

総ポリフェノール分析法

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
九州沖縄農業研究センター 沖 智之

【はじめに】

ポリフェノールは芳香環に結合した二つ以上の水酸基（フェノール性水酸基）を有した化合物の総称であり、その化学構造からフェノールカルボン酸類、フェノールアミン類、フラボノイド化合物のアントシアニン類、フラボン類およびタンニン類などに大別される。食品中でのポリフェノールは味（収斂味、苦味）や色（褐変反応）、香りという嗜好性に関連する成分として良く知られていたが、近年では生体内での抗酸化作用をはじめとした数多くの健康機能性に関与していることが報告されるようになり、機能性成分としても注目を浴びている成分である。

食品やその原材料である植物体に含まれるポリフェノールを定量する方法として、高速液体クロマトグラフィーなどによる分離技術との組み合わせにより、種類別や個別に定量する方法が挙げられるが、操作が煩雑であり、また多様な化学構造を有するポリフェノール成分の標品が入手できないなどの理由により、汎用性が劣る。このような理由から、食品や植物体のポリフェノールは総量として測定する方法が採用されることが多く、その中でもフォーリン-チオカルト（フェノール）試薬を用いた方法が頻用されており、緑茶と紅茶の総ポリフェノールを定量する方法として ISO（国際標準化機構）に採用されている。

フォーリン-チオカルト試薬には、リントングステン酸が酸化剤として含まれており、フェノール性水酸基の迅速な酸化に伴う還元により、765nm にブロードな極大吸収を示す青色を与える。これは所謂、タンングステンモリブデンブルーを形成するためである。フォーリン-チオカルト試薬は広範なポリフェノール化合物と反応するが、発色の程度は成分によって異なることから、本法では没食子酸を検量線用の標準物質として選択している。

以下に記載する総ポリフェノール分析法は「Determination of substances characteristic of green and black tea -Part 1: Content of total polyphenols in tea - Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent」（ISO 14502-1:2005）に準拠したものである。なお、使用する実験器具や試薬の調合・調整に若干の変更を加えているが、基本的な試薬の量や濃度などは ISO に準じている。

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

- ・電子天秤：0.001g 以下の計量が可能なもの。
- ・分光光度計：光路長 10mm のセルで 765nm の吸光度が測定できるもの。フローセル付自動試料導入装置が備わっていると多検体の分析が容易となる。
- ・分光光度計用セル：光路長 10mm。材質はガラス、石英、プラスチック（ディスパーザブル）のいずれでも可能。
- ・プッシュボタン式液体用微量体積計（マイクロピペット）：エアードイスプレイスメント方式で最大容量は 1mL と 5mL のもの。例：ギルソン社ピペットマン

P-1000、P-5000。ポジティブディスプレイメント方式で容量は 1mL のもの。

例：ギルソン社マイクロマン M-1000。

- ・全量フラスコ： JIS 規格 (JIS R3505:1994) で規定されているクラス A 又はそれ以上の規格のもの (100mL、200mL、500mL)。
- ・メジャー瓶 (500mL)：硬質ガラス製のもの。
- ・ビーカー (100mL、500mL)：硬質ガラス製のもの。
- ・メスシリンダー： JIS 規格 (JIS R3505:1994) で規定されているクラス A 又はそれ以上の規格のもの (20mL)。
- ・ボルテックスミキサー
- ・試験管：硬質ガラス製もしくはポリプロピレン (PP) 製で、液量 10mL で十分に攪拌できるもの。
- ・試験管立て：試験管が立てられるもの。
- ・マグネットスターラー
- ・攪拌子：ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製のもの。
- ・ボルテックスミキサー*：同等の機能を有する器具でも良い。
- ・コニカルチューブ (50mL)：ポリプロピレン (PP) 製。同等の機能を有する器具で代替可能。
- ・薬さじ
- ・薬包紙
- ・タイマー

2. 試薬

1) 水

- ・日本工業規格 (JIS K0557:1998) で規定されているクラス A4 のもの。

2) フェノール (フォーリンーチオカルト) 試薬

- ・和光純薬製、コード No. 279-08895

3) 炭酸ナトリウム (無水)

