

りんごジュース中のプロシアニジン類定量法の妥当性確認

山多 晴子¹、小林 寛子²、門倉 雅史³、庄司 俊彦⁴

YAMATA Seiko, KOBAYASHI Hiroko, KADOKURA Masashi, SHOJI Toshihiko

要約

りんごジュース中のプロシアニジン類の定量分析方法を日本農林規格（以下「JAS」という。）として制定するため、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構が特許権を有する「プロシアニジン類の分析方法及び分析システム（特許第 6508741 号）¹⁾」（以下「特許分析法」という。）を基礎とした分析方法の妥当性確認調査を行った。りんごストレートジュースを対象として、単一試験室での調査及び 11 試験室による室間共同試験を行った。共同試験の結果、プロシアニジン類の含有量が $8.5 \times 10 \text{ mg/kg} \sim 2.4 \times 10^2 \text{ mg/kg}$ の範囲で、併行相対標準偏差 RSD_r 及び室間再現相対標準偏差 RSD_R はそれぞれ 1.1%~2.6% 及び 9.9%~12.6%、 $HorRat(R)$ は 1.2~1.8 となり、本分析方法の室間再現性は妥当であると判断された。これらの精度は質量分率に基づき算出したが、飲料品においては体積当たりの含有量を表示することが多い。このことから、体積当たりの含有量に対する拡張不確かさ U ($k=2$) を推定した。その結果 U は、プロシアニジン類の測定含有量 ρ に対して $0.244\rho \text{ mg/L}$ と推定された。この分析方法は、農林水産省によって JAS 0024 として制定された。

1. はじめに

りんごは、国産果実で 3 番目の産出額を占め（令和 2 年）²⁾、その主産地は青森県や長野県である³⁾。結果樹面積及び出荷量が減少傾向である一方、消費者の需要は大きく変わらず、産出額は増加傾向にある²⁾。りんごジュースは、中国、香港、台湾等のアジア地域を中心に輸出が行われ、令和 3 年の年間輸出量は 2,945 トンと平成 28 年の 1,356 トンよりも約 2.2 倍増加しており⁴⁾、今後も輸出の増加が見込まれる。

りんごの生鮮品や加工食品に含まれるプロシアニジン類はポリフェノールの一種で、カテキン、エピカテキンの 2 量体以上の重合体の総称である。りんご由来プロシアニジン類は抗酸化作用やヒトの内臓脂肪を減らす等の機能性があるといわれている⁵⁾ ⁶⁾。この成分に対する事業者の関心は高く、りんご由来プロシアニジン類を関与成分とする機能性表示食品の届出は生鮮品及び加工食品（サプリメントを除く）において、令和 4 年 8 月現在 9 件あり、今後も増加が予想される。

このように機能性関与成分として関心が高まっているりんご由来プロシアニジン類は、信頼性の高い定量分析方法が求められていたが、これまで統一的な分析方法は定められてこなかった。また、従来的高速液体クロマトグラフ（以下「HPLC」という。）を用いた分析方法では、プロシアニジン類を重合度ごとに分離して定量するため、用意すべき標準品のコストや測定に時間を要するという課題もあった。今回、重合度の異なるプロシアニジン類をほぼ 1 つのピークとして

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部（現農林水産省）

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

⁴ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 食品健康機能研究領域

HPLC で検出、定量する迅速な分析方法を JAS とすることによって、試験者の負担を低減して取引の円滑化を図るとともに、輸出先国に対し、国産りんごの客観的な優位性を示す機会の拡大も目指した。

まず、手軽に摂取でき、かつ、前処理が簡便なりんごジュースを対象とした JAS の制定を目標とし、短時間で測定可能な特許分析法を基礎として手順書を作成し、妥当性確認調査を実施したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬及び器具

プロシアニジン類の標準品として、エピカテキンの 2 量体であるプロシアニジン B2（純度（HPLC） $\geq 97\%$ 、富士フイルム和光純薬）を用いた。L(+)-アスコルビン酸、アセトン、酢酸は、それぞれ JIS K 9502、JIS K 8034、JIS K 8355 に規定する特級を用いた。水は、JIS K 0557 に規定する A3 以上の品質を有するものを用いた。また、アセトニトリル及びメタノールは HPLC 用を用いた。

全量ピペット及び全量フラスコは、JIS R 3505 に規定するクラス A のものを用いた。また、試料抽出液のろ過には PTFE 製メンブランフィルター（孔径 0.45 μm 、ADVANTEC）を用いた。なお、添加回収試験の試料調製及び標準液の調製には JIS K 0970 に規定する可変容量形のピストン式ピペットを用いた。

