

米中の 4-アミノ酪酸 (GABA) の定量 — 高速液体クロマトグラフ法

Determination of the 4-aminobutanoic acid (GABA) in rice — 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、米 [玄米 (もみからもみ殻を取り除いて調製したもの)、精米 (玄米からぬか層と胚芽の全部又は一部を除いたもの) 並びに発芽させた後にその生長を停止させた玄米及びそれをとう精したものに限る。以下同じ。] 中に含まれる 4-アミノ酪酸 (GABA) (γ -アミノ酪酸ともいう。) 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 1042, Laboratory glassware—One-mark volumetric flasks

注記 対応日本産業規格 : **JIS R 3505** ガラス製体積計 (MOD)

JIS K 0557 用水・排水の試験に用いる水

JIS K 8576 水酸化ナトリウム (試薬)

JIS K 8589 5-スルホサリチル酸二水和物 (試薬)

3 用語及び定義

この規格には、定義する用語はない。

4 測定原理

粉碎した試料の GABA をスルホサリチル酸溶液で抽出する。水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 調整したのち、希塩酸で定容する。ポストカラム誘導体化が可能な高速液体クロマトグラフを用いて試料抽出液中の GABA を測定する。

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、法令等に基づく規制を遵守することは、この規格の利用者の責任である。

5.1 水

JIS K 0557 に規定する A3 以上の品質のもの

5.2 標準試薬

標準試薬は、次のいずれかによる。

- a) 純度 98.0 %以上の GABA
- b) 高速液体クロマトグラフ及び測定条件に適した濃度に GABA を調製した市販のアミノ酸標準液

5.3 塩酸

質量分率が 35.0 %～37.0 %のもので、ポストカラム誘導体化に適した品質のもの

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験では、誘導体化試薬としてニンヒドリンを用いた場合は、ニンヒドリン陽性物質を取り除いた塩酸を利用し、誘導体化試薬として α -フタルアルデヒドを用いた場合は、JIS K 8180 に規定する特級の品質の塩酸を利用した。

5.4 水酸化ナトリウム

JIS K 8576 に規定する特級又は同等以上の品質のもの

5.5 5-スルホサリチル酸二水和物

JIS K 8589 に規定する特級又は同等以上の品質のもの

5.6 希塩酸

水に塩酸約 0.86 mL を加え、1.0 L に定容する。

5.7 水酸化ナトリウム溶液

水 100 mL 当りに水酸化ナトリウム 12 g を溶解する。

警告 刺激性のミストが発生するので、ドラフト内等の換気のよい場所で作業を行う。

5.8 スルホサリチル酸溶液

5-スルホサリチル酸二水和物 116.5 g を水に溶解し、1.0 L に定容する。

5.9 高速液体クロマトグラフ分析試薬

高速液体クロマトグラフ及び測定条件に必要なもので、それらに適した品質のもの

5.10 一連の標準液

標準試薬を希塩酸で溶解し、使用する高速液体クロマトグラフ及び測定条件に適した 4 段階以上の濃度に調製する。この時、標準液の最低濃度は高速液体クロマトグラフの定量下限 [8.2.1 a)参照] 以上に設定する。

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験では、GABA 含有量 10 mg/kg~500 mg/kg の試験用試料に対応する一連の標準液を調製した。

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

6.2 抽出用容器

容量 50 mL 程度のガラス製又は酸性溶液に耐性のある樹脂製のもので、蓋付きのもの。十分な振り混ぜに必要な空間を保持できるもの

6.3 振り混ぜ機

振り混ぜる速度が 100 rpm 以上で、抽出用容器を往復で振り混ぜることができるもの

6.4 全量フラスコ

ISO 1042 に規定するクラス A のもので、標準液の調製 (5.10 参照) 及び/又は抽出 (8.1 参照) の操作に適した容量のもの

6.5 遠心用容器

酸性溶液に耐性のある樹脂製のもので、蓋付きのもの。遠心分離器で設定する相対遠心加速度に耐えられるもの

6.6 遠心分離器

相対遠心加速度 $2\,000 \times g$ 以上で遠心分離ができるもの

警告 事故が発生しないように、遠心分離器は、装置の説明書等に従って操作する。

6.7 メンブランフィルター

フィルターが酸性溶液のろ過に適した親水性 PTFE 製のもので、孔径が $0.45 \mu\text{m}$ 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酸性溶液に耐性のあるもの

