JAS 0023

日本農林規格
JAPANESE AGRICULTURAL STANDARD

魚類の鮮度（K 値）試験方法
― 高速液体クロマトグラフ法

Testing method of K-value as a freshness index for fish

― High performance liquid chromatographic method

2022 年　3 月　31 日　制定

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　原理 ……2
5　試薬 ……2
6　装置及び器具 ……5
7　試験用試料の調製 ……7
8　手順 ……7
8.1　一般事項 ……7
8.2　抽出 ……7
8.3　pH 調整 ……7
8.4　たんぱく質の除去 ……8
8.5　試料溶液の調製 ……8
8.6　測定 ……8
9　計算 ……9
9.1　一般事項 ……9
9.2　K 値の算出 ……9
9.3　結果の表現 ……9
10　精度 ……10
10.1　試験室間共同実験 ……10
10.2　併行精度 ……10
10.3　室間再現精度 ……10
11　品質管理 ……10
12　試験報告書 ……10
附属書 A（参考）試験室間共同実験の結果 ……11
附属書 B（参考）分光光度計によるイノシン濃度測定時の **pH** について ……12
附属書 C（参考）典型的な **HPLC** クロマトグラム ……13
参考文献 ……15

まえがき

この規格は，日本農林規格等に関する法律第4条第1項の規定に基づき，公益財団法人函館地域産業振興財団から，日本農林規格原案を添えて日本農林規格を制定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，農林水産大臣が制定した日本農林規格である。

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関わる確認について，責任はもたない。

日本農林規格

JAS
0023：2022

魚類の鮮度（K 値）試験方法
― 高速液体クロマトグラフ法

Testing method of K-value as a freshness index for fish
— 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，生鮮魚類（硬骨魚類に限定し，かつ，解凍したものを除く。）中の ATP 関連物質の含有量を高速液体クロマトグラフ法によって測定し，その含有量から鮮度指標である K 値を算出するための試験方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。

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 0557　用水・排水の試験に用いる水
JIS K 8223　過塩素酸（試薬）
JIS K 9005　りん酸（試薬）
JIS K 9009　りん酸二水素ナトリウム二水和物（試薬）
JIS K 9020　りん酸水素二ナトリウム（試薬）
JIS Z 8802　pH 測定方法
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 8655-2，Piston-operated volumetric apparatus — Part2:Piston pipettes
　注記 3　対応日本産業規格：**JIS K 0970**　ピストン式ピペット（MOD）

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。

3.1
ATP 関連物質
アデノシン 5'-三りん酸（ATP），アデノシン 5'-二りん酸（ADP），アデノシン 5'-一りん酸（AMP），イノシン 5'-一り

ん酸（IMP），イノシン（HxR）及びヒポキサンチン（Hx）の各物質

3.2
K 値
試験用試料中の ATP 関連物質の含有量の総和に対し，HxR 及び Hx の含有量の和の比率を百分率で表した値[1]
注釈 1　9.2.3 の式(3)参照。

4　原理

試験用試料に過塩素酸希釈液を加え，ATP 関連物質を分解する内因性酵素を失活させるとともに ATP 関連物質を抽出する。紫外可視吸光光度検出器付き高速液体クロマトグラフ（以下，HPLC という。）を用いて試料溶液中の ATP 関連物質の含有量を測定する。その含有量から K 値を算出する[1]，[2]。

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　過塩素酸

JIS K 8223 に規定する特級又は同等以上の品質のもので，過塩素酸の質量分率が 60 %のもの。

5.3　りん酸

HPLC 用のもの若しくは **JIS K 9005** に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.4　りん酸二水素ナトリウム二水和物

JIS K 9009 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.5　りん酸水素二ナトリウム

JIS K 9020 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.6　ATP 関連物質の標準物質

表 1 に示す ATP 関連物質ごとに規定した標準物質のうち，HPLC によって不純物（他の ATP 関連物質を含む。）を分離することで純度が確認されているもの。純度の確認は標準物質の供給者によるほか，この規格の利用者が行ってもよい。