2.2 添加回収試験

2.2.1 試料

市販のりんごストレートジュース（プロシアニジン類含有量約 100 mg/L）を測定試料とし、添加回収試験を実施した。

プロシアニジン B2 を L(+)-アスコルビン酸含有アセトン/水/酢酸混合液（アセトン、水及び酢酸を 70 : 29.5 : 0.5（体積比）で混合した溶媒 1 L 当りに L(+)-アスコルビン酸 0.5 g を溶解したもの。以下「標準希釈用混合液」という。）で希釈し、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したものを添加溶液とした。この添加溶液 2.5 mL と測定試料 11 mL とをよく混合したものを添加試料とした。対照試料として、標準希釈用混合液 2.5 mL と測定試料 11 mL とをよく混合したものを用意した。添加試料、対照試料ともに 6 点ずつを用いて以下の試験を行った。

2.2.2 抽出

2.2.1 の添加試料及び対照試料 2 mL を全量ピペットを用いてそれぞれ 10 mL 容全量フラスコにはかり取り、アセトン 7 mL を加えた。次いで L(+)-アスコルビン酸含有酢酸水溶液（水 1 L 当りに酢酸 50 mL 及び L(+)-アスコルビン酸 5 g を溶解したもの。）を標線まで加えて定容し、これを振り混ぜたものを試料抽出液とした。試料抽出液約 1.5 mL をろ過し、これを試料抽出物として HPLC による測定に供した。

2.2.3 HPLC による測定

2.2.3.1 標準液の調製

プロシアニジン B2 を標準希釈用混合液で溶解して 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を調製した。標準原液をさらに標準希釈用混合液で希釈し、3 濃度（10、30 及び 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の検量線用標準液を調製

した。

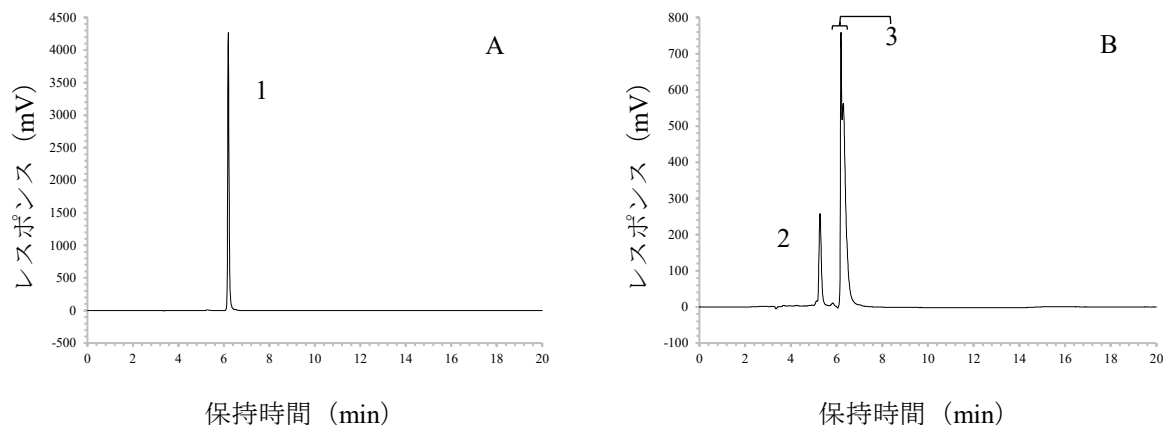
2.2.3.2 測定

試料抽出物中のプロシアニジン類の測定には、HPLC (LC-20AD、島津製作所) を用いた。HPLC の測定条件は表 1 のとおり。なお、カラムは特許分析法の推奨固定相 (ジオール相) が充填された Inertsil® WP300 Diol (GL サイエンス) を使用した。

この測定条件で得られた標準原液及び試料抽出物のクロマトグラムを図 1 に示す。各標準液のプロシアニジン B2 の濃度に対してピーク面積を一次回帰して検量線を作成した。作成した検量線は、その直線性を目視によって確認するとともに、相関係数が 0.995 以上であることを確認し、試料抽出物中のプロシアニジン類の濃度算出に用いた。このとき、濃度算出の対象は、特許分析法と同様に、試料抽出物のクロマトグラムに出現するピークのうち、標準液のクロマトグラムに出現するプロシアニジン B2 由来のピークの保持時間と一致したピーク及び連続して現れる一連のピークを合わせたものとした。これらの一連のピーク面積と検量線から分析種であるプロシアニジン類の濃度を計算した。

