

_____は、パブリックコメントを受けて修正した箇所

~~~~~は、パブリックコメント募集後に修正した箇所

日本農林規格

JAS

\*\*\*\* : 20\*\*

# 食品又は農産物における相対モル感度を利用した定量法 に関する一般要求事項

## General Requirements for Quantitative Methods

### Using Relative Molar Sensitivity in Food or Agricultural Products

#### 序文

クロマトグラフィーを用いた食品又は農産物中の成分の定量分析において、様々な化学物質に対する測定の需要が高まっている。信頼性の高い定量値を得るためには、純度又は濃度が明らかな定量用標品を必要とするが、全ての化学物質について定量用標品の供給は期待できない。相対モル感度を利用したクロマトグラフィーによる定量法では、分析対象物質と異なる物質の定量用標品を用いることができるため、この問題を解決できる。相対モル感度の利用によって、定量用標品の供給されていない分析対象物質であっても、信頼性の高い定量の実施が可能となる。相対モル感度の決定には様々な手法が考えられるが、定量核磁気共鳴分光法（qNMR）とクロマトグラフィーを組み合わせる方法が簡便である[3][4]。

#### 1 適用範囲

この規格は、ある物質を基準としたときの、それに対する分析対象物質の相対モル感度の決定手順と、あらかじめ決定された相対モル感度を利用した分析対象物質の定量法の開発及びその使用における一般要求事項を規定する。

#### 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。

JIS K 0050 化学分析方法通則

JIS K 0114 ガスクロマトグラフィー通則

JIS K 0115 吸光光度分析通則

JIS K 0124 高速液体クロマトグラフィー通則

JIS K 0138 定量核磁気共鳴分光法通則（qNMR 通則）

JIS K 0211 分析化学用語（基礎部門）

JIS K 0214 分析化学用語（クロマトグラフィー部門）

JIS K 0215 分析化学用語（分析機器部門）

#### 3 用語及び定義

この規格で用いる主な用語及び定義は、次によるほか、JIS K 0050, JIS K 0114, JIS K 0115, JIS K 0124, JIS K 0138, JIS K 0211, JIS K 0214 及び JIS K 0215 による。

### 3.1

#### 相対モル感度, RMS (relative molar sensitivity)

基準とするある物質 X の単位物質質量当たりのクロマトグラフの検出部の応答に対する, 別の物質 Y の単位物質質量当たりの検出部の応答の比

注釈 1 式(6)参照

### 3.2

#### RMS 法 (RMS method)

RMS を用いたクロマトグラフィーによる定量分析法

### 3.3

#### 分析対象物質 (analyte)

分析対象とする物質

注釈 1 分析対象成分ともいう。

### 3.4

#### RMS 基準物質 (RMS reference)

RMS 法に用いる基準となり, 分析対象物質とは異なる物質

### 3.5

#### RMS 混合標準液 (RMS mixed standard solution)

分析に適した濃度に調製された分析対象物質と RMS 基準物質の混合標準液

### 3.6

#### RMS 標準液 (分析対象物質) (RMS standard solution for analyte)

分析に適した濃度に調製された分析対象物質の標準液

### 3.7

#### RMS 標準液 (基準物質) (RMS standard solution for RMS reference)

分析に適した濃度に調製された RMS 基準物質の標準液

### 3.8

#### RMS 内標準法 (RMS internal standard method)

RMS 法のうち, 試料溶液に RMS 基準物質を添加してクロマトグラフィーによって測定する方法

### 3.9

#### RMS 外標準法 (RMS external standard method)

RMS 法のうち, 試料溶液と別に調製した RMS 標準液 (基準物質) の溶液 を用いてクロマトグラフィーによって測定する方法

## 4 原理

### 4.1 一般

2 種の異なる物質 X 及び Y は, 検出部においてそれぞれ物質固有の応答を与える。物質 X に対する物質 Y の単位物質質量当たりの応答比, すなわち, RMS を決定できるとき, 物質 X を基準として, その物質質量と, 物質 X と物質 Y の応答比の関係から, 物質 Y の物質質量を算出することができる。したがって, 分析対象物質 (物質 Y) の RMS 基準物質 (物質 X) に対する RMS を決定すれば, 試料溶液中の分析対象物質 (物質 Y) の含量は, 分析対象物質 (物質

Y) と同一の定量用標品を用いずに算出することが可能である[3][4]。

## 4.2 RMS 決定の原理

RMS 決定の原理を次に示す。

モル感度係数  $a$  は、特定のクロマトグラフィーの分析条件における物質固有の特性値であり、物質のモル濃度  $M$  が既知の溶液の検出部の応答  $Z$  の関係は次の式(1)で表される。

$$Z = aM \dots\dots\dots (1)$$

ここで、  
 $Z$  : モル濃度が  $M$  の物質に対する検出部の応答  
 $a$  : モル感度係数  
 $M$  : 溶液中のある物質のモル濃度 (mol/L)

モル感度係数  $a$  は、ある既知のモル濃度  $M$  の溶液が検出部に与える応答  $Z$  の関係の係数である。よって、モル感度係数  $a$  が既知の場合、検出部の応答  $Z$  からこの物質の溶液中のモル濃度  $M$  を求めることが可能である。

ある 2 つの物質 X 及び Y のそれぞれのモル感度係数は、次の式(2)及び式(3)で表される。

$$a_X = \frac{Z_X}{M_X} \dots\dots\dots (2)$$

$$a_Y = \frac{Z_Y}{M_Y} \dots\dots\dots (3)$$

ここで、  
 $a_X$  : 物質 X のモル感度係数  
 $a_Y$  : 物質 Y のモル感度係数  
 $Z_X$  : 物質 X のモル濃度  $M_X$  のときの検出部の応答  
 $Z_Y$  : 物質 Y のモル濃度  $M_Y$  のときの検出部の応答  
 $M_X$  : ある溶液中の物質 X のモル濃度 (mol/L)  
 $M_Y$  : ある溶液中の物質 Y のモル濃度 (mol/L)

物質 X を RMS 基準物質とし、物質 Y を分析対象物質としたとき、両者のモル濃度の比と検出部の応答比は、次の式(4)及び式(5)で表される。

$$R_m = \frac{M_{an}}{M_{rr}} \dots\dots\dots (4)$$

$$R_z = \frac{Z_{an}}{Z_{rr}} = \frac{a_{an} M_{an}}{a_{rr} M_{rr}} \dots\dots\dots (5)$$

ここで、  
 $R_m$  : 分析対象物質と RMS 基準物質のモル濃度比  
 $R_z$  : 分析対象物質と RMS 基準物質の検出部の応答比  
 $M_{an}$  : 分析対象物質のモル濃度 (mol/L)  
 $M_{rr}$  : RMS 基準物質のモル濃度 (mol/L)  
 $Z_{an}$  : モル濃度  $M_{an}$  の分析対象物質の検出部の応答  
 $Z_{rr}$  : モル濃度  $M_{rr}$  の RMS 基準物質の検出部の応答  
 $a_{an}$  : 分析対象物質のモル感度係数  
 $a_{rr}$  : RMS 基準物質のモル感度係数

したがって、物質 X を RMS 基準物質とし、物質 Y を分析対象物質としたとき、RMS は、次の式(6)で表される。

$$V_{rms} = \frac{R_z}{R_m} = \frac{\frac{Z_{an}/Z_{rr}}{M_{an}/M_{rr}}}{\frac{Z_{an}/M_{an}}{Z_{rr}/M_{rr}}} = \frac{Z_{an}/Z_{rr}}{M_{an}/M_{rr}} \cdot \frac{a_{an}}{a_{rr}} \dots\dots\dots (6)$$

ここで、  
 $V_{rms}$  : RMS 基準物質に対する分析対象物質(分析)の RMS  
 $R_z$  : 分析対象物質と RMS 基準物質の検出部の応答比  
 $R_m$  : 分析対象物質と RMS 基準物質のモル濃度比  
 $Z_{an}$  : モル濃度  $M_{an}$  の分析対象物質の検出部の応答  
 $Z_{rr}$  : モル濃度  $M_{rr}$  の RMS 基準物質の検出部の応答  
 $M_{an}$  : 分析対象物質のモル濃度 (mol/L)  
 $M_{rr}$  : RMS 基準物質のモル濃度 (mol/L)  
 $a_{an}$  : 分析対象物質のモル感度係数  
 $a_{rr}$  : RMS 基準物質のモル感度係数

なお、同一溶液中に分析対象物質と RMS 基準物質が存在するとき、モル濃度比は物質質量比と一致する。  
 具体的な RMS の決定手順を簡条 5 に示す。

### 4.3 RMS 法への利用

RMS がすでに求められている場合、RMS と RMS 基準物質を用い、この RMS を求めたときと同等の分析条件のクロマトグラフィーを行うことで、RMS 基準物質のモル濃度  $M_{rr}$  及び応答  $Z_{rr}$ 、試料溶液中の分析対象物質の応答  $Z_{an}$ 、並びにこの RMS から、分析対象物質のモル濃度  $M_{an}$  は式(7)によって求めることが可能である。

$$M_{an} = \frac{Z_{an}}{Z_{rr}} \times \frac{M_{rr}}{V_{rms}} \dots\dots\dots (7)$$

ここで、  
 $M_{an}$  : 分析対象物質のモル濃度 (mol/L)  
 $M_{rr}$  : RMS 基準物質のモル濃度 (mol/L)  
 $Z_{an}$  : モル濃度  $M_{an}$  の分析対象物質の検出部の応答  
 $Z_{rr}$  : モル濃度  $M_{rr}$  の RMS 基準物質の検出部の応答  
 $V_{rms}$  : RMS 基準物質に対する分析対象物質の RMS

RMS 法には、RMS 内標準法又は RMS 外標準法がある。RMS の決定法、RMS 法の利用目的及び適用する試料に応じていずれかの方法を選択しなければならない。(5.11 参照)

なお、RMS 法の具体的な手順を簡条 6 に示し、具体例を附属書 B 及び附属書 C に示す。

## 5 RMS の決定及び RMS 法の選択

### 5.1 一般

RMS 決定には、次のいずれかを決定しなければならない。

- ー 分析対象物質及び RMS 基準物質の物質質量比
- ー 分析対象物質及び RMS 基準物質のそれぞれのモル濃度から計算するモル濃度比

注記 1 分析対象物質及び RMS 基準物質の物質質量比の決定には qNMR を用いることが有効である。

注記 2 純度からモル濃度を求めることができる。

RMS 法を行う際は RMS を決定したときと同等の分析条件 (6.1 参照) でクロマトグラフィーを行わなければならない。RMS 決定時と異なる分析条件下では、分析対象物質及び RMS 基準物質のモル濃度に対する応答比 (ピーク面積比) が変化する可能性が高く、RMS 法から得られる定量値の妥当性が担保できない。したがって、RMS 決定時に試料溶液中のきょう雑物等を考慮してクロマトグラフィーの分析条件をあらかじめ決定しなければならない。更に、決定した RMS を利用する定量法 (RMS 内標準法又は RMS 外標準法) を想定し、RMS を決定する。

決定する RMS、及びこの RMS を用いた試料溶液中の分析対象物質の定量結果に計量トレーサビリティを確保する

ためには、**8.3** 及び**箇条9**に従わなければならない。**箇条9**に示す不確かさの評価は、計量トレーサビリティの確保が不要な場合においても、実験条件の最適化及び分析の問題点の評価のために活用することができる。

決定した RMS を試料溶液中の分析対象物質の定量に利用するために、RMS 内標準法又は RMS 外標準法のいずれかを選択し、RMS 法を確立する。

RMS の決定及び決定した RMS を適用可能な定量法に関する概要を図 A.1 に示す。

## 5.2 目標設定及び分析対象物質の要件

RMS 法を適用したい試料及び分析対象物質を設定する。分析の目的を明確化し、それに求められる目標精度を設定する。

RMS 法を適用可能な試料溶液中の分析対象物質は、クロマトグラフの検出部によってモル濃度又は物質質量に比例した応答（ピーク面積）で検出できなければならない。加えて、次のいずれかを満たさなければならない。

- RMS 混合標準液を用いる場合は、RMS 基準物質に対する分析対象物質の物質質量比が qNMR 等によって測定可能であること。
- qNMR 若しくは差数法による純度測定が可能である、又は純度既知の物質が入手可能であること。

## 5.3 予備検討

RMS 法の確立にあたり、あらかじめ次を検討する。

- 試料の前処理法（例えば、試料溶液の調製法）
