

3Dプリンターで製作する簡易比色計と市販飲料を活用する茶飲料中カテキン類の分析実験

下村 博志*

(令和5年1月31日受付；令和5年4月20日受理)

要 旨

3Dプリンターを活用して試験管をセルとする簡易比色計を製作した。光源としてフルカラーLEDを用い、受光素子として光電池を用いた。自作比色計を用い、身近な茶飲料に含まれるカテキン類を対象とする簡易な比色分析実験を行えるか試みた。没食子酸エチルを標準物質とした場合、40 ppmまでの濃度範囲で吸光度は良好な直線性を示した。自作比色計による定量結果は、分光光度計を用いた定量結果に対応する値を示した。実験を更に簡易に行うため、濃度が明示されている茶飲料を標準の代わりとして用いて分析を試みたところ、この方法でも分析できることが示された。

KEY WORDS

化学分析 Chemical analysis 比色計 Colorimeter 3Dプリンター 3D Printer
カテキン Catechin

1 はじめに

比色分析法は分析目的物質を化学反応により発色させ、その着色の強さから定量を行う方法である。この方法は物質を定量分析するためだけではなく、平衡定数や反応速度の決定などの様々な分野の実験にも用いられる。この方法は光を利用する機器分析法の基礎ともなっており、多くの大学などの教育課程で実験・実習に組み込まれている。また比色分析法を高校や中学校などの教育現場でも実施できるよう、様々な簡易自作比色計が考案されてきた⁽¹⁾。比色計を自作する際に直面する実際的な課題の一つは、溶液を入れたセルを固定し、光源と受光素子を配置する構造体の製作が必要なことである。そのための様々な工夫が行われてきたが⁽²⁾、今回3Dプリンターを活用して簡易な構造の比色計を製作することを試みた。3Dプリンターは近年普及してきているが、比色計を作成した報告は限られている⁽³⁾。また簡易比色計を通信教育課程における化学実験で使用する例も報告されている⁽⁴⁾。特に通信制やオンライン教育課程などで家庭で実験が行われる際には、試料は身近で容易に入手できるものが望ましいと考えられる。今回は市販の茶飲料中のカテキン類を対象とする分析実験について検討した。この実験では試料中に必要濃度のカテキン類が含まれることが多く、前処理の手間がほとんどかからず、発色操作も容易であると考えられる。更に市販の茶飲料にはカテキン類の濃度が一定になるよう正確に管理されていると考えられるものがあり、それは比色分析の標準溶液に準じて活用できるのではないかと考えられた。そのように市販茶飲料を活用できれば、比色分析の実験をより容易に実施できると考えられる。今回自作比色計を用いて茶飲料中のカテキン類の比色定量が可能かどうか、また市販茶飲料を標準物質の代用として用いる分析が可能かどうかについて検討することとした。

2 実験

2.1 比色計の製作

比色計の造形は3Dプリンター(IUSE IUM1)を黒色PLAフィラメントを使用して行った。CADソフトはFreeCADを、スライサーソフトはRepetierHostを使用した。造形した比色計の部品の写真を図1に、組み立てて使用する様子を図2に示す。断面の構造を図3に示す。装置は全体として(1)台座と試験管をセットする本体、(2)LEDと受光素子を保持する2本の枝、及び(3)受光素子を収納するケースに分かれ、それぞれを造形した。(2)の光源用と受光素子用の枝は同一形状である。溶液を入れるセルとして試験管(直径17.5 mm、長さ130 mm)を使用した。試験管をセットする比色計の円柱の内径は18.3 mmと設定した。ノギスで測定した仕上がり寸法は17.9~18.1 mmと

*自然・生活教育学系

なった。造形する際の樹脂の肉厚は基本的に約2 mmとした。台座の大きさは48×90 mm、厚さは4 mmとした。台座部分を除いた円柱高さは70 mmとし、中心が光を通過するようにした。光源からセルへの穴の内径は約4 mm、セルから受光素子への穴の内径は約12 mmとした。この光路となる穴は本体を造形する際に中心点に直径2 mmの穴を造形しておき、ドリルとリーマーを用いて広げた。枝の部分は本体とほぼ同じ外径で、本体の円柱に沿って取り付けられる形状に造形し接着した¹⁾。枝の長さは25 mmとした。光源はRGB-LED (OST A5131A-RGB, 635, 525, 470 nm) を適切な大きさの黒ゴム栓で固定し、定電流ダイオード(10 mA)を通して9 V電池で発光させた。ディフューザーが必要な場合はLEDの前方に半透明のビニール膜等を置いた。