表 1 HPLC 測定条件

移動相	移動相 A : アセトニトリル/酢酸混合液 (98 : 2、体積比) 移動相 B : メタノール/水/酢酸混合液 (95 : 3 : 2、体積比)		
移動相の流量	1.0 mL/min		
カラム	Inertsil® WP300 Diol (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 µm)		
カラムの設定温度	35 °C		
励起波長	230 nm		
蛍光波長	321 nm		
注入量	5 µL		
サンプルクーラー温度	4 °C		
ミキサー容量	0.5 mL		
	時間 (分)	移動相 A (体積比率%)	移動相 B (体積比率%)
グラジエント条件	0~1.5	93	7
	1.5~10	2	98
	10~20	93	7



- 1 : プロシアニジン B2
- 2 : カテキン又はエピカテキン
- 3 : プロシアニジン類

図1 標準原液 (A) 及び試料抽出物 (B) のクロマトグラム

2.2.4 回収率の計算

式1によって添加試料又は対照試料中の体積当たりのプロシアニジン類の含有量 ρ を計算し、それぞれ6点併行試験の平均値を算出した。その後、式2によって回収率 R_m を計算した。

$$\rho = \frac{\rho_s \times V}{V_s} \dots \dots \dots \text{(式1)}$$

- ここで、
- ρ : 添加試料又は対照試料のプロシアニジン類含有量 (mg/L)
 - ρ_s : 試料抽出物中のプロシアニジン類の濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 - V_s : 試験用試料採取量 (mL)、この試験では2
 - V : 抽出時の定容量 (mL)、この試験では10

$$R_m (\%) = \frac{\rho_f - \rho_u}{\rho_A} \times 100 \dots \dots \dots \text{(式2)}$$

- ここで、
- ρ_f : 添加試料のプロシアニジン類含有量平均値 (mg/L)
 - ρ_u : 対照試料のプロシアニジン類含有量平均値 (mg/L)
 - ρ_A : 添加含有量 (mg/L)、この試験では $400 \times 2.5 / (11 + 2.5)$

2.3 室間共同試験

2.3.1 試料

りんご由来プロシアニジン類は1日当たり110 mg以上を継続的に摂取したとき、内臓脂肪の低減効果があるとされている⁹⁾。この目安量の相当量～半分程度をジュースで摂取する場合を想定し、今回の室間共同試験で用いる試料の含有量を150 mg/L～250 mg/L程度と設定した。収集した市販のりんごストレートジュースのうち、酸化防止剤を使用した製品及び酸化防止剤不使用の製品から5種類の共同試験用試料(試料A～試料E)を次のように調製した。

プロシアニジン類は酸化による減少のおそれがあるため、ジュースを窒素雰囲気下でかき混ぜながら約3 mLずつ小分けし、密封した。各試験用試料の均質性の判定はIUPAC技能試験ハーモ

ナイズドプロトコル⁷⁾に基づき行い、いずれの試料も基準を満たし均質であることを確認した。共同試験用試料は1種類につき非明示2反復の計10試料を冷凍の宅配便で参加11試験室に配付した。調製した共同試験用試料を表2に示す。なお、今回の室間共同試験では、室間再現精度の評価に HorRat 値⁸⁾を採用することとし、含有量を質量分率として算出している。

表2 共同試験用試料

試料	酸化防止剤の 使用の表示	プロシアニジン類含有量* (mg/kg)
A	表示なし	93
B	表示なし	115
C	表示あり (ビタミンC)	141
D	表示あり (ビタミンC)	171
E	表示あり (ビタミンC)	226

*均質性確認において測定した含有量

2.3.2 抽出

参加試験室は、2.2.2と同様に共同試験用試料2mLを10mL容全量フラスコにはかり取った。このとき、試験用試料の採取質量を記録した。その後、2.2.2と同様に試料抽出物を調製した。試料抽出物は調製当日にHPLC測定に供された。

2.3.3 HPLCによる測定

2.3.3.1 標準液の調製

共同試験主催者において2.2.3.1と同様に100 μ g/mLの標準原液を調製し、冷凍の宅配便で参加試験室に配付した。参加試験室は、HPLC測定実施日に標準原液を標準希釈用混合液で5濃度(10、20、40、60及び80 μ g/mL)に希釈調製し、標準原液と併せて6濃度の検量線用標準液を用意した。

