

JAS
0008

日本農林規格
JAPANESE AGRICULTURAL
STANDARD

ほうれんそう中のルテインの定量
－高速液体クロマトグラフ法

Determination of the lutein in spinach
－High performance liquid chromatographic method

2019年 1月 31日 制定

2024年 7月 31日 改正

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	測定原理	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	けん化	7
8.2	ルテインの回収	7
8.3	溶解	8
8.4	測定	8
9	計算	9
9.1	一般事項	9
9.2	定量	9
9.3	結果の表現	9
10	精度	9
10.1	試験室間共同実験	9
10.2	併行精度	9
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) 典型的な HPLC クロマトグラム	12
	附属書 C (参考) ルテインの精製手順	14
	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5条において準用する同法第4条第1項の規定に基づき、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）から、日本農林規格原案を添えて日本農林規格を改正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、農林水産大臣が改正した日本農林規格である。これによって、**JAS 0008:2019**は改正され、この規格に置き換えられた。

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。

ほうれんそう中のルテインの定量

—高速液体クロマトグラフ法

Determination of the lutein in spinach

—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、ほうれんそう (*Spinacia oleracea* L.) (生鮮のもの及びブランチングして凍結しただけのものに限る。以下同じ。) 中に含まれるルテイ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。

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—Part 2: 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）

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 8101 エタノール (99.5) (試薬)

JIS K 8150 塩化ナトリウム (試薬)

JIS K 8359 酢酸アンモニウム (試薬)

JIS K 8361 酢酸エチル (試薬)

JIS K 8574 水酸化カリウム (試薬)

JIS K 8780 ピロガロール (試薬)

JIS K 8848 ヘキサン (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

ピロガロール含有エタノールを加えて粉碎したほうれんそうを試験用試料とし、これを水酸化カリウムでけん化する。けん化試料からヘキサン酢酸エチル混合液によってルテインを回収し、試料抽出物を得る。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。）を用いて試料抽出物中のルテインを測定する。

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 ルテイン

95.0%以上の純度のもの

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 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

5.6 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

5.7 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

5.8 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

5.9 メタノール

HPLC 用のもの

5.10 アセトニトリル

HPLC用のもの

5.11 エタノール (HPLC 用)

HPLC用のもの

5.12 酢酸アンモニウム

JIS K 8359 に規定する特級又は同等以上の品質のもの

5.13 窒素

99.5%以上の純度のもの

5.14 2,6-ジ-*tert*-ブチル-*p*-クレゾール, BHT

98%以上の純度のもの

5.15 ピロガロール含有エタノール

エタノール 1.0 L 当りにピロガロール 30 g を溶解する (用時調製する)。

5.16 水酸化カリウム溶液

水 100 mL 当りに水酸化カリウム 60 g を溶解する。

警告 刺激性のミストが発生するので、ドラフト内等の換気のよい場所で作業を行う。

5.17 塩化ナトリウム溶液

水 1.0 L 当りに塩化ナトリウム 10 g を溶解する。

5.18 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。

5.19 BHT 含有エタノール

エタノール (HPLC 用) 1.0 L 当りに BHT 1.0 g を溶解する。

5.20 HPLC 移動相

5.20.1 移動相 A 酢酸アンモニウム含有アセトニトリル/メタノール混合液

メタノール 1.0 L 当りに酢酸アンモニウム 5.0 g を溶解する。この溶液とアセトニトリルとを 4 : 15 (体積比) で混合する。使用前に脱気する。

注記 脱気することによって、気泡のトラブルを未然に防ぎ、安定した流量及びバックグラウンドが得られる。

5.20.2 移動相 B エタノール

エタノール (HPLC 用) を使用前に脱気する。

注記 脱気することによって、気泡のトラブルを未然に防ぎ、安定した流量及びバックグラウンドが得られる。

5.21 ルテイン標準原液

ルテインを約 100 µg/mL の濃度で含む溶液となるようにエタノール (HPLC 用) で調製し、ルテイン標準原液とする。溶液を複数の蓋付き瓶に小分けし、密封、遮光して -20 °C 以下で保存する。

