

きのこ（ぶなしめじ）中のオルニチンの定量

— 高速液体クロマトグラフ法

Determination of the ornithine in mushroom (*Hypsizygus marmoreus*)

— 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及び機器分析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、きのこ [（生鮮のぶなしめじ（*Hypsizygus marmoreus*）に限る。）] 中に含まれるオルニチンの測定のための 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

次に掲げる規格は、その内容の一部又は全てが、この規格に引用されることによって、この規格の規定の一部を構成する。これらの引用規格は、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 8180 塩酸（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

粉碎した試料のオルニチンを希塩酸で抽出する。規定の条件を満たす 高速液体クロマトグラフ分析装置を用いて抽出物中のオルニチンを測定する。

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 97.0 %以上のオルニチン塩酸塩

b) ~~又は高速液体~~クロマトグラフ分析装置及び測定条件に適した濃度にオルニチンを調製した市販のアミノ酸標準液。

5.3 塩酸

JIS K 8180 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

警告 劇物のため、目、粘膜及び皮膚に付着しないようにする。

5.4 希塩酸

水に塩酸 0.86 mL を加え、1.0 L に定容する。

5.5 内標準物質

測定 (8.2 参照) で内標準法を用いる場合に必要なもので、ふなしめじ中に含まれていないこと及びふなしめじ中の成分ピークと分離していることを確認した物質。高速液体クロマトグラフ分析装置及び測定条件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、タンデム質量分析計を備えた装置において、ノルバリン及びピテアニンを使用した。

5.6 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分析装置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。

5.7 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分析装置及び測定条件に適した 3 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分析装置の定量下限 (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、オルニチン含有量 400 mg/kg ～2500 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で、ひょう量が 200 g より大きいもの。

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 振とう機

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 (5.7 参照) 標準溶液の希釈**と 8.1.2, 8.1.3 の抽出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。相対遠心加速度 $13\,000 \times g$ に耐えられるもの。

6.6 遠心分離器

相対遠心加速度 $13\,000 \times g$ で遠心用容器を遠心分離の操作ができるもの。

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、呼び孔径が $0.2 \mu\text{m}$ 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。

6.8 バイアル

使用する**高速液体**クロマトグラフ分析装置に適合したもので、不活性処理済みのガラス製のもの又は高純度ポリプロピレン製のもの。蓋のセプタムは、PTFE 製又は PTFE でコーティングされたもの。

6.9 **高速液体**クロマトグラフ分析装置

分離部に**高速液体**クロマトグラフをもち、検出部に蛍光検出器若しくは可視吸光度検出器（いずれもポストカラム誘導体化法を用いた測定）又はタンデム質量分析計を備えたもののうち 8.2.1 の条件を設定できるもの。

7 試験用試料の調製

試料の石づきを除去した後、フードプロセッサ等を用いて、目視で均質となるよう粉碎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冷凍庫から取り出し、常温に戻し、よく混合する。

注記 **試験用試料は $-30^\circ\text{C} \sim -20^\circ\text{C}$ の保存環境で少なくとも 20 週間安定した状態を保つことが確認されている。**
 ~~$-30^\circ\text{C} \sim -20^\circ\text{C}$ で保存された試験用試料は、少なくとも 20 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（**箇条 7** 参照）約 2 g を 10 mg の桁まで抽出用容器にはかりとり、希塩酸 15 mL を加え、振とう機で 15 分間振り混ぜる。

8.1.2 抽出用容器の内容物（8.1.1 参照）を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合わせる。

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験では、50 mL の全量フラスコを使用した。

8.1.3 全量フラスコ（8.1.2 参照）に希塩酸を標線まで加えて定容し、振り混ぜ、混合溶液を得る。なお、測定（8.2 参照）で内標準法を用いる場合には、この定容時又は 8.2.2 で行う試料抽出物（8.1.5 参照）の希釈時に内標準物質を添加する。

8.1.4 混合溶液（8.1.3 参照）の一部又は全量を遠心用容器に移し、相対遠心加速度 13 000×g で 10 分間遠心分離を行う。

8.1.5 上澄み液上層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。調製した日に 8.2 の測定を行うか、又は試料抽出物を冷凍保存する。

注記 ~~試料抽出物は -30 °C ~ -20 °C の保存環境で少なくとも 18 週間安定した状態を保つことが確認されている。 -30 °C ~ -20 °C で保存された試料抽出物は、少なくとも 18 週間安定した状態を保つことが確認されている。~~

-30 °C ~ -20 °C で保存した試料抽出物は、測定前に冷凍庫から取り出し、十分に振り混ぜる。

8.2 測定

8.2.1 高速液体クロマトグラフ分析装置の測定条件の設定及び抽出条件の確認

測定は、絶対検量線法又は内標準法によって行う。高速液体クロマトグラフ分析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。

- a) 試験用試料（**箇条 7** 参照）中濃度に換算した定量下限が、50 mg/kg 以下であること
- b) 標準液及び試料抽出物（又はその希釈物）について、オルニチンのピークと**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
- c) 検量線の相関係数が 0.995 以上であること
- d) 任意の試験用試料（**箇条 7** 参照）に同量程度のオルニチンを添加^[1]してを用いた添加回収試験を行い、その回収率が表 1 の範囲内であること^[2]

表 1 — 回収率範囲

添加濃度	回収率 (%)
≥1 000 mg/kg	95~105
≥100 mg/kg	90~107
≥10 mg/kg	80~110

e) 任意の試験用試料（**箇条 7** 参照）を併行条件で 6 回以上^[3]測定し、標準偏差（質量分率）（ S_{rl} ）が次の条件を満たすこと^[24]

$$\frac{S_{rl}}{0.02w^{0.85}} \leq 1.3$$

ここで、 w : 試験用試料のオルニチン含有量（質量分率）

8.2.2 高速液体クロマトグラフ分析装置による測定

設定した条件で作動させベースラインの変動がオルニチン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物（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、実試料 5 点測定ごとに、検量線作成用溶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。

