資料４－２

日本農林規格（案）

御意見反映版

JAS
0000：20xx

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 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　測定原理

粉砕した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。分光光度計を用いて抽出液中のリコペンを測定する。

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 A2 以上の品質のもの。

4.2　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。

4.3　メタノール

JIS K 8891 が規定する特級又は同等以上の品質のもの。

4.4　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。

4.5　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。

4.6　ヘキサン/アセトン混合液

ヘキサン（**4.4**）とアセトン（**4.5**）とを，9：1（体積比）で混合する。

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 の桁の精度で量る能力をもつ~~有する~~もの。

5.2　ビーカー

容量 20 mL 程度のガラス製のもの。

5.3　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。

5.4　ガラス棒

ガラスろ過器（**5.3**）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。

5.5　減圧ろ過装置

ガラスろ過器（**5.3**）及び抽出の操作で用いる全量フラスコ（**5.6**）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。

5.6　全量フラスコ

ISO 1042 が規定するクラス A の褐色のもので，抽出及び希釈の操作に適した~~のための~~容量の~~範囲をカバーする~~もの。

5.7　全量ピペット

ISO 648 が規定するクラス A のもので，希釈の操作に適した~~のための~~容量の~~範囲をカバーする~~もの。

5.8　分光光度計

吸収セル（**5.9**）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。

5.9　吸収セル

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。

5.10　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。

6　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砕したものを試験用試料とする。直ちに **7.2** 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，試験用試料の全量又はよくかくはんした一部を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　褐色ガラス容器に入れて，−30 °C～−20 °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。

7　手順

7.1　一般事項

光によるリコペンの分解を避けるため，操作はなるべく弱い光の下で迅速に行い，長時間光にばく露させないことが望ましい。

7.2　抽出

7.2.1　一般事項

吸引ろ過時に，ガラスろ過器（**5.3**）の目詰まり，減圧ろ過装置（**5.5**）の吸引力が弱い等の理由によりガラス棒でろ過助剤を押し固められない場合，**7.2.2.11** の操作時までろ過助剤層中に水が残り，試料抽出液（**7.2.2.15**）中に水が混入する可能性がある。その結果，試料抽出液が 2 相に分離し，**7.2.2.15** の操作で正確に定容することが困難になるため，規定の操作が可能な装置及び器具を使用すること。ただし，リコペンが酸素により分解し値が減少する可能性があるため，ろ過助剤を押し固めた後は吸引を続けないこと。

7.2.2　抽出の手順

7.2.2.1　ガラスろ過器（**5.3**）を減圧ろ過装置（**5.5**）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（**4.2**）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（**5.4**）でよくかくはんし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 から 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。

7.2.2.2　調製した試験用試料（**箇条 6**）をよくかくはんし，約 5 g を 10 mg の桁までビーカー（**5.2**）にはかりとる。

7.2.2.3　ビーカー中の試料（**7.2.2.2**）に，ろ過助剤を **7.2.2.1** 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。

7.2.2.4　試料とろ過助剤の混合物（**7.2.2.3**）をガラスろ過器（**7.2.2.1**）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，試料の全量をガラスろ過器に負荷する。

7.2.2.5　ガラスろ過器（**7.2.2.4**）の 8 分目まで水を加え，試料とろ過助剤の混合物をガラス棒でよくかくはんする。この時，**7.2.2.1** で形成したろ過助剤層を崩さないようにする。

7.2.2.6　吸引ろ過してろ液を廃棄する。ろ過助剤と試料の混合物をガラス棒で押し固めてろ過助剤/試料混合層を形成する。減圧ろ過装置は速やかに常圧に戻す。

7.2.2.7　メタノール（**4.3**）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/試料混合層）をかくはんする。この時，**7.2.2.1** で形成した下層（ろ過助剤層）を崩さないよ

うにする。

7.2.2.8 1 分間静置した後にろ液を吸引ろ過して廃棄する。上層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。

