

日本農林規格

JAS
番号：2018

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（案） 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、ウンシュウミカン (*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

次に掲げる規格は、その内容の一部又は全てが、そ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。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

注記 対応日本工業規格：JIS R 3505 ガラス製体積計（MOD）

ISO 1042 Laboratory glassware — One-mark volumetric flasks

注記 対応日本工業規格：JIS R 3505 ガラス製体積計（MOD）

JIS K 0115 吸光光度分析通則

JIS K 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 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）

3 測定原理

粉碎した測定試料からエタノールによって BCR を抽出する。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不けん化物を抽出する。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。）を用いて抽出物の中の BCR を測定する。

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 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。

4.1 水 JIS K 0557 が規定する A3 以上の品質のもの。

4.2 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。

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。

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。

4.14 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。

4.15 窒素 99.5 %以上の純度のもの。

4.16 β-カロテン 90%以上の純度のもの。

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 当たりにピロガロール (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 当たりに水酸化カリウム (4.6) 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。

4.19 塩化ナトリウム溶液 濃度 1 %相当のもの。

水 (4.1) 1 L 当たりに塩化ナトリウム (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 1L 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, 冷凍保存する。

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 °C ~ -20 °C で保存した。-30 °C ~ -20 °C で冷凍保存された 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 標準原液を解凍するたびに, 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, 再凍結しない。

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 ρ_1 (µg/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 2 386^{[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 (µg/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 に示す試験室間共同実験では, 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	全量ピペットの容量 (mL)	全量フラスコの容量 (mL)	HPLC 用標準液の BCR 濃度 ($\mu\text{g/mL}$ 相当)
A	1	5	2
B	1	10	1
C	0.5	10	0.5
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。

注記 2 $-30^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ 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。

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 の桁まで量ることができるもので, 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 $400 \times g$ で遠心分離ができること。原則として, 透明のもの。PTFE 製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 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。

5.5 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 が規定するクラス A のもので, 標準溶液の希釈と抽出, 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 $(70 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ 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。

5.8 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。

- 5.9 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。
- 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 $0.20\ \mu\text{m}$ 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。
- 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、 $452\ \text{nm}$ 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 $1\ \text{cm}$ 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、 $455\ \text{nm}$ 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。
- 長さ: $150\ \text{mm}$
 - 内径: $4.6\ \text{mm}$
 - 粒径: $3\ \mu\text{m} \sim 5\ \mu\text{m}$
 - 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。
- 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。

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、常温に戻し、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^[3]。

注記 2 $-20\ ^\circ\text{C}$ 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 $2\ \text{g}$ を $0.1\ \text{mg}$ 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) $15\ \text{mL}$ 及び硫酸ナトリウム (4.5) $10\ \text{g}$ 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 $400 \times g$ 程度で 5 分間遠心分離する。上澄み液を $50\ \text{mL}$ 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 $15\ \text{mL}$ 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。

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 $400 \times g$ 程度で 5 分間遠心分離を行う。上層をなす形フラスコ (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 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。

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、測定日に常温に戻す。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) 検出波長 : 455 nm
- d) 注入量 : 20 µL
- 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。

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。

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れば平均して 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れば平均して 20 回に 1 回以下であると期待される^[1]。

10 質管理

試験所は，試験のための内部質管理手順を持つものとする。

11 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^[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。