受光素子は約3.2×2.4 cmの光電池(ケニスA-10K)を用いた。ケースは配線通路を有する箱型で、穴の直径は15 mmとし、それに3Dプリンターで造形した内径約24 mm、長さ20 mmの円筒を接着し、比色計の枝にかぶせるように装着できるようにした。ケースは黒色ビニールテープで固定した。光電池の起電力はデジタルマルチメーター(CUSTOM CDM-17D)で電圧値を測定した。比色計は黒色ゴムスポンジの上に置き実験台にテープで固定した。

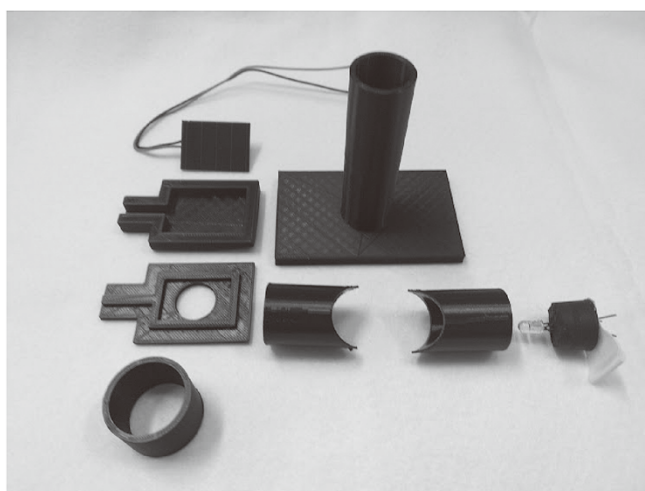


図1 造形した部品の構成(左上は光電池, 右下はゴム栓に取り付けたLED)

