

学校教育で実施可能なポリフェノールの簡易定量法の提案

Proposal of the simple quantitative method of polyphenol in school education

谷本 憂太郎¹, 菅野 友美²

¹北海道大学大学院環境科学院, ²愛知淑徳大学健康医療科学部

Yutaro Tanimoto¹, Tomomi Kanno²

¹Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University 060-0810
Kita10-Nishi5 Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido

²Department of Health and Nutritional Science, Faculty of Health and Medical Sciences, Aichi Shukutoku University
2-9 Katahira, Nagakute-shi, Aichi 480-1197

キーワード：フォーリンーチオカルト法, ポリフェノール, LEGO比色計,
デジタルカメラ, 簡易定量法

Key words : Folin-Ciocalteu method, Polyphenol, LEGO colorimeter,
Digital camera, Simple quantitative method

抄録

本研究では、学校教育で実施可能なフォーリンーチオカルト法を用いたポリフェノールの簡易定量法を検討した。簡易定量法には、デジタルカメラとパソコンを用いたデジタル画像解析を利用し、RGB値、 $L^*a^*b^*$ を用いて定量の為の検量線を作成した。また、レゴブロックとLED、硫化カドミウム素子を用いたLEGO比色計を作製し、同じく定量が可能かを検討した。実際の分析試料としては紫キャベツを用いた。その結果、検討したどの検量線も良好な直線関係が得られ、紫キャベツのポリフェノール含量は分光光度計での測定値と近い値を示した。このことから、本定量法は学校教育で実施する上で、十分な精度を有していることがわかった。

1. 緒言

化学教育や環境教育では、自作の簡易比色計^{[1][2]}やデジタルカメラ^{[3][4]}を利用した簡易比色法による分析実験を実験教材化した研究が多数報告されている。これらの教材はある現象や物質の有無をただ可視化するだけではなく、定量的に把握することが可能な教材である。

実験科学的側面から学習する教科としては理科以外にも家庭科がある。高等学校家庭科において自然科学的性質の強い学習を行う場合、実験を教材として取り扱うこともある。しかしながら、家庭科教育における実験教材に関する研究はそれ程多くはない。家庭科においても身近な物質にどれくらいの何が含まれているのかが分からなければ、日常の生活で家庭科の知識を活用することは難しいと考える。その為には定性的な理解から定量的な理解へと結び付けることが重要である。そうすることで、家庭科における教育内容を深化させ、

発展させることができる。また、実験教材を開発することで、新しい教科内容の開発にもつながる可能性がある。そこで、理科教育や環境教育だけではなく、家庭科教育においても実施可能な簡易定量実験の検討を行うこととした。

題材としては、ポリフェノールの定量実験を選択した。高等学校家庭科では食品の三次機能に関する学習も教育内容に含まれており、三次機能を有する食品成分の中でも代表的なポリフェノールの定量は重要である。ポリフェノール含量の測定にはフォーリンーチオカルト法を用いた。フォーリンーチオカルト法はフェノール試薬中に含まれるリンタンゲステン酸がポリフェノールのフェノール性水酸基との酸化還元反応により、青色のタンゲステンモリブデンブルーを形成し、765 nmに吸収極大を与える。これを比色定量することにより総ポリフェノール含量を測定する方法である。実験操作が比較的簡便であり、学校教育でも実験

教材として取り入れることができる可能性がある。

そこでこれらの反応系をデジタルカメラと自作比色計にて比色分析し、分析法の検討を行った。また、教育現場での応用を念頭に置き、紫キャベツを用いて比色分析を行い、定量分析の精度と教育応用の可能性について検討した結果について報告する。

2. 実験

2.1. 試薬及び試料

本研究に用いた試薬は特にことわらない限り、全て和光純薬製（現フジフィルム和光純薬株式会社）のものを用いた。没食子酸一水和物に関しては一級試薬を用いた。フェノール試薬はナカライテスク株式会社のものを用いた。

分析試料としては市販の紫キャベツを購入し、実験に供した。

2.2. 装置

簡易分析法に用いたカメラは IXY130, Canon を用いた。また、実際の吸光分析は紫外可視分光光度計（JASCO V-560, 日本分光株式会社）で行った。LEGO 比色計は市販のレゴブロック（レゴクリエイター 10704 Creative BOX, LEGO）を用いて作製した。