- 試料溶液中の分析対象物質を分離、検出可能なクロマトグラフィーの分析条件（検出器を含む）
- 分析対象物質の調製法（例えば、希釈溶媒、調製濃度、調製した溶液中における安定性）

**注記** 定量分析に適した応答（ピーク面積）範囲は用いるクロマトグラフの検出部によって異なるため、調製濃度が適切でない場合は、RMS の決定、RMS 法の利用ができないことがある。

## 5.4 RMS 基準物質の選定

RMS 基準物質は、次を満たさなければならない。

- クロマトグラフの検出部によってモル濃度又は物質質量に比例した応答（ピーク面積）で検出できること。
  - RMS 混合標準液を用いる場合は、RMS 基準物質に対する物質質量比が qNMR 等によって測定可能であること。
  - qNMR 若しくは差数法による純度測定が可能である、又は純度既知の物質が入手可能であること。
- 加えて、次を満たすことが望ましい。
- 安定な（例えば、吸湿性がない、酸化しにくい、分解しにくい）物質
  - 入手しやすい（例えば、安価、複数メーカーから供給されている）物質
  - 計量トレーサビリティが確保された手順等で純度が決定された物質（例えば、標準物質（RM））

RMS 決定に RMS 混合標準液を用いる場合又は RMS 法として RMS 内標準法を選択する場合、RMS 基準物質は上記に加え、次を満たさなければならない。

- 試料溶液中の分析対象物質、RMS 基準物質及びそれぞれのきょう雑物がクロマトグラフで定量に適した分離をすること。
- 試料溶液中の分析対象物質、RMS 基準物質及びそれぞれのきょう雑物が相互に反応を起こさないこと。

**注記** 例えば、酸、アルカリに不安定な分析対象物質の場合、酸性、アルカリ性の性質がある RMS 基準物質を選択すると、分析対象物質が分解され、正確な定量ができないことがある。具体的には、クロマトグラフィーによる分析において応答（ピーク面積）の著しい低下、ピーク形状の異常等がみられることがある。

## 5.5 RMS 決定時に利用する標準液の選択

RMS 決定時には、分析対象物質及びRMS 基準物質についてのRMS 混合標準液又はそれぞれのRMS 標準液のいずれかを選択する。

物質質量比及び応答比（ピーク面積比）の決定が比較的簡易であり、測定時のばらつきが抑えられ正確さが向上することが期待できるため、RMS 混合標準液を用いてRMS を決定することが望ましい。

分析対象物質と RMS 基準物質を混合したときに問題が生じる場合（例えば、分析対象物質ときょう雑物の分離に適したクロマトグラフィーの分析条件下で RMS 基準物質の分離が不十分又は単一ピークとして検出が困難な場合、qNMR で分析対象物質と RMS 基準物質のシグナルの分離が困難な場合等）は、RMS 標準液（分析対象物質）及びRMS 標準液（基準物質）をそれぞれ分析しRMS を決定する。

## 5.6 物質質量比又はモル濃度比の決定

### 5.6.1 一般

分析対象物質及びRMS 基準物質の物質質量比又はモル濃度比（式(4)の $R_m$ に相当）を決定する。

5.5 で RMS 混合標準液の利用を選択した場合は、分析対象物質及び RMS 基準物質の物質質量比を決定する。分析対象物質及びRMS 基準物質の物質質量比はRMS 混合標準液中では、式(8)に示すとおり、モル濃度比と一致する。

$$\frac{M_{an}}{M_{rr}} = \frac{n_{an}/v}{n_{rr}/v} = \frac{n_{an}}{n_{rr}} \dots\dots\dots (8)$$

ここで、  
 $M_{an}$  : RMS 混合標準液中の分析対象物質のモル濃度 (mol/L)  
 $M_{rr}$  : RMS 混合標準液中の RMS 基準物質のモル濃度 (mol/L)  
 $v$  : RMS 混合標準液の体積 (L)  
 $n_{an}$  : RMS 混合標準液中の分析対象物質の物質質量 (mol)  
 $n_{rr}$  : RMS 混合標準液中の RMS 基準物質の物質質量 (mol)

従って、RMS 混合標準液を用いる場合、5.6.2.1 に示す手順で、物質質量比を測定で決定することが可能である。

5.5 で RMS 標準液（分析対象物質）及びRMS 標準液（基準物質）の利用を選択した場合は、5.6.3 に示す手順で、分析対象物質及びRMS 基準物質の純度又はそれぞれのRMS 標準液中のモル濃度をそれぞれ求め、計算によってモル濃度比を決定する。

物質質量比又はモル濃度比の決定ができない場合は、RMS を決定することはできない。

### 5.6.2 RMS 混合標準液を利用する場合

#### 5.6.2.1 測定による物質質量比の決定

RMS 混合標準液の分析対象物質及び RMS 基準物質の物質質量比は、qNMR 等を用いた測定によって求められる[1][6][7][8][9][13]。ただし、qNMR によって物質質量比を決定する場合は、NMR スペクトル上の定量に用いる分析対象物質及びRMS 基準物質のシグナルが十分に分離して観察されなければならない。

qNMR で物質質量比を求める場合、qNMR 測定に供した RMS 混合標準液を希釈し、クロマトグラフィーに付すことによって、物質質量比に対応した検出部の応答比（ピーク面積比）を求めることができる。従って、RMS の決定にあたり、分析対象物質と RMS 基準物質の正確な純度及びひょう量値を必ずしも必要としない。

RMS 混合標準液を利用し、分析対象物質及び RMS 基準物質の物質質量比を qNMR によって決定した事例を**附属書 B**に記載する。

注記 qNMR 以外の物質質量比測定のための手法の一例として、ポストカラム反応 GC[18]が適用可能である。

### 5.6.2.2 その他の方法による純度決定及び調製による物質質量比の決定

5.6.2.1 の適用が難しい場合であり、かつ、あらかじめ純度が決定された分析対象物質と RMS 基準物質の入手が可能である場合又はそれぞれの純度決定が差数法等によって可能である場合[15]には、調製した RMS 混合標準液中の物質質量比を計算によって求めてもよい。

## 5.6.3 RMS 標準液（分析対象物質）及び RMS 標準液（基準物質）を利用する場合

### 5.6.3.1 qNMR によるモル濃度の測定

qNMR の利用が可能な場合は、それぞれの RMS 標準液中の分析対象物質及び RMS 基準物質のモル濃度の決定には qNMR を用いることとする[10][11][12][14]。

それぞれの RMS 標準液の分析対象物質及び RMS 基準物質のモル濃度は、qNMR を用いた測定によって求められる。ただし、qNMR によってモル濃度を決定する場合は、NMR スペクトル上の定量に用いる分析対象物質及び RMS 基準物質のシグナルがそれぞれ十分に分離して観察される必要がある。

qNMR でモル濃度を求める場合、qNMR 測定に供したそれぞれの RMS 標準液を希釈し、クロマトグラフィーに付すことによって、それぞれのモル濃度に対応した検出部の応答（ピーク面積）が求められ、それぞれのモル感度係数を算出することができる。(式(2)及び式(3)の  $a_{an}=Z_{an}/M_{an}$  及び  $a_{rn}=Z_{rn}/M_{rn}$  に相当)

### 5.6.3.2 その他の方法による純度決定及び調製によるモル濃度の決定

5.6.3.1 の適用が難しい場合であり、かつ、あらかじめ純度が決定された分析対象物質と RMS 基準物質の入手が可能である場合又はそれぞれの純度決定が差数法等によって可能である場合には、調製したそれぞれの RMS 標準液中のモル濃度を計算によって求めてもよい。

## 5.7 クロマトグラフィーの分析条件の最適化

RMS 法で分析対象物質の定量分析を行う際は、RMS を決定したときと同等の分析条件（6.1 参照）のクロマトグラフィーを用いる。

RMS 内標準法又は RMS 外標準法のいずれかを選択することを考慮し、次の流れでクロマトグラフィーの分析条件の最適化を行う。

まず、RMS 法の対象とする試料溶液、及び RMS 混合標準液又はそれぞれの RMS 標準液を用いて、例えば保持時間、分離、応答（ピーク面積）等を確認することによって、クロマトグラフィーの分析条件を検討する。試料溶液及び RMS 混合標準液又はそれぞれの RMS 標準液の希釈溶媒には、クロマトグラフィーに影響を与えない溶媒（例えば、HPLC の場合は移動相と完全に混和する溶媒）を用いる。

次に、設定した条件下で分析対象物質及び RMS 基準物質について繰り返し測定を行い、目標精度が達成可能な相対標準偏差が得られることを確認し、最適化したクロマトグラフィーの分析条件とする。

RMS 外標準法では、分析対象物質及び RMS 基準物質のクロマトグラフィーの分析条件が異なってもよい。分析対象物質及び RMS 基準物質の分析に適したクロマトグラフィーの分析条件をそれぞれ最適化し RMS を決定し、RMS



法に利用してもよい[2]。

## 5.8 クロマトグラフィーの濃度範囲の確認

分析対象物質及び RMS 基準物質のモル濃度と応答（ピーク面積）との間に比例関係が成立する濃度範囲を確認しなければならない。確認するために、RMS 混合標準液又はそれぞれの RMS 標準液は、RMS 法の濃度範囲内で3 濃度以上調製することが望ましい。

**注記** モル濃度と応答（ピーク面積）との間に比例関係が成立する濃度範囲の確認には JIS K 0114 及び JIS K 0124 を参考とすることができる。

RMS 法は、ここで確認した濃度範囲内で実施しなければならない。（箇条 7 参照）

また、分析対象物質及び RMS 基準物質の検出部の応答比（ピーク面積比）が極端に異ならないよう、かつ片方の物質の応答（ピーク面積）が極端に小さくならないよう、段階希釈することが望ましい。検出部の応答比（ピーク面積比）は 0.3～3 を目安とすることが望ましいが、目標精度を達成できる場合はこの限りではない。

## 5.9 RMS 混合標準液又はそれぞれの RMS 標準液の応答比の決定

応答比（ピーク面積比）の決定には、5.7 で最適化したクロマトグラフィーの分析条件において、5.6 で物質質量比を決定した RMS 混合標準液、又はモル濃度を決定したそれぞれの RMS 標準液を分析する。

分析対象物質及び RMS 基準物質それぞれの応答（ピーク面積）の比、又はそれぞれのモル濃度と応答（ピーク面積）との間の比例関係の回帰直線の傾きの比を応答比（ピーク面積比）（式(5)の  $R_z$  に相当）とする。

## 5.10 RMS の決定

分析対象物質及び RMS 基準物質のモル感度係数（応答をモル濃度で除したもの）の比、又はモル濃度比に対する応答比（ピーク面積比）の関係から、式(6)を用いて目標精度に応じた有効数字の RMS を求める。RMS 混合標準液を利用した場合は式(6)中のモル濃度比は物質質量比に等しい。

## 5.11 適用する定量法の決定

### 5.11.1 一般

5.2 で設定した試料中の分析対象物質を、5.10 で決定した RMS を用いて定量するために、RMS 内標準法又は RMS 外標準法のどちらを適用するか決定する。

### 5.11.2 RMS 混合標準液を用いて RMS を決定した場合

#### 5.11.2.1 RMS 内標準法

RMS 法の適用には、RMS を決定したときと同等の分析条件でクロマトグラフィーを行うことが求められ、通常は RMS 内標準法を選択することが望ましい [1][6][7][8][10][11][12][13]。

RMS 内標準法を適用する場合、正確な量の RMS 基準物質を試料溶液に添加する。この溶液を 5.7 で選定した希釈溶媒を加えて RMS 法に適した濃度に希釈し、定量用試料溶液とする。

#### 5.11.2.2 RMS 外標準法



試料溶液中の物質が RMS 基準物質と相互作用を起こす場合、試料溶液に RMS 基準物質を加えたくない場合等、RMS 混合標準液を用いて決定した RMS を RMS 外標準法に利用したい場合[5][14][15]においては、RMS のばらつきが目標精度の範囲内であることを確認する。

RMS 混合標準液を用いて RMS を決定した際に得られるデータを用いたばらつきの評価法の例を図 1 に示す。

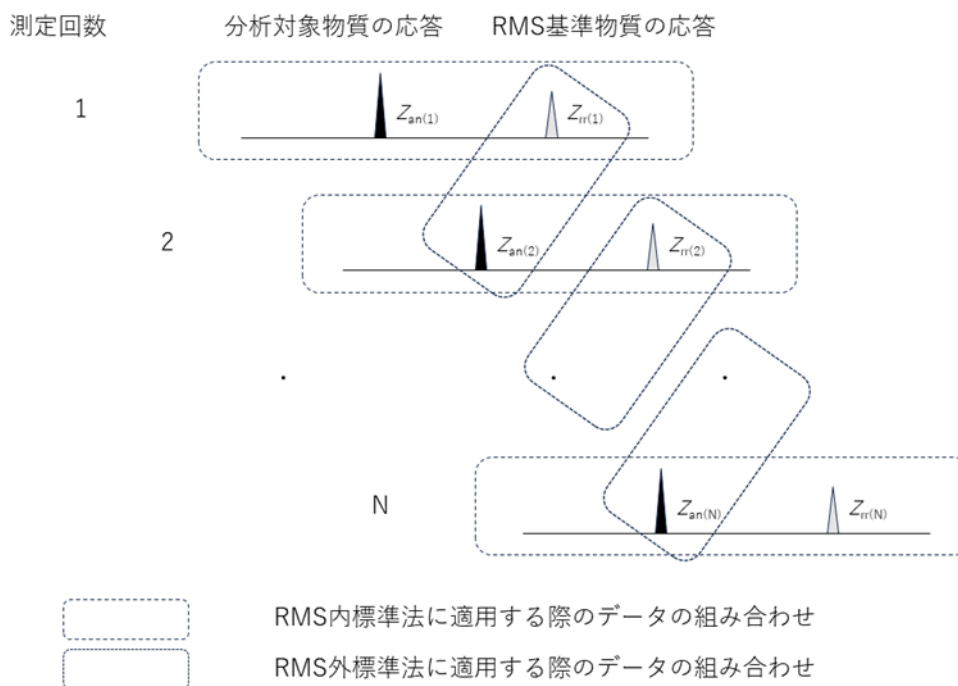


図 1—RMS 混合標準液から求めた RMS を RMS 外標準法に利用する際のばらつき評価法の例

RMS 混合標準液を 3 回以上クロマトグラフィーで測定し、RMS 基準物質の応答（ピーク面積）（ $Z_{rr(N)}$ ）に対する分析対象物質の応答（ピーク面積）（ $Z_{an(N)}$ ）の比のばらつきから、RMS 内標準法を適用する際の RMS のばらつきを評価することができる。同じデータを用い、N-1 回目の測定の RMS 基準物質の応答（ $Z_{rr(N-1)}$ ）と N 回目の測定の分析対象物質の応答（ $Z_{an(N)}$ ）の比のばらつきから、RMS 外標準法を適用する際の RMS のばらつきを評価することができる。それぞれのばらつきを評価し、それらのばらつきの度合いが目標精度の範囲内であることが確認できた場合、RMS 混合標準液を利用して求めた RMS を RMS 外標準法に利用することが可能である。

RMS 外標準法を適用する場合は、5.11.3 に示す方法で定量用試料溶液及び外標準液を調製する。ただし、調製用溶媒は、RMS 混合標準液に用いた溶媒と同等のものをを用いなければならない。

