

JAS
0009

日本農林規格
JAPANESE AGRICULTURAL
STANDARD

生鮮トマト中のリコペンの定量
－吸光光度法

Determination of the lycopene in raw tomato
－Spectrophotometric 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	1
5 試薬	2
6 装置及び器具	2
7 試験用試料の調製	3
8 手順	3
8.1 一般事項	3
8.2 抽出	3
8.3 希釈	5
8.4 測定	5
9 計算	5
9.1 定量	5
9.2 結果の表現	6
10 精度	6
10.1 試験室間共同実験	6
10.2 併行精度	6
10.3 室間再現精度	6
11 品質管理	6
12 試験報告書	6
附属書 A (参考) 試験室間共同実験の結果	7
参考文献	8

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 0009:2019**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。

生鮮トマト中のリコペンの定量 —吸光光度法

Determination of the lycopene in raw tomato —Spectrophotometric 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、赤色の熟したトマト (*Solanum lycopersicum*) (生果) 中に含まれるリコペンの測定のための吸光光度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）

JIS K 0115 吸光光度分析通則

JIS K 0557 用水・排水の試験に用いる水

JIS K 8034 アセトン（試薬）

JIS K 8848 ヘキサン（試薬）

JIS K 8891 メタノール（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

試験用試料をメタノールで洗浄してβ-カロテンを除去した後、ヘキサン/アセトン混合液でリコペンを抽出する。試料抽出液を希釈し、測定溶液を得る。分光光度計を用いて測定溶液中のリコペンを測定する。

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 A2 以上の品質のもの

5.2 ろ過助剤

融剤焼成品けい藻土。分析を妨害する成分が溶出しないもの

5.3 メタノール

JIS K 8891 に規定する特級又は同等以上の品質のもの

5.4 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

5.5 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

5.6 ヘキサン/アセトン混合液

ヘキサンとアセトンとを、9 : 1 (体積比) で混合する。

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

10 mg の桁の精度ではかる機能をもつもの

6.2 ビーカー

容量 20 mL 程度のガラス製のもの

6.3 ガラスろ過器

ブフナー型で、ろ過板直径 30 mm 程度、細孔径 16 μm ~ 40 μm 程度のもの

6.4 ガラス棒

ガラスろ過器上で試料等を混ぜる又は押し固める際に取り扱いやすい長さ及び太さのもの

6.5 減圧ろ過装置

ガラスろ過器及び抽出の操作で用いる全量フラスコを設置可能なろ過鐘に減圧装置（例えば、アスピレーター）を接続したもの

6.6 全量フラスコ

ISO 1042 に規定するクラス A の褐色のもので、抽出及び希釈の操作に適した容量のもの

6.7 全量ピペット

ISO 648 に規定するクラス A のもので、希釈の操作に適した容量のもの

6.8 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、472 nm における吸光度を測定できるもの

6.9 吸収セル

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

6.10 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 0.45 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有機溶剤に耐性のあるもの

7 試験用試料の調製

試料のへたを除去した後、ホモジナイザー等を用いて粉碎したものを試験用試料とする。直ちに 8.2 の操作を行うか、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、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調製後速やかにガラス製の密栓できる容器に入れる。冷凍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 褐色ガラス容器に入れて、 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ～ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存された試験用試料は、少なくとも 4 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 一般事項

光によるリコペンの分解を避けるため、直射日光及び人為的な強い光の当たらない場所で操作を行うことが望ましい。

8.2 抽出

8.2.1 一般事項

吸引ろ過時に、ガラスろ過器の目詰まり、減圧ろ過装置の吸引力が弱い等の理由によってガラス棒でろ過助剤を押

し固められない場合、試料抽出液 (8.2.4.6 参照) に水が混入して 2 相に分離し、正確に定容することが困難になるため、8.2.2.1 に規定する操作が可能な装置及び器具を使用する。また、8.2.2.3~8.2.4.6 の操作は、中断せずに迅速に行う。