2.3. 実験

(1) LEGO 比色計の作製

LEGO 比色計の作製は長谷川^[4]ら及び Jonas^[5]らの方法を著者らで一部改良した方法で作製した。その LEGO 比色計を図 1 に示す。測定用のセルにはセル長が 1 cm のプラスチックセルを使用した。セルが入るセルホルダーはレゴブロックを使用した。光源には赤色 LED (OSR7CA3131A) を用い、受光部には硫化カドミウム素子 (10MΩ GL5549) を用いた。次に赤色 LED と 1/4 W 炭素被膜抵抗をはんだ付けした。赤色 LED と硫化カドミウム素子の設置部には円形の穴が空いているレゴブロックを使用した。赤色 LED と硫化カドミウム素子はミノ虫クリップにつなぎ、LED は 6 V 乾電池ホルダーに、硫化カドミウム素子はデジタルテスターにつないだ。LEGO 比色計はセルを挟んで LED と硫化カドミウム素子が向かい合うように設置し、測定の際はレゴブロックで蓋をして使用した。なお、LEGO 比色計は Lambert-Beer の法則に従い、

十分に希薄な溶液では溶質の濃度と抵抗値は直線関係を示す^[4]。

(2) 分析試料の抽出

分析試料である紫キャベツは次のように抽出した。紫キャベツをきざんだものを 20 g はかりとり、家庭用のジュースミキサー (FJM-601, フカイエ工業株式会社) に入れ、200 mL の蒸留水を加えて、合計で約 4 分間粉碎と混合を行い抽出し、ろ紙でろ過後、抽出液そのままを紫キャベツ抽出液とした。なお、紫キャベツ抽出液は用事調製したものを用いた。

(3) フォーリンーチオカルト法^[6]

10%(v/v)フェノール試薬は蒸留水で希釈し、調製したものを使用した。7.5%(w/v)炭酸ナトリウム溶液は炭酸ナトリウム無水物を蒸留水で希釈し、調製したものを使用した。標準溶液はポリフェノールの代替物質として没食子酸を用い、没食子酸一水和物を蒸留水で希釈し、1,000 μg/mL に調製したものを使用した。10 μg~50 μg に調製した没食子酸溶液 1.0 mL, 10%(v/v)フェノール試薬 5.0 mL を試験管に入れ攪拌混和した。ここに速やかに 7.5%(w/v)炭酸ナトリウム溶液 4.0 mL を入れ、攪拌混和した。暗所、室温で 60 分間放置後、デジタルカメラ、LEGO 比色計、分光光度計のそれぞれの方法で比色分析を行った。

デジタルカメラでの撮影はストロボオフの状態で行った。また、撮影条件を一定にする為に検量線で使用する試験管を一列に並べ、背景には白紙を用いて撮影した。撮影した画像はパソコンに取り込み、フリーソフト CCCConv カラーコード・コンバーターを用いて色情報を取得し、種々の解析を行った。

LEGO 比色計による分析は 2.3 (1) で作製した LEGO 比色計を用いて行った。プラスチックセルに 60 分放置後の試験管から反応液を移し、LEGO 比色計にセットした。光源である赤色 LED は光を安定させる為、測定前に点灯したまま 20 分放置した。LEGO 比色計は赤色 LED からの光が硫化カドミウム素子に到達したときに電気抵抗値 (Ω) に変換され、吸光度の代わりに電気抵抗値を比色分析に利用した。

