

ウンシュウミカン中のβ-クリプトキサンチンの定量—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

○ウンシュウミカン中のβ-クリプトキサンチンの定量—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663号）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
<p style="text-align: center;">日本農林規格</p> <p style="text-align: right;">JAS 0003 : <u>2023</u></p> <p style="text-align: center;"><u>うんしゅうみかん</u>中のβ-クリプトキサンチンの定量 — 高速液体クロマトグラフ法 Determination of the β-cryptoxanthin in Satsuma Mandarin — <u>High performance</u> liquid chromatographic method</p> <p>1 適用範囲 この規格は、<u>うんしゅうみかん</u> (<i>Citrus unshiu</i> Marc.) (生果) の可食部中のβ-クリプトキサンチン (以下“BCR”という。) 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。</p> <p>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、<u>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</u>。これらの引用規格は、<u>その最新版（追補を含む。）</u>を適用する。</p> <p>ISO 648 Laboratory glassware—Single-volume pipettes <u>注記 1</u> 対応日本産業規格：JIS R 3505 ガラス製体積計（MOD）</p> <p>ISO 1042 Laboratory glassware—One-mark volumetric flasks <u>注記 2</u> 対応日本産業規格：JIS R 3505 ガラス製体積計（MOD） (削る。) (略)</p> <p>JIS K 8150 塩化ナトリウム（試薬） JIS K 8355 <u>酢酸</u>（試薬） JIS K 8361 酢酸エチル（試薬） (略)</p> <p>JIS K 8987 硫酸ナトリウム（試薬） JIS K 9705 <u>テトラヒドロフラン</u>（試薬）</p> <p>3 用語及び定義 <u>この規格には、定義する用語はない。</u></p> <p>4 測定原理 試験用試料からエタノールによってBCRを抽出する。<u>抽出試料は水酸化カリウムでけん化する。けん化試料からヘキサン及び酢酸エチルによってBCRを回収し、試料抽出物を得る。</u>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。) を用いて<u>試料抽出物中のBCR</u>を測定</p>	<p style="text-align: center;">日本農林規格</p> <p style="text-align: right;">JAS 0003 : <u>2019</u></p> <p style="text-align: center;"><u>ウンシュウミカン</u>中のβ-クリプトキサンチンの定量 — 高速液体クロマトグラフ法 Determination of the β-cryptoxanthin in Satsuma Mandarin — <u>High-performance</u> liquid chromatographic method</p> <p>1 適用範囲 この規格は、<u>ウンシュウミカン</u> (<i>Citrus unshiu</i> Marc.) (生果) の可食部中のβ-クリプトキサンチン (以下、BCRという。) 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。</p> <p>2 引用規格 次に掲げる規格は、<u>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</u>。これらの引用規格は、<u>最新版（追補を含む。）</u>を適用する。</p> <p>ISO 648 Laboratory glassware—Single-volume pipettes <u>注記</u> 対応日本産業規格：JIS R 3505 ガラス製体積計（MOD）</p> <p>ISO 1042 Laboratory glassware—One-mark volumetric flasks <u>注記</u> 対応日本産業規格：JIS R 3505 ガラス製体積計（MOD）</p> <p>JIS K 0115 <u>吸光光度分析通則</u> (略)</p> <p>JIS K 8150 塩化ナトリウム（試薬） (新設)</p> <p>JIS K 8361 酢酸エチル（試薬） (略)</p> <p>JIS K 8987 硫酸ナトリウム（試薬） (新設)</p> <p>(新設)</p> <p>3 測定原理 粉砕した測定試料からエタノールによってBCRを抽出する。<u>抽出物は水酸化カリウムでけん化する。ヘキサン及び酢酸エチルによってけん化物を抽出する。</u>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。) を用いて<u>抽出物中のBCR</u>を測定する。</p>

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 (略)

5.1 水

JIS K 0557 に規定する A3 以上の品質のもの。

5.2 BCR

(略)

5.3 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。

5.4 ピロガロール

JIS K 8780 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.5 硫酸ナトリウム

JIS K 8987 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.6 水酸化カリウム

JIS K 8574 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.7 塩化ナトリウム

JIS K 8150 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.8 ヘキサン

JIS K 8848 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.9 酢酸エチル

JIS K 8361 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.10 2-プロパノール

JIS K 8839 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.11 アセトニトリル

HPLC 用のもの。

5.12 メタノール

HPLC 用のもの。

(削る。)

(削る。)

5.13 テトラヒドロフラン

JIS K 9705 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.14 酢酸

JIS K 8355 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.15 *dl*- α -トコフェロール

97.0 %以上の純度のもの。

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)

4.1 水

JIS K 0557 が規定する A3 以上の品質のもの。

4.2 BCR

(略)

4.3 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。

4.4 ピロガロール

JIS K 8780 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。規定する濃度 99.5 %で、特級又は同等以上の品質のもの。

4.5 硫酸ナトリウム

JIS K 8987 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。

4.6 水酸化カリウム

JIS K 8574 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。

4.7 塩化ナトリウム

JIS K 8150 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。

4.8 ヘキサン

JIS K 8848 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。

4.9 酢酸エチル

JIS K 8361 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。

4.10 2-プロパノール

JIS K 8839 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。
(新設)

4.11 メタノール

高速液体クロマトグラフ用のもの。

4.12 クロロホルム

高速液体クロマトグラフ用のもの。

4.13 パルミチン酸アスコルビル

97.0 %以上の純度のもの。

(新設)

(新設)

(新設)

5.16 石油エーテル

(略)

5.17 窒素

(略)

5.18 β-カロテン

(略)

5.19 ピロガロール含有エタノール

エタノール 1.0 L 当たりピロガロール 30 g を溶解する。茶褐色に変色したものは使用しない。

5.20 水酸化カリウム溶液

水 100 mL 当たり水酸化カリウム 60 g を溶解する。

警告 (略)

