

資料 4－2

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の日本農林規格の一部を改正する件 新旧対照表
○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の日本農林規格（平成 31 年 1 月 31 日農林水産省告示第 181 号）

（下線部分は改正部分）

改正後	改正前
日本農林規格 JAS 0008 : <u>20XX</u> 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 －<u>High performance</u> liquid chromatographic method 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。 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） 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） ISO 8655-2, Piston-operated volumetric apparatus－Part 2: <u>Pipettes</u> <u>注記 3</u> 対応日本産業規格：JIS K 0970 ピストン式ビペット（MOD） （略） （削る。） （略） （削る。） （削る。） 3 用語及び定義 <u>この規格には、定義する用語はない。</u> 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 <u>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。</u>紫外可視吸光度検出器付き高速液体クロマトグラフ <u>（以下“HPLC”という。）</u>を用いて <u>試料抽出物中のルテインを測定する。</u> 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<u>利用者</u>の責任である。	日本農林規格 JAS 0008 : <u>2019</u> 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 －<u>High-performance</u> liquid chromatographic method 2 引用規格 次に掲げる規格は、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<u>規定の一部を構成する</u>。これらの引用規格は、最新版（追補を含む。）を適用する。 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） 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） ISO 8655-2 Piston-operated volumetric apparatus－Part 2: <u>Piston pipettes</u> <u>注記</u> 対応日本産業規格：JIS K 0970 ピストン式ビペット（MOD） （略） JIS K 8034 <u>アセトン（試薬）</u> （略） JIS K 8891 <u>メタノール（試薬）</u> JIS K 8987 <u>硫酸ナトリウム（試薬）</u> （新設） 3 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<u>試料</u>を水酸化カリウムでけん化する。<u>ルテインをヘキサン/酢酸エチル混合液によって抽出する。</u>紫外可視吸光度検出器付き高速液体クロマトグラフ <u>（以下、HPLC という。）</u>を用いて<u>抽出物中のルテインを測定する。</u> 4 試薬 他に規定のない限り、分析用と認められた試薬<u>だけ</u>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<u>使用者</u>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

(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 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

(略)

5.10 アセトニトリル

(略)

5.11 エタノール (HPLC 用)

(略)

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

(略)

5.14 2,6-ジ-*tert*-ブチル-*p*-クレゾール, BHT

(略)

5.15 ピロガロール含有エタノール

エタノール 1.0 L 当わりにピロガロール 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 当わ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 当わ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 当わりに BHT 1.0 g を溶解する。

5.20 HPLC 移動相

4.1 水

JIS K 0557 が規定する A3 以上の品質のもの。

4.2 ルテイン

(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。

4.5 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。

4.6 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。

4.7 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。

4.8 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。

4.9 メタノール

(略)

4.10 アセトニトリル

(略)

4.11 エタノール (HPLC 用)

(略)

4.12 酢酸アンモニウム

JIS K 8359 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。

4.13 窒素

(略)

4.14 2,6-ジ-*tert*-ブチル-*p*-クレゾール (以下, BHT という。)

(略)

4.15 ピロガロール含有エタノール

エタノール (4.3) 1.0 L 当わりにピロガロール (4.4) 30 g を溶解する (用時調製する)。

4.16 水酸化カリウム溶液

水 (4.1) 100 mL 当わりに水酸化カリウム (4.5) 60 g を溶解する。

警告 刺激性の ガス 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。

4.17 塩化ナトリウム溶液

水 (4.1) 1.0 L 当わりに塩化ナトリウム (4.6) 10 g を溶解する。

4.18 ヘキサン/酢酸エチル混合液

ヘキサン (4.7) と酢酸エチル (4.8) とを, 9 : 1 (体積比) で混合する。

4.19 BHT 含有エタノール

エタノール (HPLC 用) (4.11) 1.0 L 当わりに BHT (4.14) 1.0 g を溶解する。

4.20 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 当た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を 4 : 15（体積比）で混合する。使用前に脱気する。

注記 （略）

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 （略）

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℃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て、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。

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

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 2550[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）

（削る。）

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て、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

4.20.1 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 (4.9) 1.0 L 当たりに酢酸アンモニウム (4.12) 5.0 g を溶解する。この溶液とアセトニトリル (4.10) を 4 : 15（体積比）で混合する。使用前に脱気する。