注記 附属書 A に示す室間共同実験においては、ルアーロック式シリンジに直径 25 mm のメンブランフィルターを接続して使用した。

6.8 高速液体クロマトグラフ

検出部に蛍光検出器又は可視吸光度検出器を備えたポストカラム誘導体化が可能な高速液体クロマトグラフのうち 8.2.1 の条件を設定できるもの

7 試験用試料の調製

試料を粉砕器等を用い、均質となるよう粉砕したものを試験用試料とする。直ちに **8.1** の操作を行うか、又は試験用試料を冷凍保存する。試験用試料を冷凍保存する場合は、試験用試料の全量又は均質となるようかき混ぜた一部を、調製後速やかに密栓可能な容器に入れて保存する。冷凍保存した試験用試料を使用前に室温に戻し、よく混合する。

注記 -15°C 以下で保存された試験用試料は、少なくとも 8 週間安定した状態を保つことが確認されている。

8 手順

8.1 抽出

8.1.1 試験用試料約 2 g を 10 mg の桁まで抽出用容器にはかりとり、スルホサリチル酸溶液 25 mL を加え、直ちに振り混ぜて試料全量を懸濁させる。

8.1.2 振り混ぜ機で 20 分間振り混ぜた後、水酸化ナトリウム溶液 5 mL を加え、振り混ぜる。

8.1.3 抽出用容器の内容物 (**8.1.2** 参照) を 50 mL 容の全量フラスコに移す。抽出用容器に残った内容物に希塩酸を加え、内容物全量を全量フラスコに移す。この全量フラスコに希塩酸を標線まで加えて定容し、振り混ぜて混合物とする。

8.1.4 **8.1.3** の混合物の一部又は全量を遠心用容器に移し、相対遠心加速度 $2000\times g$ 以上で 10 分間遠心分離を行う。

8.1.5 上澄み液の一部をメンブランフィルターでろ過 (最初のろ液は捨てる。) し、これを試料抽出液とする。調製した日に **8.2** の測定を開始するか、又は試料抽出液を -15°C 以下で保存する。試料抽出液を -15°C 以下で保存した場合は、測定前に室温に戻し、試験管ミキサー等を用いて混合し不溶物を十分に溶解させる。

注記 1 附属書 A に示す試験室間共同実験では、最初のろ液として約 0.5 mL を捨てた。

注記 2 試料抽出液の pH は、約 2.2 となることが確認されている。

注記 3 -15°C 以下で保存された試料抽出液は、少なくとも 17 週間安定した状態を保つことが確認されている。

8.2 測定

8.2.1 高速液体クロマトグラフの測定条件の設定及び確認

装置の取扱説明書に従って操作し、次の検証を行い、適した測定条件を設定する。

- 試験用試料中濃度に換算した定量下限が、10 mg/kg 以下であること
- 標準液及び試料抽出液について、GABA のピークとその前後のきょう雑ピークの分離が測定に支障なく行われること
- 検量線の決定係数が 0.990 以上であること

8.2.2 高速液体クロマトグラフによる測定

設定した条件で作動させベースラインの変動が GABA の測定に支障ないことを確認した後、一連の標準液及び同じ量の試料抽出液 (**8.1.5** 参照) を装置に導入する。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では、試料抽出液 6 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 $\pm 10\%$ 以内であることを確認した。