注記 ルテインは、酸素又は光によって、分解又は異性化しやすいため、調製後のルテイン標準原液は、濃度が徐々に低下することがある。

使用前に室温に戻し、よく混合する。

5.22 標準液

5.22.1 一般事項

濃度測定用溶液 (5.22.2 参照) 及び一連の標準液 (5.22.3 参照) は、調製の都度、ルテイン標準原液を小分けした蓋付き瓶の 1 つから調製する。ルテイン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。

5.22.2 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、ルテイン標準原液をエタノールで 50 倍に希釈し、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では、ルテイン標準原液 0.200 mL をピストン式ピペットではかりとり、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。エタノールを対照試料として、濃度測定用溶液の 445 nm の吸光度を測定する。次の式によってルテイン標準原液のルテイン濃度 ρ を求める。5.22.3 の操作も同日に行う。

$$\rho = \frac{A \times V_1 \times 10\,000}{\epsilon \times V_2}$$

ここで、
 ρ : ルテイン標準原液のルテイン濃度 (µg/mL)
 A : 濃度測定用溶液の 445 nm における吸光度 (エタノール, 光路長 1 cm)
 ϵ : 濃度 1 %, 光路長 1 cm におけるルテインの吸光係数であり 2 550 [6]
 V_1 : 使用した全量フラスコの呼び容量 (mL)
 V_2 : 採取したルテイン標準原液の容量 (mL)

5.22.3 一連の標準液

全量ピペット又はピストン式ピペットを用い、ルテイン標準原液を希釈用容器にはかりとる。このルテイン標準原液に窒素を穏やかに吹き付け、エタノールを揮発させる。希釈用容器内の内容物を BHT 含有エタノールを用いて完全に溶解し、標準液とする。

注記 1 附属書 A に示す試験室間共同実験では、希釈用容器内の内容物を完全に溶解させるため、BHT 含有エタノールを加えた後、試験管ミキサーで 10 秒程度混合した。

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。次の式によって、標準液ごとのルテイン濃度 ρ_i を求める。調製した日に 8.4.2 の操作を行う。

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

ここで、
 ρ_i : i 段階目の標準液のルテイン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 ρ : 5.22.2 で得られたルテイン標準原液のルテイン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 V_3 : 採取したルテイン標準原液の容量 (mL)
 V_4 : 加えた BHT 含有エタノールの容量 (mL)

注記 2 約 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ～約 20 $\mu\text{g/mL}$ 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。

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 程度のガラス製又はポリプロピレン製で、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 $400 \times g$ 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、有機溶剤及び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

