

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の日本農林規格の一部を改正する件 新旧対照表
○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の日本農林規格（平成 30 年 3 月 29 日農林水産省告示第 662 号）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
日本農林規格JAS0002：20XX 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 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。 (削る) ISO 648Laboratory 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 1042Laboratory 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 3310-1Test 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 8655-2Piston-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） (略) JIS K 9005りん酸（試薬） (略) 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。	日本農林規格JAS0002：2019 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 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 565Test sieves — Metal wire cloth, perforated metal plate and electroformed sheet – Nominal sizes of openings ISO 648Laboratory 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 1042Laboratory 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 3310-1Test 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 8655-2Piston-operated volumetric apparatus — Part 2: Piston 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） (略) JIS K 9005りん酸（試薬） (略) (新設) 3測定原理 粉碎した茶葉の測定試料から、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。抽出物は、メンブランフィルターでろ過する。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、抽出物中の EGCG3"Me を測定する。 4試薬 他に規定のない限り、分析用と認められた試薬だけ使用する。

警告（略）	5.1 水
JIS K 0557 に規定する A3 以上の品質のもの。	5.2 EGCG3"Me
(略)	5.3 リン酸
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
(略)	5.10 リン酸溶液
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 1 000 mL 当たり にアスコルビン酸 1.76 g 及び EDTA2Na 1.00 g とを溶解する。	5.13 ブランク抽出液
簡条 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℃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℃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	

警告（略）	4.1 水
JIS K 0557 が規定する A3 以上の品質のもの。	4.2 EGCG3"Me
(略)	4.3 リン酸
JIS K 9005 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。	4.4 エタノール
JIS K 8101 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。	4.5 メタノール
高速液体クロマトグラフ用のもの。	4.6 アセトニトリル
高速液体クロマトグラフ用のもの。	4.7 アスコルビン酸
JIS K 9502 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。	4.8 エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 (以下、EDTA2Na という。)
JIS K 8107 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。	4.9 やぶきた緑茶
(略)	4.10 リン酸溶液 約 2 %に相当する水溶液。
水 (4.1) とりん酸 (4.3) とを 49 : 1 (体積分率) で混合する。	4.11 抽出溶媒 リン酸溶液/エタノール混合液。
エタノール (4.4) とりん酸溶液 (4.10) とを 1 : 1 (体積分率) で混合する。	4.12 希釈用溶媒 1.00 g/L EDTA 含有 1.76 g/L アスコルビン酸水溶液。
水 (4.1) 1 000 mL 当たりアスコルビン酸 (4.7) 1.76 g と EDTA2Na (4.8) 1.00 g とを溶解する。	4.13 ブランク抽出液 やぶきた緑茶抽出液。
簡条 6 及び 7.1 に従って、やぶきた緑茶 (4.9) から抽出液を得る。7.3 に従って、ブランク試料の抽出液のクロマトグラムを得て、EGCG3"Me のピークが検出限界以下であることを確認する。 ブランク抽出液をラベルされた褐色不活性処理済バイアル (5.8) へ入れ、冷凍保存する。使用前に冷凍庫から取り出し、室温に解凍する。ブランク抽出液の残りは捨て、再凍結しない。 注記 1 シグナル (S) とノイズ (N) の比 (S/N 比) の値が 3 であるときの目的成分量を検出限界とすることができる。検出器出力の平均値を線で結ぶことで得られるノイズを含まないクロマトグラムにおける、ベースラインから EGCG3"Me のピークの頂点までのピーク高さをシグナル (S) とする (JIS K 0124 参照)。ブランク試料の抽出液のクロマトグラムでの EGCG3"Me のピークの前後 (ピーク半値幅の 20 倍の範囲) のベースラインにおける出力信号の最大値と最小値の差の振れ幅の 1/2 をノイズ (N) とする (JIS K 0124 参照)。 注記 2 -25℃以下で冷凍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。	4.14 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 (略)

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 (略)

5.15 EGCG3"Me 標準原液

EGCG3"Me を約 100 µg/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。

(削る)

(削る)