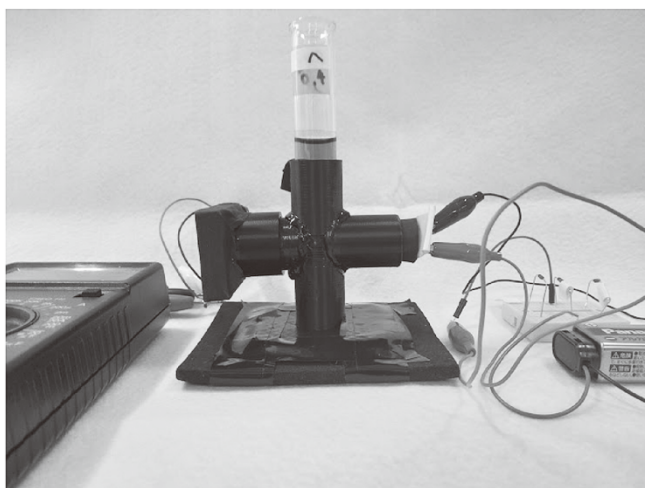


図2 組み立てて測定する際の構成

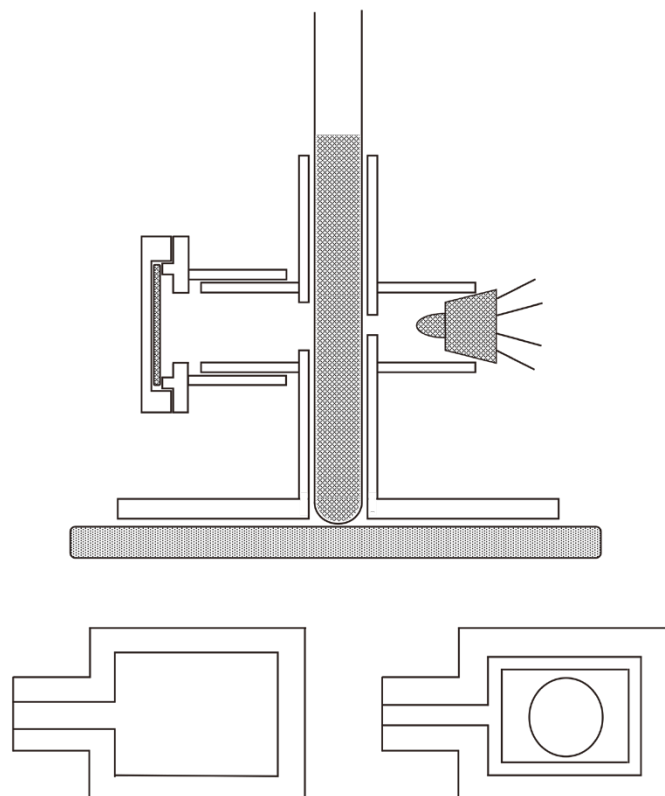


図3 装置の模式図

2. 2 溶液調製と試料

溶液調製は基本的には文献記載の方法を参考に行った⁶⁾。実験に使用する水はイオン交換水を用いた。分光光度計を用いた吸光度の測定はASONE ASV11Dを用いて波長540 nmにおいて行った。

没食子酸エチル（図4）標準溶液（500 mg/L）は100℃で1時間乾燥させデシケーター中で保存した没食子酸エチルを0.500 gを正確にはかりとり水で1000 mLに定容して調製した。

酒石酸鉄溶液は酒石酸カリウムナトリウム4水和物1.5 gを少量の水に溶かし、それに硫酸鉄（II）7水和物0.3 gを加えて溶かし、全量を300 mLとして調製した。この溶液は使用の都度調製した。

酒石酸溶液は酒石酸カリウムナトリウム4水和物0.5 gを水に溶かし全量を100 mLとして調製した。

リン酸緩衝液はリン酸水素2ナトリウム（無水物を110℃で1時間乾燥させデシケーター中に保管したもの）7.95 gと、リン酸2水素カリウム1.45 gを水に溶かして1000 mLとして調製した。この溶液のpHメーターによる測定値はpHは約7.4だった。

検量線作成に用いる溶液の調製は次のように行った。容量100 mLのメスフラスコに500 ppm没食子酸エチル標準溶液をメスピペットで0~10 mL加え、それに酒石酸鉄溶液を20 mLを加えた。それにリン酸緩衝液を60 mL加えイオン交換水で100 mLに定容した。

試料は市販の茶飲料であり、A: 350 mL中に茶カテキン540 mg含有と表示のあるもの、B: 500 mL中に茶カテキン197 mg、うちガレート型カテキン178 mg含有と表示のあるもの、C: 100 mL中に茶カテキン40 mg含有と表示のあるものを用いた。

検量線作成に用いる溶液の調製において、没食子酸エチル標準溶液の代わりに試料（Aは2 mL、BとCは5 mL）を加えることで試料溶液を調製した。またこれらの試料溶液において酒石酸鉄溶液の代わりに酒石酸溶液を用いて試料のブランク溶液とし定量に用いた²⁾。

試料Aを標準として用いる測定の溶液調製は次のように行った。試料A 25.0 mLを100 mLに希釈した溶液を0~10 mLメスピペットで容量100 mLのメスフラスコに入れ、それに酒石酸鉄溶液を20 mLを加えた。それにリン酸緩衝液を60 mL加えイオン交換水で100 mLに定容した。その際試料Bは4 mL、試料Cは5 mLを加えて調製した。

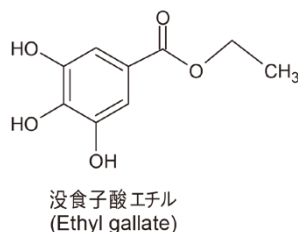


図4 没食子酸エチル (Ethyl gallate) の構造

2. 3 自作比色計を用いる定量

溶液を入れた試験管をセルホルダーに入れ、光源を点灯させ光電池の起電力をマルチメーター（電圧値）で読み取った。測定時に試験管を120°ずつ回転させ3方向から測定を行い、その平均値を用いた。データ処理は表計算ソフト（Microsoft EXCEL）のワークシートに入力し行った。