表 1－ATP 関連物質の標準物質

ATP 関連物質	標準物質	CAS 番号	純度
ATP	アデノシン 5'-三りん酸二ナトリウム塩水和物	34369-07-8	98 %以上
ADP	アデノシン 5'-二りん酸一カリウム塩二水和物	72696-48-1	95 %以上
AMP	アデノシン 5'-一りん酸ナトリウム塩水和物	149022-20-8	98 %以上
IMP	イノシン 5'-一りん酸二ナトリウム塩水和物	352195-40-5	98 %以上
HxR	イノシン	58-63-9	98 %以上
Hx	ヒポキサンチン	68-94-0	98 %以上

注記　附属書 A に示す試験室間共同実験においては，式量 551.1（結晶水を含まない塩として）のアデノシン 5'-三りん酸二ナトリウム塩水和物，式量 501.3 のアデノシン 5'-二りん酸一カリウム塩二水和物，式量 347.2（結晶水を含まない遊離酸として）のアデノシン 5'-一りん酸ナトリウム塩水和物，式量 392.2（結晶水を含まない塩として）のイノシン 5'-一りん酸二ナトリウム塩水和物，式量 268.2 のイノシン及び式量 136.1 のヒポキサンチンを使用した。

5.7　過塩素酸希釈液

水 440 mL に過塩素酸 40.0 g を加えて混合する。

5.8　水酸化ナトリウム溶液

水中に水酸化ナトリウムを 1 mol/L～5 mol/L 程度の濃度で含む溶液を調製する。同濃度の市販の水酸化ナトリウム溶液を使用してもよい。

5.9　希塩酸

水中に塩酸を 1 mol/L 程度の濃度で含む溶液を調製する。同濃度の市販の希塩酸を使用してもよい。

5.10　りん酸緩衝液

5.10.1　0.25 mol/L りん酸緩衝液（pH7.0）

水中にりん酸水素二ナトリウムを 0.25 mol/L の濃度で含む溶液を調製し，0.25 mol/L りん酸水素二ナトリウム溶液とする。水中にりん酸二水素ナトリウム二水和物を 0.25 mol/L の濃度で含む溶液を調製し，0.25 mol/L りん酸二水素ナトリウム溶液とする。0.25 mol/L りん酸水素二ナトリウム溶液に 0.25 mol/L りん酸二水素ナトリウム溶液を pH7.0 となるまで加える。

注記　6.1.2 a)に規定する基材にシリカゲルを使用したカラムを利用する場合に用いる。

5.10.2　0.05 mol/L りん酸緩衝液（pH7.0）

水中にりん酸水素二ナトリウムを 0.05 mol/L の濃度で含む溶液を調製し，0.05 mol/L りん酸水素二ナトリウム溶液とする。水中にりん酸二水素ナトリウム二水和物を 0.05 mol/L の濃度で含む溶液を調製し，0.05 mol/L りん酸二水素ナトリウム溶液とする。0.05 mol/L りん酸水素二ナトリウム溶液に 0.05 mol/L りん酸二水素ナトリウム溶液を pH7.0 となるまで加える。

5.10.3　1 mol/L りん酸緩衝液（pH2.9）

水中にりん酸二水素ナトリウム二水和物を 1 mol/L の濃度で含む溶液を調製し，1 mol/L りん酸二水素ナトリウム溶液とする。水中にりん酸を 1 mol/L の濃度で含む溶液を調製し，1 mol/L りん酸溶液とする。1 mol/L りん酸二水素ナト

リウム溶液に 1 mol/L りん酸溶液を pH2.9 となるまで加える。

注記　6.1.2 b)に規定する基材にポリマーを使用したカラムを利用する場合に用いる。

5.10.4　0.2 mol/L りん酸緩衝液（pH2.9）

水中にりん酸二水素ナトリウム二水和物を 0.2 mol/L の濃度で含む溶液を調製し，0.2 mol/L りん酸二水素ナトリウム溶液とする。水中にりん酸を 0.2 mol/L の濃度で含む溶液を調製し，0.2 mol/L りん酸溶液とする。0.2 mol/L りん酸二水素ナトリウム溶液に 0.2 mol/L りん酸溶液を pH2.9 となるまで加える。

注記　6.1.2 b)に規定する基材にポリマーを使用したカラムを利用する場合に用いる。

5.11　ATP 関連物質の標準原液

水中に **5.6** に規定する ATP 関連物質の標準物質を約 5 mmol/L の濃度で含む溶液をそれぞれ調製し，ATP 標準原液，ADP 標準原液，AMP 標準原液，IMP 標準原液，HxR 標準原液及び Hx 標準原液とする。ただし，Hx 標準原液にあっては，ヒポキサンチンを 70 ℃程度に加温した水に溶解し，放冷して調製してもよい。