分光光度計による分析は一般的な吸光分析と同様に石英セルに 60 分放置後の試験管から反応液

を移しとり、765 nm の吸光度を測定した。

なお、本研究における全ての測定は5連で行い、紫キャベツ抽出液の測定は抽出液を5倍希釈し、測定を行った。

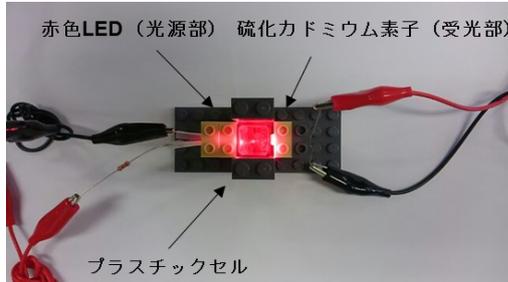


図1. 作製したLEGO比色計

3. 結果及び考察

3.1. デジタルカメラによる分析と検量線

(1) RGB値の解析

RGBの色情報のそのままの値と没食子酸濃度(10 μg ~50 μg)との関係を図2(a), に示す. 図2(a)では, B値を除いたどの値についても没食子酸濃度の増加とともに, 直線的に減少した. R値の場合, 直線は $y=-1.9697x+162.14$ ($R^2=0.997$), G値の場合, 直線は $y=-1.5674x+162.55$ ($R^2=0.991$), を示した. RGB値はCIE表色系の一つであり, それぞれのアルファベットはR(赤), G(緑), B(青)を意味し, この三刺激値で可視光における色を表すことができる. また, RGB値を利用した分析化学実験の応用は様々な呈色反応について報告^{[3][4]}されており本法でもどれも比較的良好な直線を得ることができたことから, 本法を適用できることが示唆された.

値ごとの変化を見てみると, R値, G値, B値の順に値の減少の度合いが大きかった. これはフォーリンーチオカルト法における吸収極大波長が765 nm付近であり, RGB値に対応する波長はR値が700 nm, G値が546.1 nm, B値が435.8 nmである為, 吸収極大に近いR値から検出感度の観点より, 減少の度合いが大きかったと考えられる. このことから, フォーリンーチオカルト法においては, R値及びG値のそのままの値を定量に適用できると示唆された.

