

1 研究の動機

今まで様々な方法で、L-アスコルビン酸の定量をしてきた。しかし、どれも難しく高価で手間と時間がかかる方法だったため、どうすればL-アスコルビン酸を高精度で簡単に定量できるか気になったのでL-アスコルビン酸の高精度な簡易定量法の開発について研究することにした。

2 研究の背景

酸化還元滴定法による定量では、手順が簡単だが、人によって感じる色が違うため、ヨウ素溶液の色の変化がわかりにくい。また、パックテストとTLCを用いた発色反応での定量ではパックテストは簡単だが、TLCを用いると手順が多く、費用がかかる。

3 研究の目的

L-アスコルビン酸の様々な定量法を試行・改良することで、L-アスコルビン酸の高精度な簡易定量法を開発することを目的とする。

4 仮説

研究の背景で示した2つの定量方法のそれぞれの利点を活かせば、L-アスコルビン酸の高精度な簡易定量法を開発することができるのではないかと考える。

5 実験の方法

【実験1】酸化還元滴定法で定量をする。

方法：0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%の濃度のL-アスコルビン酸水溶液と、50mLずつ5つのビーカーに分けた1000倍希釈のヨウ素溶液を用意する。ヨウ素溶液に水溶液をマイクロピペットで0.1mLずつ滴下しヨウ素溶液が透明になるまでの滴下量を調べる。

【実験2】パックテストとTLC法を用いた発色反応から定量をする。

方法：25mg/L、50mg/L、75mg/L、100mg/Lの濃度のL-アスコルビン酸水溶液を作り、その検水でパックテストをする。TLC法を用いサンプルを分離させ、シリカゲルの色素にUVランプを照射して画像を記録する。ImageJを用い、UVランプを照射したシリカゲルの色素のRGB値を測る。

【実験3-1】酸化還元滴定法をした後ImageJでヨウ素溶液の色の変化を分析して、定量をする。

方法：0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%の濃度のL-アスコルビン酸水溶液と、50mLずつ1000倍希釈のヨウ素溶液を用意する。ヨウ素溶液が透明になるまでの水溶液の滴下量を調べる。そのとき、黒の画用紙を背景で写真を撮る。ImageJを用いヨウ素溶液のRGB値をそれぞれ10か所ずつ測る。

【実験3-2】酸化還元滴定法をした後ImageJでヨウ素溶液の色の変化を分析して、定量をする。

方法：25mg/L、50mg/L、75mg/L、100mg/LのL-アスコルビン酸水溶液と、50mLずつ1000倍希釈のヨウ素溶液を用意する。ヨウ素溶液に水溶液を0.1mLずつ滴下し、黒画用紙の背景で写真を撮る。ImageJを用いヨウ素溶液と背景のRGB値を測り、(ヨウ素溶液のRGB値それぞれの10か所の平均)－(黒い背景の左右のRGB値それぞれの10か所の平均)の値でヨウ素溶液の色の変化を分析する。

【実験3-3】酸化還元滴定法をした後ImageJでヨウ素溶液の色の変化を分析して、定量をする。

方法：100mg/LのL-アスコルビン酸水溶液と、50mLずつ1000倍希釈のヨウ素溶液を用意する。ヨウ素溶液が透明になるまでの水溶液の滴下量を調べる。黒と白の背景の箱の中で操作し、滴下する度に写真を撮る。ImageJを用いヨウ素溶液と背景のRGB値を測り、(ヨウ素溶液のRGB値それぞれの10か所の平均)－(背景のRGB値の10か所の平均)の値でヨウ素溶液の色の変化を分析する。

【実験3-4】ImageJ でヨウ素溶液の色の变化を分析する精度を高めることで定量の精度を高める。

方法：実験3-3で使用した写真を全てモザイク加工する。ImageJ を用い、黒と白の背景で撮った写真それぞれのヨウ素溶液と背景の RGB 値を測定する場所を一定に揃えて測り、(ヨウ素溶液の RGB それぞれの値)-(背景の RGB それぞれの値)の値を用いて、ヨウ素溶液の色の变化を分析する。

【実験4】酸化還元滴定法のあと ImageJ を用いてヨウ素溶液の色の变化を分析して検量線を引く。

方法：25mg/L、50mg/L、75mg/L、100mg/L の L-アスコルビン酸水溶液を作る。1000 倍希釈のヨウ素溶液を作り、50mL ずつ用意する。ヨウ素溶液が透明になるまでの滴下量を調べる。黒の背景の箱の中で操作し、滴下する度に写真を撮る。写真を全てモザイク加工し、ImageJ を用い、それぞれの写真のヨウ素溶液と背景の RGB 値を測定する場所を一定に揃えて測り、(ヨウ素溶液の RGB それぞれの値)-(背景の RGB それぞれの値)の値を用いて、ヨウ素溶液の色の变化を分析する。そして、それぞれの濃度の溶液を 1.3mL 滴下した時の RGB 値を用いて検量線を引く。

