

目視評価と色情報の解析によるポリフェノール分析教材の提案

Proposal of teaching materials of polyphenol analysis by visual evaluation and image analysis

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, マイクロプレート, ろ紙

Key words : Folin-Ciocalteu method, Polyphenol, Microplate, Filter paper

抄録

本研究では学校教育で行うことができる簡易的ポリフェノール分析法を検討した。分析法にはマイクロプレートやろ紙を用いたフォーリンーチオカルト法で行った。本反応系における反応時間を検討した。本分析法の評価は目視評価と色情報の解析により行った。その結果、マイクロプレート法、ろ紙法のどちらでも、10分の反応時間でも十分に呈色した。また、マイクロプレート法では没食子酸濃度が0 µg/mLから100 µg/mLの範囲で目視による評価と色情報の解析による評価が可能であった。ろ紙法においては、没食子酸濃度が80 µg/mLから600 µg/mLでの目視評価が可能であった。このことから、本簡易分析法においても、一定程度のポリフェノール含量を把握することができ、実験の簡易化から学校教育での利用が可能であると考えられる。

1. 緒言

近年の学校教育において、実践的・体験的な活動が重要視されており、学校現場で活用できる実験教材の開発が求められている。化学教育や環境教育、家庭科教育において比色分析や目視定量を実験教材として利用するための研究が多数報告されている^{[1][2][3][4]}。しかしながら、学校教育で実施する為には学習者の学習状況や学習環境に即した実験法の改良が必要となる。学校現場で実施可能であると考えられる分析化学の実験としてはフォーリンーチオカルト法を利用した比色分析がある。フォーリンーチオカルト法はフェノール試薬中のリンタングステン酸がポリフェノールとの酸化還元反応により、青色の765 nmに吸収極大を持つタングステンモリブデンブルーを形成する。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単であり、青色に呈色することから学習者の興味も引きやすく、教材への応用が期待される。また、ポリ

フェノールの分析は理科教育だけではなく、家庭科教育の食生活領域でも利用できる。しかしながら、反応時間が30分から2時間であり、実際に授業で取り扱うには反応時間が長すぎるという欠点を持つ。

細川ら^[5]や菊池ら^[6]はマイクロプレート上で呈色反応を行い実験のモジュール化を行った実験教材を提案している。また、Tiina^[7]らはペーパーデバイス上でフォーリンーチオカルト法を行っている。これらの手法を本研究に適用し、フォーリンーチオカルト法の実験法の改善を行うことを目的とし、マイクロプレートとろ紙を用いることで、反応時間の短縮と試薬量の低減を試みた。また、学校現場での利用を想定し、目視評価と色情報の解析による評価法を検討した。

2. 実験

2.1. 試薬

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（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。

2.2. 装置

撮影にはデジタルカメラ（IXY130 Canon）を用いた。

2.3. 実験操作

(1) 試薬調製

試薬は次のように調製した^[8]。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溶解し、7.5%(w/v)に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に調製したものを原液として、各濃度に希釈して用いた。

(2) マイクロプレートによるポリフェノールの分析（マイクロプレート法）

反応時間の検討については、2.3 (1) の没食子酸標準溶液を 100 μg/mL に調製したものを用いた。

濃度変化の検討については、2.3 (1) の没食子酸標準溶液を 0 μg/mL, 20 μg/mL, 40 μg/mL, 60 μg/mL, 80 μg/mL, 100 μg/mL, 200 μg/mL, 400 μg/mL, 600 μg/mL の 8 段階に調製したものを用いた。反応は没食子酸溶液 20 μL, 10%(v/v)フェノール試薬 100 μL を 96 穴マイクロプレート (96-Well Cell Culture Plate, Thermo Fisher Scientific) に入れた。ここに速やかに 7.5%(w/v)炭酸ナトリウム溶液 100 μL を入れ、反応させた。暗所、室温で反応させ、任意の時間ごとにデジタルカメラでマイクロプレート上の呈色反応をストロボオフで撮影した。背景に白紙を使用した。