導入した標準液、試料抽出物ごとにオルニチンの出力信号を得る。なお、導入する試料抽出物は、装置に適したオルニチン濃度に希釈してよい。

9 計算

9.1 定量

一連の標準液のオルニチン濃度に対する出力信号強度を一次回帰して検量線を作成する。また、次の条件を満たしていることを確認する。

- a) 検量線の相関係数が 0.995 以上であること
- b) 試料抽出物（又はその希釈物）中のオルニチン濃度が検量線範囲内であること

試料抽出物（又はその希釈物）のオルニチンの出力信号強度から検量線を用いて試料抽出物のオルニチン濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）を算出する。試験用試料中のオルニチン含有量 w_i （ mg/kg ）は次の式によって与えられる。

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

ここで、
C : 試料抽出物のオルニチン濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）
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 ）

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験では、 V は 50 を用いた。

9.2 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**確認された与えられた**含有量範囲（ $6.7 \times 10^2 \text{ mg/kg} \sim 1.9 \times 10^3 \text{ mg/kg}$ ）及びマトリックス以外では適用できに適切でないことがある。

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 ）^[9]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^[4]。

10.3 室間再現精度

同一とみなせる試料で同じ方法を用い、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) ^[35] 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^[46]。

11 質管理

試験所は、試験のための内部質管理手順をもつものとする。

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 2 年に IUPAC 共同実験ガイドライン^[57]に従って国内で行われ、表 A.1 に示す統計結果が得られた。市販のぶなしめじについて、石づきを除去し、粉砕機を用いて 3 600 rpm で 5 分間、粉砕した。粉砕物について均質性^[68]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、オルニチン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 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	試料 5
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	9	8
オルニチン含有量の平均値, mg/kg	671 2	895 2	1 216 4	1 538 0	1 853 3
併行標準偏差 s , mg/kg	12.4	12 4	44 5	39.6 40	57.4
併行相対標準偏差, %	1.9	1.4	3.7	2.6	3.1
併行許容差 r ($r=2.8 s$), mg/kg	35 4.8	34 0	124 5	111 0.8	161 0.7
室間再現標準偏差 s_R , mg/kg	46 2	31 4	86 5.8	59 8.6	60 9.7
室間再現相対標準偏差, %	6.9	3.5	7.1	3.8	3.2
室間再現許容差 R ($R=2.8 s_R$), mg/kg	129 4	88 7.8	240 4	164 0	167 4

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分析装置は、国内での利用状況を踏まえ、分離部に高速液体クロマトグラフをもち、検出部に蛍光検出器若しくは可視吸光光度検出器 [いずれもポストカラム誘導体化法を用いた測定 (アミノ酸自動分析計)] 又はタンデム質量分析計を備えたものとした。なお、使用した装置の内訳は、蛍光検出器 (ポストカラム誘導体化法) として 2 試験室、可視吸光光度検出器 (ポストカラム誘導体化法) として 3 試験室、タンデム質量分析計として 5 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、農林水産省がこの製品を推奨するものではない。

例 1

検出器：タンデム質量分析計

カラム：ACQUITY UPLC BEH Amide (内径：2.1 mm, 長さ：150 mm) (日本ウォーターズ(株))

移動相 A：0.3 %ギ酸含有水溶液

移動相 B：0.3 %ギ酸含有 95%アセトニトリル水溶液

流速：0.3 mL/min

注入量：10 μ L

カラム温度：30 $^{\circ}$ C

イオン化モード：正の ESI

選択イオン (m/z)：プリカーサーイオン 133.00, プロダクトイオン 69.80, 115.92

分析時間：18 min

例 2

検出器：蛍光検出器 (ポストカラム誘導体化法)

カラム：Shim-pack Amino-Na (内径：6.0 mm, 長さ：100 mm) ((株)島津製作所)

移動相：アミノ酸移動相キット Na 型

流速：0.3 mL/min～0.4 mL/min

注入量：10 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：350 nm

検出波長：450 nm

分析時間：53 min

例3

検出器：可視吸光光度検出器（ポストカラム誘導体化法）

カラム：生体液分析用パッキングカラム#2622（内径：4.6 mm，長さ：60 mm）（株）日立ハイテクサイエンス）

移動相：生体液分析用緩衝液 PF セット

流速：0.35 mL/min

注入量：20 μ L

カラム温度：30 $^{\circ}$ C～70 $^{\circ}$ C

誘導体化試薬：ニンヒドリン

波長：570 nm

分析時間：125 min

参考文献

[1] Official Methods of Analysis (2019) 21st Edition, AOAC INTERNATIONAL

注記 添加回収試験の添加量について、参考文献中の「Appendix D:Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis」を参考にした。

[+2] CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION PROCEDURAL MANUAL (2019) Twenty-seventh edition, WORLD HEALTH ORGANIZATION FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS

注記 回収率の範囲について、参考文献中の「Principles for the Establishment of Codex Methods of Analysis」の「Table 1: Guidelines for establishing numeric values for the criteria」を参考にした。

[3] VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1) (2005), ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE

注記 参考文献中の「5.1. Repeatability b)」を参考にした。

[24] CODEX, GUIDELINES ON ANALYTICAL TERMINOLOGY, CAC/GL 72-2009

注記 参考文献中の「HorRat (Horwitz 比)」の項目に示されている RSD(r)/PRSD(R)の範囲から、当該数式を導出した。

[35] **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。

[46] **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。

[57] Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, 1995, 67(2), p. 331–343

[68] 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。