

ぶんぶんゴマの遠心力を利用した溶液中のアルブミンの 迅速定量分析法の開発

6年A組 吉田 有里

6年B組 中嶋 夢乃

指導教員 松浦 紀之

1. 概要

水中に含まれるアルブミンに鉛(II)イオンを加えて生じる沈殿物の体積から、もとのアルブミン濃度を定量する「沈殿容積法」について検討した。アルブミン溶液に酢酸鉛(II)水溶液を加え攪拌して懸濁させ、溶液を均一にした。この懸濁溶液をキャピラリーの中に入れて両端を封じ、ぶんぶんゴマの円盤面に張り付けて回転させることで、固体をキャピラリーの底に沈降させた。溶液中のアルブミン濃度と、キャピラリー内の溶液の高さ a と沈殿物の高さ b から求めた高さの割合 a/b には直線関係があり、検討したアルブミン濃度 1000~5000 ppm の範囲で再現性があった。

キーワード ぶんぶんゴマ 沈殿 定量 アルブミン 酢酸鉛(II)

2. はじめに

ぶんぶんゴマは、板の中央部分に2ヵ所の穴を開けて紐を通し、この紐の両端を持って何回かまわしてから引いたり緩めたりすることで板を高速回転させる玩具である(図1)り。ぶんぶんゴマを回転させるとビュンビュンと音が鳴り、類似のものは世界中で存在している。単純な仕組みで高速回転させることができるため、最近、血液検査に必要な遠心分離を実現させた研究が報告された²⁾。ここでは、理論上では100万rpm、実験値では12万5000rpm、つまり1分間に12万5000回も板が回転しており、これは回転数のギネス世界記録にもなっている。

水中に含まれる化学成分の定量分析には、成分の重量を測定する重量分析法や容量を測定する容量分析法、化学変化による色調変化を比較する比色分析法を用いるのが一般的で

ある。重量分析法の一つである沈殿重量法³⁻⁵⁾は、分析対象を沈殿物として試料の溶液から分離し、その質量を測定するために化学組成既知の化合物などに変換してから分析を行う。沈殿重量法で精度良く測定するためには、生成した沈殿物が再度溶解したり分解しないことが必要である。また、質量を測定するために秤量瓶の準備や精度が良い電子天秤が必要となり、精密で正確な測定値が期待できるものの、煩雑かつ熟練した実験操作が必要であ

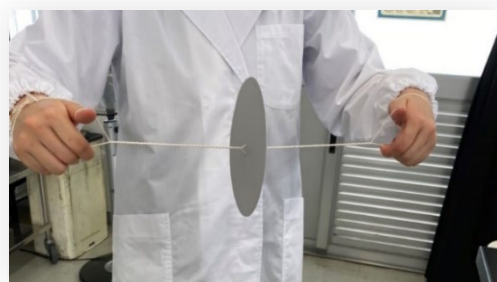


図1. ぶんぶんゴマの回転

る。

しかし、沈殿物の重量を直接測定しなくても、例えば細い管に沈殿物を入れ、その容積を測ることで、沈殿物の重量を見積もることができるのではないだろうか⁶⁾。そのためには細い管に沈殿物を密に析出させる必要があり、これには遠心分離機によって沈降させ、そのときの沈殿物の容積を測ることが有効である。

そこで、ぶんぶんゴマの遠心力を利用した化学分析法を開発することを思いついた。ぶんぶんゴマの回転には電力が不要であり、誰にでも高速回転させることができる。ぶんぶんゴマの遠心力により、細い管内に沈殿を沈降させて、その体積を測定することで、簡便に、そして迅速に定量分析できる方法を開発することを目的とした。計画した方法は、実験操作の煩雑さや、高価な器具の問題を解消することもできる。

3. 実験方法

実験で用いた試薬は、購入したものをそのまま用いた。溶液の pH 測定は pH メーター HORIBA B-711 または狭領域用の pH 試験紙 (pH 4.0~7.0, 7.2~9.7) を用いた。

(1) 試薬・器具

卵製アルブミン⁷⁾、硝酸鉛(II)、50 mL ビーカー、50 mL サンプル管、マイクロピペット (ニチリョー, Nichipet EXII)、100 mL メスフラスコ、キャピラリー (アズワン プレキャリブレードピペット, ϕ 1.5 mm, 長さ 125 mm, 容量 40 μ L)、デジタルノギス (エー・アンド・デイ AD-5764-150)、白台紙 (#9, 厚さ 0.7 mm)、4 つ穴ボタン (プラスチック製の実験用白衣のボタン)、タコ糸 (綿より糸 #6, ϕ 1.0 mm)、接着剤、サークルカッター

