

ビタミンCの定量

— Hakuryo methodを用いた食品成分分析の可能性 —

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

3年 林 宏峻 赤坂 智弥
1年 伊川 瑠衣 中村 達也



【はじめに】

柏稜高校理科研究部は、2011年より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きた。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）を用いたオリジナル定量法「Hakuryo method」を確立させた。

さらに撮影装置の開発や標準添加法を組み合わせる等の工夫を施すことにより、1 mg/Lレベルの低濃度試料における測定を実現させ、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）と同程度の感度を兼ね備えていることも実証した¹⁾。

今年度は、「Hakuryo method」をさらに汎用的なものにするため、ビタミンB₂以外の他成分測定に挑戦した。食品に含まれる成分はビタミン類も含めて多種多様であるが、その中でも広く認知されており、かつ多くの食品に含まれているため実用性が高い、ビタミンC（L-アスコルビン酸 C₆H₈O₆）をターゲットにすることにした。

本研究では、「Hakuryo method」を用いたビタミンC定量の実現を目指し、成分が表記されている市販の清涼飲料水を試料として実験を行うことで、その有効性を検証する。仮にビタミンCの定量を実現させることができれば、「Hakuryo method」による複数成分に関する定量が可能となり、高校実験室における食品分析の可能性をさらに広げることができると考えた。

【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、紫外線を照射すると強い蛍光を示すという特殊な性質を有する（図1）。



図1. リボフラビンの蛍光

【ビタミン C（L-アスコルビン酸 C₆H₈O₆）】

ビタミンCは化学的にはL-アスコルビン酸と呼ばれ、白～帯黄白色の結晶性の粉末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、生理作用の調整上、欠くことのできない物質である。ビタミンC水溶液は無色であるため、発色反応を利用する定量が一般的である（図2）。



図2. L-アスコルビン酸の結晶と水溶液

【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 (ビタミン B₂ の定量)】

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

TLCによって得られたスポットに、開発したオリジナル定量装置を用いてUV照射を行い、スポットの蛍光をカメラで記録する。

③ ImageJ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、グレー値を解析する。

④ 検量線による定量

リポフラビン標準溶液(溶媒:水)におけるグレー値をもとに標準検量線を作成し、その切片をブランク(0 mg/Lのベース)とする。また、食品や飲料に含まれる成分は多様であるため、測定に影響を与えることが考えられる。よって、定量はその影響を排除するため、標準添加法を用いて行う。

【実験方法】

予備実験 発色反応と展開溶媒の検討

ビタミン C は蛍光を示す性質が無いいため、ビタミン B₂ と同様の測定はできない。「Hakuryo method」は TLC の有色スポット内のグレー値を測定するため、まず発色させる方法を検討した。

私達は、より簡便に行うため「パックテスト」に注目した。パックテストは比色を利用した半定量キットであり、試料をチューブで吸い(2~3 mL程度)試薬と反応させるものである。パックテストの測定範囲は1~100 mg/Lであるため、濃度の異なる25、50、75、100 mg/LのL-アスコルビン酸標準溶液(溶媒:水)を用意した。マニュアルに従い試験管に入れた試薬と標準溶液2 mLを3分間反応させたところ、明確な発色の違いが確認できたため、この反応を利用することにした(図3)。

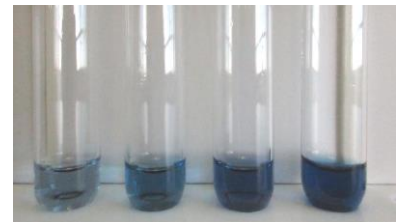


図3. パックテストによるビタミンCの発色(25, 50, 75, 100 mg/L)

その後、発色させた試料を用いて TLC の展開溶媒の検討を行った。

まず、ビタミン B₂ で用いたメタノールやアセトンを試したが、テーリングが見られた。特にメタノールにその傾向が顕著であったため、これを除きアセトンをベースとして検討を進めた。アセトンと極性指数の低い溶媒との組み合わせと比率を調査したところ、アセトン:酢酸エチル=7:3の混合溶液で展開した場合、良好なスポットが観測されたため、これに決定した。

実験 I ビタミン C 標準検量線の作成

ブランク(0 mg/Lのベース)を算出するため、標準検量線を作成した。

① L-アスコルビン酸標準溶液を25、50、75、100 mg/Lの4種類に希釈した。

② パックテストの試薬と各濃度の標準溶液2 mLを3分間攪拌することで発色反応させ、試料とした。

③ アセトン:酢酸エチル=7:3の混合溶液を展開溶媒とし、展開槽として用いたデンキケータの底から約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。薄層プレートの端から10 mmの位置を原点とし、各濃度のL-アスコルビン酸標準溶液をキャピラリーで10 μLずつスポットした(L-アスコルビン酸含有量は250、500、750、1000 ng/10 μL)。TLC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。そのため、全ての実験を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)。

④ 定量装置でUV照射を行い、画像を記録した。スポットが発色しているため、蛍光を示していなくても解析が可能である。ImageJによってグレースケール化し、Image>Adjust>Thresholdで画像調整した。グレー値を同条件で解析できるように環境を整え、スポット内のMean Gray Value(選択枠内の平均グレー値)を測定した。グレースケールは、白と黒の濃淡を256階調で表しているため0~255の値で得られる。スポット内のグレー値は、濃度が大きいほど発色が強くなるため、黒(0)に近くなる。