また吸光度をAbs, i番目の溶液の信号強度（電圧）を I_i , ブランク溶液の信号強度（電圧）を I_0 とし、次の式から吸光度を求めた。

$$\text{Abs} = -\log (I_i / I_0)$$

各濃度の溶液について吸光度を求め検量線を描き、それに未知試料の吸光度を当てはめ、希釈倍率をかけ定量した。その際、試料溶液（酒石酸鉄を加えた溶液）から試料ブランク溶液（酒石酸を加えた溶液）の吸光度を差し引き、それを真の吸光度として検量線に当てはめて定量した。

試料Aを代用標準として用いる場合も同様の操作で測定した。

3 結果と考察

3. 1 比色計の製作

自作比色計は基本的には山下らの考案したのと同じ形状のものである^(6,7)。これは塩ビ管の接続資材（TS型チーヅ）を加工して製作されるが、試験管を入れるため内径を拡大する必要がありボール盤等を必要とした。全体の構造はシンプルであり、今回3Dプリンターで製作するモデルとした。3Dプリンターで造形することで塩ビ管の内径と試験管の外径を組み合わせる制約がなくなったため、任意の直径の試験管を使用できるようになった。他の口径の試験管用の比色計も製作できている。

使用した3Dプリンターは家庭用の小型のものである。CADソフト、スライサーソフトはフリーウェアである。造形は台座と試験管を収納する円筒よりなる本体と、発光素子と受光素子を保持する二本の枝部分、受光素子を収納するケース部分に分けて行った。こうすることでCADモデルの複雑化を避け基本的な構造のみで作成可能とするとともに不要な支持体の形成を防いだ。

製作上最も困難な点は使用する試験管に適した内径の円筒のサイズを決定することだった。モデリングソフトで指定した内径値と実際に造形された値との間に誤差があり試行錯誤が必要だった。造形際の印刷速度などによっても仕上がり寸法が違ってくることがあり、造形後に試験管が入りにくい場合は円柱型のやすりで広げ、隙間ができた場合はビニールテープで埋めるなどの微調整が必要な場合もあった。枝部分は別に造形し接着した。発光ダイオードに通電していない状態で光電池の起電力がほとんど生じないことで受光部に迷光が侵入していないことを確認した。比色計は全体をケースに収納することなく使用した。ただし使用時は真上付近に位置する照明は消灯した。外部からの光が影響すると思われる場合には試験管に塩ビ管に黒色塩ビ板を接着したキャップをかぶせることで影響を軽減することができる。一連の測定中は特に受光素子と発光素子の位置関係が動かないよう注意する必要があり、比色計をゴムスポンジ製の台ごとテーブルにテープで固定した。

この比色計は一本の試験管を使用し、溶液を入れ替えての測定も可能であるが、今回の測定では個々の溶液を別々の試験管に入れておき、測定時に試験管を比色計にセットして測定する方法で測定した。この方法は試験管の大きさのばらつきなどの影響を受けるが、測定条件（発光ダイオードの色、電流の大きさ、ディフューザーの必要の有無や受光素子の種類など）の検討を容易に行うことができる。また試験管の傷や汚れなどの影響を軽減させるため、必要

に応じ試験管を比色計内で120°ずつ回転させて3回測定し、その平均値から起電力や吸光度を求めた。試験管をセルとして使用する場合、発光ダイオードの光が受光素子の位置に結像することが原因と思われる不安定が生じることがあり、その場合には光を拡散させるディフューザーが有効になることがある。またこれは光の強度を測定に適したレンジまで微調整するためにも使用できる。

3. 2 茶飲料中のカテキン類の定量

フェノール性水酸基を有する物質と鉄イオンとが錯形成し強く発色することは古くから知られており、没食子インクやかつての「お歯黒」などもこの反応によるものである。茶にはポリフェノールと呼ばれる多数のフェノール性水酸基を有する様々な化合物が含まれており、それらの一部はタンニン類あるいはカテキン類に分類される^(8,9)。それらは分子内に水酸基を複数有し鉄イオンと比較的安定なキレート化合物を形成すると考えられる。本研究で行った酒石酸で安定化された鉄イオンとカテキン類との反応は個々の物質を区別せず、一括・総括して吸光度を測定するものである。個々の分子はその分子固有のモル吸光係数を有しており、同じカテキン類濃度であっても組成の違いによって吸光度は異なると考えられる。分析値を評価する際はこのような定量原理に基づくことに十分注意する必要がある。特に他の分析方法で得られた結果と比較する際に注意が必要である。本法による分析結果はクロマトグラフィーなどの分離を伴う方法と比較すると原理的な不正確さを伴っている⁽⁵⁾。