- ・日本工業規格 (JIS K8625:2006) 以上のもの。CAS 登録番号 497-19-8。

4) 没食子酸一水和物

- ・CAS 登録番号 5995-86-8。

3. 調合・調整

1) 10%(v/v)フェノール試薬希釈液

- ① フェノール試薬 (20mL) を 20mL 全量フラスコで量り取る。
- ② 200mL 全量フラスコに①を移す。
- ③ 水で 200mL に定容し、転倒混和する。

注釈：フェノール試薬希釈液は用時調製する。

注釈：コンタミネーションを避けるため、量り取った試薬は廃棄する (試薬が入っている元の容器に戻さない)。

2) 7.5%(w/v)炭酸ナトリウム溶液

- ① 炭酸ナトリウム (無水) $37.50 \pm 0.01\text{g}$ を 500mL ビーカーに量り取る。

- ② ①のビーカーに 400mL 程度の水を入れた後、攪拌子を入れてマグネットスターラーを用いて攪拌、溶解する。
 - ③ 500mL 全量フラスコに②の溶液を移す。
 - ④ 水で 500mL に定容し、転倒混和する。
 - ⑤ ④の溶液を 500mL メジューム瓶に移した後、蓋をして室温で保存する。
- 注釈：室温で1ヶ月は保存可能。

3) 没食子酸 Stock 標準溶液（無水没食子酸 約 1000 μ g/mL に相当）

- ① 没食子酸一水和物（分子量 188.14）0.110 \pm 0.001g を薬包紙へ量り取る。量り込み量は 0.001g 単位で記録する。
- ② ①の没食子酸を 100mL ビーカーに移し、80mL 程度の水を入れた後、攪拌子を入れてマグネットスターラーを用いて攪拌、溶解する。
- ③ 100mL 全量フラスコに②の溶液を移す。
- ④ 水で 100mL に定容し、転倒混和する。

注釈：コニカルチューブに約 20mL ずつ分注して-20 $^{\circ}$ C で保管。調合後の使用は 1 週間以内にとどめる。

4) 没食子酸標準溶液 A-E

- ① 表 1 に示した没食子酸 Stock 標準溶液の容量をマイクロピペット（1mL）で 100mL 全量フラスコに移す。
- ② 水で 100mL に定容し、転倒混和する。

注釈：希釈した標準溶液は用事調製。

表 1 没食子酸の希釈標準溶液

没食子酸標準溶液	没食子酸 Stock 標準溶液 (mL)	名目上の希釈標準溶液の濃度 (μ g/mL)
A	1.0	10
B	2.0	20
C	3.0	30
D	4.0	40
E	5.0	50

【プロトコール】

1. ポリフェノールの抽出

ポリフェノールは総称であることから、その抽出方法はマトリックスやポリフェノールの種類の違いにより最適化されており、数多く報告されている。一般には含水のエタノール、メタノール、アセトンなどを抽出溶媒に用いるが、抽出溶媒に酸を添加する場合もある。

例えば、茶葉のポリフェノールでは抽出溶媒に 70%(v/v)メタノールを用いており¹⁾、野菜や果物ではアセトン、80%(v/v)エタノール²⁾や 90%(v/v)メタノール/0.5%(v/v)酢酸^{3,4)}を用いてポリフェノールの抽出を行っている。

なお、溶液状態の試料（ワイン、スピリットなど）ではポリフェノールの抽出

操作を省くことができる。

2. 試料溶液の希釈

- 1) 試料溶液 (2mL) をマイクロピペット (ポジティブディスプレイメント方式、最大容量 1mL) で試験管に移す。
注釈：試料溶液中の有機溶媒濃度が低い場合は、エアードイスプレイスメント方式のマイクロピペットの使用も可能。
- 2) 1)の試験管に水 (2mL) をマイクロピペット (最大容量 1mL) で添加し、ボルテックスミキサーで攪拌混和する。
注釈：有機溶媒濃度が高いと測定溶液に白濁が生じる。そのため、90%メタノール/0.5%酢酸溶液でポリフェノールを抽出した場合、試料溶液は水で2倍希釈以上すること。
注釈：反応後の試料溶液の吸光度が没食子酸標準溶液 E より高い場合は、2)の溶液を水で希釈して、比色法を繰り返す。