5.21 塩化ナトリウム溶液

水 1.0 L 当たり塩化ナトリウム 10 g を溶解する。

5.22 ヘキサン/酢酸エチル混合液

ヘキサンと酢酸エチルとを 9 : 1 (体積比) で混合する。

5.23 HPLC 移動相

アセトニトリル、メタノール、テトラヒドロフランと酢酸を 55 : 40 : 5 : 0.1 (体積比) で混合した溶液 1.0 L 当たり *dl-α*-トコフェロール 0.05 g を溶解する。使用前に脱気する。

(削る。)

5.24 BCR 標準原液

BCR を約 10 μg/mL の濃度で含む溶液となるように石油エーテルで調製し、BCR 標準原液とする。溶液を複数の蓋付き瓶に小分けし、密封して保存する。

注記 (略)

使用前に室温に戻した後に振り混ぜる。不溶物はメンブランフィルターを用いて除く。

5.25 標準液

5.25.1 一般事項

濃度測定用溶液 (5.25.2 参照) 及び 5.25.3 で規定されている一連の標準液は、調製の都度、BCR 標準原液の蓋付き瓶の 1 つから調製する。BCR 標準原液を室温に戻すたびに、その日のうちに濃度測定用溶液を調製し、その濃度を測定する。標準原液の残りは再保存しない。

5.25.2 濃度測定用溶液

全量ピペット及び全量フラスコを用いて、BCR 標準原液を石油エーテルで 5 倍に希釈し、濃度測定用溶液とする。

注記 附属書 A に記載された試験室間共同実験では、BCR 標準原液 2 mL をはかりとり、10 mL の全量フラスコで定容した。

装置の説明書等に従い、分光光度計の条件設定及び操作を行う。石油エーテルを対照液として、濃度測定用溶液の 452 nm の吸光度を測定する。次の式によって BCR 標準原液の BCR 濃度 ρ_0 を求める。

4.14 石油エーテル

(略)

4.15 窒素

(略)

4.16 β-カロテン

(略)

4.17 ピロガロール溶液 30 g/L 含有エタノール溶液

エタノール (4.3) 1 L 当たりピロガロール (4.4) 30 g を溶解する。茶褐色に変色したものは使用しない。

4.18 水酸化カリウム溶液 濃度 60 %相当のもの。

水 (4.1) 100 mL 当たり水酸化カリウム (4.6) 60 g を溶解する。

警告 (略)

4.19 塩化ナトリウム溶液 濃度 1 %相当のもの。

水 (4.1) 1 L 当たり塩化ナトリウム (4.7) 10 g を溶解する。

4.20 酢酸エチル/ヘキサン混合液

ヘキサン (4.8) と酢酸エチル (4.9) とを、9 : 1 (体積分率) で混合する。

4.21 HPLC 移動相

メタノール (4.11) とクロロホルム (4.12) とを 24 : 1 (体積分率) で混合した溶液 1 L 当たりパルミチン酸アスコルビル (4.13) 0.05 g を溶解する。

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験ではメタノール 960 mL にパルミチン酸アスコルビル 0.05 g を溶解した後、クロロホルム 40 mL を加えた。

4.22 BCR 標準原液

石油エーテル (4.14) 中に BCR (4.2) を 10 μg/mL の濃度で含む溶液 (例えば、BCR 1 mg では石油エーテル 100 mL) を調製する。溶液を蓋付き瓶に移し、保存する。

注記 (略)

使用前に冷凍庫から取り出し、常温に戻した後に振り混ぜる。不溶物はメンブランフィルター (5.10) を用いて除く。

4.23 標準液

4.23.1 一般事項

BCR の標準液を 4 段階以上の濃度に調製する。濃度測定用溶液 (4.23.2) 及び 4.23.3 で規定されている次の一連の標準液は、BCR 標準原液 (4.22) の蓋付き瓶の 1 つから調製する。BCR 標準原液を室温に戻すたびに、その日のうちに濃度測定用溶液を調製し、その濃度を測定する。標準原液の残りは捨て、再保存しない。

4.23.2 濃度測定用溶液

全量ピペット (5.5) 及び全量フラスコ (5.6) を用いて、BCR 標準原液 (4.22) を石油エーテルで 5 倍に希釈する。

注記 附属書 A に記載された試験室間共同実験では、BCR 標準原液 2 mL をはかりとり、10 mL の全量フラスコに移した。

装置の説明書等に従い、分光光度計 (5.12) のセットアップ及び操作を行う。石油エーテルを対照液として、濃度測定用溶液の 452 nm の吸光度を測定する。次の式によって BCR 標準原液の BCR 濃度

5.25.3 の操作も同日に行う。

$$\rho_0 = \frac{A \times V_2 \times 10\,000}{\varepsilon \times V_1}$$

ここで、 ρ_0 : BCR 標準原液の BCR 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 A : 濃度測定用溶液の 452 nm における吸光度 (石油エーテル, 光路長 1 cm)
 ε : 濃度 1%, 光路長 1 cm における BCR の吸光係数であり 2386[7][8]
 V_1 : 使用した全量ピペットの呼び容量 (mL)
 V_2 : 使用した全量フラスコの呼び容量 (mL)

5.25.3 一連の標準液

全量ピペットを用いて、BCR 標準原液をなす形フラスコにはかりとる。この BCR 標準原液に窒素を穏やかに吹き付け、石油エーテルを揮発させる。エタノールを用いて、なす形フラスコ内の内容物を完全に溶解する。溶解させる際、超音波を 10 秒間程度用いてもよい。その溶液をエタノールで複数回洗い込み、全量フラスコに完全に移す。この全量フラスコにエタノールを標線まで加えて定容し、振り混ぜる。混合した溶液をメンブランフィルターでろ過し、これを標準液とする。同様の操作で 4 段階以上の濃度の標準液を調製し、それらの標準液を一連の標準液とする。一連の標準液の調製例を表 1 に示す。次の式によって、標準液ごとの BCR 濃度 ρ_i を求める。

$$\rho_i = \frac{\rho_0 \times V_3}{V_4}$$

ここで、 ρ_i : i 段階目の標準液の BCR 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 ρ_0 : 5.25.2 で得られた BCR 標準原液の BCR 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 V_3 : 使用した全量ピペットの呼び容量 (mL)
 V_4 : 使用した全量フラスコの呼び容量 (mL)