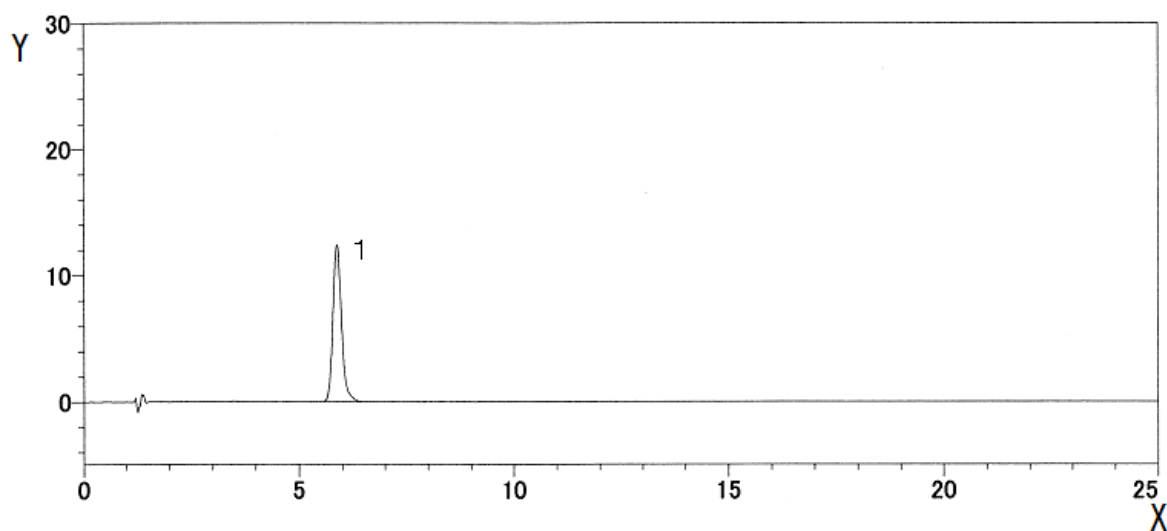
注記 カロテノイドは光、酸素、試料に含まれる酵素等によって分解することがあるため、抗酸化剤を添加した。

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。

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_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 ($r = 2.8 s_r$), 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 ($R = 2.8 s_R$), 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



凡例

X 保持時間 (min)

Y レスポンス (mV)

1 BCR

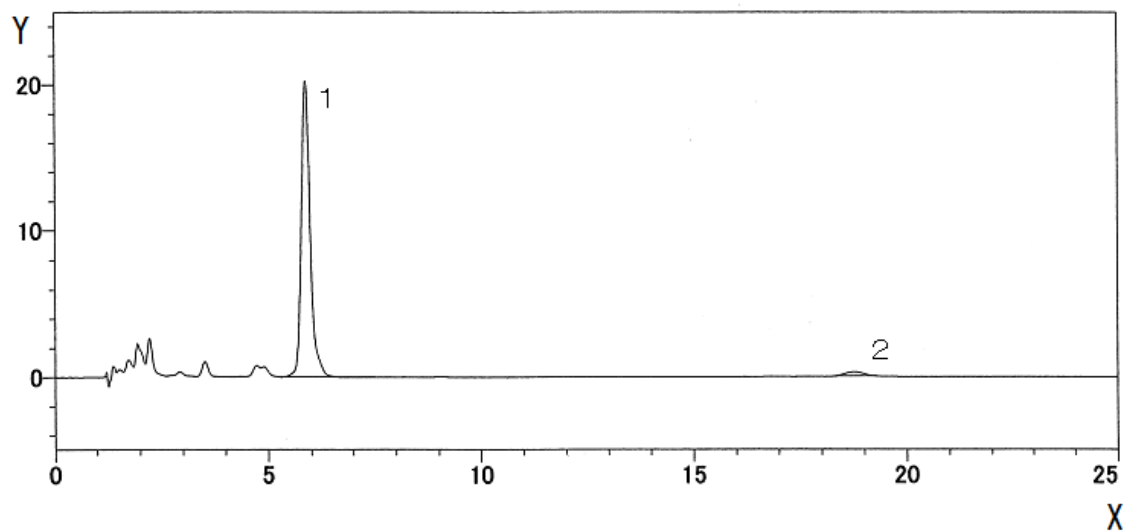
図 B.1 — BCR 標準液 B

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。



凡例

X 保持時間 (min)

Y レスポンス (mV)

1 BCR

2 β -カロテン

図 B.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。

参考文献

- [1] **ISO 5725**（規格群） Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
注記 対応日本工業規格：**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）
- [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
- [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