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
-----	-----------------------	---------------	-----------------	------------------

4.14.1 移動相 A 0.2 %に相当するりん酸水溶液。

水 (4.1) とりん酸 (4.3) とを 420 : 1 (体積分率) で混ぜる。

注記 (略)

4.14.2 移動相 B メタノール/アセトニトリル混合液。

メタノール (4.5) とアセトニトリル (4.6) とを 18 : 5 (体積分率) で混ぜる。

注記 (略)

4.15 EGCG3"Me 標準原液 100 µg/mL 相当。

EGCG3"Me 濃度が 100 µg/mL となるように、EGCG3"Me (4.2) 2 mg 以上を 0.01 mg の桁まで全量フラスコ (5.3) にはかりとる。

希釈用溶媒 (4.12) を加え、十分に溶解させる (例えば超音波処理)。希釈用溶媒を標線まで加えて定容する。標準原液をラベルされた褐色不活性処理済バイアル (5.8) へ入れ、冷凍保存する。

注記 1 溶液中の EGCG3"Me は分解しやすいため、標準原液へ EDTA 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 以下で冷凍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。

使用前に冷凍庫から取り出し、室温に解凍する。調製した標準原液中の実際の EGCG3"Me 濃度 (µg/mL) を算出する。

4.16 標準液

4.16.1 一般事項

EGCG3"Me の標準液を 5 段階以上の濃度に調製する。EGCG3"Me 濃度の最も高い標準液は、EGCG3"Me のピークに他のピークが重ならない濃度とする (7.3.2 参照)。一連の標準液は、EGCG3"Me 標準原液 (4.15) のバイアルの 1 つから調製する。使用する日に新たに溶液を調製する。標準原液の残りは捨て、再凍結しない。

注記 EGCG3"Me がクロマトグラフの金属部分へ吸着すると考えられるので、一連の標準液にブランク抽出液 (4.13) を添加することは重要である。

4.16.2 一連の標準液

全量ピペット (5.6) 又はピストン式ピペット (5.7) を用いて、EGCG3"Me 標準原液 (4.15) と希釈用溶媒 (4.12) とブランク抽出液 (4.13) とを、褐色不活性処理済バイアル (5.8) に移し、混合する。各標準液中の実際の EGCG3"Me 濃度 (µg/mL) を算出する。

(新設)

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験では、表 1 に示す標準液 A, B, C, D 及び E を使用した。
(新設)

表 1—標準液 A, B, C, D 及び E の調製

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	<u>200</u>	<u>700</u>	100	<u>20</u>
B	<u>150</u>	<u>750</u>	100	<u>15</u>
C	100	800	100	<u>10</u>
D	50	850	100	<u>5</u>
E	10	890	100	<u>1</u>
(削る)				

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

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

(略)

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

(略)

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プン、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。

A	<u>500</u>	<u>400</u>	100	<u>50.0</u>
B	<u>250</u>	<u>650</u>	100	<u>25.0</u>
C	100	800	100	<u>10.0</u>
D	50	850	100	<u>5.00</u>
E	10	890	100	<u>1.00</u>
<u>注記</u> 与えられた値は、一例である。				

5 装置及び器具

通常の実験器具及び装置のほか、特に次のものとする。

5.1 化学天びん

1 mg の桁の精度で量る機能をもつもの及び 0.01 mg の桁の精度で量る機能をもつもの。

5.2 ふるい

ISO 565 又は ISO 3310-1 が規定する公称目開き 355 µm のもの。

5.3 全量フラスコ

ISO 1042 が規定するクラス A のもので、標準溶液及び試料抽出物の希釈並びに抽出のための容量範囲をカバーするもの。

5.4 恒温水槽

(略)

(新設)

5.5 メンブランフィルター

(略)

5.6 全量ピペット

ISO 648 が規定するクラス A のもので、標準溶液と試料抽出物の希釈のための容量範囲をカバーするもの。

5.7 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、標準溶液と試料抽出物の希釈のための容量範囲をカバーするもの。

5.8 褐色不活性処理済バイアル

褐色ガラス製の不活性処理済で容量が 2 mL 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。希釈標準液用 (4.16.2 参照)。

