

JAS
0003

日本農林規格
JAPANESE AGRICULTURAL
STANDARD

うんしゅうみかん中の 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
－High performance liquid chromatographic method

2018年 3月 29日 制定
2023年 6月 28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	抽出	7
8.2	けん化	7
8.3	BCR の回収	8
8.4	溶解	8
8.5	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	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	11
	附属書 B	12
	附属書 C	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、**JAS0003:2019**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かかわる確認について、責任はもたない。

うんしゅうみかん中の 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 —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、うんしゅうみかん (*Citrus unshiu* 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。

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 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 8355 酢酸 (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 8593 石油エーテル (試薬)

JIS K 8780 ピロガロール (試薬)

JIS K 8839 2-プロパノール (試薬)

JIS K 8848 ヘキサン (試薬)

JIS K 8987 硫酸ナトリウム (試薬)

JIS K 9705 テトラヒドロフラン (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

試験用試料からエタノールによって BCR を抽出する。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。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。）を用いて試料抽出物中の BCR 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、この規格の使用者の責任である。

5.1 水

JIS K 0557 に規定する A3 以上の品質のもの。

5.2 BCR

HPLC によって純度が 99% 以上であることが確認されているもの。

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 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。

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。

5.16 石油エーテル

JIS K 8593 に規定する特級又は同等以上の品質のもの。

5.17 窒素

99.5%以上の純度のもの。

5.18 β -カロテン

90%以上の純度のもの。

5.19 ピロガロール含有エタノール

エタノール 1.0 L 当たりにはピロガロール 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 当たりには水酸化カリウム 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。

5.21 塩化ナトリウム溶液

水 1.0 L 当たりには塩化ナトリウム 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1.0L当りに *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。

5.24 BCR 標準原液

BCR を約 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 附属書 A に示す試験室間共同実験では，BCR 標準原液を $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ～ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ～ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存された BCR 標準原液は，少なくとも半年間安定した状態を保つことが確認されている。

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。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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
 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)

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

調製した日に8.5.2の操作を行う、又は -30°C ～ -20°C で保存する。

-30°C ～ -20°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。

注記2 -30°C ～ -20°C 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 $400\times g$ 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

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

(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。

6.8 なす形フラスコ

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。

6.9 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。

6.10 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 $0.2 \mu\text{m}$ 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。

- 長さ : 150 mm
- 内径 : 4.6 mm
- 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。

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

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碎し、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°C 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 $400\times g$ 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 遠心管の残さ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。

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 附属書 A に示す試験室間共同実験では 5 mL 容の全量フラスコを使用した。

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) 検出波長 : 455 nm
- d) 注入量 : 20 µL
- 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。

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、JISK0124 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_1 は、次の式によって与えられる。

$$w_1 = \frac{C \times V_3 \times d_1}{W \times d_2}$$

ここで、
 w_1 : 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_3 : 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れば、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れば、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

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 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。

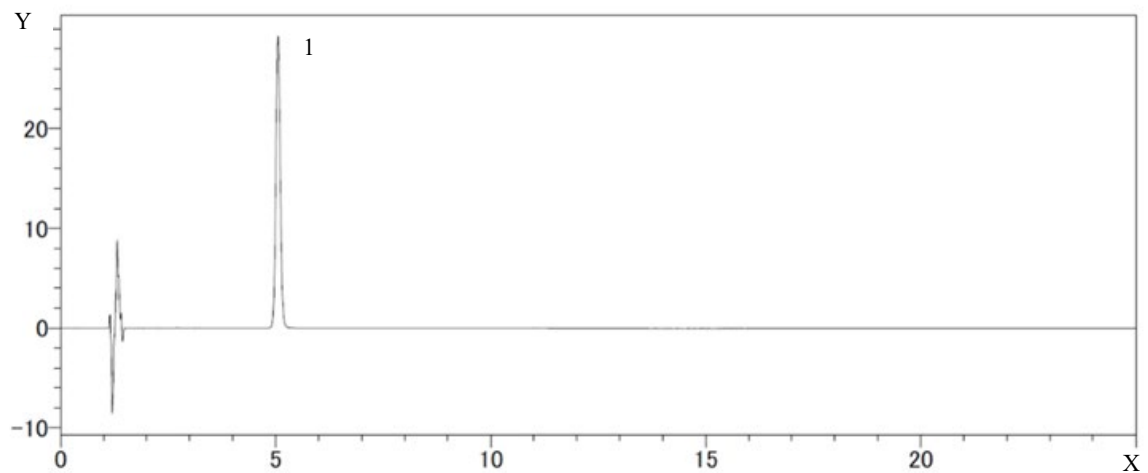
粉砕物について均質性[6]を確認し、試験試料とした。この試験室間共同実験の主催機関である独立行政法人農林水産消費安全技術センターは、手順書及び試験試料を参加試験室に配付した。各試験室は、手順書に従って、合計 10 試験試料（5 濃度の非明示試料を各 2 点）を試験した。