### 5.11.3 RMS 標準液（分析対象物質）及び RMS 標準液（基準物質）を用いて RMS を決定した場合

RMS 標準液（分析対象物質）及び RMS 標準液（基準物質）を用いて RMS を決定した場合は、原則として RMS 外標準法を適用しなければならない。

試料溶液を正確にはかりとり、適切な溶媒を加えて RMS 法に適した濃度に希釈し、定量用試料溶液とする。これとは別に RMS 基準物質を正確にはかりとり、適切な溶媒を加えて RMS 法に適した濃度に希釈し、外標準液とする。

RMS 標準液（分析対象物質）及び RMS 標準液（基準物質）について、両者の分析条件下でそれぞれ 3 回以上クロマトグラフィーで測定し、RMS 基準物質の応答（ピーク面積）に対する分析対象物質の応答（ピーク面積）の比の

ばらつきから、RMS 外標準法を適用する際の RMS のばらつきを評価する。それぞれのばらつきを評価し、それらのばらつきの度合いが目標精度の範囲内であることを確認する。

RMS 外標準法を選択する場合は、分析対象物質と RMS 基準物質が完全に同一の条件下で同時に測定されないため、RMS 内標準法に比較して定量精度が低下する可能性がある。一方、RMS 内標準法と比べ、分析対象物質と RMS 基準物質との相互反応を考慮しない多様な組合せが可能となる等、RMS 法に適用可能な試料の選択肢を広げることが可能である。

## 6 RMS 法による定量用試料溶液中の分析対象物質の定量

### 6.1 定量時に確認すべき事項

簡条 5 であらかじめ決定された RMS 法を用い、定量用試料溶液中の分析対象物質の含量を求める。このとき 5.7 で最適化されたものと同等のクロマトグラフィーの分析条件で、8.1 に示す要件を確認したうえで分析する。

クロマトグラフィーの分析条件のうち、カラム及び装置が同種のものでかつ検出法が同じであれば、例えば、異なるメーカーのものを用いる場合等においては、次の確認を行うことで同等条件とみなすことが可能である。

- ー 保持時間
- ー ピーク形状

実際に分析する装置において、5.8 で確認した濃度範囲における分析対象物質及び RMS 基準物質のそれぞれのモル濃度と応答（ピーク面積）との間に比例関係があることを確認する。分析対象物質については、適切な濃度に希釈した試料溶液を用いて確認してもよい。きょう雑物の除去、濃度の調製等の前処理を行った試料溶液を用いることで、RMS を決定した時と同等の分析条件に合わせてクロマトグラフィーを行うことが可能となることもある。

### 6.2 定量値の計算方法

RMS 内標準法の場合は 5.11.2.1 で調製した定量用試料溶液を、RMS 外標準法の場合は 5.11.2.2 で調製した定量用試料溶液及び外標準液を、RMS 決定時と同等の条件（6.1 参照）のクロマトグラフィーに付し、分析対象物質の応答（ピーク面積） $Z_{an}$  及び RMS 基準物質の応答（ピーク面積） $Z_{rr}$  を測定する。RMS 基準物質のモル濃度  $M_{rr}$ 、RMS  $V_{rms}$  を式(7)に代入し、分析対象物質のモル濃度  $M_{an}$  を求める。更に、分析対象物質の濃度  $Q_{an}$  を求めたい場合は、RMS 基準物質として用いた物質の純度を考慮した上で、式(9)及び式(10)に従う。

$$M_{rr} = \frac{W_{rr}}{m_{rr}} \times \frac{1}{V_{rr}} \times P_{rr} \dots\dots\dots (9)$$

ここで、  
 $M_{rr}$  : RMS 基準物質のモル濃度 (mol/L)  
 $W_{rr}$  : RMS 基準物質として用いた物質のひょう量値 (g)  
 $m_{rr}$  : RMS 基準物質のモル質量 (g/mol)  
 $V_{rr}$  : RMS 混合標準液又は RMS 標準液 (基準物質) の容量 (L)  
 $P_{rr}$  : RMS 基準物質の純度 (g/g)

$$Q_{an} = \frac{W_{an}}{V_{an}} = \frac{Z_{an}}{Z_{rr}} \times m_{an} \times \frac{1}{V_{rms}} \times M_{rr} = \frac{Z_{an}}{Z_{rr}} \times \frac{W_{rr}}{m_{rr}} \times m_{an} \times \frac{1}{V_{rms}} \times P_{rr} \times \frac{1}{V_{rr}} \dots\dots\dots (10)$$

ここで、  
 $Q_{an}$  : 分析対象物質の濃度 (g/L)  
 $W_{an}$  : 分析対象物質の質量 (g)  
 $V_{an}$  : 定量用試料溶液の容量 (L)  
 $Z_{an}$  : 分析対象物質の検出部の応答 (ピーク面積)  
 $Z_{rr}$  : RMS 基準物質の検出部の応答 (ピーク面積)  
 $m_{an}$  : 分析対象物質のモル質量 (g/mol)

$V_{\text{rms}}$  : RMS 基準物質に対する分析対象物質の RMS  
 $M_{\text{rr}}$  : RMS 基準物質のモル濃度 (mol/L)  
 $W_{\text{rr}}$  : RMS 基準物質として用いた物質のひょう量値 (g)  
 $m_{\text{rr}}$  : RMS 基準物質のモル質量 (g/mol)  
 $v_{\text{rr}}$  : RMS 混合標準液又は RMS 標準液 (基準物質) の容量 (L)  
 $P_{\text{rr}}$  : RMS 基準物質の純度 (g/g)

用いた RMS  $V_{\text{rms}}$  の有効数字に適応した定量値を求める。

## 7 装置

RMS の決定及び RMS 法において、装置は、分離部、検出部等から構成されるクロマトグラフを用いる。クロマトグラフは、試料溶液中の物質を分離させ、装置に搭載又は外部接続されている検出部で含有量に相当する化学量を測定する分離分析装置で、高速液体クロマトグラフ、ガスクロマトグラフ等がある。

- a) 高速液体クロマトグラフ 装置の構成は、JIS K 0124 の箇条 5 (装置) による。
- b) ガスクロマトグラフ 装置の構成は、JIS K 0114 の箇条 6 (装置) による。

検出部は、定量したい濃度範囲内で、分析対象物質と RMS 基準物質の両者のモル濃度と応答 (ピーク面積) との間に比例関係が成立する必要がある。

検出部には、例えば次のものがある。

- 例 1 紫外可視吸光度検出器[8]
- 例 2 フォトダイオードアレイ検出器[8]
- 例 3 示差屈折率検出器[24]
- 例 4 水素炎イオン化検出器[13][14]

モル濃度と応答 (ピーク面積) との間に比例関係が成立する範囲は、物質の種類及び用いる検出部によって異なることに留意する。

**注記** モル濃度と応答 (ピーク面積) との間で切片を設けない比例関係の回帰直線を作成したときと、切片を設けた回帰直線の傾きを比較したときで傾きが有意に異なる場合は、低濃度域又は高濃度域において、RMS 法による定量値にかたよりが生じることがある。

比例関係が成立し、かつ、目標精度で分析できる場合には、例 1～例 4 以外の検出部を用いて RMS の決定及び RMS 法を行うことが可能である。

モル濃度又は物質質量比を qNMR で決定する場合には、NMR 装置を用いる。NMR 装置の構成は、JIS K 0138 の箇条 5 (装置) による。

## 8 データの質の保証

### 8.1 装置の適格性の確認

装置の適格性の確認は、次による。

- a) 定期点検又は日常点検 装置に対してあらかじめ設定された仕様 (性能) に適合していることを定期的又は日常的に確認する。
- b) 測定操作に対する適格性 使用する装置の性能管理を実施する。意図する濃度範囲内において、分析対象物質又は RMS 基準物質が目標精度を満たす再現性で検出可能であることを確認する。

## 8.2 分析法の妥当性確認

データの質を保証するために、新たに開発した分析法については、分析法の妥当性確認を実施しなければならない。採取環境の条件、調製条件等が規定されている個別規格を採用する場合でも、その試験室で要求される項目についての分析法の妥当性確認を行うことが望ましい。

分析対象物質及びRMS基準物質が入手できる場合は、物質質量比が明らかなRMS混合標準液、又はそれぞれのモル濃度が明らかなRMS標準液を調製し、求めたRMSが目標精度内であることを確認する。

分析対象物質が入手できない場合は、次のいずれかの方法を用いる。

- 試料から試料溶液を調製し、意図した濃度範囲内において段階希釈した複数の濃度の溶液をRMS法で定量したとき、得られたそれぞれの定量値が目標精度内であることを確認する。
- 分析対象物質の代わりに類縁物質を用い、RMSの決定を行ったとき、分析対象物質及びRMS基準物質から求めたRMSと同等の精度であることを確認する。

## 8.3 計量トレーサビリティの確保

### 8.3.1 一般

8.3及び箇条9では、計量トレーサビリティを確保するための要求事項及び不確かさの評価方法について規定する。

RMS及びこれを用いたRMS法による分析対象物質の定量値に、計量トレーサビリティを確保する場合は、結果の信頼性に影響を与えるすべての装置は校正結果の寄与を含む測定不確かさを評価されなければならない。

**注記** 関係する不確かさ評価に関する情報は参考文献[19][20][21][22]及びJIS K 0138に示されている。

### 8.3.2 装置の校正

定量値の計量トレーサビリティを確保するためには、結果の信頼性に影響を与えるすべての装置は校正されなければならない。

RMSの決定法又はRMS法による分析対象物質の定量法によって、試験結果の信頼性に影響を与える装置は異なるが、試料調製に使用する天秤、体積計、体積と質量との変換に必要な密度計等が含まれる。また、例えば、クロマトグラフの検出器及び物質の純度を評価する装置も含まれる。

校正に関わる上位標準への計量トレーサビリティ及び不確かさ評価は、使用する装置の校正証明書の記載事項を根拠とすることが望ましい。

校正による上位標準への計量トレーサビリティが確保できない場合、許容誤差が付与された装置を用いることができる。この場合、許容誤差が示された情報を用いて装置の指示値の不確かさを評価し、試験結果に加味しなければならない。

### 8.3.3 分析対象物質及びRMS基準物質

試験に用いる分析対象物質及びRMS基準物質は、入手可能である場合は、基準とする特性値が認証され、計量トレーサビリティが確保された認証標準物質（CRM）を用いなければならない。

**注記** CRMは、JIS Q 17034[23]に適合する標準物質生産者から供給されている。

基準とする特性値が認証され、計量トレーサビリティが確保されたCRMが入手できない場合は、qNMR、差数法

等で純度等及びその不確かさをあらかじめ独自に評価した物質を分析対象物質及び RMS 基準物質として用いてもよい。この場合、評価した特性値に対する計量トレーサビリティを示さなければならない。

## 9 不確かさの評価

### 9.1 一般

RMS 及びこれを用いた RMS 法による分析対象物質の定量値に不確かさを評価するための要求事項を規定する。測定結果に対する計量トレーサビリティを確保するためには、校正に関わる寄与を含むすべての測定不確かさの要因を評価しなければならない。

測定結果に対する不確かさの評価は、定量値の信頼性の根拠となり得る。また、測定結果に対して不確かさ評価を行うことで、影響が大きいばらつき要因を特定し、精確さの向上に向けた情報を得ることができる。したがって、計量トレーサビリティの確保が必要ない場合においても本箇条に示す不確かさ評価を行うことは有用である。

### 9.2 RMS 決定

決定した RMS の不確かさ評価には、式(6)の各要因に関する不確かさをそれぞれ評価しなければならない。さらに用いる手法に応じ、RMS の信頼性に影響を与える次の項目について不確かさの寄与を評価しなければならない。

- RMS の決定に供する装置の校正に関わる不確かさ (8.3.2 参照)
- RMS の決定に用いる分析対象物質及び RMS 基準物質に関わる不確かさ (8.3.3 参照)
- 決定した RMS の信頼性に影響を与えるすべての装置の操作及び測定に関わる不確かさ (例えば、天びん指示値の繰り返し性、測定の再現性等)
- 異なる濃度でのモル感度係数の直線性に関わる不確かさ (例えば、同じ物質の異なる溶液濃度で得た RMS のばらつき、濃度依存性等)

### 9.3 RMS 法による定量

#### 9.3.1 一般

RMS 法による定量値の不確かさ評価には、式(7)の各要因に関する不確かさをそれぞれ評価しなければならない。また、RMS 法による定量に関わる測定不確かさの評価は、同一環境で決定した RMS を利用する場合と、異なる環境で決定した RMS を利用する場合とで分析環境が異なるため、分析環境に応じた不確かさの寄与を加味して評価しなければならない [9]。

#### 9.3.2 同一環境で決定した RMS を利用した RMS 法による定量

同一環境で決定した RMS を利用した RMS 法による定量値の不確かさ評価には、式(7)の各要因に関する不確かさに加え、次の項目の寄与を加味して評価しなければならない。

- RMS に関わる不確かさ (9.2 で評価)
- RMS 法の適用に必要な装置の校正に関わる不確かさ (8.3.2 参照)
- RMS 法の適用に用いる RMS 基準物質に関わる不確かさ (8.3.3 参照)
- RMS 法の適用による定量値の信頼性に影響を与える、すべての操作及び装置に関わる不確かさ (例えば、測定繰り返し性等)