(削る。)

表 1—標準液の調製例

標準液	全量ピペットの呼び容量 (mL)	全量フラスコの呼び容量 (mL)	標準液の BCR 濃度 ($\mu\text{g/mL}$ 相当)
A	1	5	2.0
B	1.5	10	1.5
C	1	10	1.0
D	0.5	10	0.50
E	0.5	20	0.25
(削る。)			

調製した日に 8.5.2 の操作を行う、又は $-30\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $-20\text{ }^\circ\text{C}$ で保存する。

$-30\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $-20\text{ }^\circ\text{C}$ で保存した一連の標準液は HPLC 測定 (8.5.2 参照) 前に室温に戻す。十分に混合し、必要に応じて超音波を 10 秒間程度用いて不溶物を溶解させた後、メンブランフィルターを用いてろ過する。

注記 1 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ~ 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 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。

ρ_1 ($\mu\text{g/mL}$) を求める。

$$\rho_1 = \frac{A \times V_2 \times 10\,000}{\varepsilon V_1}$$

ここに、 A : 吸光度測定用標準溶液の 452 nm における吸光度 (石油エーテル, 1 cm セル)
 ε : 濃度 1%, 光路長 1 cm における BCR の吸光係数であり 2386[6][7]
 V_1 : 使用した全量ピペットの容量 (mL), 共同実験では 2
 V_2 : 使用した全量フラスコの容量 (mL), 共同実験では 10

直ちに 4.23.3 の操作を行う。

4.23.3 一連の標準液

全量ピペット (5.5) を用いて、BCR 標準原液 (4.22) の各容量をなす形フラスコ (5.8) にそれぞれはかりとる。これらの BCR 標準原液に窒素 (4.15) を穏やかに吹き付け、石油エーテルを揮発させる。エタノール (4.3) を用いて、各なす形フラスコ内のそれぞれの内容物を完全に溶かす (例えば 10 秒間程度の超音波処理)。その溶液を各全量フラスコ (5.6) に完全に移す。これらの全量フラスコにエタノールを標線まで加えて定容し、振り混ぜる。混合した溶液をメンブランフィルター (5.10) でろ過し、バイアル (5.11) に入れる。次の式によって、各 HPLC 用標準液の濃度 ρ_i ($\mu\text{g/mL}$) を求める。

$$\rho_i = \frac{\rho_1 \times V_3}{V_4}$$

ここに、 ρ_1 : 4.23.2 で得られた BCR 標準原液 (4.22) の BCR 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 V_3 : 使用した全量ピペットの容量 (mL)
 V_4 : 使用した全量フラスコの容量 (mL)

注記 1 附属書 A に示す試験室共同実験では、表 1 に示す標準液 A, B, C 及び D が使用された。

表 1 標準液の調製

標準液	全量ピペットの呼び容量 (mL)	全量フラスコの呼び容量 (mL)	HPLC 用標準液の BCR 濃度 ($\mu\text{g/mL}$ 相当)
A	1	5	2.0
(新設)	(新設)	(新設)	(新設)
B	1	10	1.0
C	0.5	10	0.50
D	0.5	20	0.25
注意 この値は一例である。			

調製した日に 7.5.2 の操作を行う、又は各 HPLC 用標準液を冷凍保存する。

(新設)

注記 2 -30℃～-20℃で保存された標準液は、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。

5.26 β-カロテン溶液

β-カロテンをエタノールに溶解し、**5.25.3**で調製した一連の標準液のBCR濃度範囲内で、任意の濃度に調製する。

注記 高濃度のβ-カロテン溶液を調製する際に、β-カロテンがエタノールに完全に溶解しない場合がある。その場合は、β-カロテンをヘキサンに溶解し、その溶液を分取し、窒素を穏やかに吹き付け、ヘキサンを揮発させ、エタノールに溶解することで目的とする濃度の溶液の調製が可能である。

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

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 遠心管

容量50 mL程度のガラス製で底部が丸底で、蓋付きのものとし、振り混ぜに必要な空間を保持でき、相対遠心加速度400×gで遠心分離ができるもの。蓋は、共栓又はねじ口のものであり、有機溶剤に耐性をもつもの。また、けん化(8.2参照)の操作に用いる蓋は強塩基性の溶液に耐性をもつもの。

6.3 振り混ぜ機

遠心管を垂直方向に往復で振り混ぜることができるもの。

6.4 遠心分離器

(略)

警告 (略)

6.5 全量ピペット

ISO 648に規定するクラスAのもので、標準液の希釈(5.25参照)及びけん化(8.2参照)の操作に適した容量のもの。

6.6 全量フラスコ

ISO 1042に規定するクラスAのもので、標準液の希釈(5.25参照)、抽出(8.1参照)及び溶解(8.4参照)の操作に適した容量のもの。

6.7 恒温水槽

(略)

6.8 なす形フラスコ

(略)

6.9 ロータリーエバポレーター

(略)

6.10 メンブランフィルター

フィルターが有機溶剤系の溶液のろ過に適したPTFE製のもので、孔径が0.2 μm以下のもの。フィ

注記 2 -30℃～-20℃で冷凍保存された標準液は、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。

冷凍保存した各HPLC用標準液はHPLC測定(7.5.2)前に冷凍庫から取り出し、常温に戻す。十分に混合し、必要に応じて超音波洗浄器を用いて不溶物を溶解させた後、メンブランフィルターを用いてろ過する。

(新設)

(新設)

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 電子天びん

0.1 mgの桁の精度で量る機能を有するもので、ひょう量が200 gより大きいもの。

5.2 遠心管(遠沈管)