青紫色に発色した溶液を分光光度計を用いて波長540 nmで測定した結果、吸光度は50 ppmまでの良好な直線関係を示した。ここでの検量線のブランク溶液は酒石酸鉄と緩衝液である。その溶液は僅かに黄色～茶色味を帯びていた。試料溶液のブランクとしては、鉄イオン以外を含む溶液とした。それらの溶液もまた僅かに黄色から茶色味を帯びていたが、標準溶液のブランクの色調と濃さとは僅かに違っているように見えた。茶飲料中には本法の発色に関与しない着色成分が含まれると考えられるため、試料の吸光度から試料ブランクの吸光度を差し引き、それをカテキン類による真の吸光度として定量を行うこととした。このようなブランクの取り扱いについては文献に提案されている⁽¹⁰⁾。検量線から求めた濃度は、試料Aは1560 ppm, Bは670 ppm, Cは390 ppmであった。含有量の表示値はAは1540 ppm, Bは394 ppm, Cは400 ppmであり、試料Bは表示値よりも大きな測定結果となったが、他の試料AとCは概ね表示値と同程度の測定結果となった。試料Bで大きな差が生じた原因は明確ではないが、今回取り上げた製品のうち試料Bのみ茶カテキンとガレート型カテキンを分けて表示してあり、ガレート基を有するカテキンが大きな割合で含まれていることを示している。他の試料は茶カテキンとのみ表示されていた。図5に代表的なカテキンであるエピカテキンとエピカテキンガレート（ガレート型カテキンの一種）の構造を示す。試料Bのカテキン類には配位可能なフェノール性水酸基が単位質量あたり多量に含まれると考えられ、カテキン類分子に結合する鉄イオン数が多くなり、また錯体分子のサイズが大きくなるなど、分子吸光係数が他と比べて大きな化学種も生じたため見かけの濃度が大きくなった可能性が考えられる。

各製品の表示値の定量方法が不明であり、また今回の方法は前述の原理的な不正確さがあり、表示値と比較することの化学的意味は限定され、繰り返し測定や統計的な検討は行わなかった。この方法は定量の絶対値よりも、茶の抽出条件の違いなど、比較的組成が似ていると考えられるものどうしの比較や、濃度のおおよその順序を求めるために用いるなど、活用方法に注意する必要があると考えられる。なお今回は懸濁物が認められない製品を対象としたが、懸濁している場合はろ過などの処理を行う必要がある⁽⁵⁾。

試料Aは表示値と近い値が得られた。この試料（製品）は実習用サンプルとして数年間の間に何度か測定することがあったがその結果は常に表示値と近い値となっていた。この製品のカテキン類濃度は極めて精度よく管理されていることが示唆され、簡易分析のための標準溶液の代用として使用可能ではないかと考えられた。