5.9 HPLC 装置

5.9.1 高速液体クロマトグラフ

JIS K 0124 が規定する 2 液混合グラジエントが可能で、脱気装置、カラムオープン、オートサンプラー、UV 検出器 (272 nm) 及びデータ処理部を備えたもの。PDA 検出器を使用してもよい。

5.9.2 HPLC 用カラム

次の特性を持つ C18 (ODS) 逆相カラム。

(略)

- 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。

(略)

7 試験用試料の調製

適切な粉碎器を使用して茶葉を粉碎する。粉碎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 (最初のろ過した液は捨てる)。ろ過した液をメンブランフィルターでろ過 (最初のろ液は捨てる) し、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 -25 °C 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。

- a) 移動相の流量 : 1.0 mL/min
- b) カラムの設定温度 : 40 °C
- c) ・ d) (略)
- e) 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 (略)

(略)

- 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。7.3に従って EGCG3"Me の保持時間を確認する。

(略)

6 試験用試料の調製

適切な粉碎器を使用して茶葉を粉碎する。粉碎した試料又は粉末茶試料をふるい (5.2) に通す。直ちに 7.1 の操作を行う、又は試験用試料を冷凍保存する。

注記 -25 °C 以下で冷凍保存された粉碎試料は、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。

冷凍保存した試験用試料を抽出 (7.1) 前に冷凍庫から取り出し、室温に解凍する。

7 手順

7.1 抽出

試験用試料 (箇条 6) 240 mg~260 mg を 1 mg の桁まで 25 mL 容の全量フラスコ (5.3) にはかりとる。抽出溶媒 (4.11) 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 (5.4) 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 (4.1) を標線まで加えて定容し、混ぜる。

混合物をろ紙でろ過する (最初のろ過した液は捨てる)。ろ過した液をメンブランフィルター (5.5) でろ過 (最初のろ液は捨てる) し、ろ液約 1.5 mL を回収する。試料抽出物を冷凍保存した場合は、希釈前に冷凍庫から取り出し、室温に解凍する。

注記 -25 °C 以下で冷凍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。

7.2 希釈

全量フラスコ (5.3)、全量ピペット (5.6) 又はピストン式ピペット (5.7) を用いて、試料抽出物 (7.1) を水 (4.1) で希釈する。試料抽出物と水とを 1 : 9 (体積分率) 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 (5.8) に移す。直ちに 7.3 の操作を行う。

7.3 測定

7.3.1 HPLC 条件の設定

メーカーの取扱説明書に従って、HPLC 装置 (5.9) をセットアップする。設定は次による。

- a) 移動相 (4.14) の流量 : 1.0 mL/min
- b) カラム (5.9.2) の設定温度 : 40 °C
- c) ・ d) (略)
- e) 溶出条件 : 12 分間は移動相 A (4.14.1) を 77 % 及び移動相 B (4.14.2) 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 (略)

表 2（略）

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 （略）

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 （略）

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 (µg/mL)
V :	抽出溶媒の量 (mL)，通常 25 (<u>8.1 参照</u>)
d :	試料抽出物希釈液調製時の希釈倍率，通常 10 (<u>8.2 参照</u>)
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

表 2（略）

7.3.2 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（7.3.1）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（4.16.2）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で、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（7.2）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。

注記 （略）

データ収集/総合システムを使用して、標準液及び測定用試料溶液全てのピークのデータを集める。

7.4 同定

試料溶液について、同じ HPLC 条件（7.3.1）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 （略）

8 計算

8.1 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。JIS K 0124 に従って、標準液及び試料で同じベースラインの引き方をする。

8.2 定量

各標準液のためにデータ処理装置によって得られたピーク面積に対する EGCG3"Me の実際の濃度から、直線的な検量線を作成する。作成した検量線の相関係数は 0.995 以上であるものとする。

各試料溶液中の EGCG3"Me の濃度 (µg/mL) を算出する。べにふうき茶葉試料又は粉末試料中の EGCG3"Me の含有量 w_C (g/kg) は、次の式によって与えられる。