注記　この細分箇条で示した濃度において，ヒポキサンチンは冷水に溶けにくいことが確認されている。

5.12　標準液

5.12.1　濃度測定用溶液

全量ピペット又はピストン式ピペット及び全量フラスコを用いて，ATP 関連物質の標準原液ごとに 0.05 mol/L りん酸緩衝液（pH7.0）（**5.10.2** 参照）で 100 倍に希釈し，それぞれ ATP 濃度測定用溶液，ADP 濃度測定用溶液，AMP 濃度測定用溶液，IMP 濃度測定用溶液，HxR 濃度測定用溶液及び Hx 濃度測定用溶液とする。

注記　附属書 A に示す試験室間共同実験においては，標準原液 1 mL を全量ピペットではかりとり，100 mL の全量フラスコに移して，0.05 mol/L りん酸緩衝液（pH7.0）で定容した。

装置の説明書等に従って，分光光度計（**6.2** 参照）の条件設定及び操作を行う。0.05 mol/L りん酸緩衝液（pH7.0）を対照液として，濃度測定用溶液の吸光度を**表 2** に示す波長で測定する。次の式によって各標準原液中の ATP 関連物質 X の濃度 $c_{X,std}$ を求める。

$$c_{X,std}=\frac{A(\lambda_X)}{\varepsilon_X \times l}\times 10^6 \times \frac{V_1}{V_2} \quad \cdots\cdots\cdots\

表 2－ATP 関連物質の測定波長及びモル吸光係数[3]

ATP 関連物質	測定波長（nm）	モル吸光係数（$mol^{-1}\ L\ cm^{-1}$）
ATP	259	15400
ADP	259	15400
AMP	259	15400
IMP	249	12700
HxR	249	12300
Hx	250	10700
注記　pH7.0 における HxR のモル吸光係数に関する検討結果を**附属書 B** に示す。		

5.12.2　一連の検量線用標準液

全量ピペット又はピストン式ピペットを用いて，ATP 標準原液，ADP 標準原液，AMP 標準原液，IMP 標準原液，HxR 標準原液及び Hx 標準原液を同一の全量フラスコにはかりとり，水で希釈して検量線用混合原液とする。**6.1.2** に規定するカラムの種類に応じて，次のいずれかの方法で，検量線用混合原液から 4 段階以上の濃度の一連の検量線用標準液を調製する。

a)　基材にシリカゲルを使用したカラムを用いる場合　全量ピペット又はピストン式ピペットを用いて，検量線用混合原液を水で希釈する。この希釈液と 0.25 mol/L りん酸緩衝液（pH7.0）（**5.10.1** 参照）とを，4 : 1（体積比）で混合し，検量線用標準液とする。

b)　基材にポリマーを使用したカラムを用いる場合　全量ピペット又はピストン式ピペットを用いて，検量線用混合原液を水で希釈する。この希釈液と 1 mol/L りん酸緩衝液（pH2.9）（**5.10.3** 参照）とを，4 : 1（体積比）で混合し，検量線用標準液とする。

注記 1　**附属書 A** に示す試験室間共同実験においては，約 0.8 μmol/L，約 3.2 μmol/L，約 8 μmol/L，約 32 μmol/L，約 160 μmol/L，約 320 μmol/L 及び約 480 μmol/L の検量線用標準液をそれぞれ 1.25 mL 調製した。

注記 2　10 ℃で保存された検量線用標準液は，少なくとも 7 日間安定した状態を保つことが確認されている。

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　HPLC 装置

6.1.1　HPLC

JIS K 0124 に規定する送液ポンプ，温度制御機能をもつカラム槽（カラムオーブン），260 nm における吸光度を測定できる紫外可視吸光光度検出器及びデータ処理装置を備えているもの。移動相送液部に脱気装置を備え，かつ，試料導入装置に冷却機能を備えているものが望ましい。