(2) ぶんぶんゴマの作成

白台紙をサークルカッターを用いて直径 13.0 cm の円形に切断した。円形の白台紙の中心 2 ヶ所に 1.5 mm の穴を 6 mm 離して 2 ヶ所開けた。円形の白台紙の中央の穴の両面に、4 つ穴のボタンを 2 つの穴の位置が重なるように接着剤で止めた。この 2 ヶ所の穴にタコ糸 (長さ 90 cm) を通して結んだ (図 2)。

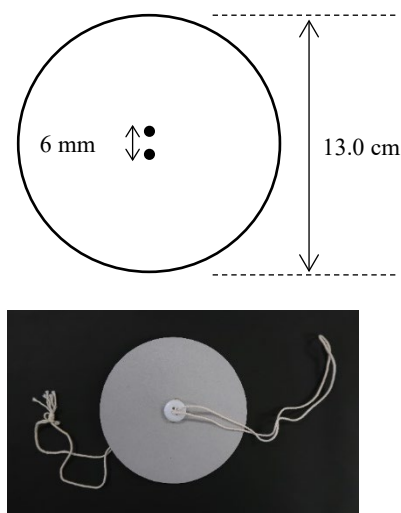


図 2. 作成したぶんぶんゴマ

(3) 実験操作

500 mg の卵製アルブミンに蒸留水を加えて溶液全体を 100 g とした (5000 ppm のアルブミン標準溶液)。なお、この溶液の密度は 1.0 g/cm³ とみなした。

5 本の試験管にマイクロピペットを用いてアルブミン標準溶液をそれぞれ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 入れた。これらの試験管に蒸留水を加え、全量を 5.0 mL とした。サンプル管にアルブミンの溶液 5.0 mL (アルブミンを 1000~5000 ppm 含むように希釈したもの) を入れ、0.20 mol/L 硝酸鉛(II)水溶液をそれぞれ 5.0 mL ずつ加えて懸濁させた。ガラス棒で攪拌して懸濁が均一になった状態で、ガラス製のキ

キャピラリーで吸わせて管内に導入した。このキャピラリーの開口部分は、ガスバーナーで加熱することでガラスを溶かし、キャピラリー内に溶液を封入した。溶液を封入したキャピラリーをぶんぶんゴマの円盤面に固定し、5分間回転させ、固体を十分に沈殿させた（図3）。キャピラリーを立てて、内部の溶液の高さと沈殿物の高さをデジタルノギスまたは定規で測定した。同じ条件で、アルブミンを含まない溶液でも実験（空実験）した。

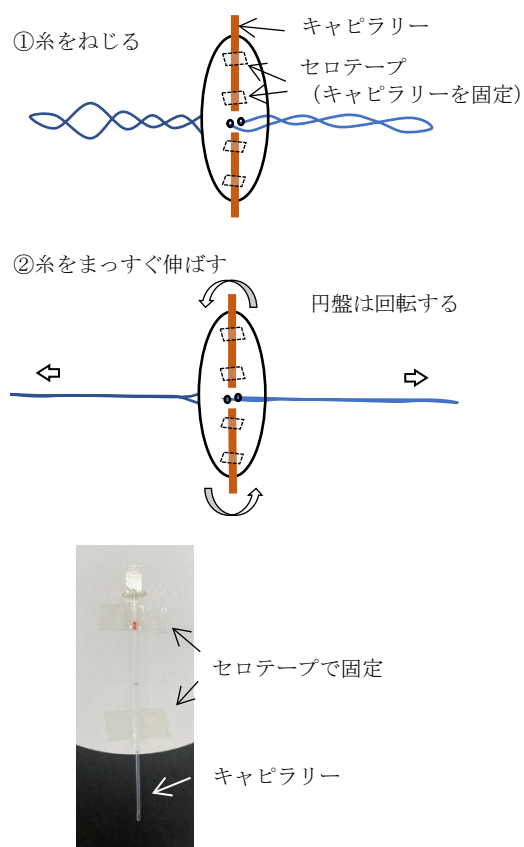


図3. ぶんぶんゴマ遠心分離機の回転

4. 結果と考察

(1) ぶんぶんゴマを用いた定量法の開発

フィールドでの環境調査で化学分析を行う際には、簡便な方法であるバックテストが用いられる⁸⁾。バックテストは取り扱いが簡単

で、水中に含まれる様々な化学種が分析できる。しかし、比色分析（比色法）で用いるカラーチャートは、5～10段階と幅があるので精度よく分析することは難しい。そこで、ぶんぶんゴマの遠心力を利用した化学分析法を開発することを思いついた。ぶんぶんゴマは、電力が不要であり、誰にでも高速回転させることができる。ぶんぶんゴマを用いた遠心分離を利用して行った分析の精度や再現性について確かめた。