2.3.3.2 測定

HPLCの測定条件例は表1のとおり。なお、ミキサー容量の設定は、各試験室で所有するHPLCの仕様に従った。また、蛍光強度は、測定環境の温度の影響を受けることから、検出器に温度調節機能を有する場合は40 $^{\circ}$ Cに設定し、その他の場合は、空調等の利用によって検出器周辺の室温変化が5 $^{\circ}$ C以内になるように条件を指定した。各試験室の所有HPLCを表3に示す。加えて、測定値の受入条件として、一連の測定の開始、中間及び終了時に40 μ g/mLの検量線用標準液を測定し、中間及び終了時のプロシアニジンB2のピーク面積が、開始時のそれと比較して $\pm 10\%$ 以内であることを求めた。

参加試験室は、2.2.3.2と同様に検量線を作成、確認して試料抽出物中のプロシアニジン類の濃度を算出した。なお、室間再現精度の評価に HorRat 値を利用するため、2.3.2で記録した試験用試料の採取質量を用い、プロシアニジン類含有量を質量分率(mg/kg)で求めた。

表 3 共同試験参加試験室の所有 HPLC

試験室	送液部			検出器	
	メーカー	型式等	ミキサー容量	型式等	温調の有無
1	島津製作所	LC-20AT	0.5 mL	RF-20Axs	有
2	島津製作所	LC-20AD	0.5 mL	RF-20Axs	有
3	島津製作所	LC-20AD	0.5 mL	RF-20Axs	有
4	島津製作所	LC-20AD	0.5 mL	RF-20Axs	有
5	島津製作所	LC-20AT	0.5 mL	RF-20Axs	有
6	島津製作所	LC-20AD	0.5 mL	RF-20A	無
7	島津製作所	LC-20AD	0.5 mL	RF-20Axs	有
8	Waters	e2695	-	2475 FLR Detector	無
9	Waters	e2695	-	2475 FLR Detector	無
10	島津製作所	LC-20AD	0.5mL	RF-20A	無
11	島津製作所	LC-40D	0.5mL	RF-20Axs	有

3. 結果及び考察

3.1 添加回収試験

対照試料及び添加試料のプロシアニジン類含有量を表 4 に示す。併行相対標準偏差 RSD_r は、それぞれ 1.3 %、2.6 %、回収率 R_m は 88 %となり、AOAC のガイドライン⁹⁾で示された許容範囲内となった。

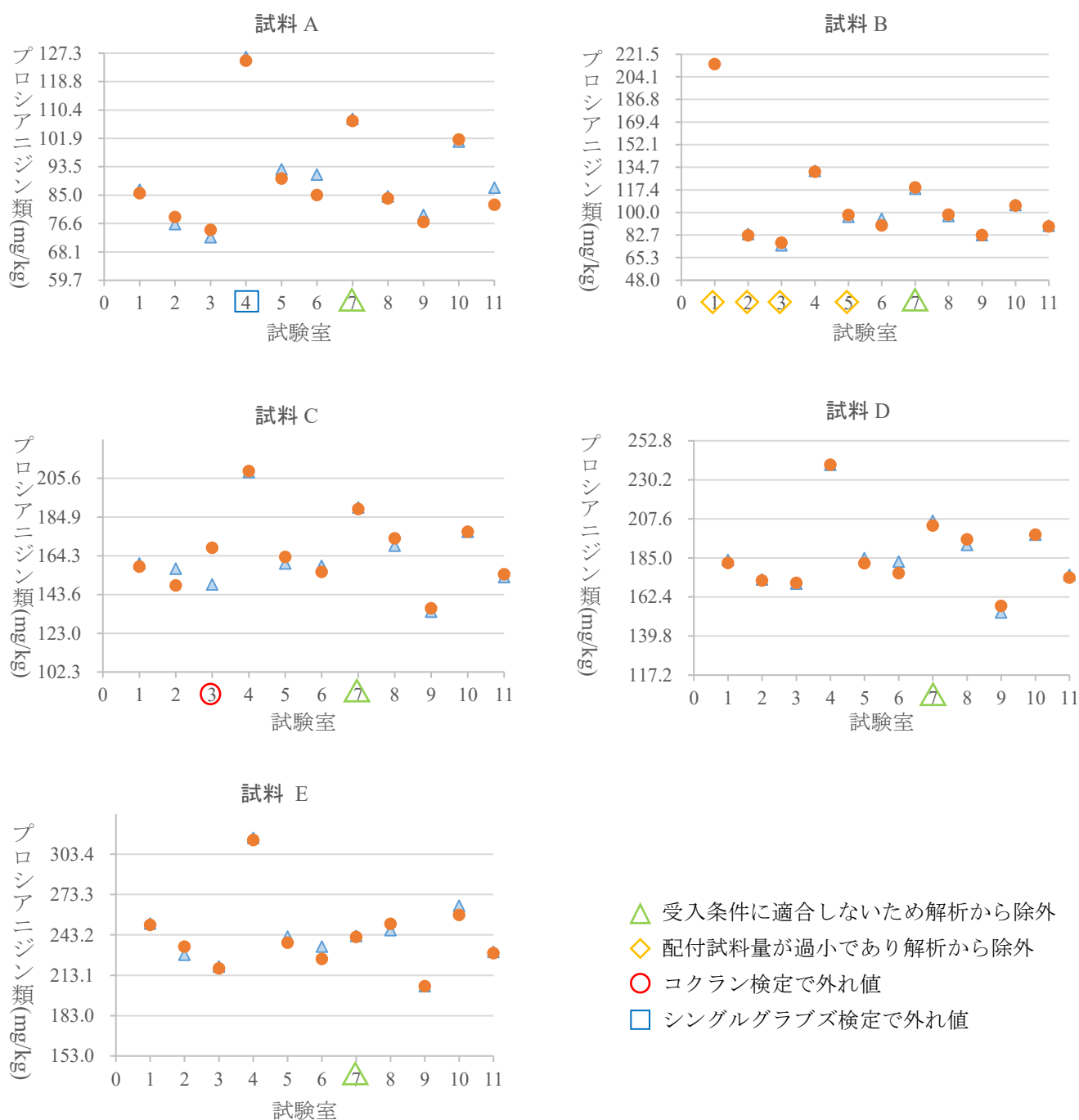
表 4 添加回収試験結果 (mg/L)

