

りんごジュース中のプロシアニジン類の定量

— 高速液体クロマトグラフ法

Determination of the procyanidins in apple juice

— High performance liquid chromatographic method

警告 この規格に基づいて試験を行う者は、通常の実験室での作業に精通していることを前提とする。この規格は、その使用に関連して起こる全ての安全上の問題を取り扱おうとするものではない。この規格の利用者は、各自の責任において安全及び健康に対する適切な処置をとり、法令等を遵守する。

1 適用範囲

この規格は、りんごジュース（ストレートに限る。以下同じ。）中に含まれるプロシアニジン類の測定のための高速液体クロマトグラフ法について規定する。

2 引用規格

次に掲げる引用規格は、この規格に引用されることによって、その一部又は全部がこの規格の要求事項を構成している。これらの引用規格は、その最新版（追補を含む。）を適用する。

ISO 648, Laboratory glassware — Single-volume pipettes

注記 1 対応日本産業規格：JIS R 3505 ガラス製体積計（MOD）

ISO 1042, Laboratory glassware — One-mark volumetric flasks

注記 2 対応日本産業規格：JIS R 3505 ガラス製体積計（MOD）

JIS K 0124 高速液体クロマトグラフィー通則

JIS K 0557 用水・排水の試験に用いる水

JIS K 8034 アセトン（試薬）

JIS K 8355 酢酸（試薬）

JIS K 9502 L(+)-アスコルビン酸（試薬）

3 用語及び定義

この規格で用いる主な用語及び定義は、次による。

3.1

プロシアニジン類

カテキン又はエピカテキンの2量体以上の重合体

注釈 1 プロシアニジン B2 等がある。

4 測定原理

りんごジュースからプロシアニジン類をアセトン/水混合液で抽出する。蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ(以下、HPLC という。)を用いて抽出物中のプロシアニジン類を測定する。プロシアニジン類の濃度は、標準物質として用いるプロシアニジン B2 のピーク面積の比によって算出する。

5 試薬

他に規定のない限り、分析用と認められた試薬を使用する。

警告 試薬の使用に関して、法律上の規制を遵守することは、この規格の使用者の責任である。

5.1 水

JIS K 0557 に規定する A3 以上の品質のもの。

5.2 プロシアニジン B2

純度を確認できるもの。

5.3 アセトン

JIS K 8034 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.4 酢酸

JIS K 8355 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.5 アセトニトリル

HPLC 用のもの。

5.6 メタノール

HPLC 用のもの。

5.7 L(+)-アスコルビン酸

JIS K 9502 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.8 L(+)-アスコルビン酸含有アセトン/酢酸/水混合液

アセトンと酢酸と水とを 70 : 0.5 : 29.5 (体積比) で混合したもの 1L 当たりに、L(+)-アスコルビン酸 0.5 g を溶解する。

5.9 L(+)-アスコルビン酸含有酢酸水溶液

水 1L 当たりに酢酸 50 mL 及び L(+)-アスコルビン酸 5 g を溶解する。

5.10 HPLC 移動相

5.10.1 移動相 A アセトニトリル/酢酸混合液

アセトニトリルと酢酸とを 98 : 2 (体積比) で混合する。使用前に脱気する。

注記 脱気することによって、気泡のトラブルを未然に防ぎ、安定した流量及びバックグラウンドが得られる。

5.10.2 移動相 B メタノール/酢酸/水混合液

メタノールと酢酸と水とを 95 : 2 : 3 (体積比) で混合する。使用前に脱気する。

注記 脱気することによって、気泡のトラブルを未然に防ぎ、安定した流量及びバックグラウンドが得られる。

5.11 一連の標準液

プロシアニジン B2 を L(+)-アスコルビン酸含有アセトン/酢酸/水混合液で溶解し、測定試料の濃度帯に適した 3 段階以上の濃度に調製する。各標準液の濃度は、プロシアニジン B2 の純度による補正を行う。

注記 1 附属書 A に示す試験室間共同実験においては、10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL 及び 100 µg/mL の標準液を調製した。

注記 2 -20 °C 以下で保存された濃度 100 µg/mL の標準液は、少なくとも 28 日間安定した状態を保つことが確認されている。

6 装置及び器具

通常の実験器具及び装置のほか、次による。

6.1 電子天びん

0.1 mg の桁の精度ではかる機能をもつもので、ひょう量が 200 g より大きいもの。

6.2 全量フラスコ

ISO 1042 に規定するクラス A のもので、試料の抽出操作 (8.1 参照) に適した容量のもの。

6.3 全量ピペット

ISO 648 に規定するクラス A のもので、試料の抽出操作 (8.1 参照) に適した容量のもの。

6.4 メンブランフィルター

フィルターが有機溶剤系の溶液のろ過に適した PTFE 製のもので、孔径が 0.45 µm 以下のもの。フィルターとハウジングが一体であり、ハウジングの材質が有機溶剤に耐性のあるもの。