(3) ろ紙によるポリフェノールの分析（ろ紙法）

反応時間の検討については、2.3 (1) の没食子酸標準溶液を 100 μg/mL に調製したものを用いた。

濃度変化の検討については、0 μg/mL, 20 μg/mL, 40 μg/mL, 60 μg/mL, 80 μg/mL, 100 μg/mL, 200 μg/mL, 400 μg/mL, 600 μg/mL の 8 段階に調製したものを用いた。反応は没食子酸溶液 20 μL, 10%(v/v)フェノール試薬 100 μL をろ紙（定性ろ紙

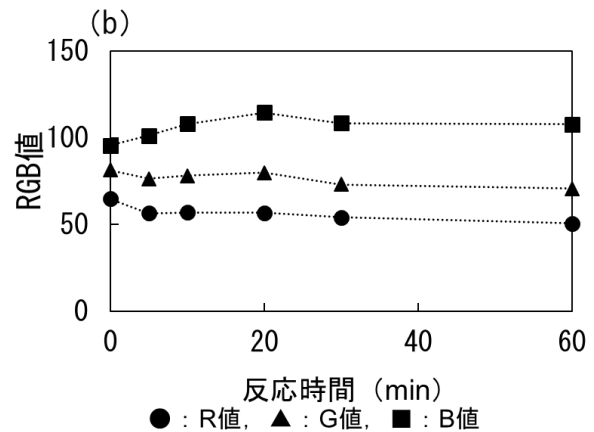
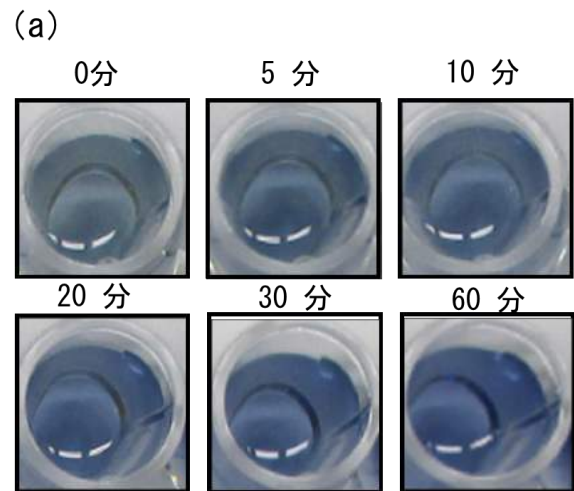


図 1. マイクロプレート法における呈色反応の経時変化（没食子酸濃度 100 μg/mL）

(a) : マイクロプレート上での呈色反応の経時変化
(b) : マイクロプレートのデジタル画像から取得した RGB 値の経時変化

No.2 55 mmφ, ADVANTEC) に滴下した。

ここに速やかに 7.5%(w/v)炭酸ナトリウム溶液 100 μL を滴下し、反応させた。暗所、室温で反応させ、任意の時間ごとにデジタルカメラでろ紙上の呈色反応をストロボオフで撮影した。

(4) 解析

撮影した画像はパソコンに取り込み、Windows のアプリ、ペイントを用いて RGB 値を取得した（RGB 値は対応する光が R は赤色 (700 nm) の値, G は緑色 (546.1 nm) の値, B は青色 (435.8 nm) の値とされている）。その後、Excel にて RGB 値の種々の解析を行った。本研究では教材として用いることを想定している為、簡易的な色情報の取得

を行った。ペイントは RGB 値の取得が容易であるが、指定範囲の色情報の平均値を検出できるわけではない。その為、色情報の取得の際には同地点にポインターを合わせ、色情報を取得することが望ましい。なお、本研究における全ての測定は5連で行った。