容量50 mL程度のガラス製で底部が丸底で、蓋(共栓又はねじ口の蓋)付きのもの。十分な振とうに必要な空間を保持でき、相対遠心加速度400×gで遠心分離ができること。原則として、透明のもの。PTFE製等の有機溶剤及び強塩基性の溶液に耐性のある材質のパッキンを取り付けた蓋を用いる。

5.3 振とう器

遠心管を垂直往復振とうすることができるもの。

5.4 遠心分離器

(略)

警告 (略)

5.5 全量ピペット

ISO 648に規定するクラスAのもので、標準液の希釈とけん化の操作のための容量範囲をカバーするもの。

5.6 全量フラスコ

ISO 1042に規定するクラスAのもので、標準液の希釈と抽出、溶解の操作のための容量範囲をカバーするもの。

5.7 恒温水槽

(略)

5.8 なす形フラスコ

(略)

5.9 ロータリーエバポレーター

(略)

5.10 メンブランフィルター

フィルターが有機溶剤系の溶液のろ過に適したPTFE製のもので、孔径が0.20 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有機溶剤に耐性のあるもの。

6.11 バイアル

使用する HPLC に適合したもので、不活性処理済のガラス製のもの又は測定に影響がないことを確認したその他のガラス製のもの。蓋のセプタムは、PTFE 製又は PTFE でコーティングされたもの。

6.12 分光光度計

吸収セルを固定できる吸収セルホルダーを備え、452 nm における吸光度を測定できるもの。

6.13 吸収セル

光路長が 1 cm で、石英製又はガラス製であること。蓋付きのものが望ましい。複数の吸収セルを使用する場合は、光学的特性が同等であることが確認されたもの。

6.14 HPLC 装置

6.14.1 HPLC

JIS K 0124 に規定する移動相送液部、温度制御機能をもつカラムオープン、455 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。

6.14.2 HPLC 用カラム

次の特性をもつ C18 (ODS) 逆相カラム。

(略)

- 粒子径：3 μm～5 μm
- 20 分以内に β-カロテンが溶出するもの。8.5 に従って β-カロテンの溶出時間及び BCR のピークに β-カロテンのピークが重なっていないことを確認する。

(略)

7 試験用試料の調製

試料の外果皮のみを除去した後、ホモジナイザー等を用いて粉砕し、試験用試料とする。

直ちに 8.1 の操作を行う、又は試験用試料を冷凍保存する。試験用試料を冷凍保存する場合は、調製後速やかにガラス製の密栓容器に入れる。冷凍保存した試験用試料を使用前に室温に戻し、よく混合する。

注記 1 試料は生果のまま冷蔵保存した場合、2 週間安定した状態を保つことが確認されている^[4]。

注記 2 -20℃以下で保存された試験用試料は、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 手順

8.1 抽出

8.1.1 試験用試料約 2 g を 10 mg の桁まで遠心管にはかりとる。ピロガロール含有エタノール 15 mL 及び硫酸ナトリウム 10 g を加える。

8.1.2 振り混ぜ機で 5 分間激しく振り混ぜる。遠心分離器で相対遠心加速度 400×g 程度で 5 分間遠心分離する。上澄み液を 50 mL 容の全量フラスコに移す。

8.1.3 遠心管の残りにピロガロール含有エタノール 15 mL を加え、8.1.2 の抽出操作を繰り返す。上澄み液は 8.1.2 の全量フラスコに合わせる。

ルターと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。

5.11 バイアル

使用する HPLC に適合したもの。不活性処理済のもの、不活性処理済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のガラス製のもの。蓋のセプタムは、PTFE 製又は PTFE でコーティングされたもの。

5.12 分光光度計

吸収セル (5.13) を固定できる吸収セルホルダーを備え、452 nm における吸光度を測定できるもの。

5.13 吸収セル

光路長が 1 cm で、石英製又はガラス製であること。蓋付きのものが望ましい。複数の吸収セルを使用する場合は、光学的特性が同等であることが保証されたものを用いる。

5.14 HPLC 装置

5.14.1 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

JIS K 0124 が規定する送液ポンプ、サーモスタット制御のカラム槽、455 nm が設定できる紫外可視吸光度検出器及びデータ処理装置を持ち、脱気の態勢が整っているもの。

5.14.2 HPLC 用カラム

次の特性を持つ C18 (ODS) 逆相カラム。

(略)

- 粒径：3 μm～5 μm
- 20 分以内に β-カロテンが溶出するもの。7.5 に従って β-カロテンの溶出時間及び BCR のピークに β-カロテンのピークが重なっていないことを確認する。

(略)

6 試験用試料の調製

試料の外果皮のみを除去した後、ホモジナイザー等を用いて粉砕する。

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。試験用試料を冷凍保存する場合は、調製後速やかにガラス製の密栓容器に入れる。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、室温に戻し、よく混合する。

注記 1 試料は生果のまま冷蔵保存した場合、2 週間安定した状態を保つことが確認されている^[4]。

注記 2 -20℃以下で冷凍保存された粉砕試料は、少なくとも 2 か月安定した状態を保つことが確認されている。

7 手順

7.1 抽出

7.1.1 試験用試料 (箇条 6) 約 2 g を 10 mg の桁まで遠心管 (5.2) にはかりとる。ピロガロール溶液 (4.17) 15 mL 及び硫酸ナトリウム (4.5) 10 g を加える。

7.1.2 振とう器 (5.3) で 5 分間激しく振とうする。遠心分離器 (5.4) で相対遠心加速度 400×g 程度で 5 分間遠心分離する。上澄み液を 50 mL 容の全量フラスコ (5.6) に移す。