	対照試料	添加試料
1	83.4	152.5
2	84.5	147.1
3	82.7	149.7
4	81.1	152.2
5	83.1	142.6
6	82.6	146.0
平均	82.9	148.3
$RSD_r(\%)$	1.3	2.6
$R_m(\%)$	88	

3.2 室間共同試験

3.2.1 試験データの解析

参加 11 試験室のうち試験室 7 は、測定の実入条件（測定中の標準液のピーク面積の変動が $\pm 10\%$ 以内）から外れたため、解析から除外した。また、試料 B では手順書で定めた採取量 2 mL に満たない配付試料が認められ、一部の参加試験室で試験用試料の採取に手順の変更を要した。この手順変更の影響を排除するため、配付試料量が過小であった 4 試験室分のデータを解析から除外した。



各図中の縦軸目盛りの間隔は、表 5 の室間再現標準偏差 S_R を利用

図 2 共同試験データプロット (非明示・2 反復試験)

試料 B の各試験室の報告データは、除外により 6 試験室分となり、解析に必要な試験室数 (8 試験室) を満たさなかったため、その解析結果は参考データとして扱うこととした。

試料 B を除く 4 試料のデータについて、IUPAC 共同試験プロトコル¹⁰⁾に規定されている外れ値検定を行った。試料 A において 1 試験室がシングルグラブズ検定で外れ値となった。試料 C において 1 試験室がコ克蘭検定で外れ値となった。これらの外れ値を除いた残りのデータについて統計処理を行った。共同試験用試料毎に各試験室の報告データをプロットしたものを図 2 に示

す。

共同試験データから求めた精度指標を表5に示す。試料Bを除いたプロシアニジン類含有量の平均値は $8.5 \times 10 \text{ mg/kg} \sim 2.4 \times 10^2 \text{ mg/kg}$ 、併行相対標準偏差 RSD_r は 1.1%~2.6%、室間再現相対標準偏差 RSD_R は 9.9%~12.6%であった。また、Horwitz式⁸⁾から予測される室間再現相対標準偏差 Predicted- RSD_R は 7.0%~8.2%、HorRat(R)は、1.2~1.8であった。室間再現精度は、コーデックスガイドライン (CAC/GL 72-2009)⁸⁾で示された正常な範囲内 ($0.5 < \text{HorRat(R)} \leq 2.0$) であることから妥当と判断した。

表5 共同試験結果 (質量当たり含有量)