6.5 HPLC 装置

6.5.1 HPLC

JISK0124 に規定する脱気装置、送液ポンプ (2 液混合グラジエントが可能なもの。)、試料導入部 (冷却機能を有するもの。)、カラム槽 (温度制御機能を有するもの。)、蛍光検出器 (8.2.1 の HPLC 測定条件の設定に規定する測定波長に設定可能なもの。) 及びデータ処理装置を備えたもの。

6.5.2 HPLC 用カラム

次の特性を持つ順相カラム。

- 固定相：ジオール相
- プロシアニジン類のピークをカテキン又はエピカテキンのピークと十分に分離できるもの。

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験においては、内径 4.6 mm、長さ 250 mm のステンレス管に、プロピルジオール基を化学的に結合した粒子径 5 µm のシリカゲルを充填したものを使用した。

7 試験用試料

常温のりんごジュースを試験用試料とする。

8 手順

8.1 抽出

8.1.1 よく振り混ぜた試験用試料（**箇条 7** 参照） 2 mL を全量ピペットを用いて 10 mL 容全量フラスコにはかりとり、アセトン 7 mL を加える。

8.1.2 全量フラスコ（**8.1.1** 参照）に L(+)-アスコルビン酸含有酢酸水溶液を標線まで加えて定容し、振り混ぜる。混合した溶液をメンブランフィルターでろ過し、これを試料抽出物とする。

8.1.3 調製した日に **8.2.1** 及び **8.2.2** の操作を行う。

8.2 測定

8.2.1 HPLC 装置の測定条件の設定

装置の取扱説明書に従って、HPLC 装置の条件を次のように設定する。このとき、カテキン又はエピカテキンのピークとプロシアニジン類のピークとを分離できるように設定する。

- a) カラムの設定温度：30 °C～35 °C
- b) 測定波長（励起及び蛍光）：230 nm 及び 321 nm
- c) 注入量：1 µL～10 µL
- d) サンプルクーラー温度：4 °C
- e) 溶出条件：試料抽出物注入後 1 分～2 分の間は、移動相 A と移動相 B とをそれぞれ 91 %～95 %、5 %～9 % の範囲で混合し、展開する。その後、即座に移動相 B を 90 %～98 % にして残りの成分を溶出することが望ましい。

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験においては、**表 1** に示す HPLC 測定条件を使用した。

表 1—共同実験の HPLC 測定条件

移動相の流量	1.0 mL/min		
カラムの設定温度	35 °C		
検出器温度	40 °C		
励起波長	230 nm		
蛍光波長	321 nm		
注入量	5 µL		
サンプルクーラー温度	4 °C		
ミキサー容量	0.5 mL		
2 液グラジエント条件	時間 (分)	移動相 A (体積比率%)	移動相 B (体積比率%)
	0~1.5	93	7
	1.5~10	2	98
	10~20	93	7
注記 与えられた値は、一例である。			

8.2.2 HPLC 測定

全体のシステムを安定化する。設定した HPLC 測定条件 (8.2.1 参照) で作動させた際、ベースラインの変動がプロシアニジン類の測定に支障がないことを確認する。一連の標準液をカラムに注入し、続いて同じ量の試料抽出物 (8.1 参照) を注入する。なお、測定中の感度の変動を確認する。

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験においては、試料抽出物 7 点測定ごとに、一連の標準液の中間濃度のものを測定して ±10% 以内であることを確認した。

8.2.3 同定

試料溶液について、同じ HPLC 条件下での標準液のクロマトグラムから得られたプロシアニジン B2 の保持時間と一致したピーク及び連続して現れる一連のピークを、プロシアニジン類のものと同定する。

注記 りんごジュースの典型的な HPLC クロマトグラムを附属書 B に示す。

9 計算

9.1 一般事項

プロシアニジン類の量は、ピーク面積から検量線によって分析成分の量を求める絶対検量線法を用いて算出する。

9.2 定量

一連の標準液中のそれぞれのプロシアニジン B2 のピーク面積を得る。各標準液のプロシアニジン B2 の濃度に対してピーク面積を一次回帰して検量線を作成する。作成した検量線の相関係数は 0.995 以上であることを確認する。