(2) ぶんぶんゴマ遠心分離機の製作

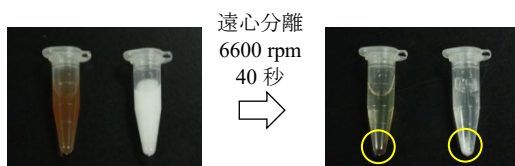
市販の遠心分離機で用いる遠沈管には様々な形がある。例えば、ガラスやプラスチック樹脂製の遠沈管（実験室レベルでは、数百 μL ～50 mL、または100 mL程度）、また、医療現場では血液の分析にヘマトクリット毛細管（数十 μL ）が用いられる（図4）。



図4. 遠心分離機に用いる様々な市販の遠沈管・マイクロチューブ

事前の予備実験では、1.5 mLのマイクロチューブ（ポリプロピレン製）を用い、小型卓上遠心分離機（LMS MCF-2360、回転速度は6600 rpm）により沈殿を生じさせた。しかし、この方法では沈殿物がマイクロチューブの底に溜まるため、質量や体積を測定することは困難であった（図5）。そこで、化学実験で用いるパストゥールピペットに注目した。パストゥールピペットの中心から先端部分にかけては、

内径 0.8~0.9 mm 程度の細い管になっている⁹⁾。内径が一定の細い管の部分に溶液を入れてから先端に蓋をして遠心分離すると、細い管の中で沈殿するので、その沈殿物の長さを測定することで、沈殿量の比較ができるのではないか。



(左) $\text{Cu}^{2+} + (\text{NH}_4)_2\text{S}$ 水, (右) $\text{Ag}^{+} + \text{塩酸}$
 ※見やすくするために、金属イオンの濃度を高くしている (1.0 mol/L)。

図5. 市販の小型卓上遠心分離機を用いた沈殿物の生成実験 (予備実験)

毛細管 (キャピラリー) として、パストゥールピペット、プラスチックストロー、ヘマトクリット毛細管などを検討した。実験の結果、プラスチックストローではぶんぶんゴマによる激しい回転によりストロー自体が変形したが、プレキャリブレードピペットはガラス製のため回転に耐えることができた。そこで、プレキャリブレードピペット ($\phi 1.5$ mm, 長さ 125 mm, 容量 40 μL)¹⁰⁾を用いることにした。キャピラリー容器内への溶液の導入方法は、毛管現象¹¹⁾による毛管上昇を利用した (図6)。これには、プレキャリブレードピペットの十分な長さ (125 mm) が有利である。

キャピラリーの両端に蓋をする方法として、グリスを塗ったり、加熱したゴムで止めたりしたが、よりしっかりと密閉することができるガスバーナーでガラスを溶かして封入する方法とした (図7)。

ぶんぶんゴマは、形状、大きさなど様々である。今回は直径 13.0 cm の円盤状のぶんぶ

んゴマを用いた¹²⁾。直径を小さくすると、キャピラリーが円盤面より大きくなり、回転させたときにキャピラリーが折れやすかった。一方、大きくすると回転速度に関して有効ではあるが、回転がぶれて不安定になった¹³⁾。

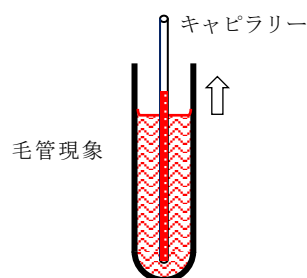


図6. 毛細管への吸い上げ(上), 実験で用いた後のキャピラリー(下)



図7. プレキャリブレードピペットの密閉 (溶液をキャピラリー内に入れ、ガスバーナーでガラスを溶かして封じた)

(3) 水中のアルブミン濃度測定法の開発

検討した化学種は、塩化物イオン Cl^- , 硫化物イオン SO_4^{2-} などの無機イオン, 茶タンニン, カフェイン, アミノ酸, タンパク質などの有機化合物である (表1)。これらは、環境や食品の分野で重要な構成成分であり、もし、高価な装置を用いずに迅速に定量測定する方法