【実験5】パケットをした後 ImageJ で検水の色の变化を分析することで検量線を引く。

方法：25mg/L、50mg/L、75mg/L、100mg/L の L-アスコルビン酸水溶液を作る。パケットをし、黒の背景の箱の中で写真を撮る。写真を全てモザイク加工し、ImageJ を用い、検水と背景の測定する場所を一定に揃えて RGB 値を測り(パケットをした後の検水の RGB それぞれの値)-(背景の RGB それぞれの値)で検水の色を分析する。4 種類の検水の RGB 値を用いて検量線を引く。

【実験6】市販飲料を用いて同様の操作をすることで実験5で作成した検量線の正確性を証明する。

方法：Y 社のオレンジジュースを 10 倍希釈、I 社の緑茶を 2 倍希釈しパケットをする。そのとき撮った写真を全てモザイク加工する。ImageJ を用い、検水と背景の RGB 値を測定する場所を一定に揃えて測り、(パケットをした後の検水の RGB それぞれの値)-(背景の RGB それぞれの値)で、ヨウ素溶液の色の变化を分析する。緑茶の場合、L-アスコルビン酸パケットでは同様の発色をするポリフェノール類が含まれるため、薄めた緑茶の L-アスコルビン酸の濃度とカテキンの濃度の差の値を用いる。実験5で引いた検量線にそれぞれの値を当てはめ、検量線の正確性を調べる。

6 実験結果と考察

【実験1】

		L-アスコルビン酸水溶液の滴下量						
		0mL	0.1mL	0.2mL	0.3mL	0.4mL	0.5mL	0.6mL
水溶液中の L-アスコルビン酸の量	0.2g							
	0.4g							
	0.6g							
	0.8g							
	1.0g							

図1 ヨウ素溶液にそれぞれの濃度の L-アスコルビン酸溶液を滴下した時のヨウ素溶液が透明になるまでの溶液の色の变化

滴下する水溶液の濃度を高くすると透明になるまでの滴下量は減少したことから、L-アスコルビン酸の定量ができたと考えられる。しかし、ヨウ素溶液が透明になったという判断が肉眼では難しかったため、他の方法で透明になったことを判断するとより正確に定量できると考えられる。

【実験2】

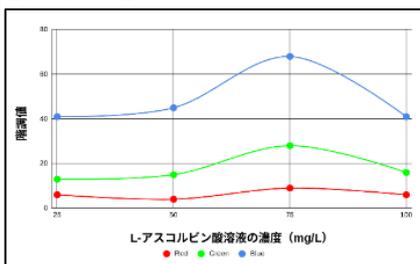


図2 UV ランプを照射したシリカゲルの色素の階調値の変化

どの L-アスコルビン酸の濃度でもシリカゲルの色素の違いがわかりにくかったことから、パケットと TLC を用いた発色反応では L-アスコルビン酸の定量はできないと考えられる。