6.1.2　カラム

一連の検量線用標準液の最低濃度を **8.6** に従い測定した場合，ATP 関連物質のピークが 60 分以内に出現し，かつ，**JIS K 0124** に規定する分離度が 1.5 以上であるものとし，基材にシリカゲル又はポリマーを使用しているもの。保護カラムを使用する場合は，測定に用いるカラムと同じ充填剤を充填したものを使用する。**a)**及び **b)**に示す仕様のものが利用可能である。

a)　基材にシリカゲルを使用したカラム

－　充填剤：アダマンチル基を導入したシリカゲル

－　クロマトグラフィー管の材質：ステンレス

- 長さ：250 mm
- 内径：4.6 mm
- 粒子径：5 μm

注記 オクタデシル基を導入したシリカゲルカラムには，試料溶液を測定した場合に HxR，Hx のピークときょう雑ピークが重なり，K 値が実際よりも高く算出されるものが確認されている。

b) 基材にポリマーを使用したカラム

- 充填剤：ポアサイズ 40 nm のポリビニルアルコール基材のゲル
- クロマトグラフィー管の材質：ステンレス
- 長さ：300 mm
- 内径：7.5 mm
- 粒子径：6 μm

6.2 分光光度計

JIS K 0115 に規定するもので，光路長が 1 cm の吸収セルを固定できる吸収セルホルダーを備え，測定波長 249 nm，250 nm 及び 259 nm における吸光度を測定できるもの。

6.3 吸収セル

石英製で，光路長が 1 cm のもの。

6.4 全量フラスコ

ISO 1042 に規定するクラス A のもの，又はそれと同等以上の精度を持つもので，調製する溶液の量に応じた容量のもの。

6.5 全量ピペット

ISO 648 に規定するクラス A のもの，又はそれと同等以上の精度を持つもの。

6.6 ピストン式ピペット

ISO 8655-2 に規定するもので，標準溶液の希釈の操作等に適したもの。

6.7 抽出用容器

抽出（**8.2** 参照）の操作に用いることができるもので，用いる溶液に対する耐性のあるもの。

6.8 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，孔径が 0.45 μm 以下のもの。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。シリンジを取り付けて使用できるもの。

6.9 電子天びん

10 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。

6.10 ホモジナイザー

抽出（**8.2** 参照）操作で試験用試料及び試薬をかき混ぜ，懸濁させることができるもの。

6.11 pH 計

JIS Z 8802 に規定するもの。

6.12 pH 試験紙

pH2.5～pH3.5 を識別できるもの。

7 試験用試料の調製

頭，骨，内臓，表皮，ひれなどが認められる場合は，それらを除き，体側筋を得る。さらに血合い肉を除き，普通肉を採取して，フードプロセッサー等で破砕したものを試験用試料とし，直ちに **8.1** の操作を行う。凍結された試料は，半解凍又は解凍して直ちにこの箇条の操作を行う。

8 手順

8.1 一般事項

ATP 関連物質の分解を避けるため，**8.4** の操作を行うまで，実験操作時以外は試料及び抽出液は氷冷し，低温状態が保たれるようにする。

8.2 抽出

試験用試料（**箇条 7** 参照）約 2.0 g を 10 mg の桁まで抽出用容器にはかりとり，あらかじめ氷冷した過塩素酸希釈液を加える。ホモジナイザーを用いてかき混ぜ，過塩素酸希釈液中に懸濁させる。ホモジナイザーに懸濁液の付着が見られる場合には，あらかじめ氷冷した過塩素酸希釈液で洗い流し，両液を混合して懸濁抽出液とする。利用する過塩素酸希釈液は合計で約 30 mL とする。

注記 **附属書 A** に示す試験室間共同実験においては，試料の入った 50 mL 容量のポリプロピレン製チューブにあらかじめ氷冷した過塩素酸希釈液 20 mL を加え，ローターステーター式ホモジナイザーで回転数 10 000 min^{-1} で 30 秒間かき混ぜた。続いてホモジナイザーシャフトをあらかじめ氷冷した過塩素酸希釈液 10 mL で洗浄し，両液を混合して懸濁抽出液とした。

8.3 pH 調整[4]

8.3.1 懸濁抽出液（**8.2** 参照）に水酸化ナトリウム溶液を加えて混合し，pH を 2.5～3.5 となるように調整する。pH は，pH 計又は pH 試験紙で確認する。pH が 3.5 以上となった場合には，希塩酸を加え，pH を調整する。