3. 結果と考察

3.1. マイクロプレート法における呈色反応の経時変化

マイクロプレートにて没食子酸濃度が 100 $\mu\text{g/mL}$ の呈色反応の経時変化を図 1 に示した。図 1 (a) の反応直後では、反応液がまだ緑色から黄色を示している部分があり、反応があまり進行していない。5 分経過後でもやや反応液は緑色の部分が残っているが、10 分経過後では緑色から黄色の部分はほとんど確認できなかった。また、図 1 (b) のデジタル画像から得られた RGB 値の経時変化について、呈色の最大吸収波長 (765 nm) に近い R 値 (700 nm の光を検知) の変化に着目してみると、反応直後から 5 分後にかけて値が減少し、その後の変化はほとんど見られなかった。この結果は目視による結果と一致している。これらの結果から、10 分での反応時間でも一定程度の比色分析や目視評価に適用できる可能性が考えられた。そこで、今後の実験は反応時間 10 分で行うこととした。

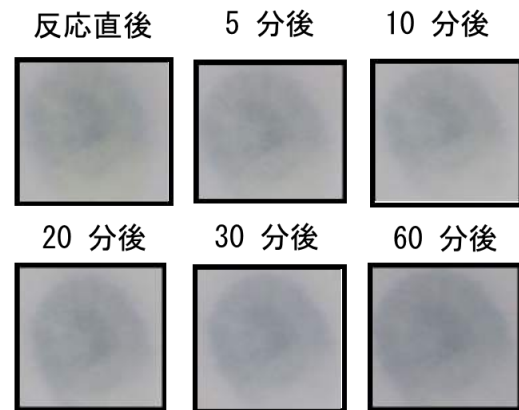
3.2. ろ紙法における呈色反応の経時変化

ろ紙法における没食子酸濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ での呈色反応の経時変化を図 2 に示した。まず、目視での呈色反応の観察を行った。図 2 (a) の炭酸ナトリウム水溶液滴下直後からろ紙の中央部が青色に変化した。紙デバイス上でのフォーリンーチオカルト法の研究では Tiina^[7]らの報告があるが、本研究のようなろ紙法においても、ろ紙上で呈色反応の変化が観察できる。また、反応直後から 5 分後にかけては、フォーリンーチオカルト試薬の黄色がかなり残っているが、10 分経過後より、青色の発色ははっきりと確認された。中心部の青色はほとんど変化がなかった。

発色が明確に観察された中心部の RGB 値を取得し、経過時間との関係を検討した。その結果が図 2 (b) である。中心部の RGB 値はいずれの反応時間においてもほとんど変化は見られなかった。

微弱な変化があるのは、撮影時の光源の影響や色情報取得の際の誤差であると考えられる。以上のことから、ろ紙法においても 10 分以上の反応時間で良好に呈色していることが確認できた。そこで、今後の実験を反応時間 10 分で行うこととした。

(a)



(b)

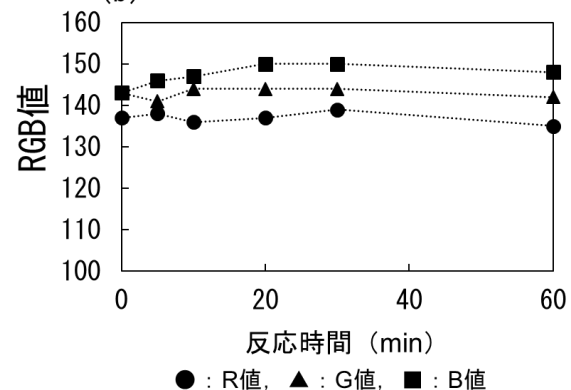


図 2. ろ紙法における呈色反応の経時変化 (100 $\mu\text{g/mL}$)

(a) : ろ紙上での呈色反応の経時変化

(b) : ろ紙のデジタル画像から取得した RGB 値の経時変化

3.3. 没食子酸濃度を変化させた場合でのマイクロプレート法における呈色反応の目視評価と色情報の解析

マイクロプレート法における没食子酸濃度を 0 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 600 $\mu\text{g/mL}$ と変化させた場合の呈色変化について図 3 に示す。反応時間は 10 分で行った。図 3 (a) は実際にマイクロプレート上で反応させた際の画像である。0

