

JAS
0002

日本農林規格
JAPANESE AGRICULTURAL
STANDARD

べにふうき緑茶中のメチル化カテキンの定量
－高速液体クロマトグラフ法

Determination of the O-methylated Catechin in 'Benifuuki' Green Tea
(*Camellia sinensis* L.) – High performance liquid chromatographic method

2018年 3月 29日 制定

2023年 6月 28日 改正

農林水産省

目 次

ページ

1	適用範囲	1
2	引用規格	1
3	用語及び定義	1
4	測定原理	2
5	試薬	2
6	装置及び器具	4
7	試験用試料の調製	5
8	手順	5
8.1	抽出	5
8.2	希釈	6
8.3	測定	6
8.4	同定	6
9	計算	7
9.1	一般事項	7
9.2	定量	7
9.3	結果の表現	7
10	精度	7
10.1	試験室間共同実験	7
10.2	併行精度	7
10.3	室間再現精度	7
11	品質管理	8
12	試験報告書	8
	附属書 A	9
	附属書 B	10
	参考文献	14

まえがき

この規格は、日本農林規格等に関する法律第5条において準用する同法第4条第1項の規定に基づき、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）から、日本農林規格原案を添えて日本農林規格を改正すべきとの申出があり、日本農林規格調査会の審議を経て、農林水産大臣が改正した日本農林規格である。これによって、**JAS0002:2019**は改正され、この規格に置き換えられた。

この規格の一部が、特許権、出願公開後の特許出願又は実用新案権に抵触する可能性があることに注意を喚起する。農林水産大臣及び日本農林規格調査会は、このような特許権、出願公開後の特許出願及び実用新案権にかかわる確認について、責任はもたない。

べにふうき緑茶中のメチル化カテキンの定量 —高速液体クロマトグラフ法

Determination of the O-methylated Catechin in 'Benifuuki' Green Tea (*Camellia sinensis* L.)—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、べにふうき（茶農林44号）だけの緑茶の茶葉及びその粉末中のメチル化カテキン類のうち(一)エピガロカテキン 3-(3"-O-メチル)ガレート（以下“EGCG3"Me”という。）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 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）

ISO 3310-1, Test sieves—Technical requirements and testing—Part 1: Test sieves of metal wire cloth

注記3 対応日本産業規格：JIS Z 8801-1 試験用ふるい—第1部：金属製網ふるい（MOD）

ISO 8655-2, Piston-operated volumetric apparatus—Part 2: Pipettes

注記4 対応日本産業規格：JIS K 0970 ピストン式ピペット（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 8101 エタノール（99.5）（試薬）

JIS K 8107 エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物（試薬）

JIS K 9005 リン酸（試薬）

JIS K 9502 L(+)-アスコルビン酸（試薬）

JIS P 3801 ろ紙（化学分析用）

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

粉碎した茶葉から、30℃でりん酸/エタノール混合抽出溶媒によってEGCG3"Meを抽出する。抽出物を水で希釈し、紫外可視吸光度検出器付き高速液体クロマトグラフ（以下“HPLC”という。）を用いたグラジエント溶離で、抽出物希釈液中のEGCG3"Me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 EGCG3"Me

純度 99%以上（HPLC）のもの。

5.3 りん酸

JIS K 9005 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.4 エタノール

JIS K 8101 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.5 メタノール

HPLC 用のもの。

5.6 アセトニトリル

HPLC 用のもの。

5.7 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 エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物, EDTA2Na

JIS K 8107 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.9 やぶきた緑茶

やぶきた（茶農林 6 号）緑茶の茶葉又は粉末茶。

5.10 りん酸溶液

水とりん酸とを49 : 1 (体積比) で混合する。

5.11 抽出溶媒

エタノールとりん酸溶液とを1 : 1 (体積比) で混合する。

5.12 希釈用溶媒

水1000 mL 当たりアスコルビン酸1.76 g 及びEDTA2Na 1.00 g とを溶解する。

5.13 ブランク抽出液

筒条7及び8.1に従って、やぶきた緑茶から抽出物を得る。この抽出物の一部を8.3に従って測定し、クロマトグラムを得る。このクロマトグラムを確認し、EGCG3"Me が検出下限以下であることを確認できた抽出物をブランク抽出液とする。ブランク抽出液を褐色不活性処理済バイアルへ入れ、 -25°C 以下で保存する。使用前に室温に戻し、よく混合する。ブランク抽出液の残りは再保存しない。