- あらかじめ決定した RMS を用いる場合は、結果の信頼性に影響を与えるすべての装置から得られる指示値の安定性等 (例えば、測定再現性等)

RMS の決定及び RMS 法による定量に同一の装置を用いた場合、その装置が結果に及ぼす不確かさは、RMS 決定

に関わる寄与と、RMS 法の適用に関わる寄与とがそれぞれ独立に影響することに留意する。

### 9.3.3 異なる環境で決定した RMS を利用した RMS 法による定量

RMS 決定のときとは異なる環境（例えば、測定装置等）において、あらかじめ決定された RMS を用いて RMS 法を適用する場合、**箇条 8** の要件の確認をもとに必要とされる不確かさを評価しなければならない。具体的には、**9.3.2** の各要因に加え、下記の要因を加味して評価を行わなければならない。

- RMS が決定された記録と同一条件下での測定結果の違いに関わる不確かさ
- 異なる濃度でのモル感度係数の直線性（例えば、同じ物質、異なる溶液濃度で得たモル感度係数のばらつき、濃度依存性等）

## 10 記録の保持

次の項目について記録を保持することが望ましい。

### a) 分析法に関する事項

- 1) 使用した方法  
例 RMS 内標準法又は RMS 外標準法
- 2) 使用した RMS  
例 決定法、引用規格等

### b) 試料に関する事項

- 1) 採取方法
- 2) 保存方法
- 3) 前処理及び調製法
- 4) 調製年月日
- 5) 試料、RMS 基準物質及び使用した溶媒の情報  
例 RMS 基準物質及び溶媒の名称、RMS 基準物質の純度、ロット番号等

### c) 測定に関する事項

- 1) 分析対象物質及び RMS 基準物質
- 2) 使用した装置及びその校正記録
- 3) 使用した規格
- 4) 測定年月日
- 5) 分析条件  
例 カラム充填剤の種類及び粒子径、カラム管の材質、内径及び長さ、カラム温度、移動相又は溶媒の種類、流量、組成及び溶離条件、試料溶液導入法並びに試料溶液導入量及びその希釈倍率、検出器、検出方法、測定時間、測定回数

### d) 解析に関する事項

- 1) 解析年月日
- 2) 解析条件
- 3) 計算方法
- 4) 結果
- 5) 代表的なクロマトグラム  
注記 分析条件、ピークの分析対象物質名、保持時間及び検出器の出力信号のスケールを付記する場合がある。
- 6) 解析者名

附属書 A  
(参考)

**RMS の決定及び決定した RMS を利用可能な定量法の概要**

箇条 5 に示す RMS の決定及び決定した RMS を利用可能な定量法についての概要を図 A.1 のフローチャートに示す。ひし形は試験者が選択できるもの，長方形は対応する箇条を示している。



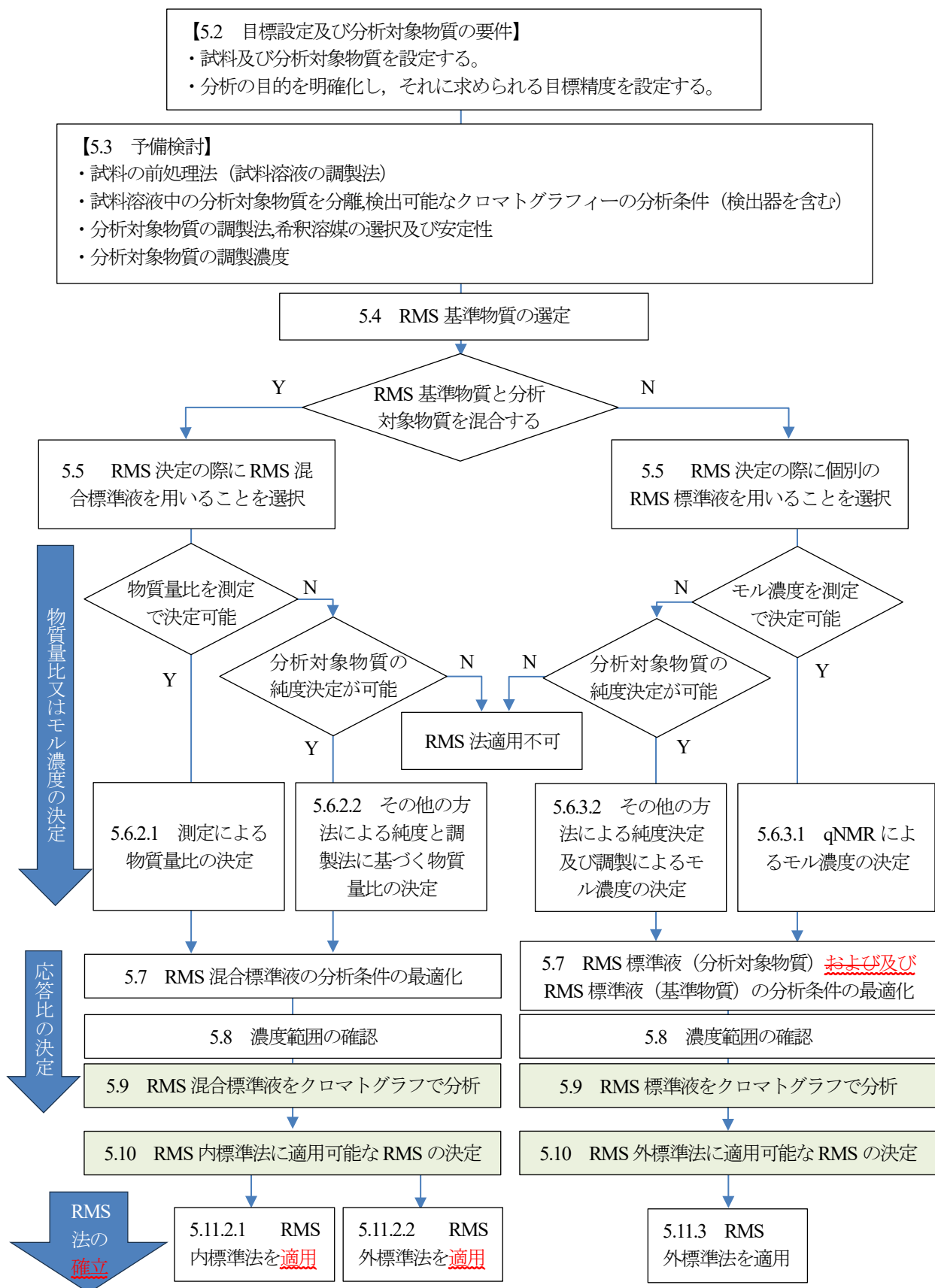


図 A.1—RMS の決定及び決定した RMS を利用可能な定量法の概要

注記 図 A.1 中の Y は「はい」、N は「いいえ」を表す。



## 附属書 B (参考)

### qNMR を用いた物質質量比に基づく RMS の決定法と定量分析事例

#### B.1 一般

分析対象物質と RMS 基準物質との物質質量比を qNMR によって求め、RMS を決定する方法、及び RMS 法の事例として、フェノール類混合標準液中のフェノールの定量分析法を示す。フェノール類は、GC-FID 及び HPLC-UV で分析可能であるが、この附属書では HPLC-UV を用いた例を示す。また、計量トレーサビリティを確保するための不確かさの計算方法の例を示す。qNMR (<sup>1</sup>H-qNMR) の測定条件は、JIS K 0138 による。

#### B.2 原理

プロトン (<sup>1</sup>H) を核種とした <sup>1</sup>H-qNMR では、定量性を確保した条件において、異なる物質のシグナル面積比は水素数の比と比例関係が成り立つ。異なる 2 物質 (物質 X 及び Y) が存在するとき、シグナル面積比はそれぞれの物質質量比及び水素数比に依存し、式(B.1)で表される。内標準法で <sup>1</sup>H-qNMR を測定した場合、NMR 測定に関わる定数 k<sub>X</sub> は k<sub>Y</sub> と等しいため、物質質量比は式(B.2)で表される。

なお、物質質量比を用いて RMS を決定する場合は、RMS 混合標準液を用いるため、式(B.1)及び式(B.2)の物質 X は RMS 基準物質、物質 Y は分析対象物質である。

$$\frac{I_Y}{I_X} = \frac{k_Y}{k_X} \times \frac{N_Y}{N_X} \times \frac{n_Y}{n_X} \dots\dots\dots (B.1)$$

$$\frac{n_Y}{n_X} = \frac{I_Y}{I_X} \times \frac{N_X}{N_Y} \dots\dots\dots (B.2)$$

ここで、  
 $I_X, I_Y$  : 物質 X 及び Y それぞれのシグナル面積  
 $k_X, k_Y$  : 物質 X 及び Y それぞれの NMR 測定に関わる定数  
 $N_X, N_Y$  : 物質 X 及び Y それぞれの水素数  
 $n_X, n_Y$  : 物質 X 及び Y それぞれの試料溶液中の物質質量 (mol)

一方、クロマトグラフィーでは、物質固有のモル吸光係数に紐づけられる吸光度等の物理量に基づいた検出器を用いる場合、検出される応答 (ピーク面積) 比は物質質量比に比例し、モル感度係数を  $a'_X$  及び  $a'_Y$  とすると、式(B.3)で表される。すなわち、式(6)と同様、RMS 基準物質に対する分析対象物質のクロマトグラフィーにおける応答比 (ピーク面積比) を RMS 基準物質に対する分析対象物質の物質質量比で除することで RMS が決定される。これを式(B.4)に示す。

$$\frac{Z'_Y}{Z'_X} = \frac{a'_Y}{a'_X} \times \frac{n_Y}{n_X} \dots\dots\dots (B.3)$$

$$\frac{Z'_Y}{Z'_X} \times \frac{n_X}{n_Y} = \frac{a'_Y}{a'_X} = V_{\text{rms}} \dots\dots\dots (B.4)$$

ここで,  $Z'_X, Z'_Y$ : 物質 X 及び Y それぞれのクロマトグラフィーにおける応答 (ピーク面積)  
 $a'_X, a'_Y$ : 物質 X 及び Y それぞれのクロマトグラフィーに関わる定数 (モル感度係数)  
 $n_X, n_Y$ : 物質 X 及び Y それぞれの試料溶液中の物質量 (mol)  
 $V_{rms}$ : 物質 X に対する物質 Y の RMS

ここで求めた RMS は, RMS 決定時と同等の分析条件 (6.1 参照) 及び濃度範囲において, 理論的に一定である。従って, RMS 法では, 試料溶液に内標準物質として RMS 基準物質を正確に添加し, 定量用試料溶液とし, クロマトグラフィーで分析することで, 式(B.5)によって, 分析対象物質の定量値を求めることが可能である。

$$q_{an} = \frac{1}{V_{rms}} \times \frac{Z'_{an}}{Z'_{rr}} \times \frac{m_{an}}{m_{rr}} \times \frac{W_{rr}}{W} \times P_{rr} \dots\dots\dots (B.5)$$

ここで,  $q_{an}$ : 分析対象物質の定量値 (g/g)  
 $V_{rms}$ : 式(B.4)で決定した RMS  
 $Z'_{an}$ : 分析対象物質のクロマトグラフィーにおける応答 (ピーク面積)  
 $Z'_{rr}$ : RMS 基準物質のクロマトグラフィーにおける応答 (ピーク面積)  
 $m_{an}$ : 分析対象物質のモル質量 (g/mol)  
 $m_{rr}$ : RMS 基準物質のモル質量 (g/mol)  
 $W$ : 試料溶液の質量 (g)  
 $W_{rr}$ : RMS 基準物質として用いた物質のひょう量値 (g)  
 $P_{rr}$ : RMS 基準物質として用いた物質の純度 (g/g)

### B.3 装置及び試薬

装置及び試薬は, 次による。

- a) 核磁気共鳴装置 (NMR 装置)
- b) 紫外可視吸光度検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-UV)
- c) 電子天びん
- d) アルミニウム製のひょう量皿
- e) NMR 試験管
- f) クロマトグラフィー用バイアル
- g) セプタム付バイアル
- h) フェノール (分析対象物質として)
- i) フェノール類混合標準液 (試料溶液として)

フェノール, 2-クロロフェノール, 4-クロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノール, 2,6-ジクロロフェノール, 2,4,6-トリクロロフェノールの各 1000 mg/L (約 1250 mg/kg) アセトン溶液

- j) 純度について計量トレーサビリティが確保された 1,4-ビス (トリメチルシリル) ベンゼン- $d_4$  (1,4-BTMSB- $d_4$ ) (RMS 基準物質として)
- k) 重水素化アセトン (アセトン- $d_6$ )
- l) 溶媒中の不純物のシグナルが定量値の信頼性に影響を与えない高純度な NMR 用のものアセトン

クロマトグラム上で RMS 基準物質に重なるきょう雑物が検出されないもの

## B.4 操作

### B.4.1 RMS 混合標準液の調製

本附属書に示す手法では、物質質量比を決定するために  $^1\text{H-qNMR}$  で用いる RMS 混合標準液（以下，“RMS 混合標準液 1”という。）と、物質質量比に対応した応答比（ピーク面積比）から RMS を決定するためのクロマトグラフィーで用いる RMS 混合標準液（以下，“RMS 混合標準液 2”という。）を用いる。RMS 混合標準液 2 は、RMS 混合標準液 1 を希釈して調製する。このとき、物質質量比を  $^1\text{H-qNMR}$  によって決定するため、分析対象物質及び RMS 基準物質の濃度及び物質質量を正確に求める必要はない。

1,4-BTMSB- $d_4$  に対するフェノールの RMS を決定するため、1,4-BTMSB- $d_4$  及びフェノールをアセトン- $d_6$  で溶解し、RMS 混合標準液 1 を調製する。RMS 混合標準液 1 の一部を取り、アセトンを加えて希釈し、RMS 混合標準液 2 を調製する。RMS 混合標準液 1 は NMR 試験管に、RMS 混合標準液 2 はクロマトグラフィー用バイアルに移す。

### B.4.2 定量用試料溶液の調製

定量用試料溶液は、フェノール類混合標準液に 1,4-BTMSB- $d_4$  を正確に添加し調製する。十分な分解能の電子天びんで、風袋にアルミニウム製のひょう量皿を用いて 1,4-BTMSB- $d_4$  を正確にはかりとり、セプタム付バイアルに移す。次にフェノール類混合標準液を正確にはかりとり、セプタム付バイアルに移し、定量用試料溶液とする。定量用試料溶液はクロマトグラフィー用バイアルに移す。

### B.4.3 $^1\text{H-qNMR}$ による物質質量比の測定及び決定

B.4.1 で調製した RMS 混合標準液 1 を  $^1\text{H-qNMR}$  で測定する。

$^1\text{H-qNMR}$  スペクトルから求める 1,4-BTMSB- $d_4$  に対するフェノールのシグナル面積比と、各物質の物質質量及び水素数を式(B.2)に代入し、1,4-BTMSB- $d_4$  に対するフェノールの物質質量比を決定する。式(B.6)に物質質量比を算出した具体例を示す。

$$\frac{n_{\text{an}}}{n_{\text{rr}}} = \frac{I_{\text{an}}}{I_{\text{rr}}} \times \frac{N_{\text{rr}}}{N_{\text{an}}} = \frac{25.253\,855}{18.393\,390} \times \frac{18}{5} = 4.942\,7 \dots\dots\dots (\text{B.6})$$

ここで、  
 $n_{\text{an}}$  : フェノールの物質質量 (mol)  
 $n_{\text{rr}}$  : 1,4-BTMSB- $d_4$  の物質質量 (mol)  
 $n_{\text{an}}/n_{\text{rr}}$  : 1,4-BTMSB- $d_4$  に対するフェノールの物質質量比  
 $I_{\text{an}}$  : フェノールのシグナル面積  
 $I_{\text{rr}}$  : 1,4-BTMSB- $d_4$  のシグナル面積

$N_{\text{an}}$  : フェノールの水素数

$N_{\text{rr}}$  : 1,4-BTMSB- $d_4$ の水素数

なお,  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトルの例を図 B.1 に示す。

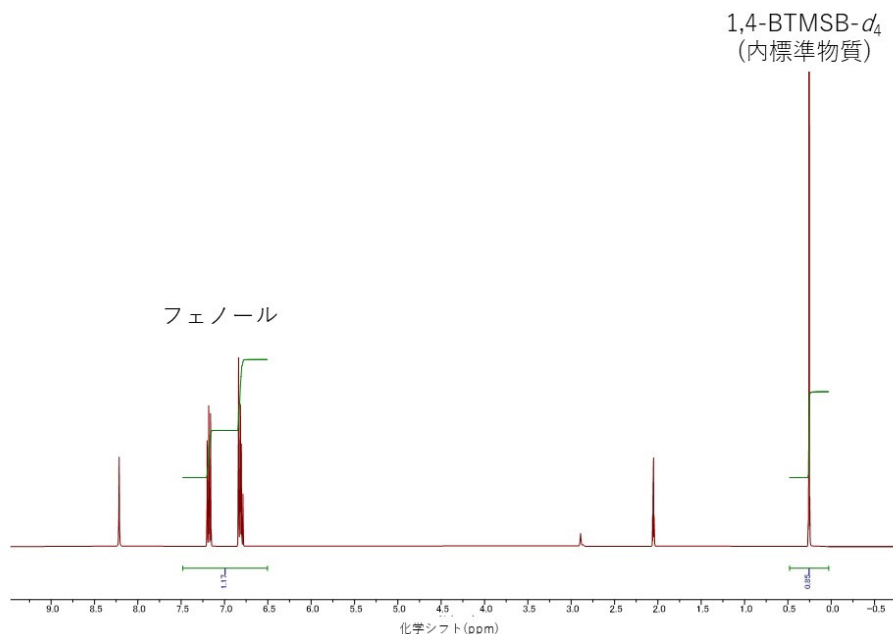


図 B.1—RMS 混合標準液 1 の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトルの例