注記 **附属書 A** に示す試験室間共同実験においては，懸濁抽出液に 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 2.7 mL を加えてガラス棒で混合した。この液の少量を取り出し，pH 試験紙にて pH を測定した。pH が 2.5 以下の場合には 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100 μL を加え，混合した後に再度，pH を測定し，pH が 2.5～3.5 となるまでこの操作を繰り返した。pH が 3.5 以上となった場合には，希塩酸 100 μL を加えて pH を測定し，pH が 2.5～3.5 となるまでこの操作を繰り返した。

8.3.2 pH を確認した懸濁抽出液（**8.3.1** 参照）の全量を水を用いて全量フラスコに移す。水で定容し，振り混ぜる。

注記 **附属書 A** に示す試験室間共同実験においては，50 mL の全量フラスコを使用した。

8.3.3　全量フラスコの内容物（**8.3.2** 参照）の全量又は一部を採取して 30 分以上氷冷する。これを pH 調整抽出液とする。

8.4　たんぱく質の除去

pH 調整抽出液（**8.3.3** 参照）の上澄み液の一部を採取し，メンブランフィルターでろ過してろ液を得る。

8.5　試料溶液の調製

全量ピペット又はピストン式ピペットを用いて，ろ液（**8.4** 参照）とりん酸緩衝液とを，4：1（体積比）で混合し，これを試料溶液とする。りん酸緩衝液は，以下のいずれかを用いる。

a)　基材にシリカゲルを使用したカラムを用いる場合　0.25 mol/L りん酸緩衝液（pH7.0）（**5.10.1** 参照）

b)　基材にポリマーを使用したカラムを用いる場合　1 mol/L りん酸緩衝液（pH2.9）（**5.10.3** 参照）

注記　10 ℃で保存された試料溶液は，少なくとも 3 日間安定した状態を保つことが確認されている。

8.6　測定

8.6.1　HPLC 装置の測定条件の設定

装置の取扱説明書に従って，HPLC 装置の条件を次のいずれかに設定する。

注記 1　移動相に多量のカリウムイオンが含まれていると，試料溶液に含まれる過塩素酸イオンと反応して沈殿が生成し，HPLC による測定に支障が生じるため，この規格においては移動相にナトリウム塩が用いられている。

a)　基材にシリカゲルを使用したカラムを用いる場合

1)　移動相：0.05 mol/L りん酸緩衝液（pH7.0）（**5.10.2** 参照）
2)　カラム温度：40 ℃
3)　測定波長：260 nm
4)　注入量：10 µL

注記 2　**附属書 A** に示す試験室間共同実験においては，流量は 1.0 mL/min に設定した。

b)　基材にポリマーを使用したカラムを用いる場合

1)　移動相：0.2 mol/L りん酸緩衝液（pH2.9）（**5.10.4** 参照）
2)　カラム温度：40 ℃
3)　測定波長：260 nm
4)　注入量：20 µL

注記 3　**附属書 A** に示す試験室間共同実験においては，流量は 0.6 mL/min に設定した。

8.6.2　HPLC 測定

全体のシステムを安定化する。設定した HPLC 条件（**8.6.1** 参照）で作動させた際，ベースラインの変動が ATP 関連物質の測定に支障がないことを確認する。一連の検量線用標準液と試料溶液（**8.5** 参照）を任意の順番でカラムに注入する。順番は無作為が望ましい。

8.6.3　同定

試料溶液について，同じ HPLC 条件（**8.6.1** 参照）下での標準液のクロマトグラムから得られた ATP 関連物質の保持時間と一致したピークを，それぞれの成分と同定する。

注記　ATP 関連物質の典型的な HPLC クロマトグラムを**附属書 C** に示す。

9　計算

9.1　一般事項

ATP 関連物質の量は，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** が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　K 値の算出

9.2.1　一連の検量線用標準液中の ATP 関連物質のピーク面積を得る。各標準液の ATP 関連物質濃度に対してピーク面積を一次回帰して，ATP 関連物質ごとに検量線を作成する。作成した検量線の相関係数は 0.998 以上であるものとする。

注記　**附属書 A** に示す試験室間共同実験においては，一般的な硬骨魚類中の ATP 関連物質の含有量を参考に，ATP 関連物質ごとに以下の濃度の検量線用標準液を用いた。