RGB値による色差は色空間におけるユークリッド距離で定義される. Mohamedら^[7]はマイクロプレートとスキャナーを用いて, RGB値のユークリ

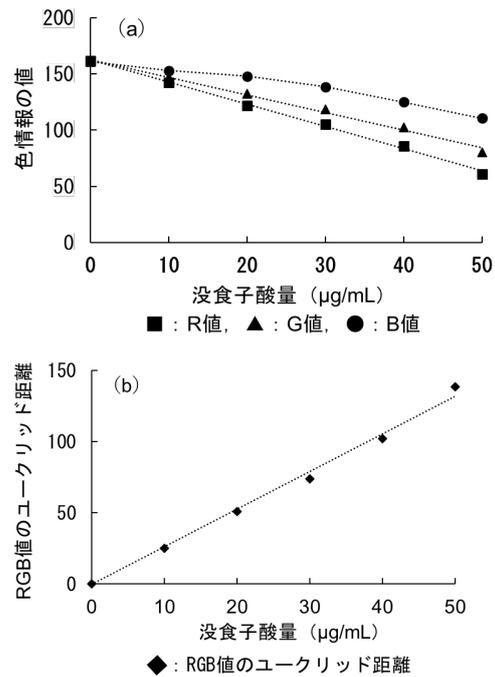


図2. RGB値による検量線の検討

- (a): RGB値そのままの値を用いた場合
(b): RGB値をユークリッド距離に変換した場合

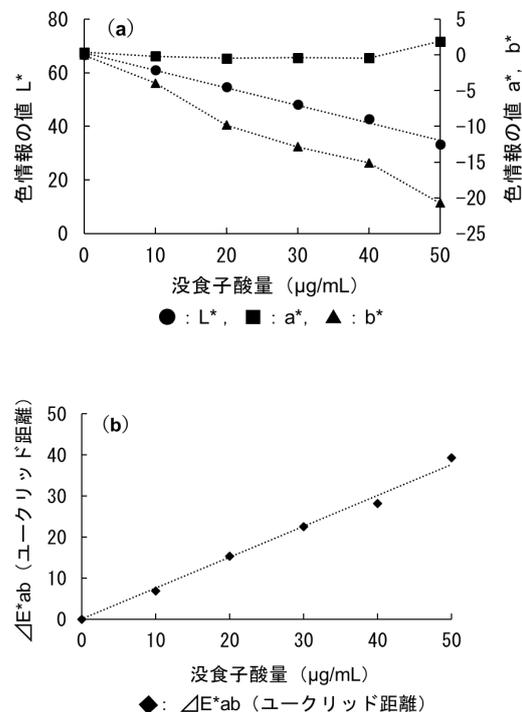


図3. $L^*a^*b^*$ による検量線の検討

- (a): $L^*a^*b^*$ そのままの値を用いた場合
(b): ΔE^*_{ab} を用いた場合

ッド距離からフォーリンーチオカルト法によりポリフェノールの定量法を検討している。そこで本簡易定量法でも RGB 値の色差（ユークリッド距離）を求め、検量線が作成できるか検討した結果が図 2 (b) である。なお、ユークリッド距離 (ED) は (1) 式^[7]で求めた。

$$ED = \{(R_s - R_b)^2 + (G_s - G_b)^2 + (B_s - B_b)^2\}^{1/2} \quad (1)$$

R_s, G_s, B_s : それぞれの値におけるサンプル又は没食子酸溶液の値を表す。

R_b, G_b, B_b : それぞれの値におけるブランク溶液の値を表す。

RGB 値をユークリッド距離に変換した値(色差)は、没食子酸濃度に対して直線的に変化した。この場合、直線は $y=2.6338x$ ($R^2=0.993$) であり、良好な直線を得ることができた。本研究は学校教育での実践を考え、試験管をそのまま用い、背景に白紙を用いるという簡便法でも、RGB 値のユークリッド距離による良好な直線を得ることができた。

(2) L*a*b*の解析

L*a*b*の値を没食子酸濃度に対してプロットしたものが図 3 (a) である。L*a*b*表色系は RGB 値と同様に CIE 表色系の一つである。L*は明度を、a*は+の場合は赤、-の場合は緑の色方向を表す。b*は+の場合は黄、-の場合は青方向を示す。L*a*b*の分析化学実験への応用に関しては Adonis^[8]らのデジタルカメラを用いたタンパク質定量の報告がある。本研究のポリフェノール含量に適用できるのか検討したところ、図 3 (a) に示すように、L*については没食子酸の濃度の増加に伴い直線的に減少した。直線は $y=-0.6525x+67.505$ ($R^2=0.993$) であった。このことから、L*の値については定量に適用できる可能性がある。L*については背景である白紙の白が試験管を透過し、デジタル画像処理に反映されていると考えられ、それが青色が濃色になるにつれて減少していった為だと思われる。a*, b*については、没食子酸濃度の増加と共に直線的には変化しなかった。b*は没食子酸濃度の増加に伴い、減少しているが、20 μg から 50 μg にかけてばらつきが大きく、直線を引くことができなかった。b*は青色の度合いが強くなるにつれて、値が減少していくはずであるが、没食子酸濃度に直線的に依存しない理由については今後検討する必要がある。L*a*b*表色系は食品の褐変現象や繊維表面の染色度合いなど、色という感性情報の数

値化という点では、様々な分野で用いられている。L*a*b*表色系は人の色に対する感覚に近いと考えられており、学校教育で利用するにあたり視覚情報を反映している表色系は有用である。

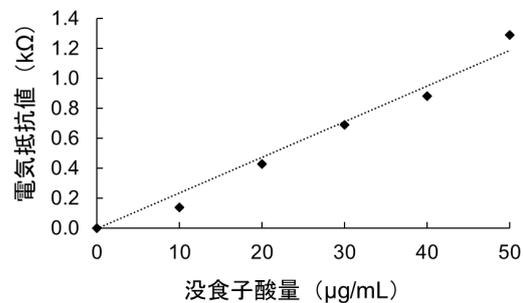


図 4. LEGO 比色計による検量線の検討

表 1. 種々の測定法を用いた紫キャベツの総ポリフェノール含量の測定

測定法	紫キャベツの総ポリフェノール含量 (mg/mL) *
R 値そのままの値	0.19 ± 0.007
G 値そのままの値	0.20 ± 0.009
RGB 値のユークリッド距離	0.20 ± 0.010
L*そのままの値	0.20 ± 0.010
∠E*ab (ユークリッド距離)	0.18 ± 0.007
LEGO 比色計	0.19 ± 0.007
分光光度計	0.18 ± 0.004