#### B.4.4 クロマトグラフィーによる応答比（ピーク面積比）の測定及び RMS の決定

クロマトグラフィーによる応答比（ピーク面積比）の測定には RMS 混合標準液 2 を用いる。RMS 混合標準液 2 は RMS 混合標準液 1 を希釈したものであるため, B.4.3 で決定した RMS 混合標準液 1 の物質質量比は, RMS 混合標準液 2 においても保存されている。RMS 混合標準液 2 をクロマトグラフィーで分析し, フェノール及び 1,4-BTMSB- $d_4$ の応答（ピーク面積）を測定する。

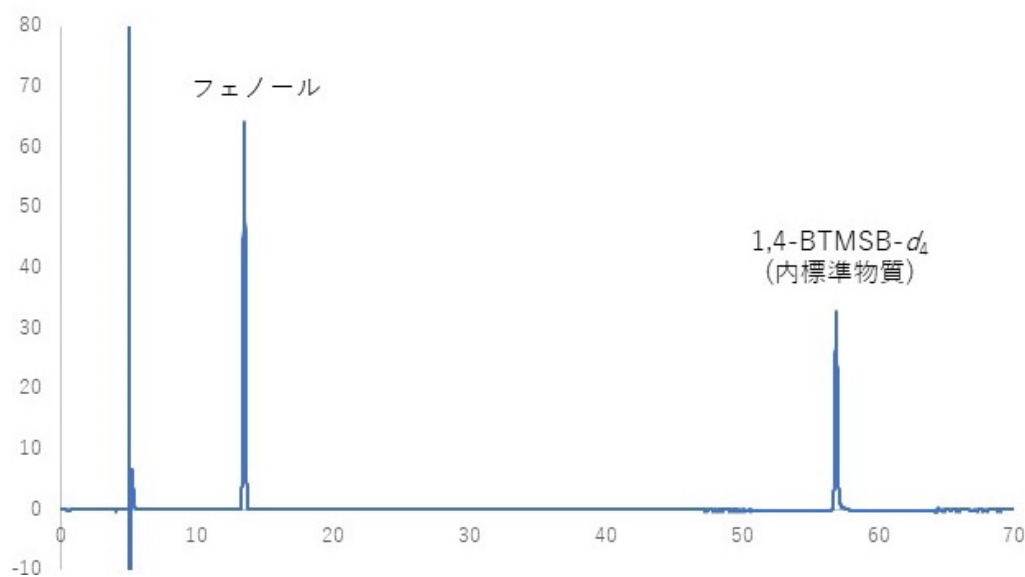
B.4.3 で決定した物質質量比及びクロマトグラフィーにおける応答（ピーク面積）を式(B.4)に代入して RMS を決定する。式(B.7)に RMS を算出した具体例を示す。

$$V_{\text{rms}} = \frac{Z'_{\text{an}}}{Z'_{\text{rr}}} \times \frac{n_{\text{rr}}}{n_{\text{an}}} = \frac{Z'_{\text{an}}}{Z'_{\text{rr}}} \times \frac{1}{n_{\text{an}}/n_{\text{rr}}} = \frac{428.6}{195.9} \times \frac{1}{4.9427} = 0.44264 \dots\dots\dots (\text{B.7})$$

ここで,  $Z'_{\text{an}}$  : フェノールのクロマトグラフィーにおける応答（ピーク面積）  
 $Z'_{\text{rr}}$  : 1,4-BTMSB- $d_4$ のクロマトグラフィーにおける応答（ピーク面積）  
 $n_{\text{an}}$  : フェノールの物質質量 (mol)  
 $n_{\text{rr}}$  : 1,4-BTMSB- $d_4$ の物質質量 (mol)

$n_{\text{an}}/n_{\text{rr}}$  は, B.4.3 で求めた 1,4-BTMSB- $d_4$ に対するフェノールの物質質量比 (4.9427) である。

なお, 図 B.2 には HPLC-UV を用いたクロマトグラフの例を示す。



縦軸：検出部の応答（ピーク面積）  
横軸：保持時間（min）

注記 分析条件は表 B.1 によって実施した。

図 B.2－RMS 混合標準液 2 の HPLC-UV クロマトグラムの例

表 B.1－分析条件

|                 |                                                        |
|-----------------|--------------------------------------------------------|
| 試料              | 各フェノール類（1 000 mg/L）+1,4-BTMSB- $d_4$ （500 mg/L）/アセトン溶液 |
| 移動相 A           | 0.1 %りん酸水溶液                                            |
| 移動相 B           | アセトニトリル                                                |
| グラジエント条件（移動相 B） | 15 %→1 %/min→75 %                                      |
| 測定時間            | 60 min                                                 |
| ポストタイム          | 15 min                                                 |
| サンプルトレイ温度       | 20 °C                                                  |
| 注入量             | 1 $\mu$ L                                              |
| カラム             | Inertsil Ph-3（250 mm×4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m）           |
| 流速              | 1 mL/min                                               |
| 検出器             | 吸光光度検出器                                                |
| 測定波長            | 260 nm                                                 |

B.4.5 RMS 法によるフェノール類混合標準液中のフェノールの定量

B.4.4 で決定した RMS と B.4.2 で調製した定量用試料溶液のクロマトグラフィーにおける各物質の応答（ピーク面積）及びモル質量，RMS 基準物質及び試料溶液の質量，及び RMS 基準物質の純度を式(B.5)に代入して，

試料溶液中の分析対象物質を定量する。クロマトグラフィーの分析条件は、**B.4.4** で設定した条件と同等（**6.1** 参照）とする。式(B.8)にフェノール類混合標準液中のフェノールの定量値を算出した具体例を示す。

$$q_{\text{an}} = \frac{1}{V_{\text{rms}}} \times \frac{Z'_{\text{an}}}{Z'_{\text{rr}}} \times \frac{m_{\text{an}}}{m_{\text{rr}}} \times \frac{W_{\text{rr}}}{W} \times P_{\text{rr}}$$

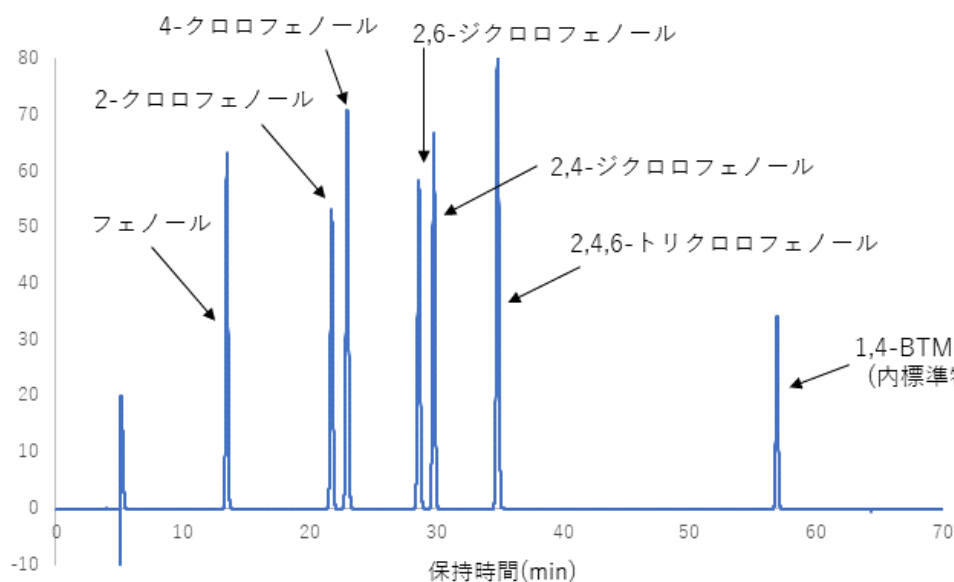
$$= \frac{1}{0.442\ 64} \times \frac{466.4}{234.1} \times \frac{94.113}{226.502} \times \frac{0.001\ 986\ 6}{2.949\ 6} \times 1.000$$

$$= 0.001\ 259\ 7\ (\text{kg kg}^{-1})$$

$$= 1259.7\ (\text{mg kg}^{-1}) \dots\dots\dots (\text{B.8})$$

ここで、 $q_{\text{an}}$  : フェノールの定量値  
 $V_{\text{rms}}$  : **B.4.4** で決定した RMS (0.44264)  
 $Z'_{\text{an}}$  : フェノールのクロマトグラフィーにおける応答（ピーク面積）  
 $Z'_{\text{rr}}$  : 1,4-BTMSB- $d_4$ のクロマトグラフィーにおける応答（ピーク面積）  
 $m_{\text{an}}$  : フェノールのモル質量 (94.113 g/mol)  
 $m_{\text{rr}}$  : 1,4-BTMSB- $d_4$ のモル質量 (226.502 g/mol)  
 $W$  : フェノール類混合標準液の質量 (g)  
 $W_{\text{rr}}$  : 1,4-BTMSB- $d_4$ のひょう量値 (g)  
 $P_{\text{rr}}$  : 1,4-BTMSB- $d_4$ の純度 (kg kg<sup>-1</sup>)

図 **B.3** には HPLC-UV を用いた定量用試料溶液のクロマトグラム例を示す。分析条件は表 **B.1** に示したものと同一である。



縦軸：検出部の応答（ピーク面積）  
 横軸：保持時間（min）

図 **B.3**—定量用試料溶液の HPLC-UV クロマトグラム例

## B.5 不確かさ評価



計量トレーサビリティが確保された定量値を得るためには不確かさの評価が必要である。式(B.4)及び式(B.5)の各項目について不確かさを評価し、合成することで、定量値に対する不確かさを得ることが可能である。

式(B.4)に示すように RMS の決定には、RMS 混合標準液の RMS 基準物質に対する分析対象物質の物質質量比及び応答比（ピーク面積比）が必要である。これらの不確かさ要因は分析結果から得られるため、繰り返し測定における再現性から不確かさを見積もることが可能である。RMS の不確かさを評価するためには、RMS 基準物質の濃度を一定にし、分析対象物質の濃度を、定量したい濃度範囲内で変化させた複数の RMS 混合標準液を調製する。調製した各 RMS 混合標準液について物質質量比と応答比（ピーク面積比）を測定し、それぞれの RMS を求める。求めた RMS のばらつきから RMS の不確かさを評価することが可能である。

1,4-BTMSB- $d_4$  に対するフェノールの RMS の不確かさを評価した際のバジェット表の例を表 B.2 に示す。

表 B.2—1,4-BTMSB- $d_4$  に対するフェノールの RMS の不確かさ評価のバジェット表の例

|                   | 不確かさ要因                         | 値<br>( $x_i$ ) | 標準不確かさ<br>$u(x_i)$ | 単位                    | 感度係数 $c_i$<br>( $=\partial f/\partial x_i$ ) | 標準不確かさ $u(q_{an})$<br>$=  c_i  u(x_i)$<br>( $\text{mg kg}^{-1}$ ) |
|-------------------|--------------------------------|----------------|--------------------|-----------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| $V_{ms}$          | RMS                            | 0.442 64       | 0.000 20           | $\text{mol mol}^{-1}$ | 1                                            | 0.000 20                                                          |
| $n_{an}/n_{rr}$   | RMS 混合標準液中の物質質量比               | 4.942 7        | 0.000 7            | $\text{mol mol}^{-1}$ | $- V_{ms} / (n_{an}/n_{rr})$                 | 0.000 06                                                          |
| $Z'_{an}/Z'_{rr}$ | RMS 混合標準液中のクロマトグラフの応答比（ピーク面積比） | 2.187 9        | 0.001 1            | -                     | $V_{ms} / (Z'_{an}/Z'_{rr})$                 | 0.000 23                                                          |
| 合成標準不確かさ          |                                |                |                    |                       |                                              | 0.000 31                                                          |

定量値の不確かさ評価には、式(B.5)に従い、定量値、RMS 基準物質に対する分析対象物質の RMS、定量用試料溶液における RMS 基準物質に対する分析対象物質の応答比（ピーク面積比）、分析対象物質及び RMS 基準物質のモル質量、試料溶液及び RMS 基準物質の質量、及び RMS 基準物質の純度に対する不確かさを見積もらなければならない。

フェノール類混合標準液中のフェノールの定量値について不確かさを評価した際のバジェット表の例を表 B.3 に示す。

表 B.3—フェノール類混合標準液中のフェノールの定量値における不確かさ評価のバジェット表の例

|  | 不確かさ要因 | 値<br>( $x_i$ ) | 標準不確かさ<br>$u(x_i)$ | 単位 | 感度係数 $c_i$<br>( $=\partial f/\partial x_i$ ) | 標準不確かさ $u(q_{an})$<br>$=  c_i  u(x_i)$<br>( $\text{mg kg}^{-1}$ ) |
|--|--------|----------------|--------------------|----|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|--|--------|----------------|--------------------|----|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|