3. 総ポリフェノールの測定

- 1) 没食子酸標準溶液 A、B、C、D、E (1mL) をマイクロピペット (最大容量 1mL) で試験管にそれぞれ2回ずつ分注する。
- 2) 水 (1mL) をマイクロピペット (最大容量 1mL) で試験管にそれぞれ2回ずつ分注する。
注釈：試薬ブランクとなる。
- 3) 希釈した試料溶液 (1mL) をマイクロピペット (最大容量 1mL) で試験管にそれぞれ2回ずつ分注する。
- 4) 10%(v/v)フェノール試薬希釈液 (5mL) をマイクロピペット (最大容量 5mL) で1)の没食子酸標準溶液が入った試験管、2)の水が入った試験管および3)の希釈した試料溶液が入った試験管に添加し、ボルテックスミキサーで攪拌混和する。
- 5) フェノール試薬希釈液を添加した3~8分間後以内に、7.5%(w/v)炭酸ナトリウム溶液 (4mL) をマイクロピペット (最大容量 5mL) で4)の試験管に添加し、ボルテックスミキサーで攪拌混和する。
- 6) 室温で60分間放置した後、分光光度計で水をブランクとして、765nmの吸光度を光路長10mmのセルで測定する。
注釈：試薬ブランクの吸光度は0.010以下である。試薬ブランクが0.010以上の場合は、品質が悪い水、試薬やガラス器具に基づくコンタミネーションが原因である。
注釈：反応後の試料溶液の吸光度が検量線範囲内であることも重要である。反応後の試料溶液の吸光度が没食子酸標準溶液 E より高い場合は、2.希釈の項に従い希釈倍率を上げて、比色法を繰り返す。

【計算方法】

1. 没食子酸標準溶液の濃度計算方法

1) 没食子酸標準溶液 A-E の濃度 c は以下の式に従い、算出できる。

$$c = m_0 \times V \times w_{DM, std}$$

c : 没食子酸標準溶液の濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

m_0 : 秤量した没食子酸一水和物 ($0.110 \pm 0.001\text{g}$)

V : 没食子酸標準溶液 A-E の調製時に分注した没食子酸 Stock 標準溶液の容量 (mL)

没食子酸標準溶液 A : 1.0mL、 B : 2.0mL、 C : 3.0mL、 D : 4.0mL、 E : 5.0mL

$w_{DM, std}$: 没食子酸の乾物含量 (%)

一水和物の場合、 $170.12 \div 188.13 \times 100 = 90.43(\%)$

2. 総ポリフェノール量の計算方法

1) 没食子酸標準溶液 A、B、C、D、E の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を X 軸に、試薬ブランクの吸光度値を差し引いた没食子酸標準溶液の吸光度を Y 軸にプロットして、検量線を作成する。

2) 検量線の傾きと切片を求める。典型的な没食子酸の検量線グラフを図 1 に示す。

注釈：定量に用いる傾きは 0.0001 の単位で算出する。切片は原点付近である。吸光度を示す Y 軸の切片の値が $> \pm 0.04$ である時は、検討を要する。例えば、没食子酸の水分含量、標準溶液の調製方法やピペットの校正を調査する。

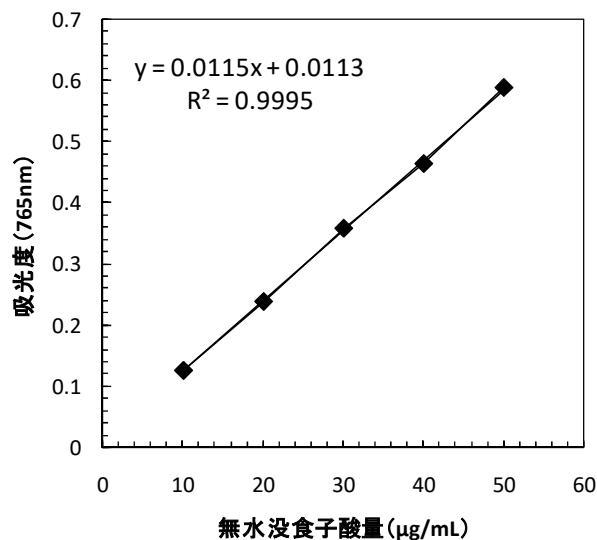


図 1 没食子酸の検量線グラフ

3) 試料中の総ポリフェノール量 W_T は以下の式に従い、算出できる。

$$W_T = \frac{(D_{\text{sample}} - D_{\text{intercept}}) \times V_{\text{sample}} \times d}{S_{\text{std}} \times M_{\text{sample}}}$$