測定結果は5回の測定の平均値±標準偏差で表した。
*ポリフェノール含量は抽出液1 mL当たりの没食子酸相当量 (mg/mL) で示した。

次に、L*a*b*の値の色差∠E*ab (ユークリッド距離) を没食子酸の濃度に対してプロットしたものが図 3 (b) である。∠E*ab は (2) 式で求めた。 $\angle E^*ab = \{(L^*_s - L^*_b)^2 + (a^*_s - a^*_b)^2 + (b^*_s - b^*_b)^2\}^{1/2}$ (2)

L^*_s, a^*_s, b^*_s : それぞれの値におけるサンプル又は没食子酸溶液の値を表す。

L^*_b, a^*_b, b^*_b : それぞれの値におけるブランク溶液の値を表す。

∠E*ab は没食子酸濃度に対して直線的に増加し、直線は $y=0.7549x$ ($R^2=0.993$) であった。このことから、L*a*b*の色差である∠E*ab についても定量に適用できる可能性がある。

Ashraf^[9]らは種々の比色法で鉄イオンの定量をデジタルカメラで行っている。それによると、Yxy 値の吸光度に変換した値が定量の際には適していると報告している。本研究では Yxy 値以外で

の色情報について定量が可能であることが考えられた。これは、反応系や撮影条件によって定量に使用できる色情報が異なってくる為であると考えられる。その為、反応系や撮影条件ごとにどの色情報を用いた分析が適当かを検討する必要があると考える。

3.2. LEGO 比色計による分析と検量線

LEGO 比色計で検量線を作成した。その結果が図4である。 $y=0.0237x$ ($R^2=0.977$) で没食子酸に対して電気抵抗値は比較的良好な直線を得ることができた。また、本研究で用いた、赤色 LED は波長が 650 nm から 670 nm であり、フォーリンーチオカルト法の最大吸収波長の 765 nm とは異なっている。奥田ら^[10]のワイン製造管理用比色計の開発に関する研究によれば、630 nm の LED を用いても、ある程度濃度の低い部分での測定や吸光度、希釈率などの条件を検討すれば総ポリフェノールの定量が可能であるとしている。このことから、本研究における簡易的な比色計においても、良好な直線関係が得られたことから定量に赤色 LED が適用できると考えられる。

3.3. 種々の検量線による実際試料の分析と教育的応用への一考察

抽出した紫キャベツの蒸留水抽出液をこれまで検討してきた検量線を用いて定量を行い、分光光度計での測定結果と比較した。その結果が表1である。また、ポリフェノール含量は抽出液 1 mL 当たりの没食子酸相当量 (mg/mL) で表した。その結果、色情報による分析や LEGO 比色計による分析について、標準偏差は平均値の 5.0% 以下であり、比較的高い再現性を有していると考えられる。分光光度計の値と最も近い値となったのは、 ΔE^*ab で分析を行った値であった。LEGO 比色計や他の色情報を用いた分析でも学校教育で行うには十分に分光光度計の結果を再現していると思われる。分析試料である紫キャベツは実験教材研究でよく用いられており^{[11][12]}、その特徴的なアントシアニン系ポリフェノール色素の色から学習者の興味も引きやすい。その為、本研究では紫キャベツを実際試料として用いることとした。ポリフェノールの簡易定量法は家庭科教育や理科教育、環境教育での活用が可能である。また、パソコンを用いた色情報の取得や解析を通して情報教育とも関連さ

せた指導内容の考案も可能である。このことから、本簡易定量法は実際の分析実験をスモールスケールで行うことができ、多教科を関連させた有機的な教材として利用することができる。また、本研究では LEGO 比色計と色情報の解析という 2 種の分析法を検討したが、学習者の学習状況や環境に合わせた選択が望ましいと考える。今後はより簡便法を検討し、試験管以外での反応系を模索する必要がある。また、他の色情報での解析や撮影条件が本分析法に及ぼす影響についても今後検討する必要がある。