|                   |                                                    |          |                |                       |                              |     |
|-------------------|----------------------------------------------------|----------|----------------|-----------------------|------------------------------|-----|
| $q_{an}$          | フェノール類混合標準液中のフェノールの定量値                             | 1 259.7  | 0.3            | mg kg <sup>-1</sup>   | 1                            | 0.3 |
|                   | 調製間差                                               | 1 259.7  | 0.0            | mg kg <sup>-1</sup>   |                              |     |
|                   | 測定ばらつき                                             | 1 259.7  | 0.3            | mg kg <sup>-1</sup>   |                              |     |
| $V_{rms}$         | RMS                                                | 0.442 64 | 0.000 31       | mol mol <sup>-1</sup> | $-q_{an} / V_{rms}$          | 0.8 |
| $Z'_{an}/Z'_{rr}$ | 定量用試料溶液における 1,4-BTMSB- $d_4$ に対するフェノールの応答比（ピーク面積比） | 1.992    | $q_{an}$ に含まれる |                       | $q_{an} / (Z'_{an}/Z'_{rr})$ |     |
| $m_{an}$          | フェノールのモル質量                                         | 94.113   | 0.005          | g mol <sup>-1</sup>   | $q_{an} / m_{an}$            | 0.1 |
| $m_{rr}$          | 1,4-BTMSB- $d_4$ のモル質量                             | 226.502  | 0.013          | g mol <sup>-1</sup>   | $-q_{an} / m_{rr}$           | 0.1 |
| $W_{rr}$          | 1,4-BTMSB- $d_4$ のひょう量値                            | 1.986 6  | 0.003          | mg                    | $q_{an} / W_{rr}$            | 0.2 |
| $W$               | フェノール類混合標準液の質量                                     | 2 949.6  | 0.015 5        | mg                    | $-q_{an} / W$                | 0.0 |
| $P_{rr}$          | 1,4-BTMSB- $d_4$ の純度                               | 1.000    | 0.002 5        | kg kg <sup>-1</sup>   | $q_{an} / P_{rr}$            | 3.2 |
| 合成標準不確かさ          |                                                    |          |                |                       |                              | 3.3 |
| 拡張不確かさ ( $k=2$ )  |                                                    |          |                |                       |                              | 6.6 |

この細分箇条のように RMS 及び定量値についてそれぞれ不確かさ要因を計算式に基づいて評価し、各項目を合成して定量値に対する不確かさを付与することで、計量トレーサビリティが確保された RMS 法による定量値を得ることが可能である。

## 附属書 C (参考) りんごジュース中のクロロゲン酸の定量

### 序文

この附属書では、りんごジュース中に含まれるクロロゲン酸を、RMS 法によって定量する方法を、一例として示す。なお、この例では、RMS 基準物質としてカフェ酸を選択し、外標準法を用いた。

### C.1 適用範囲

りんご (*Malus domestica* Borkh. 又は *Malus asiatica* Nakai) を浸漬又は圧搾することで製造されるジュース（ストレートのほか、酵素処理、低温殺菌処理又は濃縮還元処理されたものを含む。また、酸化防止剤としてアスコルビン酸が含まれているものも含む。以下、“りんごジュース” という。）中に含まれるクロロゲン酸を、RMS 法によって定量する方法について規定する。

### C.2 引用規格

- JIS K 0138** 定量核磁気共鳴分光法通則（qNMR 通則）
- JIS K 0557** 用水・排水の試験に用いる水
- JIS K 0970** ピストン式ピペット
- JIS K 8223** 過塩素酸（試薬）
- JIS K 8264** ぎ酸（試薬）
- JIS K 8891** メタノール（試薬）
- JIS R 3505** ガラス体積計
- ISO 648** Laboratory glassware—Single-volume pipettes
- ISO 1042** Laboratory glassware—One-mark volumetric flasks
- ISO 8655-2** Piston-operated volumetric apparatus—Part 2: Pipettes

### C.3 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。

- a) 水 **JIS K 0557** が規定する A3 以上の品質のもの。
- b) クロロゲン酸（5-カフェオイルキナ酸）（CAS 番号 327-97-9）
- c) メタノール **JIS K 8891** が規定する特級又は同等以上のもの。
- d) カフェ酸（3,4-ヒドロキシけい皮酸）（CAS 番号 331-39-5） **JIS K 0138** が規定する方法又はそれと同等以上の正確性をもつ手法によって純度が求められたもの。CRM 又は RM が望ましい。

- e) 過塩素酸 JIS K 8223 が規定する特級又は同等以上のもの。
- f) アセトニトリル HPLC 用のもの。
- g) ぎ酸 JIS K 8264 が規定する特級又は同等以上のもの。
- h) 0.1 mol/L 過塩素酸/メタノール混合液 質量分率 70 %過塩素酸の場合は 2.125 mL を、質量分率 60 %過塩素酸の場合は 2.75 mL を、ピストン式ピペットを用いてはかりとり、250 mL の全量フラスコに移す。これに水で定容し、振り混ぜる。混合した溶液とメタノールとを、9:1 (体積比) で混合する。
- i) メタノール/水混合液 メタノールと水とを、1:9 (体積比) で混合する。
- j) HPLC 移動相 [水/アセトニトリル/ぎ酸混液 (900 : 100 : 1)] 水とアセトニトリルとぎ酸とを、900 : 100 : 1 (体積比) で混合する。使用前に脱気するか、又は脱気装置を用いる。(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。)
- k) クロロゲン酸標準液 クロロゲン酸約 50 mg を正確にはかりとり、25 mL の全量フラスコに移し、メタノールで定容する。この液 1 mL を全量ピペットを用いてはかりとり、20 mL の全量フラスコに移し、水 9 mL を加えて混合し、10 分間室温下に静置する。これをメタノール/水混合液で定容する。この液 5 mL を全量ピペットを用いてはかりとり、10 mL の全量フラスコに移す。これをメタノール/水混合液で定容する。(濃度約 50 µg/mL)

注記 1 クロロゲン酸標準液が RMS 標準液 (分析対象物質) (3.4) に相当する。

- l) カフェ酸標準液 カフェ酸約 50 mg を正確にはかりとり、25 mL の全量フラスコに移し、メタノールで定容する。この液 1 mL を全量ピペットを用いてはかりとり、20 mL の全量フラスコに移し、水 9 mL を加えて混合し、10 分間室温下に静置する。これをメタノール/水混合液で定容する。この液 5 mL を全量ピペットを用いてはかりとり、10 mL の全量フラスコに移す。これをメタノール/水混合液で定容する。(濃度約 50 µg/mL)

注記 2 カフェ酸標準液が RMS 標準液 (基準物質) (3.5) に相当する。

#### C.4 装置

通常の実験装置のほか、次による。

- a) 電子天びん 0.01 mg の桁の精度で量る機能をもつもので、ひょう量が 40 g より大きいもの。
- b) 超音波洗浄機 25 mL の全量フラスコが入る大きさで、かつ発振周波数が約 40 kHz のもの。
- c) 全量フラスコ ISO 1042 が規定するクラス A のもので、希釈溶媒の調製、標準液及び試料溶液の希釈の操作に適した容量のもの。
- d) 全量ピペット ISO 648 が規定するクラス A のもので、標準液の希釈の操作に適した容量のもの。
- e) ピストン式ピペット ISO 8655-2 が規定する容量可変で空気置換式 (type A) のピストン式ピペットで、希釈溶媒の調製の操作に適した容量のもの。
- f) メンブランフィルター フィルターが水系/有機溶剤系の溶液のろ過に適した親水性修飾ポリテトラフルオロエチレン (親水性 PTFE) 製のもので、孔径が 0.45 µm 以下のもの。また、フィルター及び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。
- g) バイアル 使用する HPLC 装置に適合し、不活性処理済みのもの、不活性処理済みのインサートバイアルを入れたもの又は影響がないことを確認したその他ガラス製のもの。蓋のセプタムは、PTFE 製又は PTFE でコーティングされたもの。
- h) HPLC 装置 JIS K 0124 で規定する送液ポンプ (2 液混合グラジエントが可能なもの、又は手動で送液ライ

ンの切り替えができるもの。), サーモスタット制御のカラム槽, 検出波長として 325 nm が設定できる紫外可視吸光光度検出器又はフォトダイオードアレイ検出器, 及びデータ処理装置を備えたもの。

#### i) HPLC カラム

次の特性を持つ C18 (オクタデシル) 逆相カラム。

- ー 充填剤は, 基材として粒子径 5  $\mu\text{m}$  のシリカゲルにオクタデシル (C18) 基を修飾したもの。カラム管は, ステンレス製で内径 4.6 mm, 長さ 150 mm のもの。
- ー C.6 に記載した測定条件でクロロゲン酸のピークが 7.5 分付近に検出され, かつ, きょう雑ピークと分離できるもの。
- ー 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。

### C.5 定量用試料溶液の調製

- a) りんごジュースは常温のものを用い, よく振り混ぜておく。果肉が含まれる場合には, あらかじめ十分に粉碎する。なお, りんごジュースの開封後は直ちに **b)以降**の操作を行う。
- b) 全量ピペットを用いてりんごジュース 5.0 mL をはかりとり, 25 mL の全量フラスコに移す。これに, 0.1 mol/L 過塩素酸水/メタノール混合液を約 15 mL 加えて栓をする。
- c) b)の 25 mL の全量フラスコを, 超音波洗浄機にて, 5 分間超音波照射する。
- d) c)の 25 mL の全量フラスコの標線まで 0.1 mol/L 過塩素酸水/メタノール混合液を加えて 25 mL に定容し, よく混合する。得られた溶液は, メンブランフィルターを用いてろ過し, ろ液をバイアルに回収し, 定量用試料溶液とする。ただし, 必要であれば 5 000  $\times$  g で 5 分間 (さらに必要な場合は 8 000  $\times$  g で 10 分間) 遠心分離し, 上清をメンブランフィルターでろ過する。