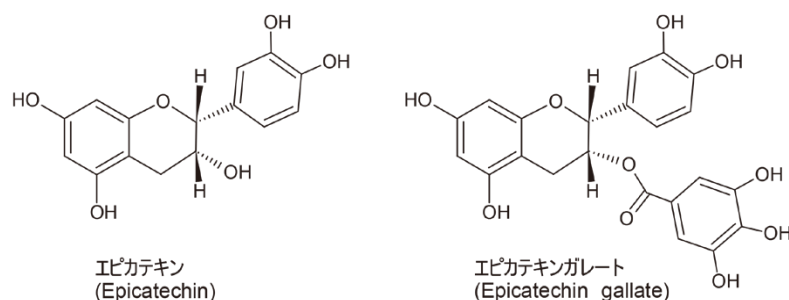


図5 エピカテキンとエピカテキンガレート（ガレート型カテキン）の構造

3. 3 簡易比色計を用いた定量

自作比色計での測定は緑色光を用いた。光電池が示した電圧と濃度との関係を図6に示す。濃度の増加とともに起電力が減少し僅かに湾曲する関係を示した。吸光度を求めたところ、50 ppmの濃度は直線からやや外れた位置にあったので、40 ppmまでの範囲で検量線を作成した(図7)。検量線は良好な直線性を示し、これに試料の吸光度を当てはめて定量した。なお測定溶液の試料濃度は全て40 ppm以下の範囲にあった。分光光度計を用いた定量と同様にブランクを差し引いて求めた濃度は、試料Aは1540 ppm, Bは650 ppm, Cは420 ppmであった。自作比色計で求めた値は分光光度計で求めた値とおおむね対応していた。試料Bの値が表示値より大きな値となったことも分光光度計で得られた結果と対応していた。

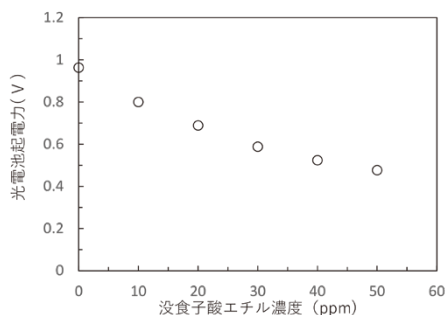


図6 没食子酸エチル濃度と光電池起電力(電圧)との関係(自作比色計)

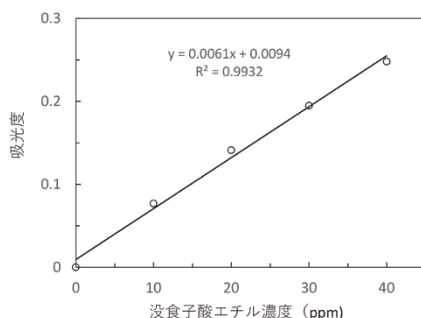


図7 没食子酸エチル濃度と吸光度との関係(自作比色計)

3. 4 市販飲料を標準の代用として用いた定量

試料Aをカテキン類濃度1540 ppmであるとして没食子酸エチル標準の代わりとして用い、自作比色計を用いて得られた検量線を図8に示す。吸光度とカテキン類濃度とは良好な直線関係が得られた。この検量線から求めた濃度は、試料Bは730 ppm, 試料Cは420 ppmとなった。試料Bは分光光度計を用いて得られた値と同様に表示値より大きな値となった。試料Cは分光光度計を用いて得られた値に近い値を示した。定量原理として不正確さが著しく大きくなる場合があること、標準溶液そのものの不正確さも含む結果であり結果の定量的な取り扱いに十分注意する必要があるものの、市販飲料を標準の代用として用いても教育現場や家庭である程度の定量的な実験が可能であることが示された。

またこの結果は、試料BがAの約48%の濃度、試料CがAの約27%の濃度であることを示す。このような表現はその実験に使用した試料Aの濃度が1540 ppmでなくとも、測定結果に試料Aの濃度を基準とした比例尺度の値を与え得る。その試料Aを基準として使用する限りという条件下で一連の測定結果は定量性を与えられ、教育目的の分析実験の結果の比較方法としては有効であると考えられる。

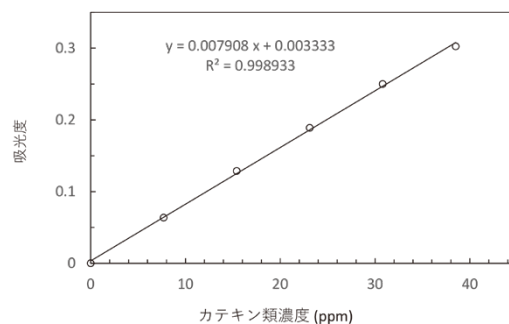


図8 試料Aのカテキン類濃度を1540 ppmとして得られた検量線（自作比色計）

4 おわりに

3Dプリンターを活用し比色計を容易に作成することができた。これは基本的な形状の構造のみで構成され3Dプリンターの初心者にも作成しやすいと考えられる。簡易比色計を用いて得られた結果は、分光光度計で得られる結果とおおむね対応していた。この比色計を用いて茶飲料中のカテキン類を分析できた。実験の発色操作は容易であり、試料は入手しやすく試薬に毒劇物を使用しない。これらは学校での実施のみならず、通信制教育課程やオンライン教育などにおいて家庭で実施する実験としても適した特性でもありと考えられる。今回記載した比色計とそれを用いる実験は、幅広い教育活動で化学実験を実施する可能性を広げると考えられる。