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

ここに、

C :	試料抽出物希釈液中の EGCG3"Me の濃度 (µg/mL)
V :	抽出溶媒の量 (mL)，通常 25
d :	試料抽出物希釈液調製時 (<u>7.2</u>) の希釈倍率，通常 10
m :	測定用試料の質量 (mg)

8.3 結果の表現

有効数字 2 桁 (例えば質量分率 16 g/kg) で結果を表示する。

9 精度

9.1 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の詳細は附属書 A にまとめられる。この試

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 質管理

試験所は、試験のための内部質管理手順をもつ。

12 試験報告書

(略)

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)
(略)	(略)	(略)	(略)	(略)	(略)
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	<u>0.83</u>
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	<u>2.1</u>

試験室間共同実験から得られた値は、そこで与えられた濃度範囲（11 g/kg～19 g/kg）及びマトリックス以外に適切でないこともある。

9.2 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) 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 回以下であると期待される^[1]。

9.3 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) 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 回以下であると期待される^[1]。

10 質管理

試験所は、試験のための内部質管理手順を持つものとする。

11 試験報告書

(略)

附属書 A

(参考)

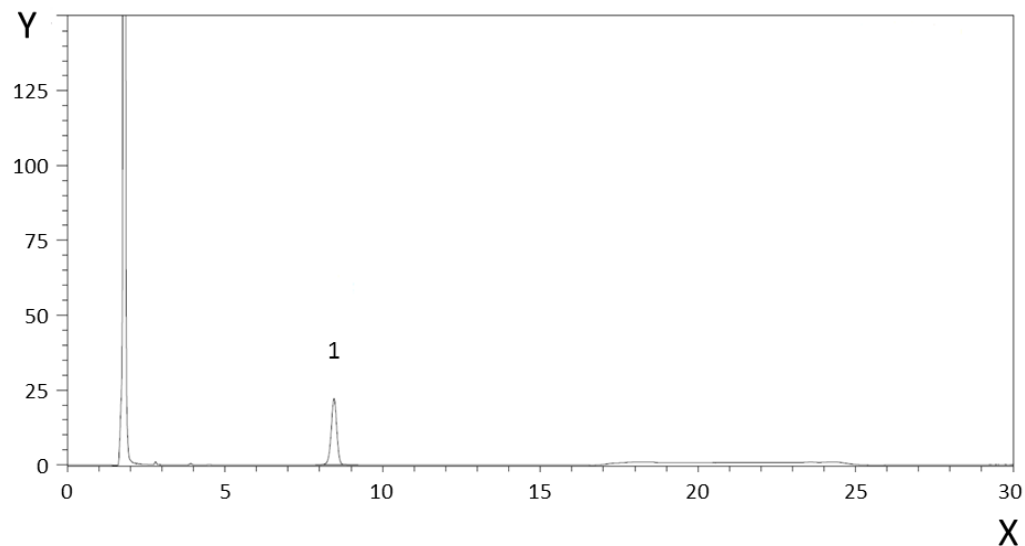
試験室間共同実験の結果

この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^[2]に従って国内で行われ、表 A.1^[3]に示す統計結果が得られた。市販のべにふうき茶葉及び粉末茶から、均質な^[4]試験試料が調製された。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、手順書及び試験試料だけでなく、既知濃度の EGCG3"Me 標準原液及びブランク抽出液も参加試験室に配付した。各参加試験室は、手順書に従って、合計 10 試験試料（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)
(略)	(略)	(略)	(略)	(略)	(略)
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, %	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	<u>0.25</u>
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, %	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	<u>0.21</u>