なお, 計算 (C.7.2 参照) で使用するカフェ酸に対するクロロゲン酸の RMS は, クロロゲン酸の濃度が約 1  $\mu\text{g/mL}$ ~50  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で作成した一次回帰直線によって算出したものである。定量用試料溶液中のクロロゲン酸量がこの範囲を逸脱する場合は, クロロゲン酸の濃度がこの範囲内となるよう調整する。定量用試料溶液を調製した日に HPLC 測定を行う。

### C.6 測定

#### C.6.1 HPLC 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。

- a) HPLC 移動相の流量 1.0 mL/min
- b) HPLC カラムの設定温度 40  $^{\circ}\text{C}$
- c) サンプルクーラー温度 10  $^{\circ}\text{C}$
- d) 検出波長 325 nm
- e) 注入量 10  $\mu\text{L}$
- f) 分析時間 20 分

カフェ酸標準液の繰返し測定 (通常, 6 回以上) において, 応答 (ピーク面積) の相対標準偏差が 1.0 %以下

を満たすことが望ましい。このとき、**JIS K 0124**で規定するシンメトリー係数は0.90～1.10であることとする。

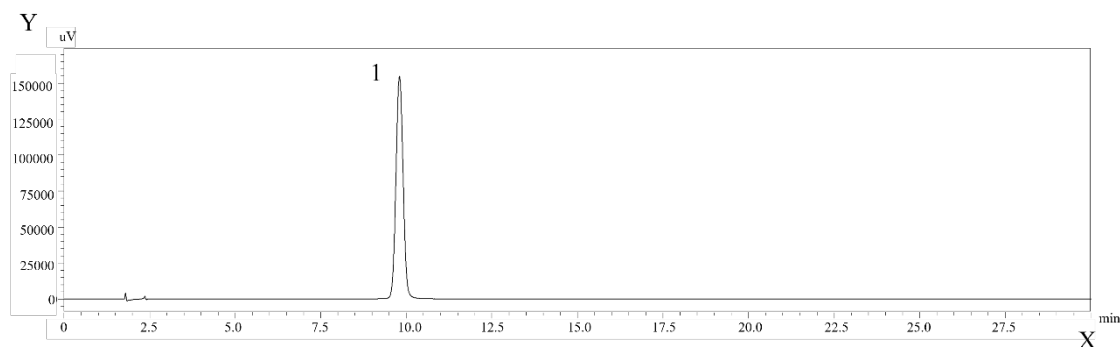
**注記** 定量用試料溶液の分析後は、アセトニトリル 100%で 5 分間カラムを洗浄する。その後、分析条件の HPLC 移動相に戻して 15 分間平衡化する。次の定量用試料溶液中のクロロゲン酸が適切に分析できれば、カラム洗浄時間及び平衡化時間を変更することが可能である。

### C.6.2 操作

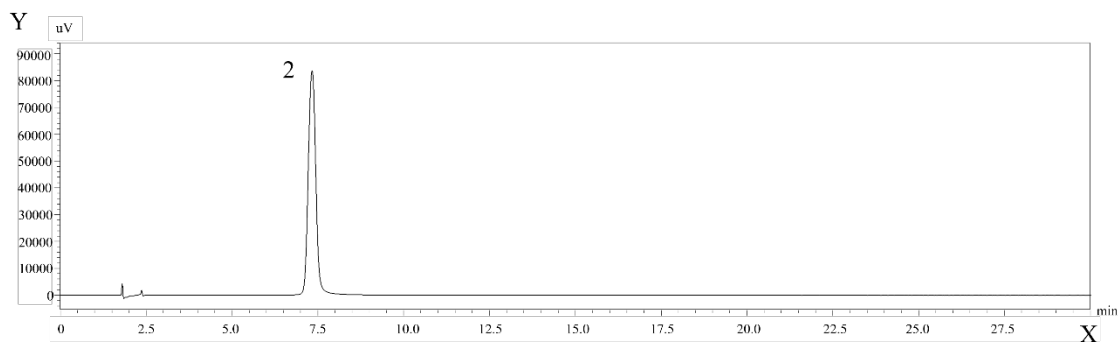
- a) 全体のシステムを安定化する。
- b) 設定した HPLC 条件で作動させた際、ベースラインの変動がカフェ酸及びクロロゲン酸の測定に支障がないことを確認する。
- c) クロロゲン酸標準液を測定する。
- d) カフェ酸標準液を測定する。
- e) 定量用試料溶液を測定する。

### C.6.3 同定

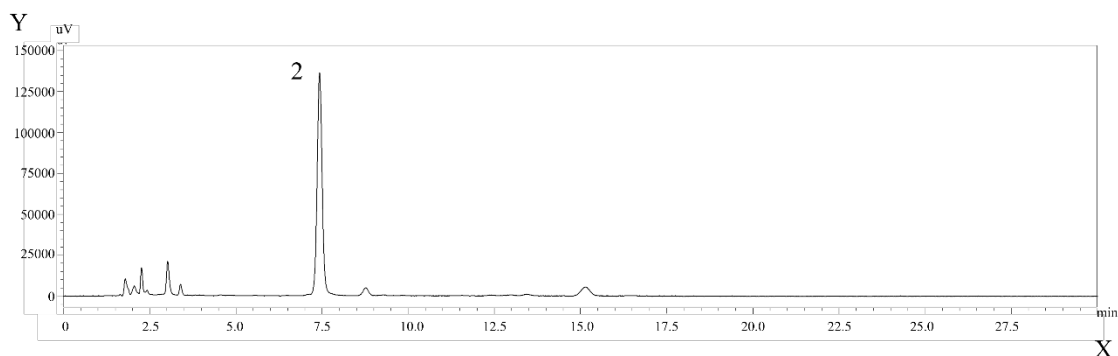
定量用試料溶液について、クロロゲン酸標準液のクロマトグラムから得られたクロロゲン酸の保持時間と一致したピークを、クロロゲン酸と同定する。カフェ酸標準液、クロロゲン酸標準液、及びりんごジュースの典型的なクロマトグラムを図 C.1 に示す。



a) カフェ酸標準液



b) クロロゲン酸標準液



c) りんごジュース（ストレート，アスコルビン酸含有）

## 記号説明

X：保持時間（min）

Y：検出部の応答（ピーク面積）（μV）

1：カフェ酸

2：クロロゲン酸

**注記** HPLC 条件は C.6.1 によるほか，カラムは（株）日立ハイテクサイエンス LaChrom C18 を用いた。また，クロロゲン酸およびカフェ酸として，富士フイルム和光純薬（株）製クロロゲン酸 0.5 水和物及び 3,4-ジヒドロキシけい皮酸（RM）を用いた。これは，商業的に入手可能な適切な製品の一例である。この情報は，この適用例の利用者の便宜のために示しており，農林水産省がこの製品を推奨するものではない。

図 C.1—典型的なクロマトグラム

## C.7 計算

### C.7.1 一般

りんごジュースに含まれるクロロゲン酸の量は，定量用試料溶液のクロロゲン酸及びカフェ酸標準液のカフェ酸の応答（ピーク面積），カフェ酸に対するクロロゲン酸の RMS との関係から算出する。きょう雑ピークに対しては，JIS K 0124 が規定する垂線法又は接線法に従って適切に対処する。

### C.7.2 計算

HPLC 測定の結果から，りんごジュース中のクロロゲン酸の定量値は，式(10)を変形した式(C.1)によって計算する。

$$Q_{an} = \frac{Z_{an}}{Z_{rr}} \times C_{rr} \times m_{an} \times D \times \frac{1}{V_{rms}} \dots\dots\dots (C.1)$$

ここで， $Q_{an}$ ： りんごジュース中のクロロゲン酸の定量値（μg/mL）

$Z_{an}$ ： 定量用試料溶液のクロロゲン酸の応答（ピーク面積）

$Z_{rr}$ ： カフェ酸標準液のカフェ酸の応答（ピーク面積）

$C_{\text{r}}$  : カフェ酸標準液のカフェ酸濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )  
 $m_{\text{an}}$  : クロロゲン酸のモル質量 (354.31 g/mol)  
 $D$  : 定量用試料溶液調製時の希釈倍率 (5)  
 $V_{\text{ms}}$  : カフェ酸に対するクロロゲン酸の RMS (1.099)

**注記 1** カフェ酸標準液のカフェ酸濃度は、用いるカフェ酸の純度を考慮し算出する。

**注記 2**  $V_{\text{ms}}=1.099$  は**附属書 D** に従い求めた値である。

### C.7.3 結果の表現

有効数字 3 桁で結果を表示する。

## C.8 精度

この試験法の精度を判断するための室間共同試験が行われ、その結果を**附属書 D** に示す。

この室間共同試験から得られた値は、そこで与えられたマトリックス以外にあてはめることが適切でないこともある。

- a) **併行精度** 同等の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 D.1** に示す併行許容差 ( $r$ ) [17]を超えるのは、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[16]。
- b) **室間再現精度** 同等の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 D.1** に示す再現許容差 ( $R$ ) [17]を超えるのは、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[16]。



## 附属書 D (参考) 室間共同試験の結果

### D.1 概要

室間共同試験は、RMS 技術に関する標準開発委員会において計画され、令和 4 年に国内で実施された。室間共同試験は次の **D.2** 及び **D.3** に示す 2 つの試験で構成されており、**表 D.1** 及び**表 D.2** に示す統計結果が得られた。どちらの試験においても、手順書、カフェ酸試薬 a)、クロロゲン酸試薬 b)、HPLC 用カラム c)及び試料が参加試験室に配付された。得られたデータの解析は AOAC ガイドライン[25]を用いて外れ値検定を行い、外れ値を除外したデータを使った後、一元配置分散分析し、併行標準偏差、室間再現標準偏差を求めた。なお、許容差の算出は ISO 5725-6[17]を参考とした。

**注記** a)は 3,4-ジヒドロキシけい皮酸 富士フイルム和光純薬（株） 042-20981, b)はクロロゲン酸 0.5 水和物 富士フイルム和光純薬（株） 039-14243, c)は LaChrom C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 µm) (株)日立ハイテクサイエンス 891-5050 を用いた。これは、商業的に入手可能な適切な製品の一例である。この情報は、この適用例の利用者の便宜のために示しており、農林水産省がこの製品を推奨するものではない。

### D.2 カフェ酸に対するクロロゲン酸の RMS の精度

各試験室は手順書に従い、附属書 C に示すクロロゲン酸の RMS 法に用いる、カフェ酸（RMS 基準物質）に対するクロロゲン酸（分析対象物質）の RMS を決定した。試験の流れを次に示す。

あらかじめ  $^1\text{H-qNMR}$  によって純度決定したカフェ酸試薬及びクロロゲン酸試薬を用いて、RMS 標準液（分析対象物質）及び RMS 標準液（基準物質）を  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ ～ $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  の濃度範囲で 6 濃度ずつ調製した。それぞれについて定められた分析条件で HPLC に付し、横軸にモル濃度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )、縦軸に応答（ピーク面積）をとった回帰直線を作成した。**4.1** の式(4)、式(5)及び式(6)より、RMS は、RMS 基準物質の回帰直線の傾きに対する分析対象物質の回帰直線の傾きの比である。従って、先に作成した一次回帰直線の傾きの比から、カフェ酸に対するクロロゲン酸の RMS を決定した（**表 D.1**）。

表 D.1ーカフェ酸に対するクロロゲン酸の RMS の精度

|                           |              |
|---------------------------|--------------|
| 参加分析機関数                   | 10           |
| データ解析に有効な分析機関数            | 10           |
| <del>外れ値になった分析機関数</del>   | <del>0</del> |
| <del>各試験室の併行測定回数</del>    | <del>3</del> |
| RMS の値の平均値                | 1.099 2      |
| 併行標準偏差 $s_r$              | 0.009 4      |
| 併行許容差 $r (r = 2.8 s_r)$   | 0.026 4      |
| 併行相対標準偏差%                 | 0.857 9      |
| 室間再現標準偏差 $s_R$            | 0.016 5      |
| 室間再現許容差 $R (R = 2.8 s_R)$ | 0.046 2      |
| 室間再現相対標準偏差 %              | 1.502 4      |

## D.3 RMS 法によるりんごジュース中のクロロゲン酸の定量値の精度

室間共同試験では、国産 4 製品、アメリカ産 1 製品の計 5 試料（開栓していない市販品、濃度が非明示のものを各 2 点）が配布された。これらの試料はそれぞれ同一ロットのりんごジュースであり、十分に均質であると見なせるものである。

各試験室は手順書に従い、**附属書 C** に示す手順で、クロロゲン酸標準液、カフェ酸標準液及び定量用試料溶液を調製した。**D.2** で得られた RMS を用い、カフェ酸を RMS 基準物質として 5 試料中のクロロゲン酸の定量値を求めた（表 D.2）。

表 D.2ーRMS 法によるりんごジュース中のクロロゲン酸の定量値の精度

|                                              | 試料 1           | 試料 2           | 試料 3           | 試料 4           | 試料 5           |
|----------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 参加試験室数                                       | 10             | 10             | 10             | 10             | 10             |
| データ解析に有効な試験室数試験結果の数                          | 9              | 8              | 9              | 9              | 9              |
| <del>外れ値になった分析機関数</del>                      | <del>1</del>   | <del>2</del>   | <del>1</del>   | <del>1</del>   | <del>1</del>   |
| <del>各試験室の併行測定回数</del>                       | <del>6</del>   | <del>6</del>   | <del>6</del>   | <del>6</del>   | <del>6</del>   |
| クロロゲン酸含有量の平均値, $\mu\text{g/mL}$              | 26.7           | 89.3           | 97.7           | 115.5          | 153.2          |
| 併行標準偏差 $s_r$ , $\mu\text{g/mL}$              | 0.4            | 0.5            | 1.5            | 2.6            | 2.5            |