注記1 JIS K 0124 に規定する方法によって、検出下限を求めることが可能である。

注記2 -25°C 以下で保存されたブランク抽出液は、少なくとも3か月間安定した状態を保つことが確認されている。

5.14 HPLC 移動相

5.14.1 移動相 A

水とりん酸とを420 : 1 (体積比) で混合する。使用前に脱気する。

注記 適切に脱気することによって、HPLC 測定への移動相内の溶存気体の影響が小さくなる。

5.14.2 移動相 B

メタノールとアセトニトリルとを18 : 5 (体積比) で混合する。使用前に脱気する。

注記 適切に脱気することによって、HPLC 測定への移動相内の溶存気体の影響が小さくなる。

5.15 EGCG3"Me 標準原液

EGCG3"Me を約 $100\ \mu\text{g/mL}$ の濃度で含む溶液となるように希釈用溶媒で調製し、EGCG3"Me 標準原液とする。EGCG3"Me を溶解させる際、超音波を利用してもよい。直ちに一連の標準液の調製(5.16 参照)に使用する、又は褐色不活性処理済バイアルに移し、 -25°C 以下で保存する。EGCG3"Me 標準原液を -25°C 以下で保存した場合は、使用前に室温に戻し、よく混合する。一連の標準液を調製後の標準原液の残りは再保存しない。

注記1 溶液中のEGCG3"Me は分解しやすいため、標準原液へEDTA2Na を添加し、褐色不活性処理済バイアルで保存することは重要である。

注記2 -25°C 以下で保存された標準原液は、少なくとも2か月間安定した状態を保つことが確認されている。

5.16 一連の標準液

一連の標準液は、同一のEGCG3"Me 標準原液から調製し、調製した日に8.3.2の操作を行う。EGCG3"Me 標準原液と希釈用溶媒とブランク抽出液とを混合し、試料抽出物希釈液の測定に適した5段階以上の濃度に調製する。各標準液は褐色不活性処理済バイアルに入れる。各標準液中の実際のEGCG3"Me 濃度を算出する。

注記1 EGCG3"Me がHPLC 装置の配管部分の金属に吸着すると考えられ、その吸着を軽減するため、一連の標準

液にブランク抽出液を添加することは重要である。

注記2 一連の標準液の調製例を表1に示す。

注記3 1 µg/mL～50 µg/mL の範囲の検量線において、決定係数は0.990 以上であること及びy 切片の95%信頼区間に原点が含まれることが確認されている。

表1—標準液の調製例

標準液	EGCG3"Me 標準原液 の採取量, µL	希釈用溶媒の採取量, µL	ブランク抽出液の採 取量, µL	標準液の濃度, µg/mL 相当
A	200	700	100	20
B	150	750	100	15
C	100	800	100	10
D	50	850	100	5
E	10	890	100	1

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

1 mg の桁の精度ではかる機能をもつもの及び0.01 mg の桁の精度ではかる機能をもつもの。

6.2 ふるい

ISO 3310-1 に規定する公称目開き 355 µm のもの。

6.3 全量フラスコ

ISO 1042 に規定するクラス A のもので、EGCG3"Me 標準原液の調製 (5.15 参照) , 抽出 (8.1 参照) 及び希釈 (8.2 参照) のための容量範囲をカバーするもの。

6.4 恒温水槽

(30±3) °Cに温度設定が可能なもの。

6.5 ろ紙

JIS P 3801 に規定する定性分析用 2 種のもので、抽出 (8.1 参照) に適した寸法のもの。

6.6 メンブランフィルター

親水性 PTFE で、孔径が 0.45 µm のもの。

6.7 全量ピペット

ISO 648 に規定するクラス A のもので、希釈 (8.2 参照) のための容量範囲をカバーするもの。

6.8 ピストン式ピペット

ISO 8655-2 に規定する空気置換式 (type A) のピストン式ピペットで、希釈 (8.2 参照) のための容量範囲をカバーするもの。

6.9 褐色不活性処理済バイアル

不活性処理済の褐色ガラス製で、ブランク抽出液の保管 (5.13 参照)、EGCG3"Me 標準原液の保管 (5.15 参照)、測定 (8.3 参照) のそれぞれの容量範囲をカバーするもの。蓋のセプタムは、PTFE 製又は PTFE でコーティングされたもの。