試料	有効試験室数 ^a (外れ試験室)	平均値 (mg/kg)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)	Horwitz-Predicted RSD_R (%) ^b	HorRat value ^c
A	9 (1)	85.0	2.2	8.5	2.6	9.9	8.2	1.2
(A ^d)	10 (0)	89.1	2.1	15.1	2.3	17.0	8.1	2.1)
(B)	6 (0)	100.0	1.5	17.3	1.5	17.3	8.0	2.2)
C	9 (1)	164.3	2.7	20.6	1.6	12.6	7.4	1.7
(C ^d)	10 (0)	163.7	5.0	19.8	3.1	12.1	7.4	1.6)
D	10 (0)	185.0	2.0	22.6	1.1	12.2	7.3	1.7
E	10 (0)	243.2	3.3	30.1	1.3	12.4	7.0	1.8

S_r : 併行標準偏差、 S_R : 室間再現標準偏差、 RSD_r : 併行相対標準偏差、 RSD_R : 室間再現相対標準偏差

a 外れ値検定をする前の試験室数から外れ試験室を除いた数。なお、試料Bは解析に必要な試験室数(8試験室)が確保できなかったため参考データとして掲載。

b Horwitz-Predicted RSD_R (%) = $2 \times (\text{平均値} / 10^6)^{0.1505}$

c $RSD_R / \text{Predicted } RSD_R$

d 外れ試験室を除かないで統計処理を行った場合の参考データとして掲載。

3.2.2 不確かさの算出

3.2.2.1 試験用試料の採取方法による変動

ジュース中のプロシアニジン類含有量は、体積当たりの含有量 (mg/L) で示される場合が多く、操作の簡便性から試験用試料の採取量を体積計で測定することが一般的である。このことから、試料Bを除く4試料で体積当たりのプロシアニジン類含有量 ρ を、2.3.2で採取した試験用試料の採取容量 (2mL) を用い、改めて計算してそのデータから室間再現標準偏差 S_R' を解析した (表6)。ここで、試験用試料の採取に体積計を用いる場合に増加する標準不確かさ $S_{R(v)}$ を式3により求めた。

$$S_{R(v)}' = \sqrt{S_R'^2 - S_R^2} \dots \dots \dots \text{(式3)}$$

いずれの試料においても、 $S_{R(v)}$ は S_R' の 1/3 未満であった (表6)。このことから、試験用試料の採取方法として体積計を用いることによる不確かさ全体への寄与は 5% 以下であり十分に小さく¹¹⁾、体積計を用いることに問題はないと考えた。このため、本項以降に実施した室間再現精度の含有量に対する従属性の確認及び不確かさの算出には、体積当たりのプロシアニジン類含有量 ρ 及びその室間再現標準偏差 S_R' を利用した。

本分析方法は農林水産省に JAS 制定の申出が行われ、日本農林規格調査会の議決を経て、令和4年3月に JAS 0024 として制定された。

謝辞

本研究を実施するにあたり、室間共同試験に参加いただいた関係者各位に感謝の意を表します。

文献

- 1) 庄司俊彦, 升本早枝子: プロシアニジン類の分析方法及び分析システム, 特許第6508741号
- 2) 農林水産省, 果樹をめぐる情勢 (令和4年8月)
- 3) 農林水産省, 作物統計調査 令和3年産りんごの結果樹面積、収穫量及び出荷量 (令和4年5月)
- 4) 財務省, 貿易統計
- 5) 庄司俊彦: リンゴポリフェノールの健康機能性とその活用, 日本食品科学工学会誌, 63(1), 57-61 (2016)
- 6) Akazome, Y.; Kametani, N.; Kanda, T.; Shimasaki, H.; Kobayashi, S.: Evaluation of safety of excessive intake and efficacy of long-term intake of beverages containing apple polyphenols. *J. Oleo Sci.*, 59(6), 321-338(2010)
- 7) Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R.: The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Appl. Chem.*, 78(1), 145-196 (2006)
- 8) Codex Alimentarius Commission: Guidelines on analytical terminology (CAC/GL 72-2009).
- 9) AOAC Int.: Guidelines for dietary supplements and botanicals (Appendix K). In “Official Methods of Analysis of AOAC Int.”, 21st ed (2019)
- 10) Horwitz, W.: Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure Appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995)
- 11) Eurachem: Quantifying uncertainty in analytical measurement (Eurachem Guides), 3rd ed (2012)
- 12) 日本産業規格, 測定方法及び測定結果の正確さ (真度及び精度) - 第2部: 標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的方法 (JIS Z 8402-2 : 1999)