注記 （略）

4.20.2 移動相 B エタノール

エタノール（HPLC 用）(4.11) を使用前に脱気する。

注記 （略）

4.21 ルテイン標準原液

エタノール（HPLC 用）(4.11) 中にルテイン (4.2) を 100 µg/mL の濃度で含む溶液を調製する。溶液を蓋付き瓶に移し、遮光して－20℃以下で保存する。

注記 ルテインは劣化しやすいため、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。

使用前に冷凍庫から取り出し、常温に戻した後に振り混ぜる。

4.22 標準液

4.22.1 一般事項

ルテインの標準液を 4 段階以上の濃度に調製する。濃度測定用溶液 (4.22.2) 及び 4.22.3 で規定されている一連の標準液は、ルテイン標準原液 (4.21) の蓋付き瓶の 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。標準原液の残りは捨て、再保存しない。

4.22.2 濃度測定用溶液

全量ピペット (5.6) 又はピストン式ピペット (5.7) 及び全量フラスコ (5.5) を用いて、ルテイン標準原液 (4.21) をエタノール (4.3) 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 の全量フラスコに移した。

装置の説明書等に従って、分光光度計 (5.14) の条件設定及び操作を行う。エタノールを対照液として、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 (µg/mL) を求める。

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

ここに、

A : 濃度測定用溶液の 445 nm における吸光度（エタノール、1 cm セル）

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 2550^[5]

V_1 : 使用した全量フラスコの容量（mL）

V_2 : 採取したルテイン標準原液の容量（mL）

注記 附属書 A に示す試験室間共同実験では、 V_1 は 10、 V_2 は 0.200 を用いた。

求めた後、直ちに 4.22.3 の操作を行う。

4.22.3 一連の標準液

全量ピペット (5.6) 又はピストン式ピペット (5.7) を用いて、ルテイン標準原液 (4.21) をガラス製容器 (5.9) にはかりとる。このルテイン標準原液に窒素 (4.13) を穏やかに吹き付け、エタノールを

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 (μg/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 (μg/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 μg/mL 〜 約 20 μg/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、次に由る。

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

(略)

警告 (略)

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

(略)

揮発させる。ガラス製容器内の内容物を BHT 含有エタノール (4.19) を用いて完全に溶解する。

注記 1 附属書 A に示す試験室間共同実験では、試験管ミキサーで 10 秒程度混合した。

調製した各標準液をバイアル (5.13) に入れる。次の式によって、各標準液の濃度 ρ_i (μg/mL) を求める。

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

ここに、
 ρ : ルテイン標準原液 (4.21) の濃度 (μg/mL)
 V_3 : 採取したルテイン標準原液 (**4.21**) の容量 (mL)
 V_4 : 採取した BHT 含有エタノール (4.19) の容量 (mL)

注記 2 附属書 A に示す試験室間共同実験では、約 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20 μg/mL の標準液を調製した。

調製した日に 7.4.2 の操作を行う。

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もつもので、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 程度のガラス製又はポリプロピレン製で、蓋付きのものとし、十分な振とうに必要な空間を保持でき、相対遠心加速度 $400 \times g$ 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であること。

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 全量フラスコ

ISO 1042 が規定するクラス A のもので、標準溶液の希釈と抽出物の溶解の操作に適した容量のもの。

5.6 全量ピペット

ISO 648 が規定するクラス A のもので、標準溶液の希釈の操作に適した容量のもの。

5.7 ピストン式ピペット

ISO 8655-2 が規定する容量可変で空気置換式 (type A) のピストン式ピペットで、標準溶液の希釈の操作に適した容量のもの。

5.8 恒温水槽

(略)

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

(略)

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。

(略)

ー 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。

(略)

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碎することによって、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し、粉碎用容器 (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、そのまま粉碎用容器 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。

5.9 ガラス製容器

褐色で、標準溶液 の希釈の操作に適した容量のもの。

5.10 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 (5.11) に装着可能で、かつ、減圧濃縮に利用可能なもの。

5.11 ロータリーエバポレーター

(略)

5.12 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 0.20 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。

5.13 バイアル

使用する HPLC 装置 (5.16) に適合し、褐色のもの。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。