$\mu\text{g/mL}$ から $100 \mu\text{g/mL}$ までは、目視で呈色の違いを確認することができた。しかしながら、高濃度の $200 \mu\text{g/mL}$ から $600 \mu\text{g/mL}$ では呈色の変化を確認することができなかった。

次にマイクロプレート上の RGB 値を取得し、没食子酸濃度に対してプロットしたものが図 3 (b) である。その結果、 $0 \mu\text{g/mL}$ から $100 \mu\text{g/mL}$ までは R 値では、 $y=-1.298x+193.87$ ($R^2=0.996$)、G 値では、 $y=-1.1071+194.46$ ($R^2=0.9915$)、B 値では、 $y=-0.9903x+197.11$ ($R^2=0.9881$) を示し、どの値も直線的に低下した。このことから、RGB 値では $0 \mu\text{g/mL}$ から $100 \mu\text{g/mL}$ までの範囲でポリフェノール含量の目視評価とデジタル画像解析による評価が可能であることが示唆されたが、より吸光分析に近い条件で分析や評価を行う場合は、回帰直線の決定係数 (R^2) が最も高く、フォーリン-チオカルト法の最大吸収波長 765 nm に近い R 値 (700 nm) を使用することが望ましいと考える。また、Mohamed ら^[9]の方法に準じて、RGB 値からユークリッド距離 (色差) を計算し、没食子酸濃度に対してプロットしたものが図 3 (c) である。なお、ユークリッド距離 (ED) は (1) 式^[9]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。ユークリッド距離は $0 \mu\text{g/mL}$ から $100 \mu\text{g/mL}$ までは $y=1.8873x$ ($R^2=0.9914$) で直線的に増加した。このことから、マイクロプレート法では $0 \mu\text{g/mL}$ から $100 \mu\text{g/mL}$ の範囲において目視による評価と RGB 値の解析によるポリフェノール含量の評価が可能である。

3.4. 没食子酸濃度を変化させた場合でのろ紙法における呈色反応の目視評価と色情報の解析

没食子酸濃度を変化させた場合でのろ紙法における呈色反応の変化を図 4 に示す。図 4 (a) はろ紙法における呈色変化の画像である。 $0 \mu\text{g/mL}$ から $60 \mu\text{g/mL}$ までは目視による判別が困難であったが、 $80 \mu\text{g/mL}$ から青色に呈色し、 $600 \mu\text{g/mL}$ にかけて青色が濃色になっていくのが目視で確認できた。図 3 (b) はろ紙法におけるデジタル画像から RGB 値を取得し、没食子酸濃度に対してプロットしたものである。 $0 \mu\text{g/mL}$ から $60 \mu\text{g/mL}$ までは RGB 値の変化がほとんど見られず、目視での観察の変