- ATP：約 0.8 μmol/L，約 3.2 μmol/L，約 8 μmol/L，約 32 μmol/L，約 160 μmol/L 及び約 320 μmol/L
- ADP：約 0.8 μmol/L，約 3.2 μmol/L，約 8 μmol/L，約 32 μmol/L 及び約 160 μmol/L
- AMP：約 0.8 μmol/L，約 3.2 μmol/L，約 8 μmol/L 及び約 32 μmol/L
- IMP：約 0.8 μmol/L，約 3.2 μmol/L，約 8 μmol/L，約 32 μmol/L，約 160 μmol/L，約 320 μmol/L 及び約 480 μmol/L
- HxR：約 0.8 μmol/L，約 3.2 μmol/L，約 8 μmol/L，約 32 μmol/L，約 160 μmol/L 及び約 320 μmol/L
- Hx：約 0.8 μmol/L，約 3.2 μmol/L，約 8 μmol/L，約 32 μmol/L，約 160 μmol/L 及び約 320 μmol/L

9.2.2　各試料溶液中の ATP 関連物質のピーク面積から検量線を用いて ATP 関連物質の濃度を算出する。次の式によって試験用試料中の ATP 関連物質 X の含有量 b_X を求める。

$$b_X = c_{X,sp} \times \frac{V_3 \times 10^{-3}}{m} \times \frac{V_4 + V_5}{V_4} \quad \cdots\cdots (2)$$

ここで，
b_X ： 試験用試料中の ATP 関連物質 X の含有量（μmol/g）
$c_{X,sp}$ ： 試料溶液中の X の濃度（μmol/L）
V_3 ： **8.3.2** における定容量（mL）
m ： 試験用試料採取質量（g）
V_4 ： **8.5** におけるろ液採取量（μL）
V_5 ： **8.5** におけるりん酸緩衝液採取量（μL）

注記　**附属書 A** に示す試験室間共同実験においては，V_3 は 50 mL，V_4 は 1000 μL，V_5 は 250 μL を用いた。

9.2.3　算出した試験用試料に含まれる ATP 関連物質含有量を用い，次式により，K 値を算出する。

$$\text{K 値} = \frac{b_E + b_F}{b_A + b_B + b_C + b_D + b_E + b_F} \times 100 \quad \cdots\cdots (3)$$

ここで，
b_A ： 試験用試料中の ATP 含有量（μmol/g）
b_B ： 試験用試料中の ADP 含有量（μmol/g）
b_C ： 試験用試料中の AMP 含有量（μmol/g）
b_D ： 試験用試料中の IMP 含有量（μmol/g）
b_E ： 試験用試料中の HxR 含有量（μmol/g）
b_F ： 試験用試料中の Hx 含有量（μmol/g）

9.3　結果の表現

有効数字 2 桁で結果を表示する。必要に応じて単位（%）を付記する。

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，そこで与えられた測定範囲（6.12 %～83.4 %）以外では適用できないこともある。

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）[5]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[6]。

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）[5]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[6]。

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，令和 3 年に IUPAC 共同実験ガイドライン[7]に従って日本国内で行われ，**表 A.1** に示す統計結果が得られた。市販の生鮮硬骨魚類の体側筋普通肉を採取して細切後，変質を抑えるために液体窒素で凍結し，凍結した状態で粉砕した。粉砕物を，1 回の試験に供する量である約 2.0 g ずつに小分けして，その均質性[8]を確認し，試験用試料とした。参加試験室に送付するまでの間，試験用試料を−80 ℃で保管した。この試験室間共同実験の主催機関である公益財団法人函館地域産業振興財団は，手順書，ATP 関連物質の標準原液及び試験用試料を参加試験室に送付するとともに，はかりとった試料の質量を通知した。各試験室への輸送中及び試験開始までの間の試験用試料の温度は，−20 ℃以下に維持した。各試験室は，受領後 4 日以内に，手順書に従って，合計 10 試験用試料（5 種類の非明示試料を各 2 点）を試験した。各試験室は，解凍による試料の変質を避けるため，凍結状態の試験用試料全量を用いて試験し，K 値の算出に必要な試料の質量には，主催機関から通知された情報を用いた。