5.14 分光光度計

吸収セル (5.15) 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。

5.15 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を用いる。

5.16 HPLC 装置

5.16.1 HPLC

JIS K 0124 が規定する送液ポンプ (2 液混合グラジエントが可能なもの又は手動で送液ラインの切り替えができるもの)、サーモスタット制御のカラム槽、445 nm が設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たもの。

5.16.2 HPLC 用カラム

次の特性を持つ C30 (トリアコンチル) 逆相カラム。

(略)

ー 15 分以内にルテインが溶出するもの。7.4 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。

(略)

6 試験用試料の調製

(新設)

(新設)

6.1 生鮮ほうれんそうは、根部を除去した後に細切し、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、そのまま容器にはかりとる。試料 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碎用容器に加える。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碎し、これを試験用試料とする。

(削る。)

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℃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℃～-20℃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℃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×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て、**8.2.4**のなす形フラスコの有機溶媒を40℃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て、**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 (略)

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℃以下で保存する。

注記2 (略)

-30℃～-20℃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。

6.2 **6.1**ではかりとった試料の3倍量の質量のピロガロール含有エタノール**(4.15)**を**6.1**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。

6.3 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。

6.4 直ちに**7.1**の操作を行う又は試験用試料を-20℃以下で保存する。試験用試料を-20℃以下で保存する場合は、試験用試料の全量又は均質となるようかくはんした一部を調製後速やかに褐色ガラス製の密栓容器に入れる。-20℃以下で保存した試験用試料を使用前に冷凍庫から取り出し、常温に戻し、よく混合する。

注記 -30℃～-20℃で保存された試験用試料は、少なくとも6ヶ月間安定した状態を保つことが確認されている。

7 手順

7.1 けん化

7.1.1 試験用試料(**箇条6**)約2gを10mgの桁まで遠心管**(5.2)**にはかりとる。ピロガロール含有エタノール**(4.15)**10mLを加える。

7.1.2 水酸化カリウム溶液**(4.16)**1.0mLを加える。穏やかに振り混ぜる。遠心管を70℃に設定した恒温水槽**(5.8)**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。遠心管を室温まで放冷又は冷却する。

7.2 ルテインの回収

7.2.1 塩化ナトリウム溶液**(4.17)**20mLとヘキサン/酢酸エチル混合液**(4.18)**12mLを**7.1.2**の遠心管に加え、振り混ぜる。

7.2.2 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**(5.10)**に移す。

7.2.3 遠心管に残った液にヘキサン/酢酸エチル混合液**(4.18)**12mLを加える。**7.2.2**の操作を繰り返す。上層を**7.2.2**のなす形フラスコに合わせる。

7.2.4 **7.2.3**の操作を繰り返す。

7.2.5 ロータリーエバポレーター**(5.11)**を用いて、**7.2.4**のなす形フラスコの有機溶媒を40℃以下でほとんど減圧留去する。窒素**(4.13)**を穏やかに吹き付け乾固させる。

7.3 溶解

BHT含有エタノール**(4.19)**を用いて、**7.2.5**のなす形フラスコの内容物を完全に溶かす。その溶液を全量フラスコ**(5.5)**に完全に移す。

注記1 (略)

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**(5.12)**でろ過し、ろ液をバイアル**(5.13)**に回収し、これを試料抽出物とする。

調製した日にHPLC測定(**7.4.2**)を行う又は試料抽出物を-20℃以下で保存する。

注記2 (略)

-30℃～-20℃で保存した試料抽出物は、測定前に冷凍庫から取り出し、十分に振り混ぜる。

7.4 測定

7.4.1 HPLC条件の設定

装置の取扱説明書に従って、HPLC装置**(5.16)**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)・d) (略)
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。

- a) 移動相 (4.20) の流量：1.0 mL/min
b) カラム (5.16.2) の設定温度：40 °C
c)・d) (略)
e) 溶出条件：試料抽出物 (7.3) の注入から 15 分間は、移動相 A (4.20.1) については 95 %，移動相 B (4.20.2) 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2 液グラジエント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、送液ラインを手動で切り替えた条件を用いた。

表 1—2 液グラジエント条件

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

7.4.2 HPLC 測定

全体のシステムを安定化する。設定した HPLC 条件（7.4.1）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 (4.22.3) をカラムに注入し、続いて同じ量の試料抽出物 (7.3) を注入する。

7.4.3 同定

試料溶液について、同じ HPLC 条件（7.4.1）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 ほうれんそうの典型的な 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