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

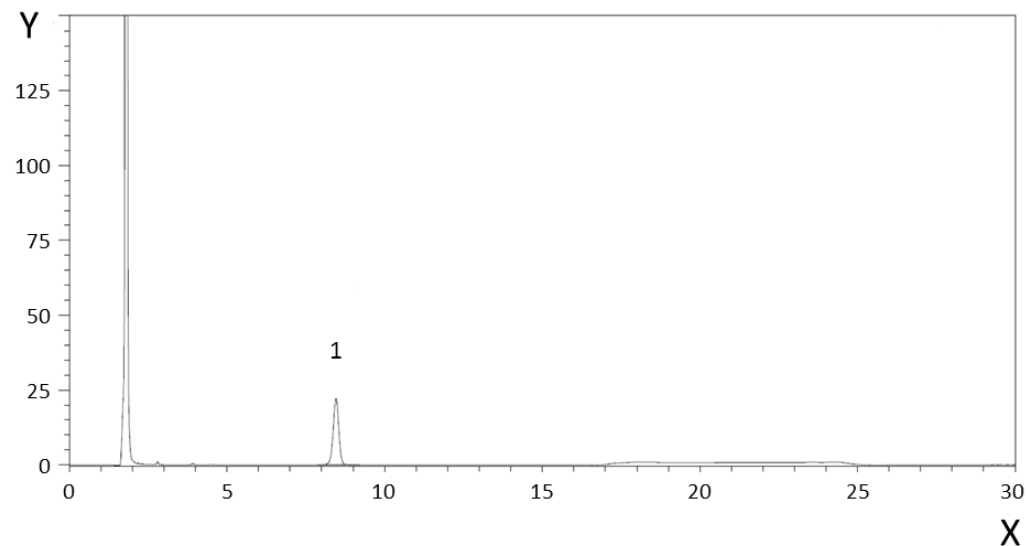
注記 HPLC 条件は **8.3.1** によるほか、溶出は表 2 の 2 液グラジエント条件を用い、カラムは Wakopak® Navi C18-5 を用いた。なお、この情報は、この規格の利用者の便宜のために示しており、この製品を推奨するものではない。

図 B.1—EGCG3"Me 標準液 (ブランク抽出液を含まない)

(削る)

(削る)

附属書 B
(参考)
典型的な HPLC クロマトグラム



凡例

X 保持時間 (min)

Y レスポンス (mAU)

1 EGCG3"Me

(新設)

図 B.1—EGCG3"Me 溶液

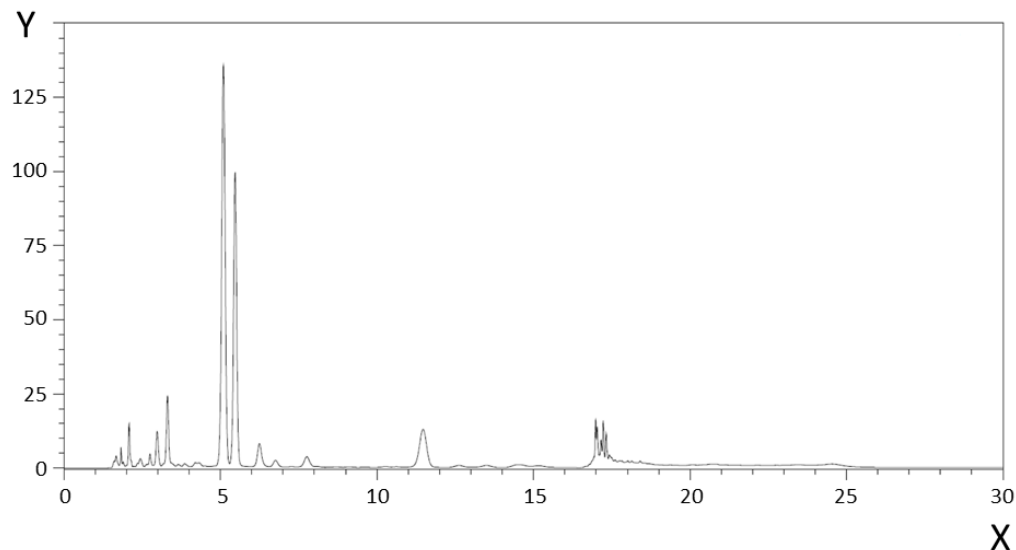
HPLC 条件

HPLC 条件は **7.3.1** によるほか、次による。

a) カラム : Wakopak® Navi C18-5¹⁾

b) 2 液グラジエント条件 : 表 2

1) Wakopak®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。



記号説明

X : 保持時間 (min)