【実験3-1】

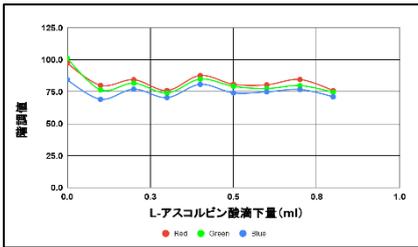


図3 0.2%のL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係

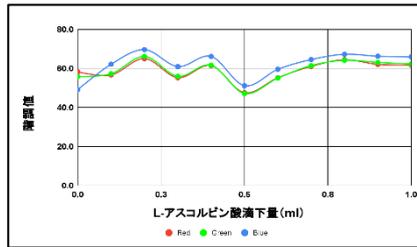


図4 0.4%のL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係

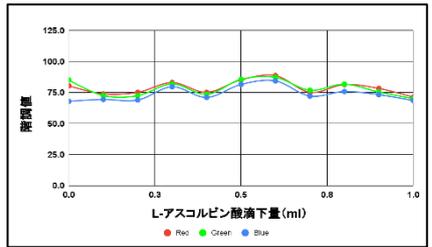


図5 0.6%のL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係

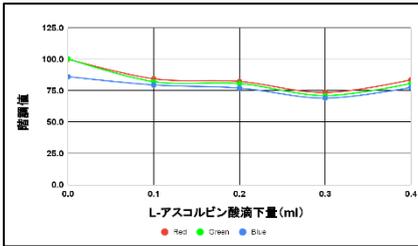


図6 0.8%のL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係

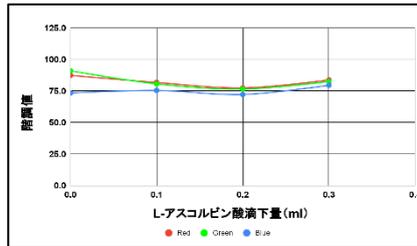


図7 1.0%のL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係

どの濃度の水溶液を用いても、滴下量が増加しても階調値が低下しなかったことから、RGB値を測るために撮った写真の明るさの変化が階調値に影響を与えてしまったと考えられる。よって、実験3-2では、階調値に明るさの影響が出ないように、(ヨウ素溶液のRGB値それぞれの10か所の平均)-(黒い背景の左右のRGB値それぞれの10か所の平均)の値を用いてヨウ素溶液の色の変化を分析する。

【実験3-2】

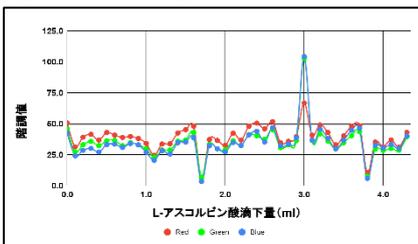


図8 25mg/LのL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調値の変化

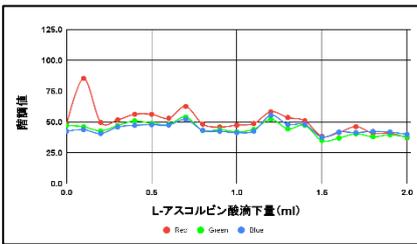


図9 50mg/LのL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係

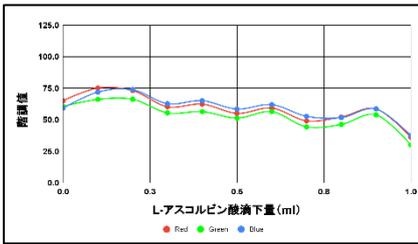


図10 75mg/LのL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係

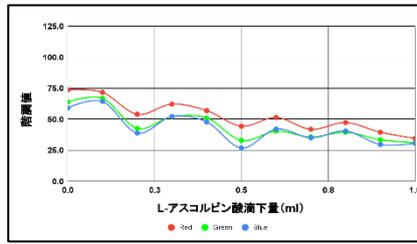


図11 100mg/LのL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係

滴下量が増加しても階調値が低下しなかったことから、写真の明るさの変化がまだ階調値に影響を与えてしまっていたと考えられる。よって、実験3-3では、黒と白の背景の箱それぞれの中で写真を撮ることで、光を遮り明るさの変化の影響を受けにくくする。

【実験3-3】

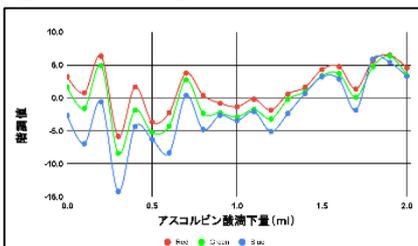


図12 100mg/LのL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係 (黒い背景の箱で写真を撮った場合)

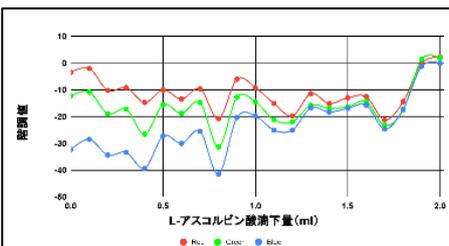


図13 100mg/LのL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係 (白い背景の箱で写真を撮った場合)

黒と白の背景の箱の中のどちらで行っても、滴下量が増加したとき階調値が低下しなかったことから、RGB値を測る位置が全て正確ではなかったと考えた。よって、実験3-4では、写真をモザイク加工して、RGB値を測る場所を全て揃えることでRGB値の正確性を高める。

【実験3-4】

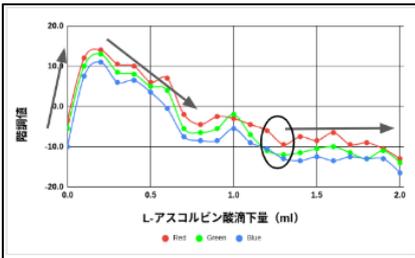


図14 100mg/LのL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係 (黒い背景の箱で撮った写真をモザイク加工した場合)