4. 結論

本研究では、デジタルカメラ及び自作の LEGO 比色計を用いて、学校教育で実施可能なフォーリンーチオカルト法によるポリフェノールの簡易定量法を検討した。デジタルカメラでは、RGB 値及び $L^*a^*b^*$ を用いた解析法を検討した。その結果、R 値、G 値、RGB 値のユークリッド距離を計算した値、 L^* 、 ΔE^*ab がフォーリンーチオカルト法の検量線に適用できることがわかった。また、LEGO 比色計でも検量線の作成は可能であった。これらの検量線を用いて、紫キャベツ抽出液のポリフェノール含量を測定し、分光光度計との測定値と比較した。その結果、どの検量線を用いた場合でも、分光光度計の値と近い値を示した。このことから、本簡易定量法は学校教育の中で分光光度計を使わなくても、ポリフェノールの定量が十分に行えると考えられる。また、本法は学習者の学習状況や環境によって測定法を選択することが望ましく、多教科との関連を意識した学習への適用も可能であると考えられる。

引用文献

- [1]長谷川浩ほか。自作できる簡易比色計の感度及び精度向上に関する工夫。化学と教育。2005, 53(8), p.458-461.
- [2]永川元。自作簡易比色計による環境分析。化学と教育。1993, 41(11), p.762-765.
- [3]菊地洋一ほか。デジタルカメラと画像処理ソフトを用いた天然水中の微量鉄の定量。化学と教育。2002, 50(10), p.714-717.
- [4]村上裕ほか。簡便なルミノール発光解析のための CdS セルおよびデジタルカメラの活用。岩手大学教育学部附属教育実践総合センター研究紀要。

2009, 8, p.81-87.

[5]Jonas, Asheim et al. A Simple, Small-Scale Lego Colorimeter with a Light-Emitting Diode(LED) Used as Detector. Journal of CHEMICAL EDUCATION. 2014, 91, p.1037-1039.

[6]Determination of substances characteristic of green and black tea-Part1: Content of total polyphenols in tea – Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent, ISO 14502-1. 2005.

[7]Mohamed Abderrahim et al. A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in foods. Talanta. 2016, 152, p.82-89.

[8]Adonis A. Yanos et al. Digital photometric Determination of Protein Using Bluret, Bradford and Bicinchoninic Acid Reagents. Philippine Science Letters. 2013, 6(2), p.168-175.

[9]Ashraf A. Mohamed et al. The Yxy colour space parameters as novel signaling tools for digital imaging sensors in the analytical laboratory. RSC Advances. 2018, 8, p.10673-10679.

[10]奥田徹ほか. LEDを用いたワイン製造管理用比色計の開発. 日本ブドウ・ワイン学会誌. 2013, 24(3), p.136-144.

[11]渡瀬洋平ほか. 中学校理科における酸・アルカリの実験に用いる抽出乾燥ムラサキキャベツ色素の教材研究. 熊本大学教育学部紀要, 自然科学. 2010. 59. p.67-69.

[12]鎌田正喜ほか. 小中学校教員のための理科実験教材: 酸塩基指示薬としてのムラサキイモパウダーの活用. 新潟大学教育学部研究紀要. 2017. 10(1).p.29-43.

Abstract

The aim of this study is to propose a simplified method for the quantitative evaluation of polyphenol and to apply the method to the field of the school education. This method uses a digital camera and a handmade LEGO colorimeter. Its reaction system uses the folin-ciocalteu method. First, the digital camera gets the RGB intensities (red, green, blue) and $L^*a^*b^*$ (lightness, two color channels) from the digital image data. The RGB intensity, $L^*a^*b^*$ and LEGO colorimeter are used to calculate the calibration curve of the folin-ciocalteu method. In addition, the simple folin-ciocalteu method is used to detect the total polyphenol content in red cabbage. As the results, there was possibility that total polyphenol content can be determined quantitatively by the digital camera and LEGO colorimeter in school education.

(受付日: 2018年8月29日, 受理日: 2018年10月4日)

谷本 憂太郎 (たにもと ゆうたろう)

現職: 北海道大学大学院環境科学院 環境物質科学専攻 大学院生

専門は高分子環境科学, 食物学.