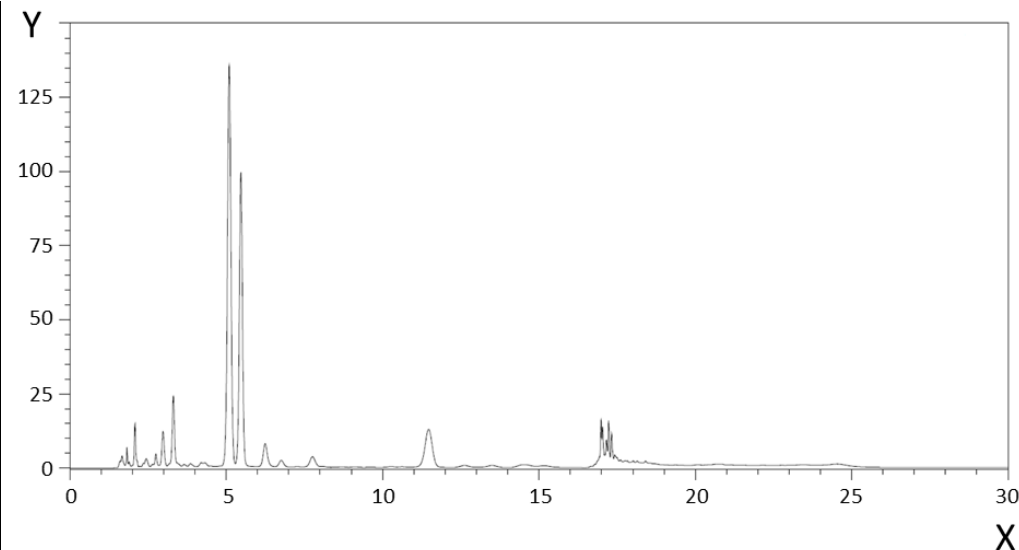
Y : レスポンス (mAU)

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

(削る)

(削る)



凡例

X 保持時間 (min)

Y レスポンス (mAU)

(新設)

図 B.2—やぶきた緑茶抽出液

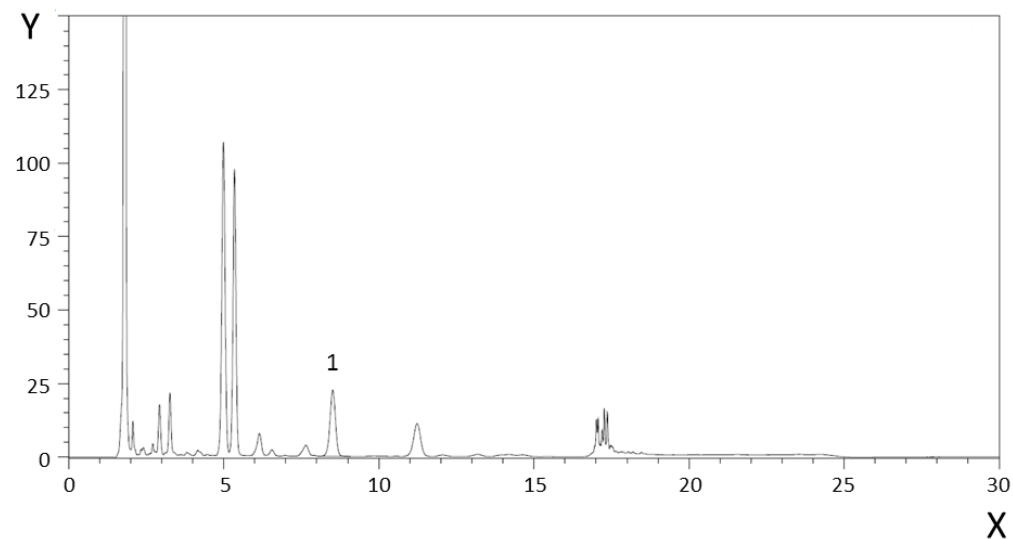
HPLC 条件

HPLC 条件は **7.3.1** によるほか、次による。

a) カラム : Wakopak® Navi C18-5²⁾

b) 2 液グラジエント条件 : **表 2**

2) Wakopak®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。



記号説明

X : 保持時間 (min)