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
魚種	ヒラメ（天然）	ブリ（天然）	ブリ（養殖）	マサバ（天然）	タイセイヨウサケ（養殖）
参加試験室数	11	11	11	11	11
採択された試験結果の数	11	10	9	10	11
平均値，%（K 値）	6.12	10.08	26.78	39.25	83.4
併行標準偏差 s_r，%（K 値）	0.10	0.11	0.05	0.11	0.2
併行相対標準偏差 RSD_r，%	1.6	1.1	0.18	0.28	0.2
併行許容差 r（$r = 2.8 s_r$），%（K 値）	0.27	0.31	0.14	0.31	0.6
室間再現標準偏差 s_R，%（K 値）	0.21	0.23	0.45	0.50	1.2
室間再現相対標準偏差 RSD_R，%	3.5	2.3	1.7	1.3	1.4
室間再現許容差 R（$R = 2.8 s_R$），%（K 値）	0.60	0.65	1.3	1.4	3.3

附属書 B
（参考）
分光光度計によるイノシン濃度測定時の pH について

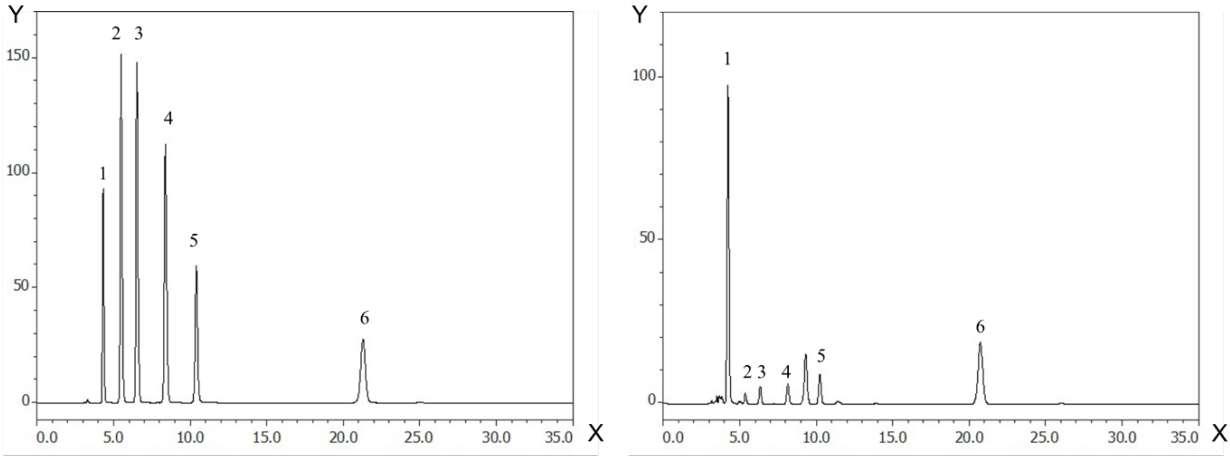
ATP 関連物質のモル吸光係数は，ATP，ADP，AMP，IMP 及び Hx では pH7.0 のりん酸緩衝液中の値が，HxR では pH6.0 のりん酸緩衝液中の値が利用されている[3]。規格利用者の作業量軽減のため，HxR についても，吸光度測定時の pH を 7.0 とするための検討を実施した。

pH6.0 と pH7.0 との溶媒の違いによる，HxR 溶液の吸光度の差についての評価結果を**表 B.1** に示す。

表 B.1－pH6.0 と pH7.0 の HxR 溶液の吸光度

測定	吸光度	
	pH6.0	pH7.0
1	0.617	0.619
2	0.617	0.616
3	0.617	0.617
4	0.617	0.619
5	0.618	0.617
平均値	0.617	0.618
注記 pH6.0 と pH7.0 での吸光度について，Welch の t 検定（両側）による有意差は認められなかった。（有意水準 5 %）		