9 計算

9.1 一般事項

GABA 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

一連の標準液の GABA 濃度に対するピーク面積を一次回帰して検量線を作成する。

試料抽出液の GABA のピーク面積から検量線を用いて GABA 濃度を算出する。試験用試料中の GABA 含有量 w_1 は次の式によって与えられる。

$$w_1 = \frac{C \times V}{W}$$

ここで、
 w_1 : 試験用試料中の GABA 含有量 (mg/kg)
 C : 試料抽出液の GABA 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 V : 定容 (8.1.3 参照) 時の定容量 (mL)
 W : 試験用試料採取量 (8.1.1 参照) (g)

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 ($2.3 \times 10 \text{ mg/kg} \sim 3.6 \times 10^2 \text{ mg/kg}$) 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) [2] 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[3]。

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) [2] 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[3]。

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 5 年に IUPAC 共同実験ガイドライン[4]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。市販の米（玄米、精米及び発芽玄米）を粉碎機を用いて 10 000 rpm で粉碎した。

粉碎物について均質性[5]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、GABA 標準品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 12 試験用試料（6 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 (精米) | 試料 2 (精米) | 試料 3 (玄米) | 試料 4 (発芽玄米) | 試料 5 (発芽玄米) | 試料 6 (発芽玄米) |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|----------------|
| 参加試験室数 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 採択された試験結果の数 | 9 | 10 | 10 | 8 | 9 | 9 |
| GABA 含有量の平均値, mg/kg | 22.8 | 35.0 | 56.4 | 58.3 | 148.3 | 359.7 |
| 併行標準偏差 s_p , mg/kg | 1.0 | 0.61 | 1.0 | 0.93 | 2.0 | 5.0 |
| 併行相対標準偏差 RSD _p , % | 4.3 | 1.7 | 1.8 | 1.6 | 1.3 | 1.4 |
| 併行許容差 $r(r=2.8 s_p)$, mg/kg | 2.7 | 1.7 | 2.8 | 2.6 | 5.5 | 14 |
| 室間再現標準偏差 s_R , mg/kg | 1.6 | 1.6 | 2.3 | 1.9 | 3.8 | 8.1 |
| 室間再現相対標準偏差 RSD _R , % | 6.8 | 4.7 | 4.0 | 3.3 | 2.5 | 2.2 |
| 室間再現許容差 $R(R=2.8 s_R)$, mg/kg | 4.4 | 4.6 | 6.4 | 5.3 | 11 | 23 |

注記 1 試験室間共同実験で使用した高速液体クロマトグラフは、国内での利用状況を踏まえ、検出部に蛍光検出器又は可視吸光度検出器を備えたポストカラム誘導体化が可能なものとした。なお、使用した装置の内訳は、蛍光検出器として 4 試験室、可視吸光度検出器として 6 試験室であった。

注記 2 試験室間共同実験で各試験室が採用した測定条件の例を次に示す。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。

例 1 検出器：蛍光検出器

カラム：AApak Na-LG（内径：6.0 mm，長さ：50 mm）（日本分光株式会社）

移動相：AminoBuffer Reagent Na-LG セット

流速：0.5 mL/min

注入量：5 μ L

カラム温度：60 $^{\circ}$ C

誘導体化試薬：o-フタルアルデヒド

励起波長：345 nm

検出波長：455 nm

分析時間：60 min

例 2 検出器：可視吸光度検出器

カラム：#2622PH（内径：4.0 mm，長さ：60 mm）（株式会社日立ハイテクサイエンス）

移動相：タンパク質加水分解物分析法用緩衝液 PH セット

流速：0.4 mL/min

注入量：20 μ L

カラム温度：57 $^{\circ}$ C

誘導体化試薬：ニンヒドリン

波長：570 nm

分析時間：53 min

参考文献

- [1] **JIS K 8180** 塩酸 (試薬)
- [2] **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) —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。
- [3] **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) —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。
- [4] Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, 1995, **67**(2), 331–343.
- [5] Thompson, M., et al., The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. *Pure Appl. Chem.*, 2006, **78**(1), 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。