7.1.3 遠心管に残った液にピロガロール溶液 15 mL を加え、7.1.2 の抽出操作を繰り返す。上澄み液は 7.1.2 の全量フラスコに合わせる。

8.1.4 8.1.3の操作を繰り返す。

8.1.5 ピロガロール含有エタノールを上澄み液を回収した全量フラスコの標線まで加えて定容し、振り混ぜて混合し、抽出試料とする。

8.2 けん化

全量ピペットを用いて、**8.1.5**の抽出試料 10 mL を新しい遠心管に移し、水酸化カリウム溶液 1 mL を加える。穏やかに振り混ぜる。遠心管を 70 °C に設定した恒温水槽に入れ、5 分程度おきに遠心管を振り混ぜながら、30 分間加熱する。その後、遠心管を室温まで冷却し、けん化試料とする。

8.3 BCR の回収

8.3.1 塩化ナトリウム溶液 20 mL と 2-プロパノール 5 mL とヘキサン/酢酸エチル混合液 12 mL とを **8.2** のけん化試料に加え、振り混ぜる。

8.3.2 振り混ぜ機を用いて 5 分間激しく振り混ぜる。遠心分離器で相対遠心加速度 400×g 程度で 5 分間遠心分離を行う。上層をなす形フラスコに移す。

8.3.3 遠心管に残った液にヘキサン/酢酸エチル混合液 12 mL を加える。**8.3.2** の操作を繰り返す。上層は **8.3.2** のなす形フラスコに合わせる。

8.3.4 8.3.3 の操作を繰り返す。

8.3.5 ロータリーエバポレーターを用いて、**8.3.4** のなす形フラスコの有機溶媒を 40 °C 以下でほとんど減圧留去する。その後、残留物に窒素を穏やかに吹き付け乾固し、これを乾固残留物とする。

8.4 溶解

エタノールを用いて、**8.3.5** のなす形フラスコの乾固残留物を完全に溶解する。溶解させる際、超音波を 10 秒間程度利用してもよい。その溶液をエタノールで複数回洗い込み、全量フラスコに完全に移す。

注記 1 (略)

この全量フラスコにエタノールを標線まで加えて定容し、振り混ぜる。混合した溶液をメンブランフィルターでろ過し、試料抽出物とする。試料抽出物をバイアルに回収する。

調製した日に HPLC 測定 (**8.5.2** 参照) を行う、又は試料抽出物を -30 °C ~ -20 °C で保存する。

注記 2 -30 °C ~ -20 °C で保存された試料抽出物は、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。

-30 °C ~ -20 °C で保存した試料抽出物は、測定日に室温に戻す。試験管ミキサー等を用いて混合し、必要に応じて超音波を 10 秒間程度用いて不溶物を十分に溶解させた後、メンブランフィルターを用いてろ過する。

8.5 測定

8.5.1 HPLC 条件の設定

メーカー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) 移動相の流量：1.5 mL/min
- b) カラムの設定温度：40 °C
- c)・d) (略)
- e) 測定時間：25 分。β-カロテン溶液を注入し、β-カロテンの溶出が次の測定に影響しないことが確認できた場合、測定時間を短縮してもよい。

7.1.4 7.1.3 の操作を繰り返す。

7.1.5 ピロガロール溶液を標線まで加えて定容し、振り混ぜて混合する。

7.2 けん化

全量ピペット (**5.5**) を用いて、**7.1.5** の希釈液 10 mL を新しい遠心管 (**5.2**) に移し、水酸化カリウム溶液 (**4.18**) 1 mL を加える。穏やかに振り混ぜる。遠心管を 70 °C に設定した恒温水槽 (**5.7**) に入れ、5 分程度おきに遠心管を振り混ぜながら、30 分間加熱する。遠心管を水道水の入った水槽に入れて、室温まで冷却する。

7.3 不けん化物の回収

7.3.1 塩化ナトリウム溶液 (**4.19**) 20 mL と 2-プロパノール (**4.10**) 5 mL と酢酸エチル/ヘキサン混合液 (**4.20**) 12 mL とを **7.2** の遠心管に加え、振り混ぜる。

7.3.2 振とう器 (**5.3**) を用いて 5 分間激しく振とうする。遠心分離器 (**5.4**) で相対遠心加速度 400×g 程度で 5 分間遠心分離を行う。上層をなす形フラスコ (**5.8**) に移す。

7.3.3 遠心管に残った液に酢酸エチル/ヘキサン混合液 12 mL を加える。**7.3.2** の操作を繰り返す。上層は **7.3.2** のなす形フラスコに合わせる。

7.3.4 7.3.3 の操作を繰り返す。

7.3.5 ロータリーエバポレーター (**5.9**) を用いて、**7.3.4** のなす形フラスコの有機溶媒を 40 °C 以下でほとんど減圧留去する。窒素 (**4.15**) を穏やかに吹き付け乾固させる。

7.4 溶解

エタノール (**4.3**) を用いて、**7.3.5** のなす形フラスコの内容物を完全に溶かす (例えば 10 秒間程度の超音波処理)。その溶液を全量フラスコ (**5.6**) に完全に移す。

注記 1 (略)

全量フラスコにエタノールを標線まで加えて定容し、振り混ぜる。混合した溶液をメンブランフィルター (**5.10**) でろ過し、ろ液をバイアル (**5.11**) に回収する。

調製した日に HPLC 測定 (**7.5.2**) を行う、又は試料抽出物を冷凍保存する。

注記 2 -30 °C ~ -20 °C 冷凍保存された試料抽出物は、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。

冷凍保存した試料抽出物は、測定日に室温に戻す。ボルテックスミキサー等を用いて混合し、不溶物を十分に溶解させる (例えば更に 10 秒間程度の超音波処理)。その後、メンブランフィルターを用いてろ過する。

7.5 測定

7.5.1 HPLC 条件の設定

メーカーの取扱説明書に従って、HPLC 装置 (**5.14**) をセットアップする。設定は次による。

冷却機能を持つ自動試料導入装置の設定温度は 20 °C にするのが望ましい。

- a) 移動相 (**4.21**) の流量：1.5 mL/min
- b) カラム (**5.14.2**) の設定温度：40 °C
- c)・d) (略)
- e) 測定時間：25 分。β-カロテンの溶出が次の測定に影響しなければ、測定時間を短縮してもよい。