相対遠心加速度 $400 \times g$ で遠心分離ができるもの

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。

6.5 全量フラスコ

ISO 1042 に規定するクラス A のもので、濃度測定用溶液の希釈 (5.22.2 参照) 及び試料抽出物の溶解 (8.3 参照) の操作に適した容量のもの

6.6 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 (5.22 参照) の操作に適した容量のもの

6.7 ピストン式ピペット

ISO 8655-2 に規定する容量可変で空気置換式 (type A) のもので、標準液の希釈 (5.22 参照) の操作に適した容量のもの

6.8 恒温水槽

(70±3) °C に温度設定が可能なもので、遠心管立てが入る大きさのもの

6.9 希釈用容器

褐色のガラス製で、一連の標準液の希釈 (5.22.3 参照) の操作に適した容量のもの

6.10 なす形フラスコ

褐色の容量 100 mL の共通すり合わせなす形フラスコ等で、使用するロータリーエバポレーターに装着可能で、かつ、減圧濃縮に利用可能なもの

6.11 ロータリーエバポレーター

水浴と減圧装置を備え、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール等の溶媒を減圧留去できるもの

6.12 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

6.13 バイアル

使用する HPLC に適合し、褐色のもので、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

6.14 分光光度計

JIS K 0115 に規定する、吸収セルを固定できる吸収セルホルダーを備え、445 nm における吸光度を測定できるもの

6.15 吸収セル

光路長が 1 cm で、石英製又はガラス製のもの。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

6.16 HPLC 装置

6.16.1 HPLC

JIS K 0124 に規定する、2 液混合ステップワイズ溶離又は移動相の切り替えができる移動相送液部、温度制御機能をもつカラムオープン、445 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

6.16.2 HPLC 用カラム

次の特性をもつ C30 (トリアコンチル) 逆相カラム

- 長さ : 250 mm
- 内径 : 4.6 mm
- 粒子径 : 5 µm

- 15 分以内にルテインが溶出するもの。8.4 に従ってルテインの溶出時間及びルテインのピークに他のピークが重なっていないことを確認する。

ガードカラムを使用する場合は、測定に用いるカラムに対応するものを使用する。

7 試験用試料の調製

7.1 一般事項

酸化によるルテインの分解を抑えるため、ピロガロール含有エタノールを加えてほうれんそうを粉砕することによって、試験用試料を調製する。調製の手順は7.2による。

7.2 調製の手順

7.2.1 生鮮ほうれんそうは、根部を除去した後に細切り、粉砕用容器（例えば、ホモジナイザーカップ等）にはかりとる。ブランチングして凍結しただけのほうれんそうは、そのまま粉砕用容器にはかりとる。ほうれんそうの質量を、3桁以上の有効数字で記録する。

7.2.2 はかりとったほうれんそうの約3倍量の質量のピロガロール含有エタノールを粉砕用容器に加える。加えた溶液の質量を、3桁以上の有効数字で記録する。ホモジナイザー等を用いて粉砕し、これを試験用試料とする。

7.2.3 直ちに8.1の操作を行うか、又は試験用試料を密栓できる容器に保存する。試験用試料を保存する場合は、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褐色ガラス製の密栓できる容器に入れ、これを -20°C 以下で保存する。保存した試験用試料は、使用前に室温に戻し、よく混合する。

注記 -30°C ～ -20°C で保存された試験用試料は、少なくとも6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 けん化

8.1.1 試験用試料約2gを10mg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10mLを加える。

8.1.2 水酸化カリウム溶液1mL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、遠心管を室温まで放冷又は冷却し、けん化試料とする。

8.2 ルテインの回収

8.2.1 塩化ナトリウム溶液20mLとヘキサン/酢酸エチル混合液12mLを8.1.2のけん化試料に加え、振り混ぜる。

8.2.2 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 $400\times g$ 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。

8.2.3 遠心管に残った液にヘキサン/酢酸エチル混合液12mLを加える。8.2.2の操作を繰り返す。上層を8.2.2のなす形フラスコに合わせる。

8.2.4 8.2.3の操作を繰り返す。

8.2.5 ロータリーエバポレーターを用い、**8.2.4** 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。

8.3 溶解

BHT 含有エタノールを用い、**8.2.5** のなす形フラスコの乾固残留物を完全に溶解する。その溶液を BHT 含有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 附属書 A に示す試験室間共同実験では、10 mL 容の全量フラスコを使用した。

この全量フラスコに BHT 含有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 (**8.4.2** 参照) を行うか、又は試料抽出物を -20 °C 以下で保存する。

注記 2 -30 °C ~ -20 °C で保存された試料抽出物は、少なくとも 12 日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、測定前に室温に戻し、十分に振り混ぜる。