7.2.2.9 **7.2.2.7**～**7.2.2.8** の操作を更に 2 回繰り返す。

7.2.2.10 50 mL 容の全量フラスコ（**5.6**）を減圧ろ過装置に設置する。

7.2.2.11 ヘキサン/アセトン混合液（**4.6**）約 10 mL をガラスろ過器の壁面を洗いながら加える。ガラス棒で上層及び下層両方をかくはんする。

7.2.2.12 吸引ろ過してヘキサン/アセトン混合液を全量フラスコに採取する。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。

7.2.2.13 **7.2.2.11**～**7.2.2.12** の操作を更に 3 回繰り返す。

7.2.2.14 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。

7.2.2.15 全量フラスコを減圧ろ過装置から取り出す。常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（**7.3**）及び分光光度計による測定（**7.4**）を行う又は試料抽出液をガラス製の密封容器に入れて~~冷凍~~−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，冷凍庫から取り出し，常温に戻し，よく混合する。

注記 褐色ガラス容器に入れて−30 °C～−20 °C で~~冷凍~~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。

7.3 希釈

全量フラスコ（**5.6**）及び全量ピペット（**5.7**）を用いて，試料抽出液（**7.2.2.15**）をヘキサン/アセトン混合液（**4.6**）で 5 倍に希釈する。希釈溶液をメンブランフィルター（**5.10**）でろ過して，測定溶液とする。

7.4 測定

7.4.1 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。

7.4.2 分光光度計条件の設定

装置~~メーカー~~の取扱説明書に従って，分光光度計（**5.8**）の条件を設定~~セットアップ~~する。測定波長は 472 nm に設定する。

7.4.3 分光光度計による測定

7.4.3.1 対照液としてヘキサン/アセトン混合液（**4.6**）を入れた吸収セル（**5.9**）を分光光度計（**5.8**）の光路に置き，吸光度を 0 に合わせる。

7.4.3.2 測定溶液（**7.3**）で~~をメンブランフィルター（**5.10**）でろ過する。~~吸収セルを 2 回共洗いした後，吸収セルに入れる。

7.4.3.3 測定溶液を入れた吸収セル（**7.4.3.2**）を分光光度計の光路に置き，吸光度を測定する。

8 計算

8.1 定量

試料中のリコペン濃度 w（mg/kg）を次の式により算出する。

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

ここに，

A ：測定溶液の吸光度

V ：抽出（**7.2**）時の定容量（mL）~~，通常 50~~

d ：測定溶液調製時（**7.3**）の希釈倍率~~，通常 5~~

E ：濃度 1 %，光路長 1 cm におけるリコペンの吸光係数，3450[4]

l ：吸収セル（**5.9**）の光路長（cm）

m ：**7.2.2.2** の試料採取量（g）

注記　附属書 **A** に示す試験室間共同実験では，V は 50，d は試料により 5～10 を用いた。

8.2　結果の表現

有効数字 2 桁で結果を表示する。

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が行われ，その結果~~詳細~~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（39 mg/kg～1.7×10^2 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 回以下であろう~~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 回以下であろう~~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もつ~~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

この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[2]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。提供された及び市販のトマトのへたを除去しから，その試料質量の 3 %に相当する量のピロガロールを抗酸化剤として加えて粉砕した。均質な[3]試験試料が調製された。

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，試料調製時に抗酸化剤として試料質量の 3 %に相当する量のピロガロールを添加した。

粉砕物について均質性[3]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，手順書及び試験試料を参加試験室に配付した。各参加試験室は，手順書に従って，合計 12 試験試料（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	38.6	45.6	61.9	97.2	119	169
併行標準偏差 s_r, mg/kg	0.48	0.67	1.2	2.7	2.2	5.1
併行相対標準偏差, %	1.2	1.5	2.0	2.7	1.9	3.0
併行許容差 r (($r = 2.8\ s_r$)), 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, %	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**（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] 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.

[4] Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. ed.,*Carotenoids handbook*, Birkhauser Verlag, Basel/Boston/Berlin, 2004 , 31