8.5.2 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 (8.5.1 参照) で作動させた際、ベースラインの変動が BCR の測定に支障がないことを確認する。一連の標準液をカラムに注入し、続いて同じ量の試料抽出物を注入する。

8.5.3 同定

試料抽出物について、同じ HPLC 条件 (8.5.1 参照) 下での標準液のクロマトグラムから得られた BCR の保持時間と一致したピークを、BCR と同定する。

注記 うんしゅうみかんの典型的な HPLC クロマトグラムを附属書 B に示す。

9 計算

9.1 一般事項

BCR 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。異性体由来のショルダーピークに対しては、それらのピーク面積を合算し BCR のピーク面積とする。

注記 典型的な異性体由来のショルダーピークを附属書 C に示す。一般に BCR の異性体は、all-trans 体が最も安定であり、一部 cis 体への異性化が報告されている。8.5.1 に示す HPLC 条件では、all-trans 体のピークの直後に cis 体のピークが検出されることが確認されている (図 C.1 の a) 参照)。なお、cis 体の吸収スペクトルでは、主要な吸収ピークが all-trans 体より 2 nm~5 nm 程度短波長にシフトし、近紫外域に all-trans 体にはないピークが存在することが報告されている [9] (図 C.1 の b) 参照)。

9.2 定量

一連の標準液中のそれぞれの BCR のピーク面積を得る。各標準液の BCR 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。

各試料抽出物中の BCR のピーク面積から検量線を用いて BCR の濃度を算出する。試験用試料中の BCR 含有量 w_i は、次の式によって与えられる。

$$w_i = \frac{C \times V_5 \times d_1}{W \times d_2}$$

ここで、
 w_i : 試験用試料中の BCR 含有量 (mg/kg)
 C : 試料抽出物の BCR 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 V_5 : 試料抽出物の調製 (8.4 参照) 時の定容量 (mL)
 d_1 : 抽出試料の調製 (8.1 参照) 時の定容量 (mL), 通常 50
 d_2 : 抽出試料のけん化 (8.2 参照) 時の分取量 (mL), 通常 10
 W : 試験用試料の採取量 (g)

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

7.5.2 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 (7.5.1) で作動させた際、ベースラインの変動が BCR の測定に支障がないことを確認する。一連の標準液 (4.23.3) をカラムに注入し、続いて同じ量の試料抽出物 (7.4) を注入する。

7.5.3 同定

試料溶液について、同じ HPLC 条件 (7.5.1) 下での標準液のクロマトグラムから得られた BCR の保持時間と一致したピークを、BCR と同定する。

注記 ウンシュウミカンの典型的な HPLC クロマトグラムを附属書 B に示す。

8 計算

8.1 一般事項

BCR 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。夾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。異性体由来のショルダーピークに対しては、それらのピーク面積を合算し BCR のピーク面積とする。

(新設)

8.2 定量

一連の標準液 (4.23.3) 中のそれぞれの BCR の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を算出する。各標準のためにデータ処理装置 (5.14.1) によって得られたピーク面積に対する BCR 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 BCR の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を算出する。ウンシュウミカン試料中の BCR 含有量 w_i (mg/kg) は、次の式によって与えられる。

$$w_i = \frac{C \times V_5 \times d_1}{W \times d_2}$$

ここに、
 C : 試料抽出物の BCR 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 V_5 : 回収した不けん化物の溶解 (7.4) 時の定容量 (mL), 共同実験では 5
 d_1 : 抽出 (7.1) 時の定容量 (mL), 通常 50
 d_2 : けん化 (7.2) する分取量 (mL), 通常 10
 W : 試料採取量 (g)

8.3 結果の表現

有効数字 2 桁 (例えば質量分率 11 mg/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（4.7 mg/kg～23 mg/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けば、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けば、平均して 20 回に 1 回以下であることが見込まれる[2]。

11 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

(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]に従って国内で行われ、表 A.1[5] に示す統計結果が得られた。市販のうんしゅうみかんの外果皮を除去した試料 150 g～200 g に、試料質量の 10 % のピロガロールを抗酸化剤として加えて、粉砕器を用いて 12 000 rpm で 10 分間、粉砕した。

注記 1 カロテノイドは光、酸素、試料に含まれる酵素等によって分解することがあるため、抗酸化剤を添加した。

粉砕物について均質性[6]を確認し、試験試料とした。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、手順書及び試験試料を参加試験室に配付した。各試験室は、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。

注記 2 この試験室間共同実験では、5.23 に規定する HPLC 移動相の代わりにメタノールとクロロホルムとを 24 : 1（体積比）で混合した溶液 1.0 L 当たりパルミチン酸アスコルビル 0.05 g を溶解した移動相を使用した。それぞれの移動相を使用した際の定量値の差を、令和 4 年度に独立行政法人農林水産消費安全技術センターが確認したところ、有意な差は認められなかった（有意水準 5 %）。

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
(略)	(略)	(略)	(略)	(略)	(略)

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（4.7 mg/kg～23 mg/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けば平均して 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けば平均して 20 回に 1 回以下であると期待される^[1]。

10 品質管理

試験所は、試験のための内部品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

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^[4] に示す統計結果が得られた。市販のウンシュウミカンの外果皮を除去した試料 150 g～200 g に、試料質量の 10 % のピロガロールを抗酸化剤として加えて、粉砕器を用いて 12 000 rpm で 10 分間、粉砕した。

注記 カロテノイドは光、酸素、試料に含まれる酵素等によって分解することがあるため、抗酸化剤を添加した。

粉砕物について均質性^[5]を確認し、試験試料とした。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、手順書及び試験試料を参加試験室に配付した。各試験室は、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。

(新設)

