定できる。
- ・TLCとImageJのグレー値を用いた定量化は、食品及び飲料中に含まれるビタミンB<sub>2</sub>定量法(Hakuryo method)になる。

### 【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B<sub>2</sub>の定量化
- 2) 及川 剛司(2005) Umu試験におけるPlasmid pSK1002数と $\beta$ -Galactosidase活性
- 3) 綿抜 邦彦(2003) 分析化学[新訂版], サイエンス社
- 4) 露木 英男・田島 眞(2002) 食品学-栄養機能から加工まで-, 共立出版
- 5) 立屋敷 哲(2003) 生命科学・食品学・栄養学を学ぶための有機化学 基礎の基礎, 丸善
- 6) 科学技術庁資源調査会編(2000) 五訂 日本食品標準成分表(2000)

### 【受賞にあたって】

この度は化学系学協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。