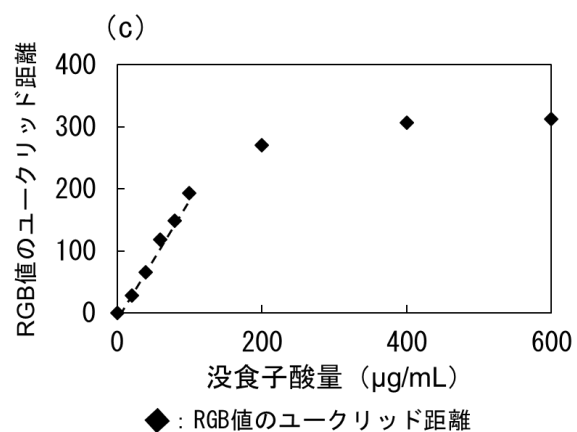
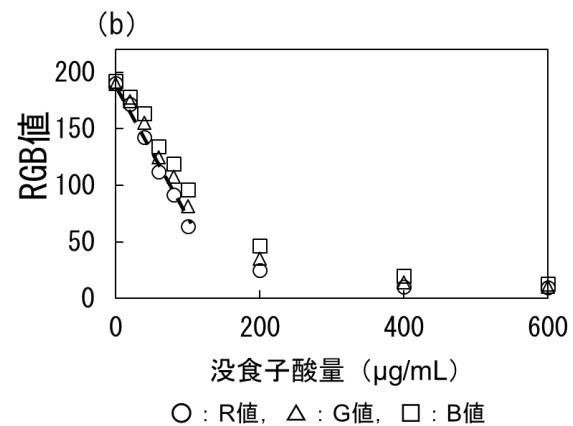
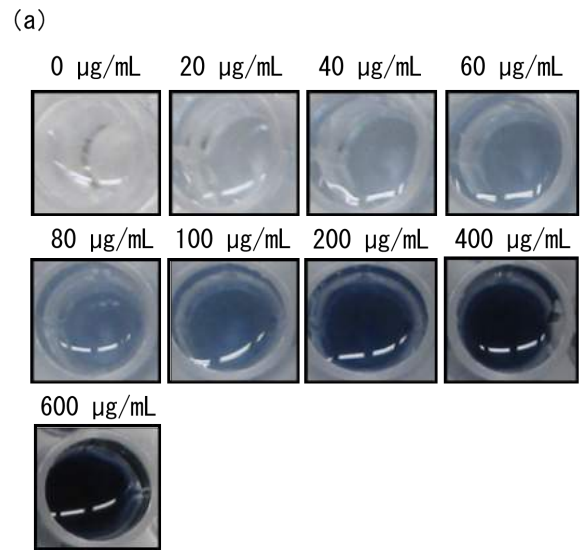


図 3. マイクロプレート法における没食子酸濃度変化
(a): マイクロプレート上での呈色反応
(b): RGB 値の没食子酸濃度に対する変化
(c): RGB 値をユークリッド距離に変換した値の没食子酸濃度に対する変化

化と一致している。80 $\mu\text{g/mL}$ から 600 $\mu\text{g/mL}$ にかけては RGB 値の低下が顕著になった。

次に、RGB 値をマイクロプレート法と同様にユークリッド距離に変換したが、規則性は見られなかった (data were not shown)。このことから、ろ紙法では 80 $\mu\text{g/mL}$ から 600 $\mu\text{g/mL}$ の範囲でポリフェノール含量の目視での評価が可能であり、RGB 値についてもこの範囲で一定程度のポリフェノール含量の評価が可能であると考えられた。

3.5. マイクロプレート法とろ紙法の教育的応用に関する一考察

教育現場での応用を考えた場合、化学反応に対する学習者の視覚的情報と科学的な解析法が一致していることが、理解の促進に繋がると考える。本研究におけるマイクロプレート法、ろ紙法のいずれの方法も目視評価と RGB 値の解析が一致していることから、容易に解析について理解できる教材である。また、反応時間が 10 分でも評価可能である為、通常の 1 単位時間での使用も可能であると思われる。使用が期待される教科としては、家庭科で食品の機能性を学ぶ題材として、理科では物質とエネルギーの題材として、総合的な学習では家庭科や理科などの教科を関連させ、地域の食材に含まれるポリフェノール含量の評価にも応用可能である。

4. 結論

本研究ではマイクロプレートやろ紙を用いたポリフェノール含量の分析を一単位時間の授業で実施可能かどうか検討した。その結果、マイクロプレート法、ろ紙法のどちらでも、10 分の反応時間でも十分に呈色した。また、マイクロプレート法では 0 $\mu\text{g/mL}$ から 100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で目視による評価と RGB 値の解析によるポリフェノール含量の評価を数値で表すことが可能であった。ろ紙法においては、高濃度の 80 $\mu\text{g/mL}$ から 600 $\mu\text{g/mL}$ での目視評価が可能であった。RGB 値を没食子酸濃度に対してプロットした場合は 80 $\mu\text{g/mL}$ から 600 $\mu\text{g/mL}$ の範囲では目視評価と一致し、濃度の増加とともに緩やかに値が減少した。以上より、本簡易分析法においても一定程度のポリフェノール含量を評価することができ、実験の簡易化から一単位時間での実施が可能であると考えられる。