が開発できれば、分析化学の分野では非常に価値がある。

表 1. いくつかの化学種の一般的な定量法

化学種	一般的な定量法
塩化物イオン Cl ⁻	イオンクロマトグラフ法 硝酸滴定法 イオン電極法自動分析法
硫酸イオン SO ₄ ²⁻	比濁法 重量法 クロム酸バリウム吸光光度法 クロム酸バリウム-ジフェニルカルバジド吸光光度法
タンパク質	ケルダール法 デュマ燃焼法 ¹⁴⁾
茶タンニン	没食子酸鉄吸光光度法 イオンクロマトグラフ法

この中で私たちの研究では、タンパク質を取り上げた。理由は、本研究を行う直前に、タイの高校生との共同課題研究に取り組み「タイと日本の味噌や醤油の違い」に関する研究でタンパク質の分析を行った経験があるからだ¹⁵⁾。このとき、食品中のタンパク質の定量にはケルダール法^{16, 17)}を用いた。この方法の原理は簡単であるものの、大掛かりで特別なガラス器具が必要で、また、蒸留操作にも慣れる必要があった。

分析に用いるタンパク質として、卵アルブミン、大豆タンパク質、小麦グルテンが入手

しやすい。そこで今回は卵アルブミンを用いた。アルブミンはタンパク質の定量の基準物質とする場合があり、これにより食品中のタンパク質を定量・比較することができると考えた。

タンパク質に重金属イオンを加えると変性し、凝固・沈殿する^{18, 19)}。そこで、この沈殿反応を利用することにした。用いる試薬の濃度を様々に検討した結果、1000~5000 ppm のアルブミン水溶液に 0.20 mol/L 硝酸鉛(II)水溶液をそれぞれ 5.0 mL ずつ加えると沈殿を生じた。ガラス棒で攪拌して沈殿物が均一に分散した状態で、キャピラリーの中に導入し、キャピラリーの両端部分を加熱封入した。このキャピラリーをぶんぶんゴマで遠心分離することで生じた沈殿物の高さを計測した(これを「沈殿容積法」と呼ぶことにする)(図 8)。それぞれのアルブミン濃度について、キャピラリー内の溶液全体の高さ a [cm]、沈殿物の高さ b [cm]、その割合 b/a を求めた(表 2)。

アルブミン濃度[ppm]と高さの割合 b/a には直線関係があり、再現性もあった(図 9)。これより、この直線(検量線)を利用することで溶液中のアルブミンの定量、つまり食品中のタンパク質量(窒素量)を求めることが可能であることが分かった²⁰⁻²²⁾。実際、市販の牛乳水を 10 倍に希釈した溶液について実験を行うと、アルブミン換算で 1.2×10^3 ppm

表 2. ぶんぶんゴマ遠心分離機を用いた水中のアルブミンの定量測定 (3 回測定の平均)

アルブミン濃度[ppm]	0	1000	2000	3000	4000	5000
キャピラリー内の溶液全体の高さ(平均) a [cm]	8.00	8.09	7.77	8.08	8.07	7.85
キャピラリー内での沈殿物の高さ(平均) b [cm]	0	0.072	0.095	0.14	0.17	0.23
高さの割合 b/a	0	0.0089	0.012	0.018	0.021	0.030
分散	—	8.14×10^{-5}	1.57×10^{-4}	3.19×10^{-4}	4.96×10^{-4}	9.04×10^{-4}
標準偏差	—	0.00154	0.00267	0.00317	0.00716	0.00551