各試料抽出物中のプロシアニジン類のピーク面積から検量線を用いてプロシアニジン類の濃度を算出する。試験用試料中のプロシアニジン類含有量 ρ は、次の式によって与えられる。

$$\rho = \frac{\rho_s \times V}{V_s}$$

ここで、 ρ : 試験用試料中のプロシアニジン類含有量 (mg/L)

ρ_s : 試料抽出物中のプロシアニジン類の濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 V_s : 試験用試料採取量 (8.1.1 参照) (mL)
 V : 抽出 (8.1.2 参照) 時の定容量 (mL)

9.3 結果の表現

有効数字 2 桁で結果を表示する。

10 精度

10.1 試験室間共同実験

この試験方法の精度を判断するための試験室間共同実験が行われ、その結果は**附属書 A** にまとめられている。この試験室間共同実験から得られた値は、そこで確認された含有量範囲 ($8.9 \times 10 \text{ mg/L} \sim 2.5 \times 10^2 \text{ mg/L}$) 及びマトリックス以外では適用できないことがある。

10.2 併行精度

同一とみなせる試料で、同じ試験者が同じ装置を使って、可能な限り短い時間間隔で試験して得られた 2 つの測定結果の差が**表 A.1** に示す併行許容差 (r) [1]を越えるのは、規定の操作を間違いなく行っていれば、平均して 20 回に 1 回以下であることが見込まれる[2]。

10.3 室間再現精度

同一とみなせる試料について同じ方法を用い、異なる試験室で、異なる試験者が、異なる装置を用いて得られた測定結果の差が**表 A.1** に示す再現許容差 (R) [1]を越えるのは、規定の操作を間違いなく行っていれば、平均して 20 回に 1 回以下であることが見込まれる[2]。

11 品質管理

試験所は、試験のための内部品質管理手順をもつ。

12 試験報告書

試験報告書には少なくとも次の事項を記載する。

- a) この規格の名称又は規格番号
- b) 試験試料を識別する詳細
- c) 試験年月日
- d) 試験結果

附属書 A

(参考)

試験室間共同実験の結果

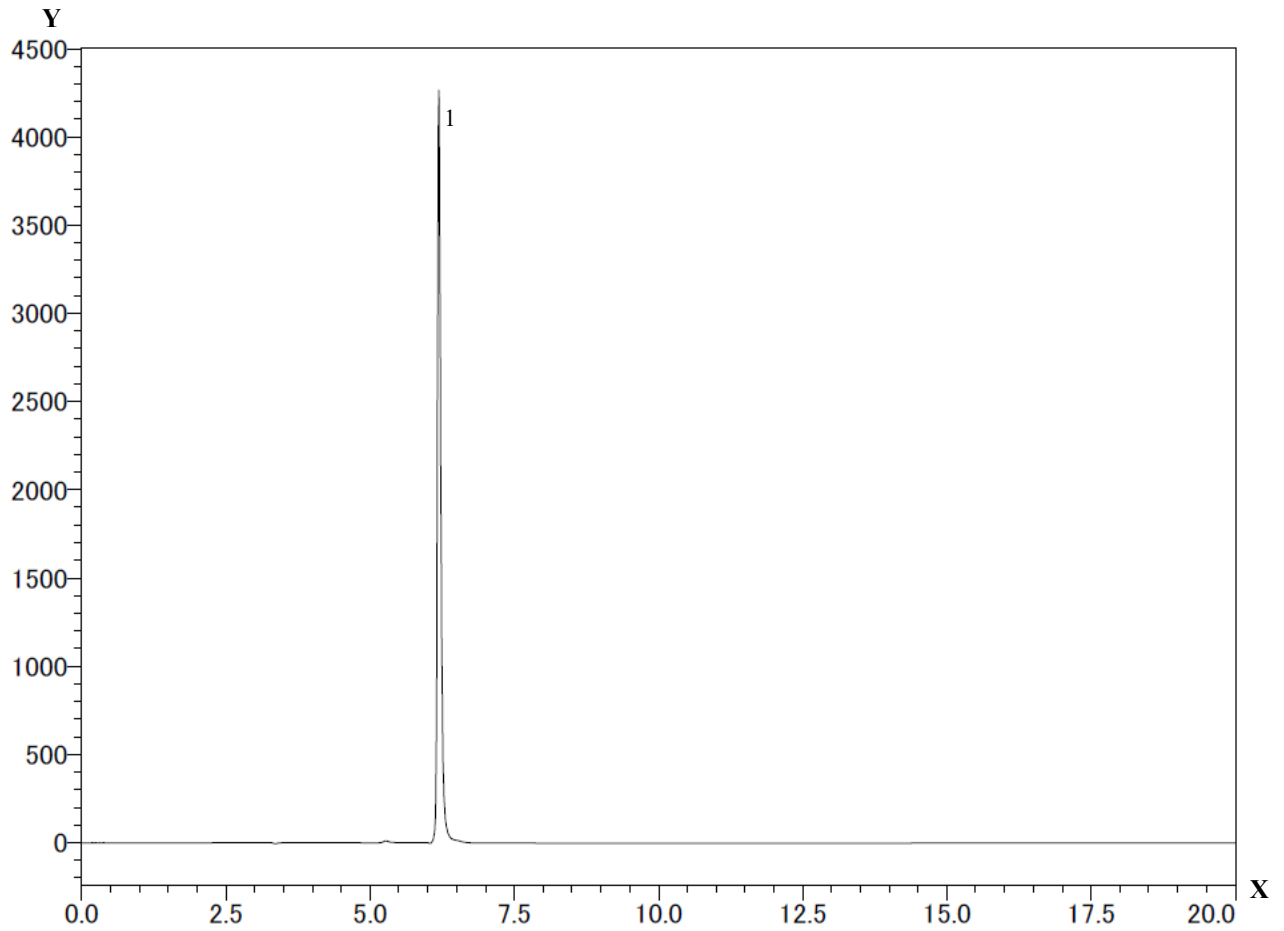
試験室間共同実験は、令和3年にIUPAC共同実験ガイドライン[3]に従って日本国内で行われ、表 A.1 に示す統計結果が得られた。常温でよく振り混ぜた市販のりんごジュースについて均質性[4]を確認し、試験用試料とした。この試験室間共同実験の主催機関である独立行政法人農林水産消費安全技術センターは、手順書、標準原液として100 µg/mL プロシアニジン B2 溶液及び試験用試料を参加試験室に送付した。各試験室は、手順書に従って、合計10試験用試料(5濃度の非明示試料を各2点)を試験した。