Y : レスポンス (mAU)

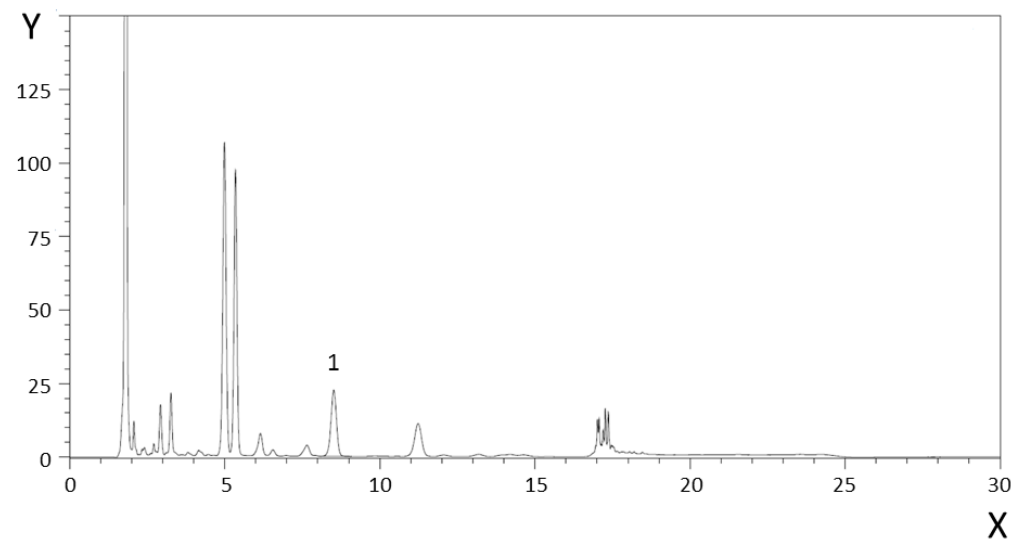
1 : EGCG3''Me

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

(削る)

(削る)



凡例

X 保持時間 (min)

Y レスポンス (mAU)

1 EGCG3''Me

(新設)

図 B.3—やぶきた緑茶抽出液を含む EGCG3''Me 標準液

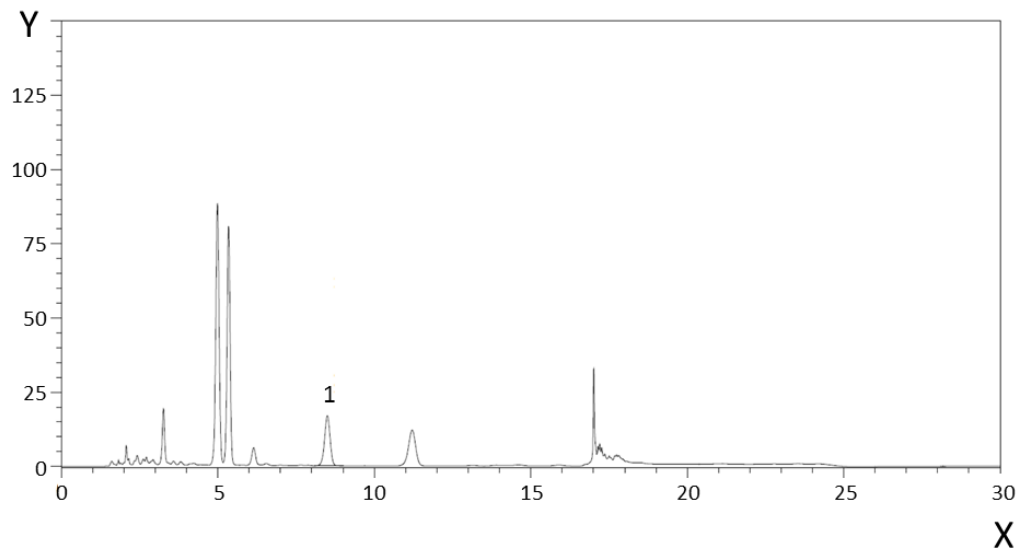
HPLC 条件

HPLC 条件は 7.3.1 によるほか、次による。

a) カラム : Wakopak® Navi C18-5³⁾

b) 2 液グラジエント条件 : 表 2

3) Wakopak®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。



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

(削る)