6.10 HPLC 装置

6.10.1 HPLC

JIS K 0124 に規定する 2 液混合グラジエントが可能な移動相送液部、温度制御機能をもつカラムオーブン、オートサンプラー、272 nm における吸光度を測定できる紫外可視吸光度検出器及びデータ処理部を備えたもの。移動相送液部に脱気装置を備えているものが望ましい。

6.10.2 HPLC 用カラム

次の特性をもつ C18 (ODS) 逆相カラム。

- 長さ : 150 mm
- 内径 : 4.6 mm
- 粒子径 : 5 μ m
- 12 分以内に EGCG3"Me が他の成分の影響を受けない状態で溶出するもの。8.3 に従って EGCG3"Me の保持時間を確認する。

ガードカラムを使用する場合は、測定に用いるカラムに対応するものを使用する。

7 試験用試料の調製

適切な粉砕器を使用して茶葉を粉砕する。粉砕した試料又は粉末茶試料をふるいに通したものを試験用試料とする。直ちに 8.1 の操作を行う、又は試験用試料を -25°C 以下で保存する。 -25°C 以下で保存した場合は、抽出 (8.1 参照) 前に室温に戻し、よく混合する。

注記 -25°C 以下で保存された試験用試料は、少なくとも 1 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

試験用試料 (箇条 7 参照) 240 mg ~ 260 mg を 1 mg の桁まで 25 mL 容の全量フラスコにはかりとる。抽出溶媒 20 mL を加え、軽く混合する。試料の入った全量フラスコを 30°C に設定した恒温水槽に入れ、60 分間静置する。恒温水槽から全量フラスコを取り出し、室温になるまで静置する。水を標線まで加えて定容し、振り混ぜて混合物とする。

混合物をろ紙でろ過する (最初のろ液は捨てる。)。ろ液をメンブランフィルターでろ過 (最初のろ液は捨てる。)。ろ液約 1.5 mL を回収し、これを試料抽出物とする。直ちに 8.2 の操作を行うか、又は試料抽出物を -25°C 以下で保存する。試料抽出物を -25°C 以下で保存した場合は、希釈前に室温に戻し、よく混合する。

注記 1 附属書 A に示す試験室間共同実験では、ろ紙でろ過した際の最初のろ液として約 2 mL を捨てた。また、メンブランフィルターでろ過した際の最初のろ液として約 1 mL を捨てた。

注記 2 -25℃以下で保存された試料抽出物は、少なくとも 2 か月間安定した状態を保つことが確認されている。

8.2 希釈

全量ピペット又はピストン式ピペットを用いて、試料抽出物 (8.1 参照) を水で希釈し、これを試料抽出物希釈液とする。希釈操作で全量フラスコを用いてもよい。試料抽出物と水とを 1 : 9 (体積比) で混ぜることが望ましい。試料抽出物希釈液を褐色不活性処理済バイアルに移す。直ちに 8.3 の操作を行う。

8.3 測定

8.3.1 HPLC 条件の設定

メーカーの取扱説明書に従って、HPLC 装置をセットアップする。設定は次による。

- 移動相の流量 : 1.0 mL/min
- カラムの設定温度 : 40℃
- 検出波長 : 272 nm
- 注入量 : 10 µL
- 溶出条件 : 12 分間は移動相 A を 77 %及び移動相 B を 23 %とする。その後、移動相 B の比率を高くし、迅速に残りの成分を溶出する。次に、移動相 A を 77 %及び移動相 B を 23 %に再設定して、次の注入の前の約 10 分間、平衡化する。

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験では、表 2 に示す 2 液グラジエント条件を使用した。

表 2-2 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%)
0~12	77	23
12~20	30	70
20~30	77	23