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。

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。

8.2 定量

一連の標準液 (4.22.3) 中のそれぞれのルテインのピーク面積を得る。各標準のルテイン濃度 ($\mu\text{g/mL}$) に対してピーク面積を一次回帰して検量線を作成する。

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 ($\mu\text{g/mL}$) を算出する。ほうれんそう試料中のルテイン含有量 w_i (mg/kg) は、次の式によって与えられる。

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

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 (μg/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} ： 試験用試料調製時 (7.2.1 参照) のほうれんそう採取量 (g)
 W_{et} ： 試験用試料調製時 (7.2.2 参照) に加えたピロガロール含有エタノールの質量 (g)

注記 (略)

9.3 結果の表現 (略)

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～1.5×10² 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

(略)

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

ここに、
 C ： 試料抽出物のルテイン濃度 (μg/mL)
 V_5 ： 溶解 (7.3) 時の定容量 (mL)
 W ： 試験用試料採取量 (7.1.1) (g)
 W_{sp} ： 試験用試料調製時 (6.1) の試料採取量 (g)
 W_{et} ： 試験用試料調製時 (6.2) のピロガロール含有エタノール採取量 (g)

注記 (略)

8.3 結果の表現 (略)

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、そこで与えられた濃度範囲 (65 mg/kg～1.5×10² 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) [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]。

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) [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 質管理

試験所は、試験のための内部質管理手順をもつものとする。

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 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
(略)	(略)	(略)	(略)	(略)	(略)
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_r , mg/kg	3.3	3.6	6.7	4.8	5.1
併行相対標準偏差 RSD_r , %	5.1	5.0	7.5	4.1	3.4
併行許容差 $r(r = 2.8 s_r)$, 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 A

(参考)

試験室間共同実験の結果

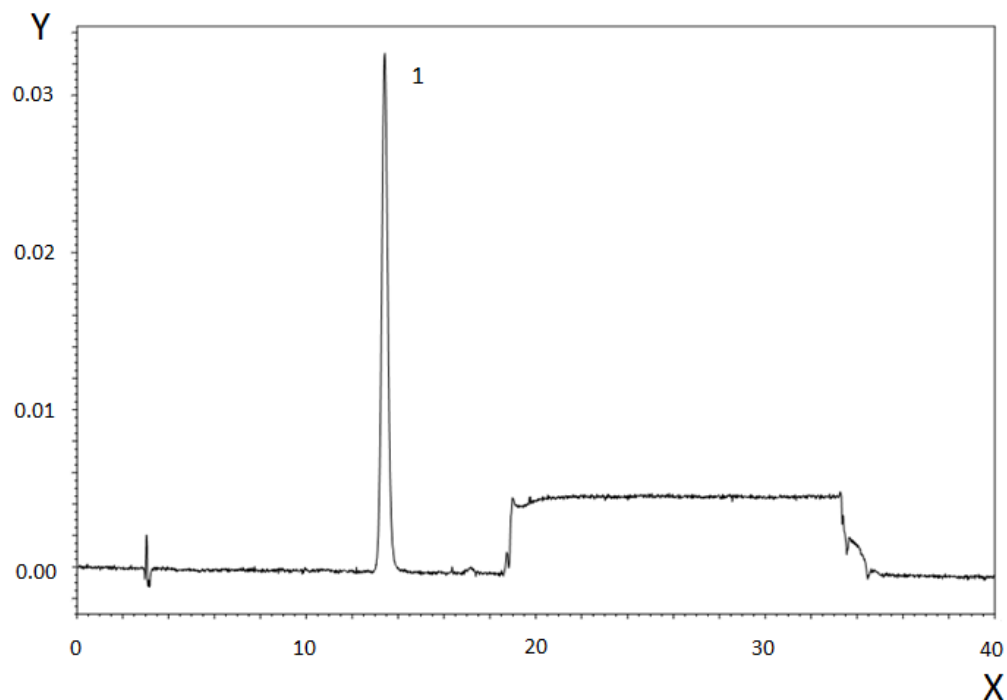
試験室間共同実験は、平成 29 年に IUPAC 共同実験ガイドライン[4]に従って国内で行われ、表 A.1 に示す統計結果が得られた。市販のほうれんそう及び縮みほうれんそう並びにほ場から収穫された縮みほうれんそうの根部を除去し、細切した試料約 50 g に、試料質量の 3 倍のピロガロール含有エタノールを抗酸化剤として加えて、粉碎機を用いて 5 000 rpm で 5 分間粉碎した。