⑤ 標準検量線を作成し、得られた線形近似関数の切片をブランクとした。

実験 II 標準添加法を用いた市販飲料の定量

市販の清涼飲料水(ビタミンウォーター)を試料とし、そのビタミンC含有量を測定した。その際、飲料中に含まれる成分は多様であるため、ビタミンC以外の成分が測定に影響を与えることが考えられた。よって、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。表記されている含有量をもとに100倍である20 mg/Lに希釈し、20、40、80 mg/LのL-アスコルビン酸標準溶液を添加した。添加しないものを含め4種類の試料を実験 I ②~④と同様の手順でMean Gray Valueを解析した。

【実験結果】

実験 I 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）。Mean AVEに関するCVが全て2%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たところ $y = -0.1719x + 105.24$ という結果が得られた（図4）。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 も0.9945と良好であるため、ブランクの値を105.24に決定した。

表 1. L-アスコルビン酸の Mean Gray Value (n=10)
(25, 50, 75, 100 mg/L)

(mg/L)	25	50	75	100
Mean AVE	101.33	96.08	92.32	88.26
SD	1.65	1.88	1.13	0.76
CV (%)	1.62	1.96	1.22	0.86

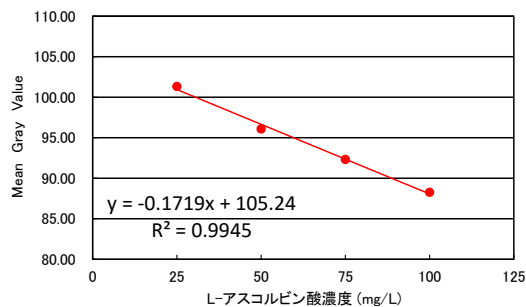


図 4. L-アスコルビン酸標準検量線 (n=10)
(25, 50, 75, 100 mg/L)

実験 II 他成分を含む市販飲料であったが、有色スポットは良好に観測された（図5）。実験 I と同様に10回の測定平均値であるMean AVEを示した（表2）。Mean AVEに関するCVは、全て2%以内であり添加したことによる影響は少ないと判断できる。さらに、標準添加法の手法に従い、ブランクの値 $y = 105.24$ と交わるように延長させた検量線を作成したところ、 $R^2 = 0.9993$ と良好な直線であった（図6）。

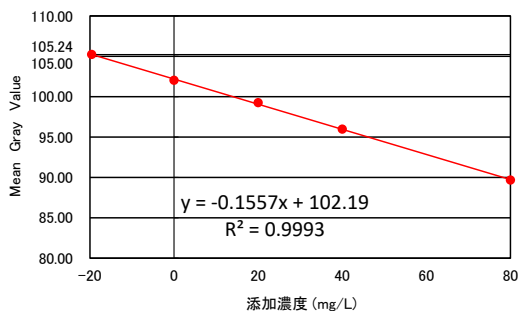


図 6. 標準添加法による検量線 (n=10)
(添加濃度 0, 20, 40, 80 mg/L)

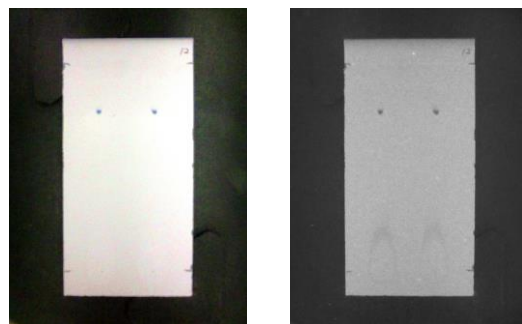


図 5. TLC 画像とグレースケール化した画像
(左スポット:L-アスコルビン酸 100 mg/L
右スポット:100倍希釈した市販飲料
+L-アスコルビン酸 80 mg/L)

表 2. L-アスコルビン酸を添加した市販飲料の
Mean Gray Value (n=10)
(添加濃度 0, 20, 40, 80 mg/L)

(mg/L)	0	20	40	80
Mean AVE	102.04	99.27	95.98	89.68
SD	1.40	1.15	1.89	1.62
CV (%)	1.37	1.16	1.97	1.81

【考察・結論】

標準添加法を用いた市販飲料における検量線より、ビタミンCの定量を行うことができる。線形近似関数 $y = -0.1557x + 102.19$ に $y = 105.24$ を代入し、 x の絶対値を求めれば $|x| = 19.59$ mg/Lとなる。さらに、100倍希釈を行っているため $19.59 \times 100 = 1959$ となり、「Hakuryo method」を用いた市販飲料のビタミンC含有量は1959 mg/Lになった。得られた値と成分表に記載されている値との開きは-2.1%であった。これは、厚生労働省が定める栄養表示基準の許容範囲である-20~+80%内であったため²⁾、「Hakuryo method」におけるビタミンC定量の有効性を十分に示すことができる結果であったと考えられる。

パックテストは、リンモリブデン酸ナトリウムの還元を利用した比色法であるが、タンニンやポリフェノール等の還元性物質においても反応するため、補正が必要である。しかしながら、「Hakuryo method」ではTLCでビタミンCを分離・同定しているため、他の物質を計測している可能性は低いと思われる。また、代表的なビタミンC定量法であるインドフェノール反応やヨウ素デンプン反応を利用した滴定と比較しても、実験方法や操作が圧倒的にシンプルであるため、測定誤差等も少ないと考えられる。

このように、「Hakuryo method」によるビタミンC定量は非常に有用であり、高校実験室においても簡便にビタミン分析を実現させることができる。これらの成果より、「Hakuryo method」を用いることで、ビタミンB2・ビタミンCといった構造や性質の異なる複数の成分分析が可能になり、高校実験室における食品分析の可能性をさらに広げることができたと結論付ける。

【参考文献】

- 第59回日本学生科学賞 (2015) ビタミンB2の定量 - Hakuryo methodを用いたヨーグルトホイイの測定 -
- <http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin1098.pdf>

【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。