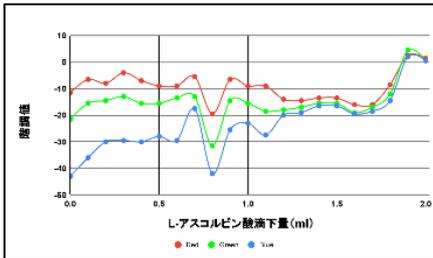


図15 100mg/LのL-アスコルビン酸溶液の滴下量と各色の階調変化の関係 (白い背景の箱で撮った写真をモザイク加工した場合)

黒い背景の箱の中で行った方は、溶液の滴下量が増加すると、階調値は一度大きくなったあと、小さくなっていき、その後変化がほとんどなくなったことから、L-アスコルビン酸の定量ができたと考えられる。よって、実験4では、RGB値を用いてL-アスコルビン酸の検量線を作ることで、簡単に定量できるようにする。

【実験4】

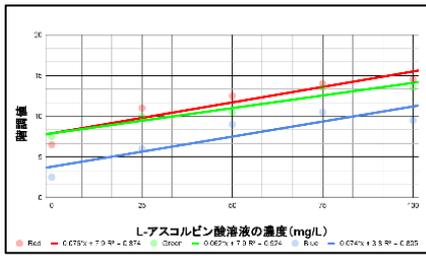


図16 25mg/L、50mg/L、75mg/L、100mg/LのL-アスコルビン酸溶液それぞれを1.3mL滴下した時のヨウ素溶液の階調値を用いた検量線

溶液の濃度が高くなった分階調値が上がったことから、検量線を引くことができたと考えられる。しかし、ヨウ素溶液が濁ってしまうため、この方法では有色不透明な液体に含まれるL-アスコルビン酸の定量ができないことに気が付いた。よって、実験5では、バックテストをした後ImageJで検水の色の变化を分析して検量線を引き、どの液体でも簡単に定量できるようにする。

【実験5】

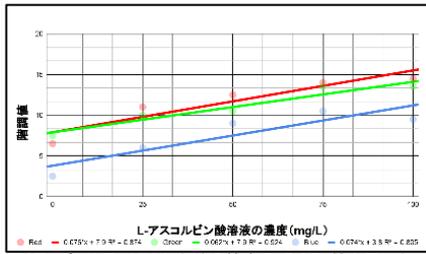


図17 バックテストをした後の検水のRGB値を用いたL-アスコルビン酸の検量線

階調値は明るさが暗くなるほど小さくなり、バックテストは濃度が高いほど濃い色になる。溶液の濃度が高くなった分階調値が下がっていったことから、L-アスコルビン酸の検量線を引くことができたと考えられる。よって、実験6では、市販の飲料を用いてL-アスコルビン酸を定量して、実験5で作成した検量線の正確性を証明する。

【実験6】

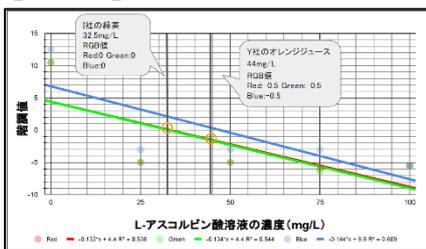


図18 実験5の検量線にI社の緑茶とY社のオレンジジュースのL-アスコルビン酸の濃度とバックテストをした時のRGB値を当てはめた図

2倍希釈のI社の緑茶のL-アスコルビン酸の濃度とカテキンの濃度の差は $72.5\text{mg/L} - 40\text{mg/L} = 32.5\text{mg/L}$ だから、左側の線的位置になりRGB値のRedとGreenの検量線と交わっている。また、10倍希釈のY社のオレンジジュースのL-アスコルビン酸の濃度は 44mg/L より右の線となりRGB値のRedとGreenの検量線と交わっている。よって、検量線の正確性が証明でき、RGB値のRedとGreenの検量線の正確性が高いと考えられる。

7 まとめ

本研究ではヨウ素溶液を用い酸化還元反応を利用した酸化還元滴定法(実験1)、バックテストとTLCを用いた発色反応を分析する方法(実験2)ではどちらも正確な定量はできなかった。無色透明な液体の場合、酸化還元滴定法をした後ImageJでヨウ素溶液の色の变化を分析する方法(実験3、4)、また、有色な液体や不透明な液体の場合、バックテストをした後ImageJで検水の色の变化を分析する方法(実験5、6)で、階調値を用いたL-アスコルビン酸の検量線を引くことで、溶液中に含まれるL-アスコルビン酸を高精度で簡易的に定量することができた。