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配付した。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
(略)	(略)	(略)	(略)	(略)	(略)
ルテイン含有量の平均値, mg/kg	64.9	71.8	88.8	119	150
併行標準偏差 s_r , mg/kg	3.3	3.6	6.7	4.8	5.1
併行相対標準偏差, %	5.1	5.0	7.5	4.1	3.4
併行許容差 $r(r = 2.8 s_r)$, 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, %	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

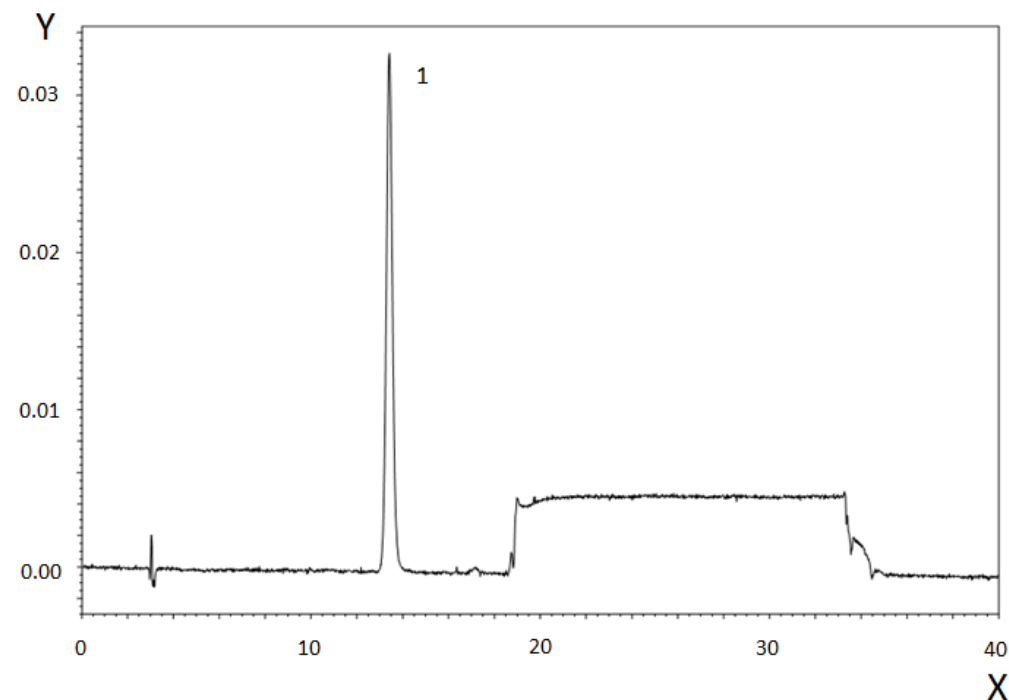
注記 1 HPLC 条件は 8.4.1 によるほか、ステップワイズ溶離条件は、表 1 による。カラムは YMC® Carotenoid を用いた。なお、この情報は、この規格の利用者の便宜のために示しており、この製品を推奨するものではない。

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)

(削る。)

附属書 B
(参考)
典型的な HPLC クロマトグラム¹⁾



凡例

X 保持時間 (min)
Y レスポンス (AU)
1 ルテイン

(新設)

(新設)