8.2.2 抽出の準備

8.2.2.1 ガラスろ過器を減圧ろ過装置に取り付け、少量の水でろ過器のガラスフィルターを湿らせる。ろ過助剤をガラスろ過器に加え、ガラスろ過器の 8 分目まで水を加える。ガラス棒でよくかき混ぜた後に吸引ろ過する。ろ過助剤をガラス棒で押し固めて 5 mm~8 mm のろ過助剤層を形成する。減圧ろ過装置は常圧に戻す。

8.2.2.2 調製した試験用試料 (箇条 7 参照) をよくかき混ぜ、約 5 g を 10 mg の桁までビーカーにはかりとる。複数の試験用試料を採取するなど、8.2.2.3 の操作を行うまでに時間を要する場合は、試験用試料は遮光する (例えば、ビーカーにアルミホイルをかける) ことが望ましい。

8.2.2.3 はかりとった試験用試料に、ろ過助剤を 8.2.2.1 でガラスろ過器に加えた量の 1/2~同量程度加え、ガラス棒でかき混ぜる。これを、ろ過助剤混合試料とする。

8.2.2.4 ろ過助剤混合試料を 8.2.2.1 のガラスろ過器に加える。ビーカーの残さを少量の水ですすいでガラスろ過器に加え、ろ過助剤混合試料の全量をガラスろ過器に負荷する。

8.2.2.5 ガラスろ過器の 8 分目まで水を加え、ろ過助剤混合試料をガラス棒でよくかき混ぜる。この時、8.2.2.1 で形成したろ過助剤層を崩さないようにする。

8.2.2.6 吸引ろ過してろ液を廃棄する。ろ過助剤混合試料をガラス棒で押し固めてろ過助剤混合試料層を形成する。減圧ろ過装置は速やかに常圧に戻す。

注記 吸引ろ過時間が長いほど、酸素によるリコペンの分解が促進され、値が減少する可能性がある。

8.2.3 β -カロテンの除去

8.2.3.1 メタノール約 10 mL をガラスろ過器の壁面を洗いながら加え、ガラス棒で上層 (ろ過助剤混合試料層) をかき混ぜる。この時、8.2.2.1 で形成した下層 (ろ過助剤層) を崩さないようにする。

8.2.3.2 1 分間静置した後に吸引ろ過してろ液を廃棄する。かき混ぜたろ過助剤混合試料をガラス棒で押し固めてろ過助剤混合試料層を再形成する。減圧ろ過装置は速やかに常圧に戻す。

8.2.3.3 8.2.3.1 及び 8.2.3.2 の操作を更に 2 回繰り返す。

注記 8.2.3.1~8.2.3.3 の操作を行うことで、試料中の β -カロテンのほぼ全量が除去されることが確認されている[4]。

8.2.4 リコペンの抽出

8.2.4.1 50 mL 容の全量フラスコを減圧ろ過装置に設置する。

8.2.4.2 ヘキサン/アセトン混合液約 10 mL をガラスろ過器の壁面を洗いながら加え、ガラス棒で上層 (ろ過助剤混合試料層) 及び下層 (ろ過助剤層) 両方をかき混ぜる。

8.2.4.3 吸引ろ過してろ液を全量フラスコに採取する。8.2.4.2 でかき混ぜたろ過助剤及び試料をガラス棒で押し固める。減圧ろ過装置は速やかに常圧に戻す。

8.2.4.4 8.2.4.2 及び 8.2.4.3 の操作を更に 3 回繰り返す。

8.2.4.5 ヘキサン/アセトン混合液約 5 mL をガラスろ過器の壁面を洗いながら加え、直ちに吸引ろ過する。ろ過後は減圧ろ過装置を速やかに常圧に戻す。

8.2.4.6 全量フラスコを減圧ろ過装置から取り出す。室温に戻した後にヘキサン/アセトン混合液で定容し、よく振り混ぜ試料抽出液とする。調製した日に希釈及び分光光度計による測定を行うか、又は試料抽出液をガラス製の密栓できる容器に入れて-20 °C 以下で保存する。-20 °C 以下で保存した試料抽出液を使用する場合は、使用前に室温に戻し、よく混合する。