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
参加試験室数	11	11	11	11	11
採択された試験結果の数	10	9	9	9	10
BCR 含有量の平均値, mg/kg	4.73	6.75	10.2	13.7	23.4
併行標準偏差 s , mg/kg	0.12	0.13	0.32	0.57	0.50
併行相対標準偏差 RSD _i , %	2.6	2.0	3.1	4.2	2.1
併行許容差 r ($r=2.8 s$), 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 ($R=2.8 s_R$), 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



記号説明

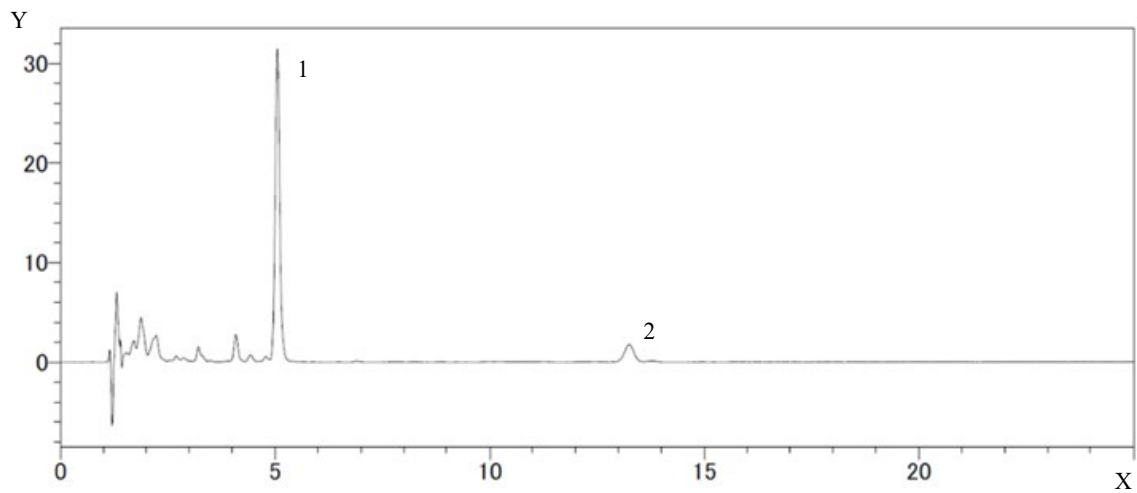
X : 保持時間 (min)

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)



記号説明

X : 保持時間 (min)

Y : レスポンス (mAU)

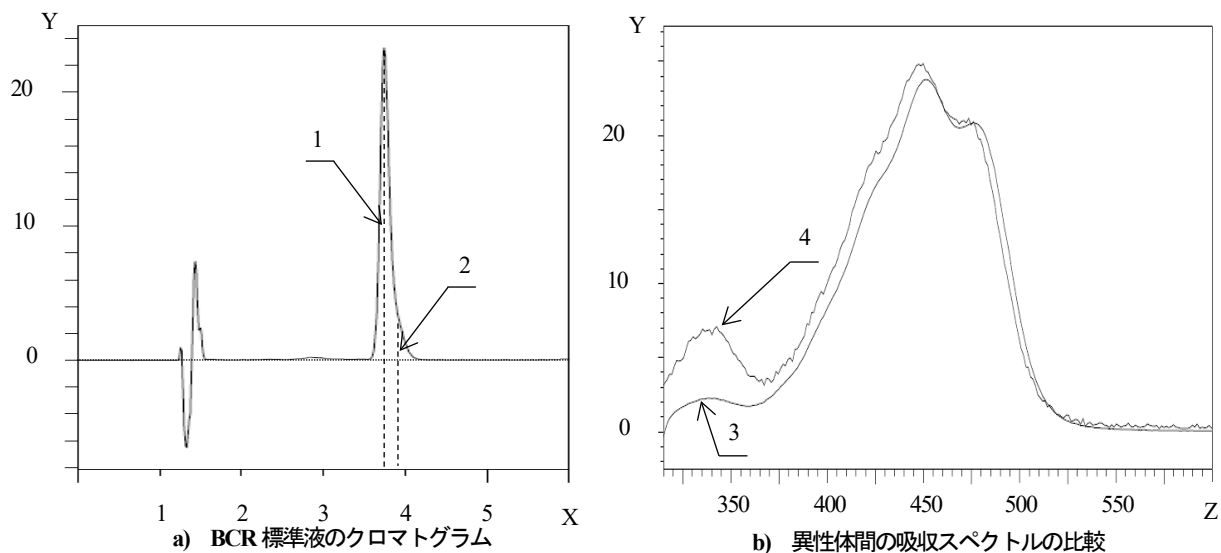
1 : BCR

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—試料抽出物

附属書 C
(参考)
BCR の異性体由来のショルダーピーク



記号説明

- X : 保持時間 (min)
- Y : レスポンス (mAU)
- 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, London/New York, 1976, p. 98-101.

制定等の履歴

制定 平成30年3月29日農林水産省告示第663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5年6月28日農林水産省告示第808号

制定文、改正文、附則等（抄）

- 令和5年6月28日農林水産省告示第808号
令和5年7月28日から施行する。