図 B.1—ルテイン標準液

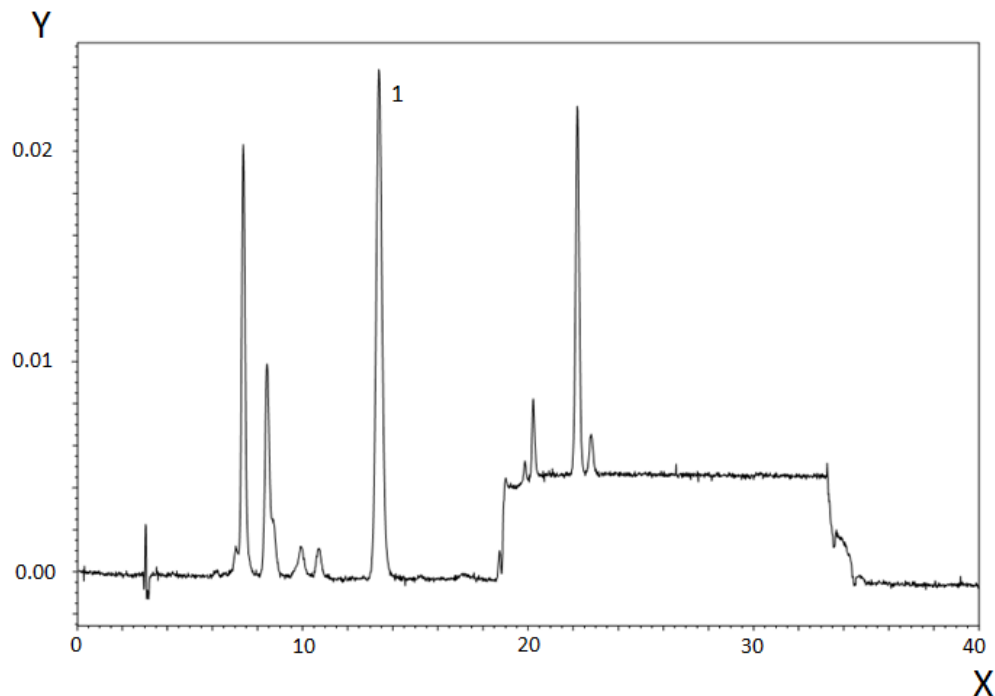
HPLC 条件

HPLC 条件は 7.4.1 によるほか、次による。

- a) カラム : YMC® Carotenoid²⁾
b) 2 液グラジエント条件 : 表 1

(削る。)

(削る。)



記号説明

X : 保持時間 (min)

Y : レスポンス (AU)

1 : ルテイン

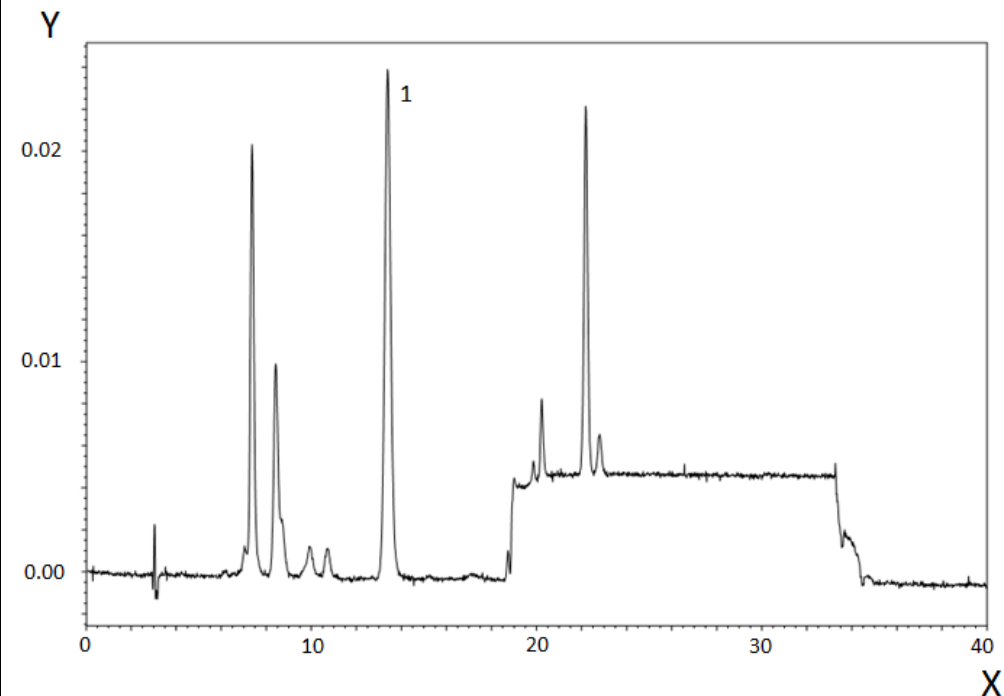
注記 HPLC 条件は 8.4.1 によるほか、ステップワイズ溶離条件は、表 1 による。カラムは YMC® Carotenoid を用いた。なお、この情報は、この規格の利用者の便宜のために示しており、この製品を推奨するものではない。

図 B.2－試料抽出物

(削る。)