注記 与えられた値は、一例である。

8.3.2 HPLC 測定

安定化させるために、全体のシステムを稼働させておく。設定した HPLC 条件 (8.3.1 参照) で作動させた際、ベースラインの変動が EGCG3"Me の測定に支障がないことを確認する。一連の標準液のうち、最も濃度の高い標準液 (例えば表 1 に示す標準液 A) をカラムに注入し、得られたクロマトグラムとブランク抽出液のクロマトグラムとを比較し、EGCG3"Me の測定を妨害するピークがないことを確認する。その後、一連の標準液をそれぞれカラムに注入し、続いて試料抽出物希釈液 (8.2 参照) を注入する。一定の間隔 (通常、5 つの試料溶液の後) を置いて、一つの濃度の標準液 (例えば表 1 に示す標準液 C) の注入を繰り返すことが望ましい。

データ処理装置を使用して、標準液及び試料抽出物希釈液の全てのピークのデータを集める。

注記 一定の間隔で注入された標準液の各ピーク面積の“最大値/最小値”の比を算出した値は、通常 11/9 以下である。

8.4 同定

試料抽出物希釈液について、同じ HPLC 条件 (8.3.1 参照) 下での標準液のクロマトグラムから得られた EGCG3"Me の保持時間と一致したピークを、EGCG3"Me と同定する。

注記 やぶきた緑茶及びびべにふうき緑茶の典型的な 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

EGCG3"Me 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。きょう雑ピークに対しては、**JIS K 0124** に規定する垂線法又は接線法に従って、適切に対処する。

9.2 定量

一連の標準液中のそれぞれの EGCG3"Me のピーク面積を得る。各標準液の EGCG3"Me 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。

各試料抽出物希釈液中の EGCG3"Me のピーク面積から検量線を用いて EGCG3"Me の濃度を算出する。試験用試料中の EGCG3"Me の含有量 w_C は、次の式によって与えられる。

$$w_C = \frac{C \times V \times d \times 1\,000}{m \times 1\,000}$$

ここで、
 w_C : 試験用試料中の EGCG3"Me の含有量 (g/kg)
 C : 試料抽出物希釈液中の EGCG3"Me の濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 V : 抽出溶媒の量 (mL) , 通常 25 (**8.1** 参照)
 d : 試料抽出物希釈液調製時の希釈倍率, 通常 10 (**8.2** 参照)
 m : 試験用試料の採取量 (mg)

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 (11 g/kg~19 g/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) [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)