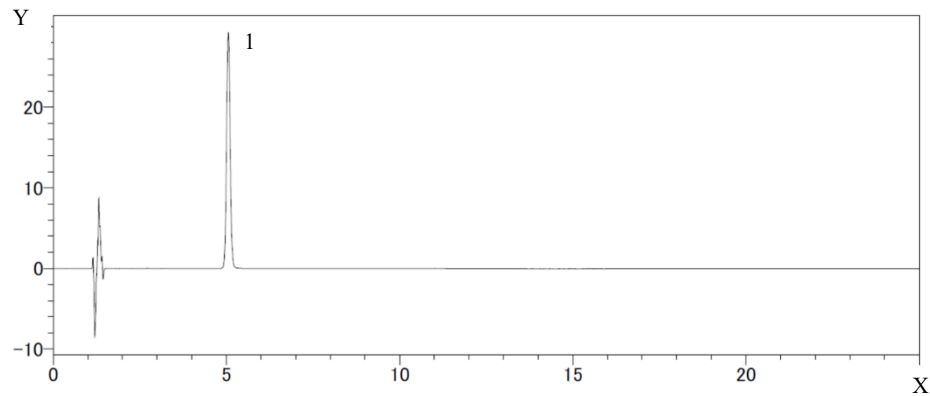
表 A.1—試験室間共同実験の結果

試料識別	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5
(略)	(略)	(略)	(略)	(略)	(略)

併行標準偏差 s_r , mg/kg	0.12	0.13	0.32	0.57	0.50
併行相対標準偏差 RSD_r , %	2.6	2.0	3.1	4.2	2.1
併行許容差 r ($r = 2.8s_r$), mg/kg	0.34	0.36	0.90	1.6	1.4
室間再現標準偏差 s_R , mg/kg	0.67	0.61	1.0	1.3	2.6
室間再現相対標準偏差 RSD_R , %	14	9.0	9.9	9.6	11
室間再現許容差 R ($R = 2.8s_R$), mg/kg	1.9	1.7	2.8	3.6	7.3

附属書 B
(参考)
典型的な HPLC クロマトグラム

(削る。)

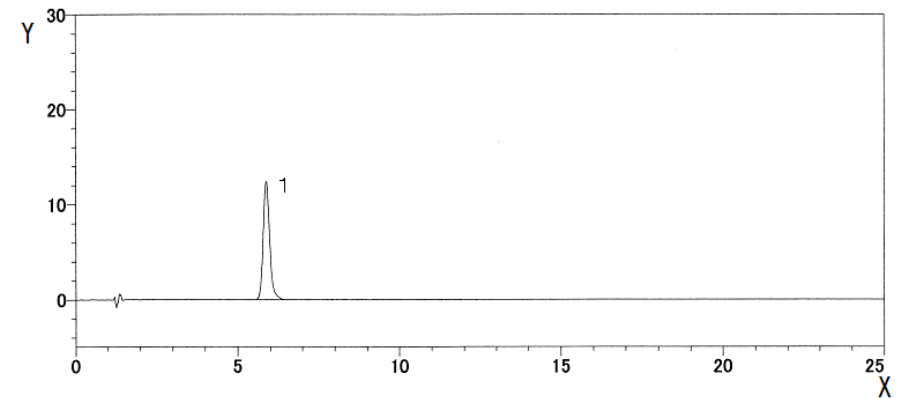


記号説明

X : 保持時間 (min)

併行標準偏差 s_r , mg/kg	0.12	0.13	0.32	0.57	0.50
併行相対標準偏差, %	2.6	2.0	3.1	4.2	2.1
併行許容差 r ($r = 2.8s_r$), mg/kg	0.34	0.36	0.90	1.6	1.4
室間再現標準偏差 s_R , mg/kg	0.67	0.61	1.0	1.3	2.6
室間再現相対標準偏差, %	14	9.0	9.9	9.6	11
室間再現許容差 R ($R = 2.8s_R$), mg/kg	1.9	1.7	2.8	3.6	7.3

附属書 B
(参考)
典型的な HPLC クロマトグラム



(新設)

凡例

X 保持時間 (min)

Y : レスポンス (mAU)

1 : BCR

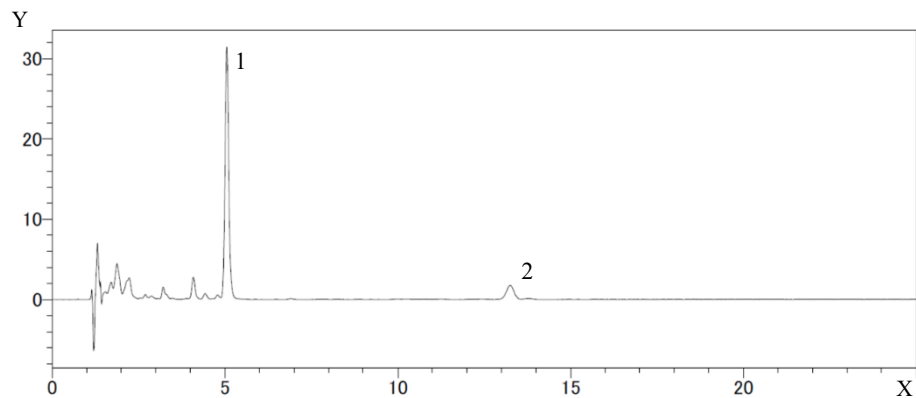
注記 HPLC 条件は **8.5.1** によるほか、カラムは Inertsil® ODS-3 を用いた。なお、この情報は、この規格の利用者の便宜のために示しており、この製品を推奨するものではない。

図 B.1-BCR 標準液 (1 µg/mL 相当)

(削る。)

(削る。)

(削る。)



Y レスポンス (mV)

1 BCR

(新設)