(0.12 %) のタンパク質を含むという値になった^{23, 24)}。

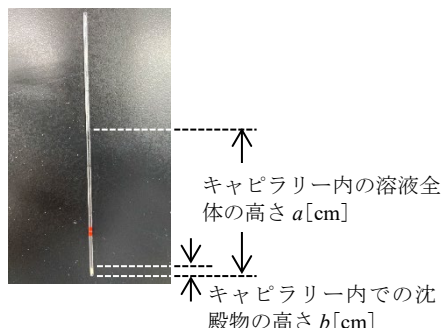


図8. キャピラリーの中に析出した沈殿物の測定

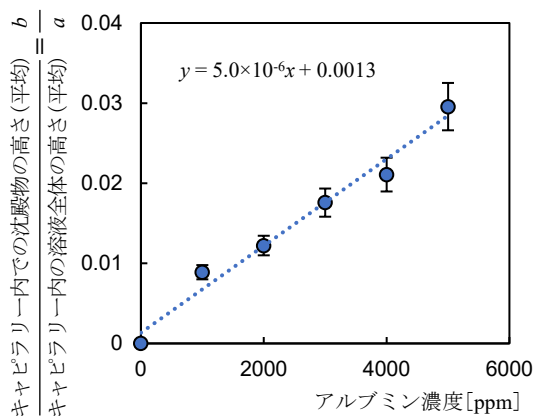


図9. アルブミン濃度とキャピラリー内の沈殿の高さに割合 (b/a) の関係

(4) 他の化学種への応用

キャピラリー中で Cl^- を含む水溶液に硝酸銀 AgNO_3 水溶液を加えることで白色の塩化銀 AgCl を沈殿させ、キャピラリー内の沈殿の高さより Cl^- の定量分析ができないか検討した²⁵⁾。塩化ナトリウム水溶液 (Cl^- を含む) と硝酸銀水溶液を混合する際、濃度を 0.010~1.0 mol/L と様々な設定したものの、いずれも沈殿がすぐに生成した。さらに、沈殿粒子が大きく、毛管現象でキャピラリーに吸い上げることができなかった。

次に水中の硫酸イオン SO_4^{2-} についても検討した。環境分野の分析には比濁法²⁶⁾が広く用いられるが、この方法は精度が悪い (10% 程度の誤差がある)。もし精度よく測定することができれば、簡易測定に有効である。硫酸バリウム水溶液を加えると沈殿はするものの、塩化銀の沈殿同様、細いキャピラリー内にうまく導入ができなかった。混合前の 2 つの溶液をそれぞれキャピラリー内に導入してから遠心分離を行うことで混合、沈殿を生じさせる方法も検討したが、沈殿の粒子が大きいためか、キャピラリー内での溶液の混合が十分でなかった。

一方、水中の茶タンニン (緑茶の苦み成分) の定量分析については、 1.26×10^{-3} mol/L の没食子酸エチル水溶液 1.0 mL (没食子酸エチルは、茶タンニン測定 of 標準物質として用いられる) に 0.10 mol/L の硫酸鉛 (II) 1.0 mL (物質質量として 5 倍) を加えて遠心分離すると黄緑色の沈澱が生じ、定量測定が可能であることが分かった²⁷⁾。

無機イオンに沈殿試薬を加えることにより生じる沈殿物は、粒子径が大きく、凝集しやすい等、キャピラリーを用いる本方法には相応しくないとと思われる (太い管の遠沈管による沈殿回収や通常の重量分析には適している)。一方、有機化合物 (アルブミン、茶タンニン、カフェイン²⁸⁾) の沈殿は、キャピラリーに吸い上げることが容易であり、本方法に適していると考えられる。

5. まとめ・今後の展望

水中に含まれるアルブミンについて、鉛 (II) イオンを加えることでアルブミンを変性させ、その沈殿物の体積を測定することで、アルブミン濃度を定量する「沈殿容積法」に

について検討した。キャピラリー内に沈殿させるために、ぶんぶんゴマ遠心分離機を用いた。実験の結果、溶液中のアルブミン濃度 [ppm] と、キャピラリー内の溶液全体の高さ a [cm] と沈殿物の高さ b [cm] から求めた高さの割合 b/a には直線関係があり、検討したアルブミン濃度 1000~5000 ppm の範囲で再現性があった。これより、溶液中のアルブミン濃度の簡易測定が可能であることが分かった。本方法は、高価な機器や電源を必要とせず、フィールド調査での迅速な定量測定に向いている。ぶんぶんゴマの遠心力を利用して、キャピラリー内に沈殿物を沈降させ、その体積から目的の物質を簡易定量する方法は、調べた限り初めての報告である。

一般に、沈殿物の質量を測定する沈殿重量法では、大きな粒子からなる沈殿物の方がろ過しやすく、不純物も除きやすいため有利である。しかし、今回開発した「沈殿容積法」では、沈殿物の粒形が大きいと、細いキャピラリー内にうまく入れることができず、精度よく再現性のある測定が難しかった。一方、粒形が小さいとコロイド懸濁液となって沈降しにくく、これも分析に適さなかった。私たちの実験結果より、タンパク質の変性や水溶性タンニンの重合は、本方法が適していることが分かった。今後は、他の化学種への応用や、今回、実現しなかった無機イオンの分析に適した沈殿試薬の開発や測定条件の検討をさらに進め、専門的な分析でも利用可能な測定法として普及させていきたい。