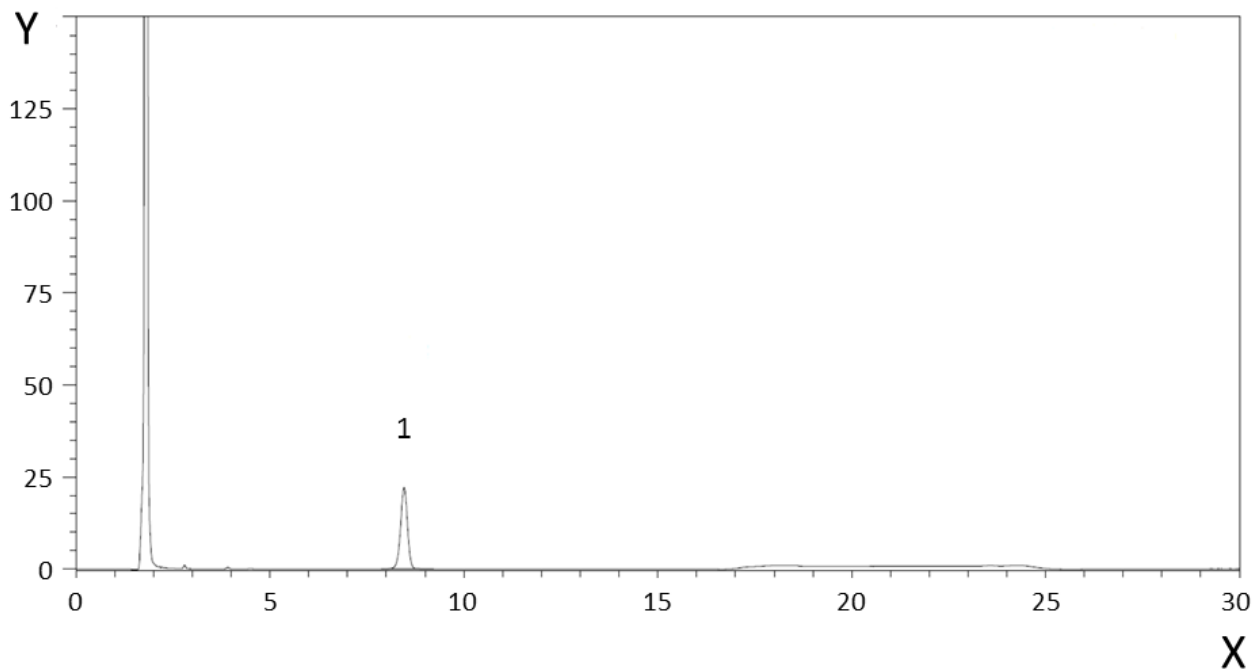
試験室間共同実験の結果

試験室間共同実験は、平成 27 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[4]に示す統計結果が得られた。市販のべにふうき緑茶の茶葉及び粉末茶から、均質な[5]試験用試料が調製された。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、試験用試料、既知濃度の EGCG3"Me 標準原液及びブランク抽出液を参加試験室に送付した。各参加試験室は、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 (茶葉)	試料 2 (粉末茶)	試料 3 (粉末茶)	試料 4 (粉末茶)	試料 5 (粉末茶)
参加試験室数	10	10	10	10	10
採択された試験結果の数	10	8	10	8	10
EGCG3"Me 含有量の平均値, g/kg	10.85	10.77	13.65	15.59	18.89
併行標準偏差 s_r , g/kg	0.22	0.15	0.20	0.21	0.30
併行相対標準偏差 RSD_r , %	2.0	1.4	1.5	1.4	1.6
併行許容差 r ($r=2.8 s_r$), g/kg	0.61	0.42	0.57	0.59	0.83
室間再現標準偏差 s_R , g/kg	0.62	0.17	0.54	0.25	0.76
室間再現相対標準偏差 RSD_R , %	5.7	1.6	4.0	1.6	4.0
室間再現許容差 R ($R=2.8 s_R$), g/kg	1.7	0.47	1.5	0.71	2.1