8.4 測定

8.4.1 HPLC 条件の設定

装置の取扱説明書に従って、HPLC 装置の条件を次のように設定する。

- a) 移動相の流量 : 1.0 mL/min
- b) カラムの設定温度 : 40 °C
- c) 検出波長 : 445 nm
- d) 注入量 : 10 µL
- e) 溶離条件 : 試料抽出物の注入から 15 分間は、移動相 A については 95%、移動相 B については 5% 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 については 95%、移動相 B については 5% と再設定して、次の注入の前の約 10 分間、平衡化する。ルテインが他の成分から適切に分離できれば、溶出時間、平衡化時間及び移動相の体積比率を変更してもよい。

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験では、表 1 に示すステップワイズ溶離条件、又はあらかじめ移動相 A 及び B を表 1 に示す体積比率になるように混合し、それぞれを表 1 に示す時間に従い送液する条件を用いた。

表 1—ステップワイズ溶離条件

時間 (分)	移動相 A (体積比率%)	移動相 B (体積比率%)
0~15	95	5
15~30	5	95
30~40	95	5

8.4.2 HPLC 測定

全体のシステムを安定化する。設定した HPLC 条件 (**8.4.1** 参照) で作動させた際、ベースラインの変動がルテイン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。

8.4.3 同定

試料抽出物について、同じ HPLC 条件 (8.4.1 参照) 下での標準液のクロマトグラムから得られたルテインの保持時間と一致したピークを、ルテインと同定する。

注記 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

ルテインの量は、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ルテインのピーク面積を得る。各標準液のルテイン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。

各試料抽出物中のルテインのピーク面積から検量線を用いてルテイン濃度を算出する。ほうれんそう中のルテイン含有量 w_i は、次の式によって与えられる。

$$w_i = \frac{C \times V_5}{W \times \frac{W_{sp}}{W_{sp} + W_{et}}}$$

ここで、
 w_i : ほうれんそう中のルテイン含有量 (mg/kg)
 C : 試料抽出物のルテイン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
 V_5 : 溶解 (8.3 参照) 時の定容量 (mL)
 W : 試験用試料の採取量 (8.1.1 参照) (g)
 W_{sp} : 試験用試料調製 (7.2.1 参照) 時のほうれんそう採取量 (g)
 W_{et} : 試験用試料調製 (7.2.2 参照) 時に加えたピロガロール含有エタノールの質量 (g)

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験では、 V_5 は 10 を用いた。

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 (65 mg/kg ~ 1.5×10^2 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) [2] 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[1]。

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) [2]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[1]。