注記 褐色ガラス容器に入れて-30 °C~-20 °C で保存された試料抽出液は、少なくとも 5 日間安定した状態を保つことが確認されている。

8.3 希釈

全量フラスコ及び全量ピペットを用い、試料抽出液 (**8.2.4.6** 参照) をヘキサン/アセトン混合液で 5 倍に希釈する。希釈溶液をメンブランフィルターでろ過し、測定溶液とする。**8.4** の操作を行うまで、測定溶液は遮光することが望ましい。

8.4 測定

8.4.1 一般事項

測定溶液の吸光度が 0.2 未満又は 1 より大きい場合は、希釈倍率を変更して再度測定溶液を調製し、測定する。

8.4.2 分光光度計条件の設定

装置の取扱説明書に従って、分光光度計の条件を設定する。測定波長は 472 nm に設定する。

8.4.3 分光光度計による測定

8.4.3.1 対照試料としてヘキサン/アセトン混合液を入れた吸収セルを分光光度計の光路に置き、吸光度を 0 に合わせる。

8.4.3.2 測定溶液 (**8.3** 参照) で吸収セルを 2 回共洗った後、測定溶液を吸収セルに入れる。

8.4.3.3 測定溶液を入れた吸収セルを分光光度計の光路に置き、吸光度を測定する。

9 計算

9.1 定量

試験用試料中のリコペン含有量 w は、次の式によって与えられる。

$$w = \frac{A \times V \times d \times 10^4}{E \times l \times m}$$

ここで、
 w : 試験用試料中のリコペン含有量 (mg/kg)
 A : 測定溶液の吸光度
 V : 抽出 (**8.2.4** 参照) 時の定容量 (mL)
 d : 希釈時 (**8.3** 参照) の希釈倍率
 E : 濃度 1 %, 光路長 1 cm におけるリコペンの吸光係数, 3 450[7]

l : 吸収セルの光路長 (cm)

m : 試験用試料の採取量 (g)

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験では、 V は 50、 d は試料によって 5 又は 10 を用いた。

9.2 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 (39 mg/kg ~ 1.7×10^2 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 30 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]。提供された及び市販のトマトのへたを除去し、その試料質量の 3 %に相当する量のピロガロール [5]を抗酸化剤として加えて粉碎した。

粉碎物について均質性[6]を確認し、試験用試料とした。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、手順書及び試験用試料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 12 試験用試料（6 濃度の非明示試料を各 2 点）を試験した。

注記 リコペンは光、酸素、試料に含まれる酵素等によって分解することから、試験室間共同実験中のリコペン含有量の安定性を確保するため、試験用試料調製時に抗酸化剤を添加した。

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	試料 6
参加試験室数	10	10	10	10	10	10
採択された試験結果の数	9	9	9	10	10	10
リコペン含有量の平均値, mg/kg	38.57	45.6	61.9	97.2	118.7	168.8
併行標準偏差 s_p , mg/kg	0.48	0.67	1.2	2.7	2.2	5.1
併行相対標準偏差 RSD _p , %	1.2	1.5	2.0	2.7	1.9	3.0
併行許容差 $r(r=2.8 s_p)$, mg/kg	1.3	1.9	3.5	7.5	6.2	14
室間再現標準偏差 s_R , mg/kg	0.94	1.9	2.5	3.8	4.5	5.8
室間再現相対標準偏差 RSD _R , %	2.4	4.2	4.1	3.9	3.8	3.4
室間再現許容差 $R(R=2.8 s_R)$, mg/kg	2.6	5.4	7.1	11	13	16

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] Kakubari, S., et al., Determination of Lycopene Concentration in Fresh Tomatoes by Spectrophotometry: A Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, 2020, **103**(6), p 1619-1624.
- [5] **JIS K 8780** ピロガロール（試薬）
- [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] Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. ed., *Carotenoids handbook*, Birkhauser Verlag, Basel/Boston/Berlin, 2004
注記 リコペンの吸光係数について、参考文献中の“MAIN LIST 31(Lycopene) Spectroscopic data”を参考にした。

制定等の履歴

制 定 平成31年 1月31日農林水産省告示第 182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1485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 1485号

令和 6年 8月 30日から施行する。