表 A.1—試験室間共同実験の結果

試料識別	試料1	試料2	試料3	試料4
参加試験室数	11	11	11	11
採択された試験結果の数	9	9	10	10
プロシアニジン含有量の平均値, mg/L	88.9	171.4	193.9	253.3
併行標準偏差 s_r , mg/L	2.6	2.9	2.1	3.4
併行相対標準偏差 RSD _r , %	2.9	1.7	1.1	1.3
併行許容差 r ($r=2.8 s_r$), mg/L	7.2	8.1	5.8	9.5
室間再現標準偏差 s_R , mg/L	8.9	21.3	23.6	31.5
室間再現相対標準偏差 RSD _R , %	10.0	12.4	12.2	12.4
室間再現許容差 R ($R=2.8 s_R$), mg/L	24.9	59.7	66.0	88.1

注記 この附属書で示す試験室間共同実験は、IUPAC共同実験ガイドラインに従い5試料を用意して行われたが、複数試験室で配付量が規定量に満たない1試料が認められた。この1試料について、参加試験室は規定手順で試験を実施できなかったことから、表 A.1 ではこの試料のデータを採用しなかった。

附属書 B
(参考)
典型的な HPLC クロマトグラム

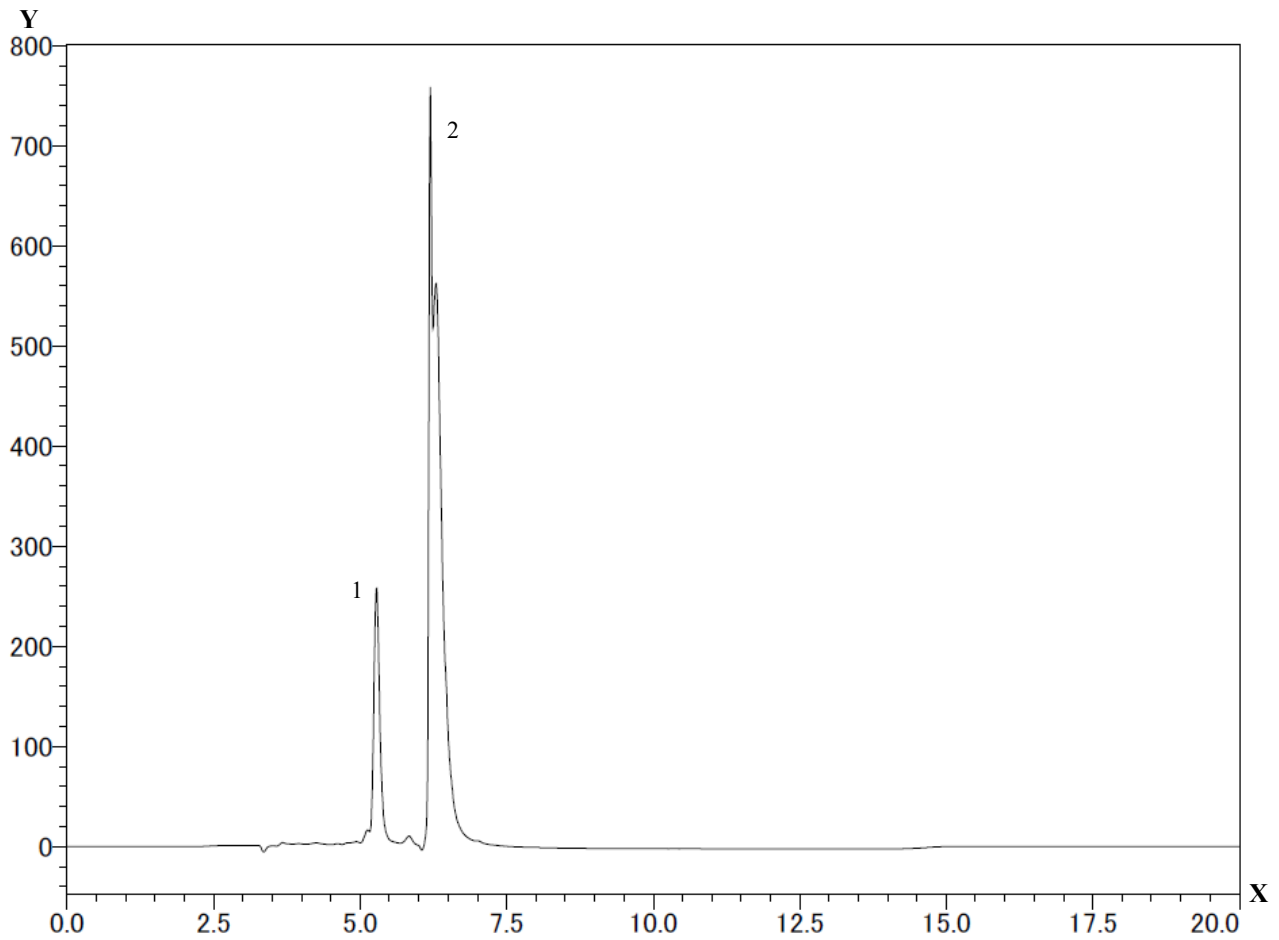


記号説明

- X : 保持時間 (min)
- Y : レスポンス (mV)
- 1 : プロシアニジン B2

注記 HPLC 条件は表 1 によるほか、カラムは Inertsil® WP300 Diol を用いた。なお、この情報は、この規格の利用者の便宜のため
に示しており、この製品を推奨するものではない。

図 B.1—100 µg/mL 標準液



記号説明

X : 保持時間 (min)

Y : レスポンス (mV)

1 : カテキン又はエピカテキン

2 : プロシアニジン類