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

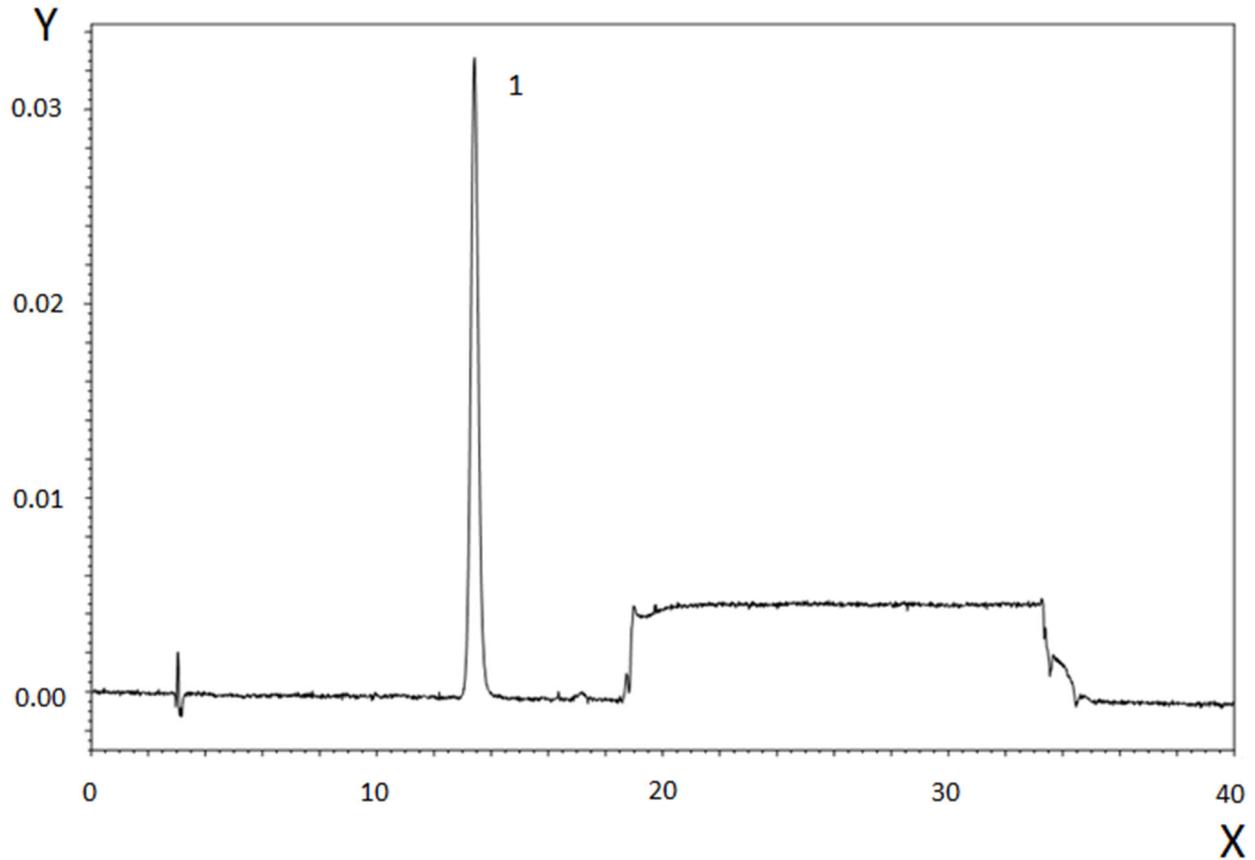
試験室間共同実験は、平成 29 年に IUPAC 共同実験ガイドライン[3]に従って日本国内で行われ、表 A.1 に示す統計結果が得られた[4]。市販のほうれんそう及びちぢみほうれんそう並びにほ場から収穫されたちぢみほうれんそうの根部を除去し、細切した試料約 50 g に、試料質量の 3 倍のピロガロール含有エタノールを抗酸化剤として加えて、粉碎機を用いて 5 000 rpm で 5 分間粉碎した。

粉碎物について均質性[5]を確認し、試験用試料とした。ルテイン標準原液には、調製後の濃度低下を避けるため、附属書 C に示す手順で精製したルテインを使用した。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、ルテイン標準原液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	12	12	12	12	12
採択された試験結果の数	10	11	12	12	12
ルテイン含有量の平均値, mg/kg	64.9	71.8	89	118.6	150.0
併行標準偏差 s_p , mg/kg	3.3	3.6	6.7	4.8	5.1
併行相対標準偏差 RSD _p , %	5.1	5.0	7.5	4.1	3.4
併行許容差 $r(r=2.8 s_p)$, mg/kg	9.2	10	19	13	14
室間再現標準偏差 s_R , mg/kg	3.6	5.4	12	7.5	6.8
室間再現相対標準偏差 RSD _R , %	5.6	7.5	13	6.4	4.6
室間再現許容差 $R(R=2.8 s_R)$, mg/kg	10	15	33	21	19