附属書 B
(参考)
典型的な HPLC クロマトグラム

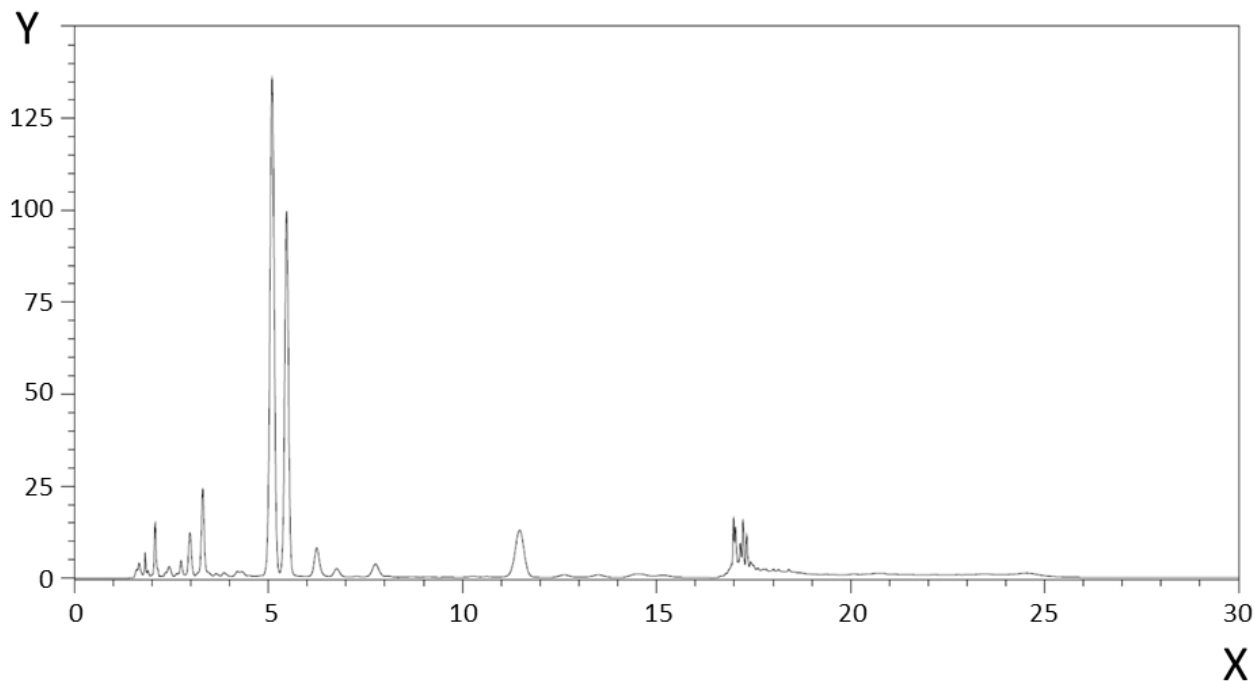


記号説明

- X : 保持時間 (min)
- Y : レスポンス (mAU)
- 1 : EGCG3"Me

注記 HPLC 条件は 8.3.1 によるほか、溶出は表 2 の 2 液グラジエント条件を用い、カラムは Wakopak® Navi C18-5 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—EGCG3"Me 標準液 (ブランク抽出液を含まない)



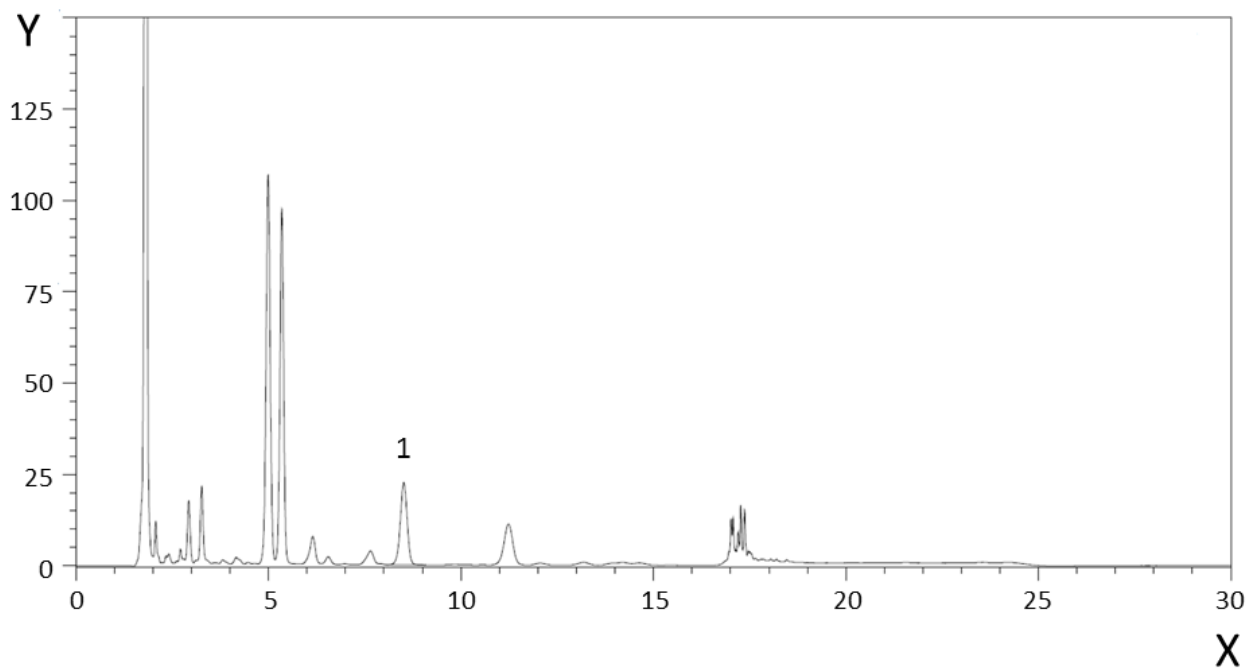
記号説明

X : 保持時間 (min)

Y : レスポンス (mAU)