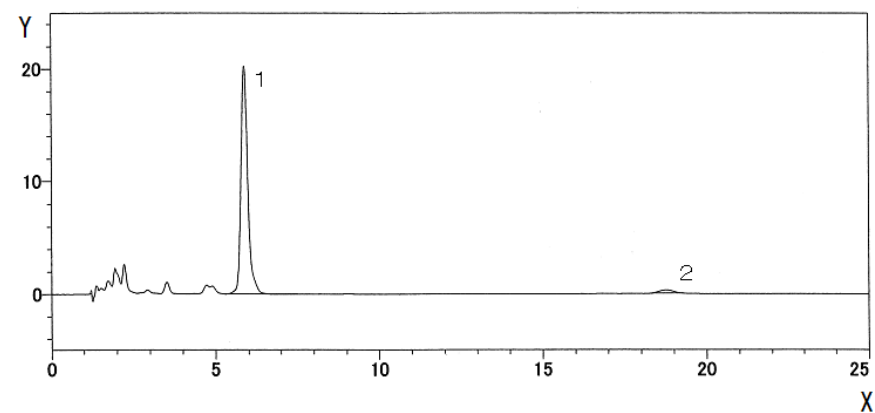
図 B.1-BCR 標準液 B

HPLC 条件

HPLC 条件は **7.5.1** によるほか、次による。

a) カラム : Inertsil® ODS-3¹⁾

1) Inertsil®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。



(新設)

記号説明

- X : 保持時間 (min)
Y : レスポンス (mAU)
1 : BCR
2 : β-カロテン

注記 HPLC 条件は 8.5.1 によるほか、カラムは Inertsil® ODS-3 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.2-1 試料抽出物

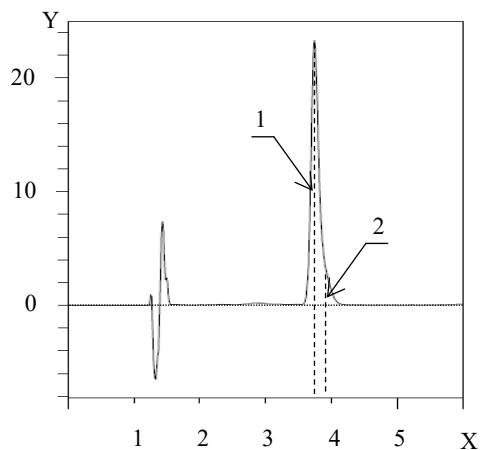
(削る。)

(削る。)

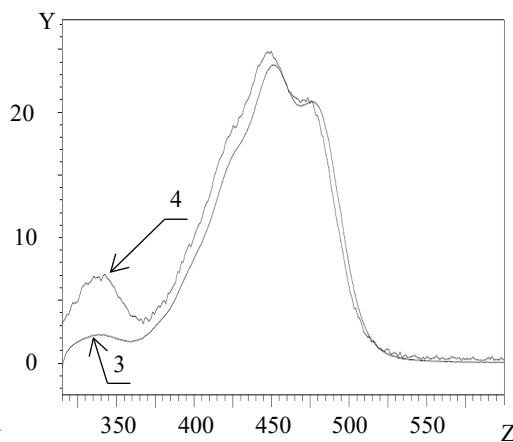
附属書 C

(参考)

BCR の異性体由来のショルダーピーク



a) BCR 標準液のクロマトグラム



b) 異性体間の吸収スペクトルの比較

記号説明

- X : 保持時間 (min)
Y : レスポンス (mAU)

凡例

- X 保持時間 (min)
Y レスポンス (mV)
1 BCR
2 β-カロテン
(新設)

図 B.2-2 ウンシュウミカン抽出物

HPLC 条件

HPLC 条件は 7.5.1 によるほか、次による。

a) カラム : Inertsil® ODS-3²⁾

2) Inertsil®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。

(新設)

Z : 波長 (nm)

1 : BCR の all-trans 体ピーク (X=3.7 min)

2 : BCR の cis 体ショルダーピーク (X=3.9 min)

3 : all-trans 体の吸収スペクトル

4 : cis 体の吸収スペクトル (325 nm~350 nm に特徴的な吸収ピーク)

注記 HPLC 条件は **8.5.1** によるほか、カラムは TSKgel® ODS-120A 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—異性体の検出例

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”を参考にした。
- [2] **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。
- [3] Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure Appl. Chem.*, 1995, **67**(2), p. 331–343.
- [4] Matsumoto, H., et al., Effect of Postharvest Temperature and Ethylene on Carotenoid Accumulation in the Flavedo and Juice Sacs of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Fruit, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**(11), p. 4724–4732.
- [5] 熊谷雅孝ら, ウンシュウミカン中の β-クリプトキサンチン測定法の室間共同試験による妥当性確認, *日本食品科学工学会誌*, 2016, **63**(10), p. 450–454.
- [6] 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。
- [7] 食品表示基準について (平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号消費者庁次長通知) 別添 栄養表示関係
- [8] Bauernfeind, J. C., Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors, ACADEMIC PRESS, United States of America, 1981, p.893.
- [9] Goodwin, T. W. ed., *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2nd ed., ACADEMIC PRESS,

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)
- (新設)
- (新設)
- (新設)
- [2] Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure Appl. Chem.*, 1995, **67**(2), p. 331–343
- [3] Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Nakajima, N., Hasegawa, Y., Effect of Postharvest Temperature and Ethylene on Carotenoid Accumulation in the Flavedo and Juice Sacs of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Fruit, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**(11), p. 4724–4732
- [4] 熊谷雅孝, 門倉雅史, 水田賢司, 田中真澄, 生駒吉識, 鈴木忠直, 安井明美, ウンシュウミカン中の β-クリプトキサンチン測定法の室間共同試験による妥当性確認, *日本食品科学工学会誌*, 2016, **63**(10), p. 450–454.
- [5] 内藤成弘, 塚越芳樹, データの統計的取り扱い, *食糧*, 2008, **46**, p. 27–62
(新設)
- [6] 食品表示基準について (平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号消費者庁次長通知) 別添 栄養表示関係
- [7] Bauernfeind, J. C., Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors, ACADEMIC PRESS, United States of America, 1981, p.893
(新設)

London/New York, 1976, p. 98-101.