注記 HPLC 条件は表 1 によるほか、カラムは Inertsil® WP300 Diol を用いた。なお、この情報は、この規格の利用者の便宜のために示しており、この製品を推奨するものではない。

図 B.2—りんごジュース抽出物

参考文献

- [1] **ISO 5725-6:1994**, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6: Use in practice of accuracy values
注記 1 対応日本産業規格 : **JIS Z 8402-6:1999** 測定方法及び測定結果の精確さ (真度及び精度) 一第 6 部 : 精確さに関する値の実用的な使い方 (IDT)
注記 2 併行許容差及び再現許容差の計算方法について, 参考文献中の「4. 許容差の求め方」を参考にした。
- [2] **ISO 5725-1:1994**, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions
注記 1 対応日本産業規格 : **JIS Z 8402-1:1999** 測定方法及び測定結果の精確さ (真度及び精度) 一第 1 部 : 一般的な原理及び定義 (IDT)
注記 2 併行許容差及び再現許容差の表現について, 参考文献中の「7.1.5」を参考にした。
- [3] Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, 1995, **67**(2), p. 331-343
- [4] Thompson, M., et al., The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure Appl. Chem.*, 2006, **78**(1), p. 145-196
注記 均質性の確認方法について, 参考文献中の「3.11 Testing for sufficient homogeneity and stability」を参考にした。