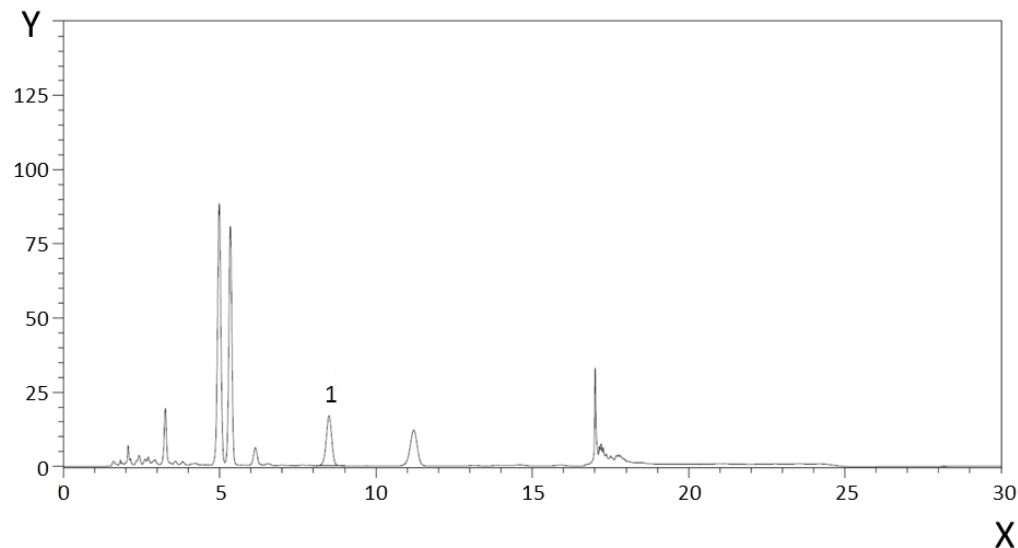
(削る)

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



凡例

X 保持時間 (min)

Y レスポンス (mAU)

1 EGCG3"Me

(新設)

図 B.4—べにふうき緑茶抽出物希釈液

HPLC 条件

HPLC 条件は 7.3.1 によるほか、次による。

a) カラム：Wakopak® Navi C18-5⁴⁾

b) 2 液グラジエント条件：表 2

4) Wakopak®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。

参考文献

- [1] ISO 5725（規格群） Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results

注記 対応日本産業規格：JIS Z 8402（規格群） 測定方法及び測定結果の精確さ（真度及び精度）
（IDT）

（新設）

<u>参考にした。</u> [2] <u>ISO 5725-1:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions</u> <u>注記 1</u> 対応日本産業規格：JIS Z8402-1:1999 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） <u>注記 2</u> 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, <i>Pure & Appl. Chem.</i>, 1995, 67(2), p. 331–343. [4] 法邑雄司ら，べ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，<i>日本食品科学工学会誌</i>, 2016, 63(7), p. 312–318. [5] Thompson, M., et al., The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, <i>Pure & Appl. Chem.</i>, 2006, 78(1), p. 145-196. <u>注記</u> 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。	（新設） （新設） （新設） [2] Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, <i>Pure & Appl. Chem.</i>, 1995, 67(2), p. 331–343 [3] 法邑雄司，稗島佑介，児玉貴志，田中真澄，堀江秀樹，鈴木忠直，安井明美，べ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，<i>日本食品科学工学会誌</i>, 2016, 63(7), p. 312–318. [4] 内藤成弘，塚越芳樹，データの統計的取り扱い，<i>食糧</i>, 2008, 46, p. 27-62. （新設）
--	--