| 併行許容差 $r (r = 2.8 s_r)$ , $\mu\text{g/mL}$   | 1.2            | 1.5            | 4.1            | 7.4            | 6.9            |
| 併行相対標準偏差 %                                   | 1.6            | 0.6            | 1.5            | 2.3            | 1.6            |
| <del>HorRat(<math>r</math>)</del>            | <del>0.2</del> | <del>0.1</del> | <del>0.2</del> | <del>0.2</del> | <del>0.2</del> |
| 室間再現標準偏差 $s_R$ , $\mu\text{g/mL}$            | 0.7            | 0.9            | 2.0            | 3.7            | 3.4            |
| 室間再現許容差 $R (R = 2.8 s_R)$ , $\mu\text{g/mL}$ | 1.9            | 2.4            | 5.5            | 10.2           | 9.5            |
| 室間再現相対標準偏差 %                                 | 2.5            | 1.0            | 2.0            | 3.2            | 2.2            |
| <del>HorRat(<math>R</math>)</del>            | <del>0.3</del> | <del>0.1</del> | <del>0.3</del> | <del>0.4</del> | <del>0.3</del> |
| 注記 RMS は表 D.1 にて得られた平均値 (1.099) を用いた。        |                |                |                |                |                |



## 参考文献

- [1] Nishizaki Y, Ishizuki K, Masumoto N, Tada A, Sato K: HPLC determination of quercetin using relative molar sensitivity to methylparaben as a single reference. *Jpn. J. Food Chem. Saf.*, 27, 42-52 (2020)
- [2] Masumoto N, Ishizuki K, Nishizaki Y, Ohtsuki T, Kuroe M, Yamazaki T, Numata M, Matsufuji H, Sugimoto N, Sato K: Determination of mogroside V in luohanguo extract for daily quality control operation using relative molar sensitivity to single-reference caffeine. *Chem. Pharm. Bull.*, 69, 18-25 (2021)
- [3] Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: Application of <sup>1</sup>H-Quantitative NMR From the Viewpoint of Regulatory Science. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, 2019, (DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14681-5)
- [4] 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 食品分析の信頼性確保における定量 NMR に基づく相対モル感度の役割—分析対象物質の定量用標品不要なクロマトグラフィーの開発—. *FFI ジャーナル*, 224, 123-130 (2019)
- [5] Masumoto N, Nishizaki Y, Maruyama T, Igarashi Y, Nakajima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sugimoto N, Sato K: Determination of perillaldehyde in perilla herbs using relative molar sensitivity to single - reference diphenyl sulfone. *J. Nat. Med.*, 73, 566-576 (2019)
- [6] 黒江美穂, 斎藤直樹, 山崎太一, 西崎雄三, 杉本直樹, 沼田雅彦, 井原俊英: <sup>1</sup>H 核定量核磁気共鳴分光法と HPLC の組合せによるヘプタオキシエチレンデシルエーテル標準液の値付け. *分析化学*, 67, 541-549 (2018)
- [7] Nishizaki Y, Masumoto N, Nakajima K, Ishizuki K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Tada A, Sugimoto N, Sato K: Relative molar sensitivities of carnosol and carnosic acid with respect to diphenylamine allow accurate quantification of antioxidants in rosemary extract. *Food Add. Contam., A*, 36, 203–211 (2019)
- [8] Nishizaki Y, Masumoto N, Yokota A, Mikawa T, Nakashima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Ito Y, Sugimoto N, Sato K.: HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. *Food Add. Contam., A*, 35, 838–847 (2018)
- [9] Saito N, Kitamaki Y, Otsuka S, Yamanaka N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata H, Ihara T.: Extended internal standard method for quantitative <sup>1</sup>H NMR assisted by chromatography (EIC) for analyte overlapping impurity on <sup>1</sup>H NMR spectra. *Talanta*, 184, 484-490 (2018)
- [10] Takahashi M, Nishizaki Y, Morimoto K, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Design of synthetic single reference standards for the simultaneous determination of sesamin, sesamolin, episesamin, and sesamol by HPLC using relative molar sensitivity. *Sep. Sci. plus*, 1(7), 498-505 (2018)
- [11] Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Single reference quantitative analysis of xanthomonasin A and B in *Monascus* yellow colorant using high-performance liquid chromatography with relative molar sensitivity based on high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1555, 45-52 (2018)
- [12] 西崎雄三, 佐藤 (増本) 直子, 中西章仁, 橋爪雄志, タンジャマハマドウ, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量 NMR に基づく相対モル感度を利用した加工食品中のヘスペリジンおよびモノグルコシルヘスペリジンの定量. *食衛誌*, 59(1), 1-10 (2018)
- [13] Kitamaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata M, Ihara T. Determination of PAHs in Solution with a Single Reference Standard by a Combination of <sup>1</sup>H Quantitative NMR Spectroscopy and Chromatography. *Anal. Chem.*, 89(13), 6963–6968 (2017)

- [14] Masumoto N, Ohno T, Suzuki T, Togawa T, Sugimoto N: Application of the relative molar sensitivity method using GC-FID to quantify safranal in saffron (*Crocus sativus* L.). J. Nat. Med., 77, 829-838 (2023) (<https://doi.org/10.1007/s11418-023-01724-8>)
- [15] Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Araho D, Murakami T, Nishizaki ~~FX~~, Masumoto N, Sugimoto N: A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on <sup>1</sup>H-qNMR for khellactone esters from *Peucedanum japonicum* root extract. Food Chemistry, 2023; 427: 136647 (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136647>)
- [16] **ISO 5725-1** Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions
- [17] **ISO 5725-6** Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 6: Use in practice of accuracy values
- [18] Kitamaki Y, Saito N, Numata M, Ihara T: Application of post-column reaction GC for accurate and direct determination of musty odor substances in standard solution. Accreditation Qual. Assur., 23, 297–302 (2018) (DOI: 10.1007/s00769-018-1338-4)
- [19] **JIS R 3505** ガラス製体積計
- [20] **JIS B 7609** 分銅
- [21] **JIS Z 8804** 液体の密度及び比重の測定方法
- [22] **JIS Q 17025** 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項
- [23] **JIS Q 17034** 標準物質生産者の能力に関する一般要求事項
- [24] Kuroe M, Numata M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Itoh N: Use of Relative Molar Sensitivity as a Specific Value for Evaluating Heptaoxyethylene Dodecyl Ether Concentrations in Methanol Solution. Anal. Sci., 37, 917-919 (2021).
- [25] AOAC Int. (2005) . Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int. 18 ed., Gaithersburg, MD,USA.