附属書 B
(参考)
典型的な HPLC クロマトグラム



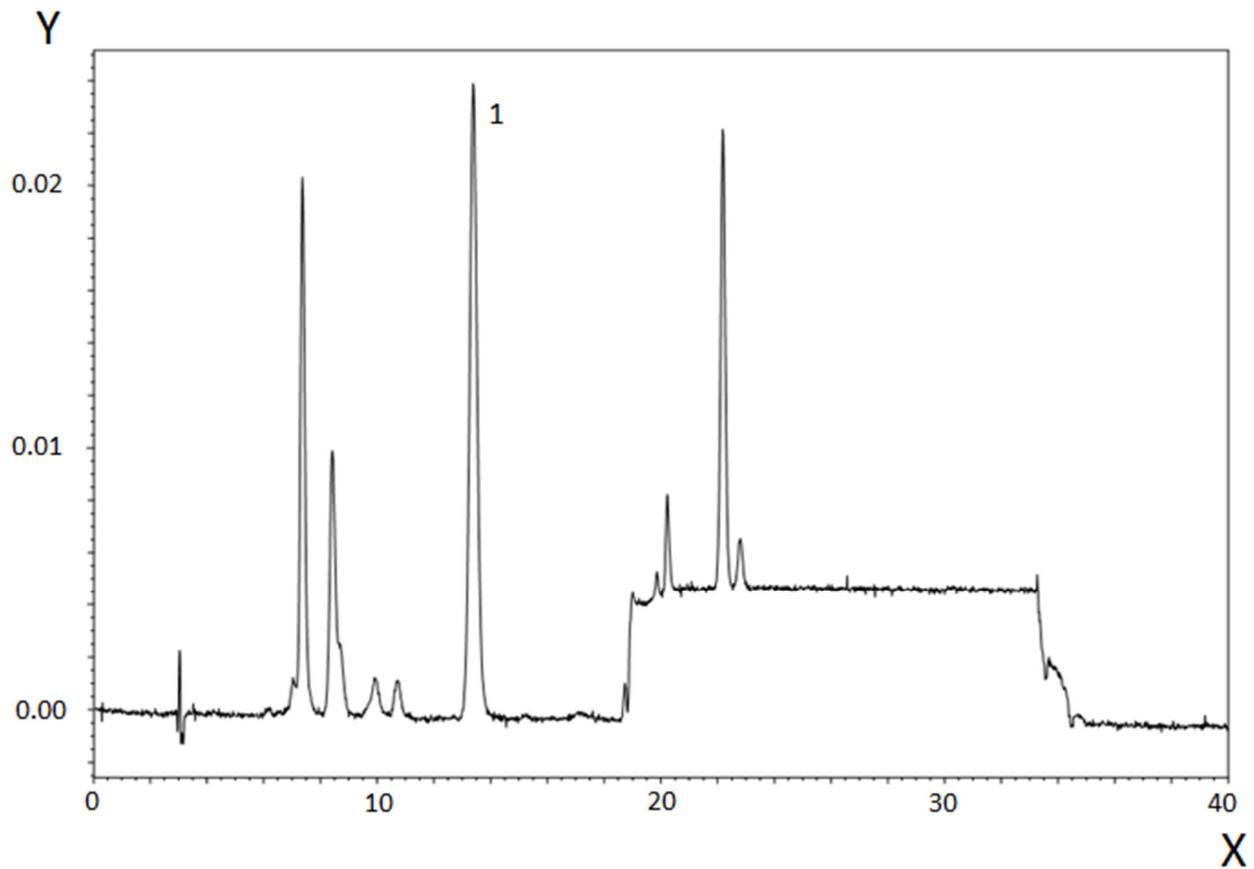
記号説明

- X : 保持時間 (min)
- Y : レスポンス (AU)
- 1 : ルテイン

注記1 HPLC 条件は 8.4.1 によるほか、ステップワイス溶離条件は、表 1 による。カラムは YMC® Carotenoid 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。

注記2 18 分及び 33 分付近のベースラインの変動は、移動相の切り替えによるものである。ベースラインが高くなる場合もあれば、低くなる場合もある。

図 B.1—ルテイン標準液 (4.4 µg/mL 相当)



記号説明

- X : 保持時間 (min)
- Y : レスポンス (AU)
- 1 : ルテイン

注記 HPLC 条件は 8.4.1 によるほか、ステップワイス溶離条件は、表 1 による。カラムは YMC® Carotenoid 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—試料抽出物