1) 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。

2) YMC® Carotenoid 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。



凡例

X 保持時間 (min)

Y レスポンス (AU)

1 ルテイン

(新設)

図 B.2－ほうれんそう抽出物

HPLC 条件

HPLC 条件は 7.4.1 によるほか、次による。

a) カラム : YMC® Carotenoid

b) 2 液グラジエント条件 : 表 1

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

(略)

- a) 充填剤 (略)
- 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を 6 : 4 (体積比) で混合する。

C.3 器具及び装置

(略)

- a) (略)
- 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

(略)

- 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。

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 (4.2) 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

(略)

- a) 充填剤 (略)
- b) ルテイン 4.2 による。
- c) アセトン JIS K 8034 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。
- d) ヘキサン 4.7 による。
- e) 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。
- f) 酢酸エチル 4.8 による。
- g) 窒素 4.13 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 4.18 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 (4.7) と酢酸エチル (4.8) 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 (4.7) と酢酸エチル (4.8) を 6 : 4 (体積比) で混合する。

C.3 器具及び装置

(略)

- a) (略)
- 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 (C.3 a) の出口側に詰めて充填剤 (C.2 a) が流れ落ちないもの。
- c) なす形フラスコ 5.10 による。
- d) ロータリーエバポレーター 5.11 による。

C.4 操作

(略)

- a) ウール (C.3 b) を詰めたクロマトグラフィー管 (C.3 a) に、充填剤 (C.2 a) 約 10 g と少量のヘキサン (4.7) を混合して入れる。
- b) アセトン (C.2 c) に溶解させたルテイン (4.2) を a)のクロマトグラフィー管に入れる。ルテインのアセトン溶液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 (C.2 e) 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 (4.18) 100 mL, 溶離液 B (C.2 i) 100 mL, 溶離液 C (C.2 j) 100 mL, 酢酸エチル (C.2 f) 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

注記 (略) 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 °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<u>乾固</u>する。 参考文献 [1] <u>ISO 5725-1:1994</u>, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions 注記 1 (略) 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“<u>7.1.5</u>”を参考にした。 [2] <u>ISO 5725-6:1994</u>, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 6: Use in practice of accuracy values 注記 1 (略) 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“<u>4. 許容差の求め方</u>”を参考にした。 [3] Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, <i>Pure & Appl. Chem.</i>, 1995, 67(2), p. 331–<u>343</u>. [4] Sonoda, T., et al., Validation of a Method for Quantification of Lutein in Spinach Using High-Performance Liquid Chromatography: Interlaboratory Study <i>J. AOAC Int.</i>, 2020, 103(4), p 1073-1080. [5] <u>Thompson</u>, M., et al., The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. <i>Pure Appl.Chem.</i>, <u>2006</u>, 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“<u>3.11 Testing for sufficient homogeneity and stability</u>”を参考にした。 [6] Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. ed.,<i>Carotenoids handbook</i>, 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“<u>MAIN LIST 133(Lutein) Spectroscopic data</u>”を参考にした。 [7] <u>JIS K 8034 アセトン (試薬)</u> [8] <u>JIS K 8987 硫酸ナトリウム (試薬)</u>	(<u>5.10</u>) で受ける。 注記 (略) e) ロータリーエバポレーター (<u>5.11</u>) を用いて、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 (<u>4.13</u>) を穏やかに吹き付け<u>乾固</u>させる。 参考文献 [1] <u>ISO 5725-1:1994</u> Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions 注記 1 (略) 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「<u>7.1.5</u>」を参考にした。 [2] <u>ISO 5725-6:1994</u> Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 6: Use in practice of accuracy values 注記 1 (略) 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「<u>4. 許容差の求め方</u>」を参考にした。 [3] Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, <i>Pure & Appl. Chem.</i>, 1995, 67(2), p. 331–<u>343</u> (新設) [4] <u>Tompson</u>, M., et al., The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. <i>Pure Appl.Chem.</i> 78(1), 145-<u>196 (2006)</u> 注記 均質性の確認方法について、参考文献中の「<u>3.11 Testing for sufficient homogeneity and stability</u>」を参考にした。 [5] Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. ed.,<i>Carotenoids handbook</i>, 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「<u>MAIN LIST 133(Lutein) Spectroscopic data</u>」を参考にした。 (新設) (新設)
--	--