W_T : 試料中のポリフェノール量 ($\mu\text{g/g}$)

D_{sample} : 反応後の試料溶液の吸光度

$D_{\text{intercept}}$: 検量線 Y 軸切片の吸光度
 S_{std} : 検量線の傾き
 M_{sample} : 試料量 (g)
 V_{sample} : 試料抽出液量 (mL)
 d : 比色定量した時の試料希釈倍率

【プロトコールのポイント・注意点】

1. 10%(v/v)フェノール試薬希釈液は用時調製する。
2. 7.5%(w/v)炭酸ナトリウム溶液は必要量をビーカーに移して使用し、元の保存容器に戻さない。
3. 試験管内の溶液が白濁した場合、そのままでは吸光度の測定ができない。そのため、遠心分離を行って清澄な上清を得て、その上清の吸光度を測定する。なお、遠心分離時に遠心機のチャンバーを冷却すると白濁度が増加する。
4. 分光光度計への自動試料導入装置（例：日本分光製 QFS-480P 型クイックフローサンプラー）を取り付けると短時間で多検体の測定が可能となる。
5. 没食子酸 Stock 標準溶液の調製には、没食子酸（無水）ではなく、没食子酸一水和物を用いることが、1) 溶解性の増大、2) 吸湿性の低下、3) 認証された試薬の入手の点で望ましい。没食子酸（無水）を用いる場合は、水含量（103°C）を求めてから、没食子酸 Stock 標準溶液の濃度を算出する¹⁾。
6. 反応溶液中のエタノール濃度が 1%(v/v)では、分析結果に影響を与えないことが報告されている⁵⁾。
7. アセトン、メタノール、ジメチルホルムアミドは本分析法では反応しないことが報告されており、これら溶媒は使用可能である。これら以外の溶媒でも使用可能であると考えられているが、使用したい溶媒が分析結果に影響を与えないか、あらかじめ標準品を用いた分析により確認することが望ましい⁵⁾。

【おわりに】

市販の調製試薬(フォーリンーチオカルト試薬)を用いた総ポリフェノールの定量法は簡便であり、植物体中で多様な化学構造を有するポリフェノールの総量を没食子酸相当量として算出できるという点では優れた方法である。標準物質には没食子酸を用いることが多いが、これはフォーリンーチオカルト試薬を活用した研究初期でワインやスピリッツを測定対象としていたという歴史的な背景もあるが、没食子酸が安価に入手できることや溶解性、安定性、検量線の直線性範囲という実際の測定上の面でも優れていることが理由である。対象とするポリフェノール成分が限定されている場面では、(+)-カテキンやクロロゲン酸などを標準物質にすることも可能であるが、それらで検量線を作成して試料中の総ポリフェノール量を算出するのではなく、相当量として表記したいポリフェノール成分と没食子酸との換算係数をあらかじめ算出しておき、測定毎に没食子酸で作成した検量線から試料中の総ポリフェノールを定量後、換算係数を乗じて算出する方法が実用的である。

【参考文献】

- 1) Determination of substances characteristic of green and black tea -Part 1: Content of total polyphenols in tea - Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent, ISO 14502-1 (2005) .
- 2) 須田郁夫, 沖智之, 西場洋一, 増田真美, 小林美緒, 永井沙樹, 比屋根理恵, 宮重俊一, 沖縄県産果実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性, 食科工, 52, 462-471 (2005).
- 3) Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K., Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and tea, J. Agric. Food Chem., 51(3), 571-581 (2003) .
- 4) Watanabe, J., Oki, T., Takebayashi, J., Extraction efficiency of hydrophilic and lipophilic antioxidants from lyophilized foods using pressurized liquid extraction and manual extraction, J. Food Sci., 79(9), C1665-C1671 (2014) .
- 5) Singleton, V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventós, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymol., 299, 152-178 (1999) .