附属書 C (参考) ルテインの精製手順

C.1 一般

附属書 A に示す試験室間共同実験で使用したルテインについては、カラムクロマトグラフィーによる精製を行ったことから、その精製手順について記載する。

C.2 試薬

試薬は、次による。

- a) 充填剤 粒径約 150 μm ~425 μm のシリカゲルで、カラムクロマトグラフィー用のもの
- b) ルテイン 5.2 による。
- c) アセトン JIS K 8034 に規定する特級又は同等以上の品質のもの
- d) ヘキサン 5.7 による。
- e) 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
- f) 酢酸エチル 5.8 による。
- g) 窒素 5.13 による。
- h) 溶離液 A ヘキサン/酢酸エチル 9 : 1 (体積比) 混合液 5.18 による。
- i) 溶離液 B ヘキサン/酢酸エチル 7 : 3 (体積比) 混合液 ヘキサンと酢酸エチルとを 7 : 3 (体積比) で混合する。
- j) 溶離液 C ヘキサン/酢酸エチル 6 : 4 (体積比) 混合液 ヘキサンと酢酸エチルとを 6 : 4 (体積比) で混合する。

C.3 器具及び装置

器具及び装置は、次による。

- a) クロマトグラフィー管 内径 15 mm~20 mm 程度、長さ 30 cm 以上のガラス製で、出口側にコックが付属しているもの
- b) ウール グラスウール又は脱脂綿で、クロマトグラフィー管の出口側に詰めることによって、充填剤の流出を防ぐことが可能なもの
- c) なす形フラスコ 6.10 による。
- d) ロータリーエバポレーター 6.11 による。

C.4 操作

操作は、次による。

- a) ウールを詰めたクロマトグラフィー管に、充填剤約 10 g と少量のヘキサンとを混合して入れる。
- b) ルテインをアセトンに溶解させ、a) のクロマトグラフィー管に入れる。ルテインを溶解させたアセトンに少量の充填剤を混ぜ、アセトンを揮発させたものをクロマトグラフィー管に入れてもよい。
- c) 硫酸ナトリウム約 3 g を b) のクロマトグラフィー管に入れる。
- d) 溶離液 A 100 mL, 溶離液 B 100 mL, 溶離液 C 100 mL, 酢酸エチル 100 mL の順にクロマトグラフィー管を洗浄し、橙色の溶出液をなす形フラスコで受ける。
注記 溶出液は無色、黄色、橙色、黄色の順に変化する。
- e) ロータリーエバポレーターを用いて、なす形フラスコの有機溶媒を 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下でほとんど減圧留去する。窒素を穏やかに吹き付け乾固する。

参考文献

- [1] **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。
- [2] **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。
- [3] Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, 1995, **67**(2), p. 331–343.
- [4] Sonoda, T., et al., Validation of a Method for Quantification of Lutein in Spinach Using High-Performance Liquid Chromatography: Interlaboratory Study *J. AOAC Int.*, 2020, **103**(4), p 1073-1080.
- [5] 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。
- [6] Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. ed., *Carotenoids handbook*, Birkhauser Verlag, Basel/Boston/Berlin, 2004
注記 ルテインの吸光係数について、参考文献中の“MAIN LIST 133(Lutein) Spectroscopic data”を参考にした。
- [7] **JIS K 8034** アセトン（試薬）
- [8] **JIS K 8987** 硫酸ナトリウム（試薬）

制定等の履歴

制 定 平成31年 1月31日農林水産省告示第 181号
改 正 令和元年 6月27日農林水産省告示第 475号
最終改正 令和 6年 7月31日農林水産省告示第1484号

制定文、改正文、附則等（抄）

- 令和 6年 7月 31日農林水産省告示第 1484号
令和 6年 8月 30日から施行する。