注記 HPLC 条件は 8.3.1 によるほか、溶出は表 2 の 2 液グラジエント条件を用い、カラムは Wakopak® Navi C18-5 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—ブランク抽出液



記号説明

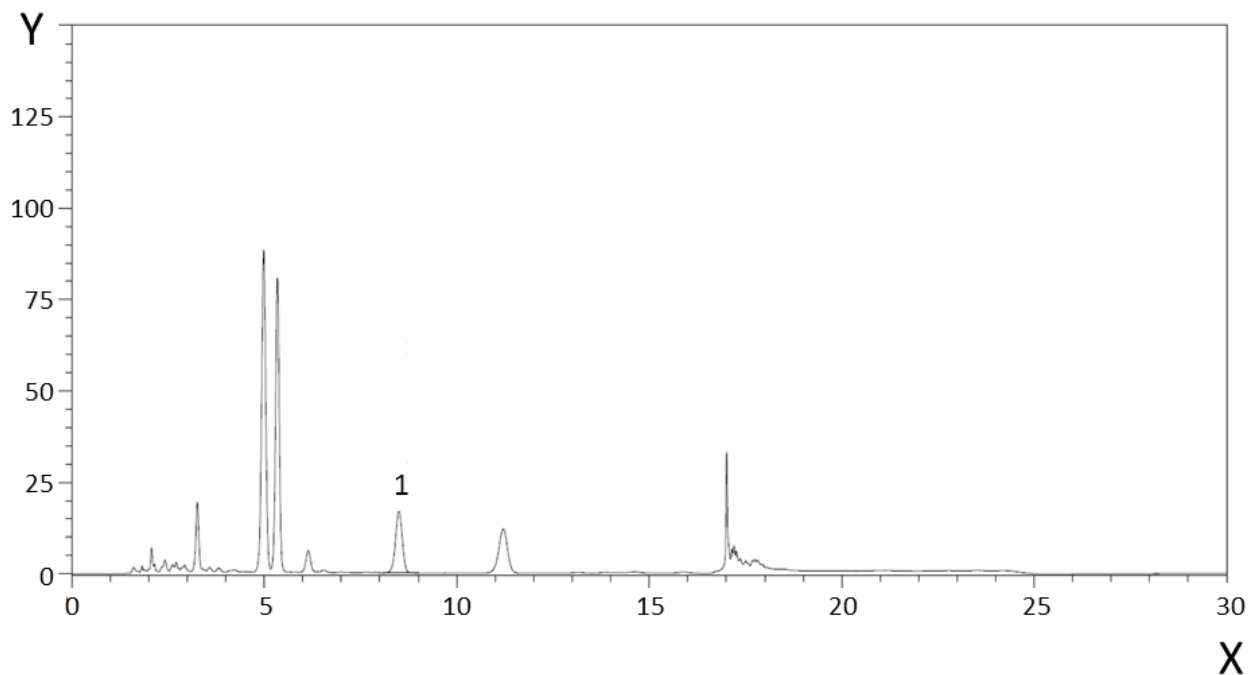
X : 保持時間 (min)

Y : レスポンス (mAU)

1 : EGCG3"Me

注記 HPLC 条件は 8.3.1 によるほか、溶出は表 2 の 2 液グラジエント条件を用い、カラムは Wakopak[®] Navi C18-5 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.3—EGCG3"Me 標準液



記号説明

X : 保持時間 (min)

Y : レスポンス (mAU)

1 : EGCG3"Me

注記 HPLC 条件は 8.3.1 によるほか、溶出は表 2 の 2 液グラジエント条件を用い、カラムは Wakopak[®] Navi C18-5 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.4—試料抽出物希釈液

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）—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）—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] 法邑雄司ら, ベにふうき緑茶中のメチル化カテキン測定法の室間共同試験による妥当性確認, *日本食品科学工学会誌*, 2016, **63**(7), p. 312-318.
- [5] 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。

制定等の履歴

制定 平成30年3月29日農林水産省告示第662号
改正 令和元年6月27日農林水産省告示第475号
最終改正 令和5年6月28日農林水産省告示第807号

制定文、改正文、附則等（抄）

- 令和5年6月28日農林水産省告示第807号
令和5年7月28日から施行する。