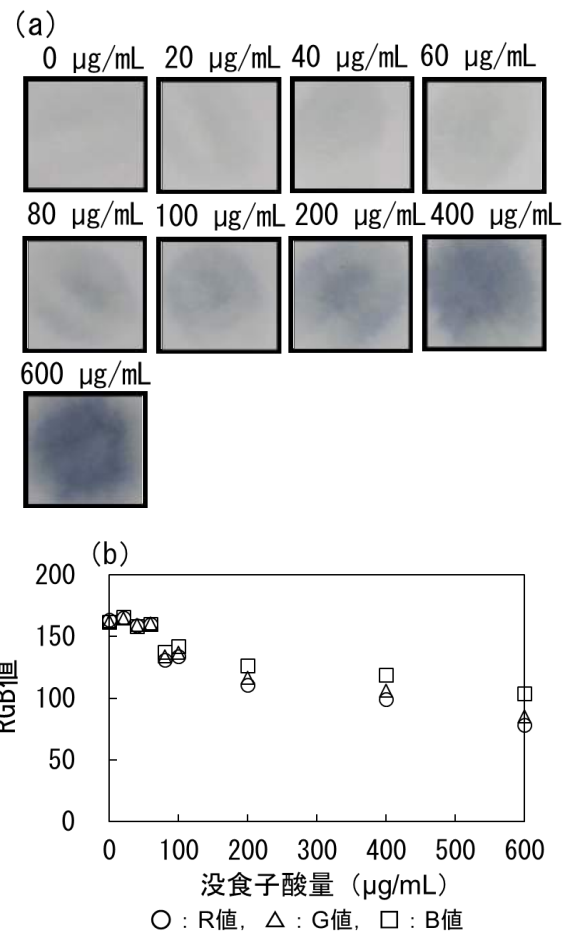


図 4. ろ紙法における没食子酸濃度変化

(a) : ろ紙上での呈色反応

(b) : RGB 値を没食子酸濃度に対する変化

引用文献

- [1] 菊池洋一ほか. アルギン酸カプセル (人工イクラ) を用いた鉄の簡易比色分析. 岩手大学教育学部附属教育実践総合センター研究紀要. 2016, 15, p.111-116.
- [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] 菊池洋一ほか. 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] 細川朝子ほか. 中学校の家庭科教材におけるたんぱく質可視化の試み. 北海道教育大学紀要. 2018,

68(2), p.387-396.

[6]菊池洋一ほか. デジタルカメラとウェルプレートを用いた連続変化法のスモールスケール実験. 岩手大学教育学部附属教育実践総合センター研究紀要. 2013, 12, p.73-78.

[7]Tiina Aid et al. Colorimetric determination of total phenolic contents in ionic liquid extracts by paper microzones and digital camera. Analytical methods. 2015, 7, p.3193-3199.

[8] 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.

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

Abstract

We investigated a simplified polyphenol analysis suitable to school education. The analysis uses microplates and filter paper, and its reaction system is based on the folin-ciocalteu method. We examined the optimal reaction time in the assay. The evaluation is then conducted both visually and by the image analysis. As a result, both the microplate method and the filter paper method showed sufficient coloration in the reaction time of 10 min. The color changed visually in the microplate method with the gallic acid concentration of 0 $\mu\text{g/mL}$ to 100 $\mu\text{g/mL}$. The same visible changes were observed in the filter paper method according to the gallic acid concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ to 600 $\mu\text{g/mL}$. The proposed simplified analysis can appropriately evaluate the approximate polyphenol content amount and it is easily available to the situation of school education.

(受付日 : 2018 年 9 月 11 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.