本研究は、第 66 回日本学生科学賞奈良県審査において最優秀賞・教育委員会賞を、第 66 回日本学生科学賞中央最終審査において入選 2 等を受賞した。

参考文献・注釈

- 1) 例えば、柴田芳作, 図画工作 de たのしい作品づくり うごくおもちゃ, 国土社, 2021.
- 2) M. Saad Bhamla, Brandon Benson, Chew Chai, Georgios Katsikis, Aanchal Johri, Manu, *Nat. Biomed. Eng.*, 2017, 1, 0009.
- 3) Skoog, West, Holler Crouch, 小澤岳昌訳, スクーグ分析化学, 2019.
- 4) 菅原健, 通野鶴松, 基礎応用定量分析, 朝倉書店, 1962.
- 5) 合原眞, 今任稔彦, 岩永達彦, 吉塚和治, 脇田久伸, 環境分析化学第 3 版, 三共出版, 2021.
- 6) 岡宗次郎, 武藤義一, 分析化学, 1952, 1, 136.
- 7) ナカライテスクより購入した卵由来のアルブミンである。
- 8) 岡内完治, だれでもできるパックテストで環境しらべ, 合同出版, 2002.
- 9) AGC テクノガラスのパスツールピペット IK-PAS-9P を用いた。実測値 (デジタルノギスで測定) は, 上部外径: $\phi 7.1$ mm, 先端外径: $\phi 1.1$ mm, 先端内径: 0.8~0.9 mm だった。
- 10) アズワンより購入した。
- 11) Peter Atkins, Loretta Jones, Loroy Laverman, 渡辺正訳, アトキンス一般科学(上), 東京科学同人, 2014.
- 12) 奈良女子大学工学部が所有するハイスピードカメラ NAC MEMRECAM Q2m (フル HD 1920×1080 ピクセル, 2000 コマ/秒可能) で撮影したが, 作成したぶんぶんゴマの回転数は計測できなかった。少なくとも 2000 rpm 以上の回転数があると考えられる。
- 13) 物体に働く遠心力には, 回転の中心から物体までの距離 (回転半径) と回転の速さが

関係する。遠心効果 $\propto 895rN^2$ (r : 回転半径(m), N : 回転数(min^{-1}))

14) 燃焼によって生じた窒素酸化物を窒素 N_2 に還元し, ガスクロマトグラフィー・熱伝導検出器により分離検出)

15) Yuri Yosida, Yumeno Nakajima, Jessada Pakotiprapha, Pawin Sirisinha, Karyn Viseshakul “The Comparative Study of Protein Amount in Thai-Style Salted Soybean from Soybean Meal and Japanese Miso” *Japan Super Science Fair 2019*.

16) 藤田修三, 山田和彦編著, 食品学事件第 3 版 医歯薬出版, 2017.

17) 片山榮子ら編著, 食品科学実験第 2 版, 地人書館, 2003.

18) 菅原二三男, 倉持幸司監訳, 原著 8 版マクマリー生物有機化学生化学編, 丸善, 2018.

19) 斎藤烈, 藤嶋昭編, 化学改訂版, 啓林館, 2020. (2017 年検定済教科書)

20) アルブミンの定量分析法には, 私たちの研究グループの先輩方が開発した 2 つの新規な方法 (文献 20, 21, どちらも比色法) がある。

21) 大野友豊, 「色素を用いた溶液中のタンパク質の定量分析」第 11 回高校化学グランドコンテスト要旨集, 2014. (色素結合法を応用した方法)

22) 堀内崇志, 吉田安貴, 「インドフェノール青吸光光度法を用いたタンパク質・アミノ酸中の窒素の定量」第 59 回日本学生科学賞中央最終審査 (入選 3 等), 2015. (インドフェノール青吸光光度法を応用した方法)

23) 牛乳中の脂肪分の定量として, 古くは沈殿の代わりに液状物質として定量する方法が紹介されている。

24) H. Copaux, *Comp. Rens.*, 1921, 173, 66.

25) 半谷高久, 小倉紀雄, 第 3 版水質調査法, 丸善, 1995.

26) 日本分析化学会北海道支部, 水の分析第 5 版, 化学同人, 2005.

27) 相関関数 $R = 0.98$ の直線となった。

28) 山田乃愛, 「簡便なカフェインの定量」第 62 回日本学生科学賞中央最終審査 (入選 1 等), 2018.