謝辞

本研究で製作した比色計の基となった、塩化ビニール部品を用いた比色計の製作方法と使用方法は（故）山下伸典兵庫教育大学名誉教授にご教授いただきました。また本研究の一部に大森歩、浅野翔太の両氏にご協力いただきました。ここに記して感謝いたします。

注

- 1) PLAの接着剤として今回はアクリル用接着剤を用いた。また隙間が生じた際の充填などに黒色ホットメルトを用いた。
- 2) 文献記載の方法では、没食子酸エチルを用いて作成した検量線から求めた値を1.5倍するとあるが、ここではそのような処理を行わなかった。また文献記載の方法では特に試料のブランクの吸光度を差し引いていないが、今回は鉄以外の成分と濃度を同一にした溶液を試料ブランクとして吸光度を差し引いており文献とは取り扱い方法が異なっている。

引用及び参考文献

- (1) 例えば安川絢子, 下村博志: 小型コンピュータ (Raspberry Pi) を活用した簡易自作比色計の開発 上越教育大学研究紀要, 第39巻 第2号 509-516 (2020) 及びその引用文献
- (2) 例えばLEGOブロックを活用する方法なども報告されている。Jonas Asheim, Eivind V. Kvittingen, Lise Kvittingen, Richard Verley: A Simple, Small-Scale Lego Colorimeter with a Light-Emitting Diode (LED) Used as Detector *J. Chem. Educ.*, 91, 7, 1037-1039 (2014)
- (3) Lon A. Porter, Jr., Benjamin M. Washer, Mazin H. Hakim, Richard F. Dallinger: User-Friendly 3D Printed Colorimeter Models for Student Exploration of Instrument Design and Performance *J. Chem. Educ.*, 93, 7, 1305-1309 (2016)
- (4) Dietmar Kennepohl, Martin Connors: An inexpensive mini-colorimeter for undergraduate science laboratories *Aust. J. Ed. Chem.*, 70, 38-45 (2009)
- (5) 日本食品工業学会食品分析法編集委員会: 茶のカテキン定量法, 食品分析法第2版, 813-816, 光琳 (1984)
- (6) 山下浩之, 松本伸示, 尾関 徹, 山下伸典: 酵素反応を導入するための簡易比濁計による分解速度測定法 科学教育研究, 第26巻 第2号 105-112 (2002)
- (7) 下村博志, 下坂知子, 神宮瑞美, 小林辰至, 高津戸 秀, 林 康久, 山下伸典: 学校現場で実施可能な自作光度計を用いる定量分析実験 - モリブデンブルー法による飲料水及び環境水中イオン状シリカへの応用 - 化学と教育, 第52巻 第5号 332-335 (2004)
- (8) 日本カテキン学会: カテキンのいろは <https://www.catechin-society.com/iroha.html> (2023-01-31)
- (9) 株式会社共立理化学研究所: パックテスト緑茶タンニン利用方法 <https://en.kyoritsu-lab.co.jp/seihin/list/instructions/zak-rc.pdf> (2023-01-31)
- (10) 岩浅 潔, 鳥井秀一: 酒石酸鉄による茶タンニンの比色定量法 茶業研究報告, 第19号 104-108 (1962)

Tea beverage catechin analysis using a simple 3D printed colorimeter

Hiroshi SHIMOMURA*

ABSTRACT

Using a 3D printer, a simple colorimeter was fabricated with a test tube as the cell. A full-color LED was used as the light source, and a photovoltaic cell was used as the light receiving element. A 3D printed colorimeter was used to perform a simple colorimetric analysis experiment on the catechins contained in tea beverages. With ethyl gallate as a standard, the absorbance showed good linearity in concentrations up to 40 ppm. The quantification results using the 3D printed colorimeter had values that corresponded to the spectrophotometer quantification results. To make the experiment simpler, an analysis was attempted using a tea beverage with a specified concentration as the substitute standard, from which it was found that this method could also be used for analysis.

* Natural and Living Science