附属書 C
（参考）
典型的な HPLC クロマトグラム



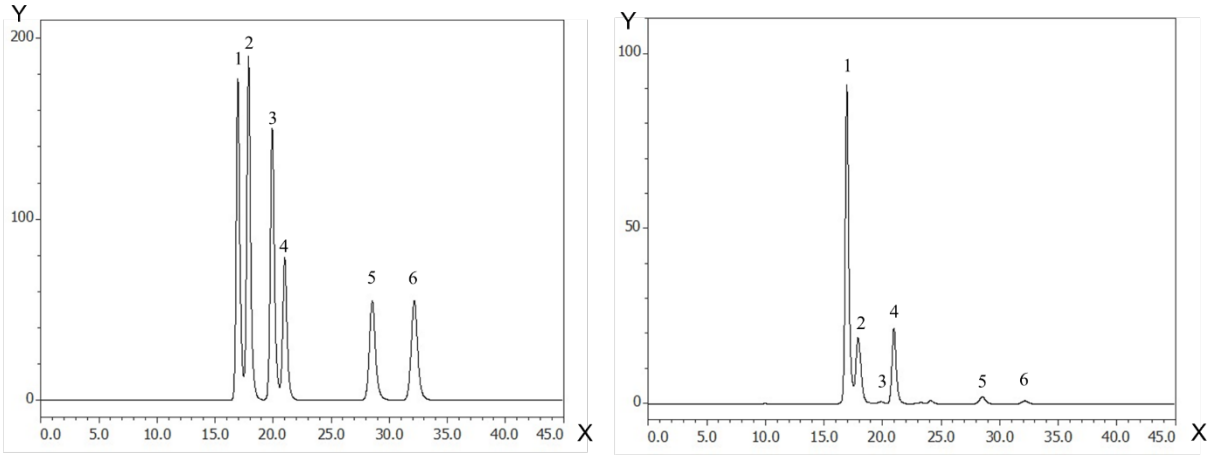
a)　検量線用標準液（ATP 関連物質，それぞれ約 160 µmol/L）　　**b)　試料溶液（クロマグロ）**

記号説明

X ：　保持時間（min）
Y ：　レスポンス（mV）
1　　：　IMP
2　　：　ATP
3　　：　ADP
4　　：　AMP
5　　：　Hx
6　　：　HxR

注記　HPLC 条件は**8.6.1 a)**によるほか，カラムは CAPCELL PAK ADME-HR™ 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 C.1－基材にシリカゲルを使用したカラムのクロマトグラム例



a) 検量線用標準液（**ATP** 関連物質，それぞれ約 **160 µmol/L**）　　**b)** 試料溶液（ヒラメ）

記号説明

X ： 保持時間（min）
Y ： レスポンス（mV）
1 ： ATP
2 ： ADP
3 ： AMP
4 ： IMP
5 ： HxR
6 ： Hx

注記 HPLC 条件は **8.6.1 b)** によるほか，カラムは Asahipak® GS-320 HQ 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 C.2－基材にポリマーを使用したカラムのクロマトグラム例

参考文献

[1] Saito, T., et al., A new method for estimating the freshness of fish. Nippon Suisan Gakkaishi, 1959, 24(9), p. 749-750
注記 参考文献中の K 値算出式を参考にした。

[2] Lee, EH., et al., High performance liquid chromatographic determination of K value as an index of freshness of fish. Nippon Suisan Gakkaishi, 1982, 48(2), p. 255
注記 HPLC 法による K 値の算出方法について，参考文献中の分析方法を参考にした。

[3] National Academy of Science, Specifications and Criteria for Biochemical Compounds. 3rd Edition., Washington D.C..1972
注記 ATP 関連物質のモル吸光係数について，参考文献に記載されている値を参考にした。

[4] 胡 亜芹, 張 佳琪, 蛯谷 幸司, 今野 久仁彦, 魚肉からの ATP 関連化合物抽出法の簡便化, 日水誌, 2013, 79(2), p. 219-225
注記 懸濁抽出液の pH 調整方法について，参考文献中の「結果，抽出液の中和条件」を参考にした。

[5] **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。

[6] **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。

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

[8] **ISO 13528**:2005，Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
注記 1 対応日本産業規格：**JIS Z8405**: 2008 試験所間比較による技能試験のための統計的方法（IDT）
注記 2 均質性の評価について，参考文献の**附属書 B** を参考にした。

制定等の履歴

制　　定　令和４年３月 31 日農林水産省告示第 660 号

制定文、改正文、附則等（抄）

○　令和４年３月 31 日農林水産省告示第 660 号

令和４年４月 30 日から施行する。