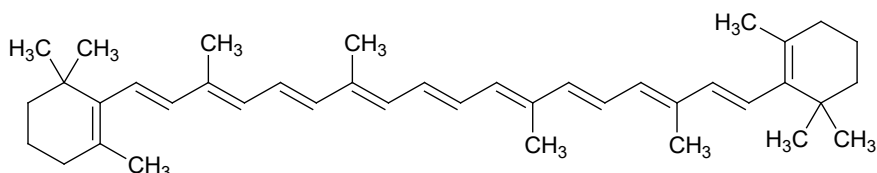


着色料

 β -カロテン β -CaroteneC₄₀H₅₆ : 536.87

1. 分析法の概要

食品中の β -カロテンは、液体クロマトグラフィーにより定量する¹⁾。食品中には天然の β -カロテンが広く分布している。したがって、定量値は食品由来と添加された β -カロテンの合計値である。(2024年改正)

2. 分析法(液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製²⁾

① 脂質を含む固形食品及び液状食品

液状食品はよく振り混ぜ、固形食品は乳鉢等で細かく粉碎した試料約2gを精密に量り、3w/v%ピロガロール・エタノール溶液³⁾10mL、60w/v%水酸化カリウム溶液1mL、水酸化カリウム1gを加え、56°Cで20分間加温する。水冷後、1w/v%塩化ナトリウム溶液15mL、2-プロパノール4mL、ヘキサン/酢酸エチル混液(9:1)15mLを入れ、激しく振り混ぜる。その後、遠心(10分間、3000回転/分)し、有機層を分液漏斗に移す。水層と沈殿物を合わせたものにヘキサン/酢酸エチル混液(9:1)15mLを加えて、再び激しく振り混ぜて遠心した後、有機層を分液漏斗に合わせる。合わせた有機層を蒸留水20mLで2回洗浄した後、減圧濃縮する。残留物を0.1w/v%BHT⁴⁾・エタノール溶液10mLに溶解し、試験溶液とする。

② 脂質の少ない液状食品

よく振り混ぜた試料約2gを精密に量り、ヘキサン/酢酸エチル混液(9:1)20mL、次いで無水硫酸ナトリウム10g⁵⁾を加え、激しく振り混ぜる。その後遠心(10分間、3000回

転／分) した後、上清を分取する。沈殿物にヘキサン／酢酸エチル混液 (9 : 1) 15mL を加えて、再び激しく振り混ぜて遠心した後、上清は、先の上清に合わせる。合わせた上清を減圧濃縮した後、残留物を 0.1w／v % BHT・エタノール溶液 10mL に溶解し、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁶⁾

β-カロテン^{7,8)} 20.0mg を量り、20mL の褐色メスフラスコに入れ、0.1w／v % BHT・THF 溶液を加えて正確に 20mL とし、標準原液とする (濃度 1000µg/mL)。標準原液 0.04、0.1、0.2、0.3、0.4 及び 0.5mL をそれぞれ正確に量り、100mL の褐色メスフラスコにそれぞれ入れ、0.1w／v % BHT・エタノール溶液⁹⁾を加えてそれぞれ正確に 100mL とし、検量線用標準溶液とする (濃度 0.4～5 µg/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件

可視吸光光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管¹⁰⁾：内径 2～4.6mm、長さ 100～150mm

移動相：50µg/mL L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有 メタノール／アセトニトリル混液 (8 : 2)

カラム温度：40℃

測定波長：455nm

流速：0.4～2.0mL／分

注入量：10µL

② 検量線¹¹⁾

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。横軸にはβ-カロテンの純度を考慮した値を用いる。

③ 定量¹²⁾

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試験溶液中のβ-カロテン濃度 (µg/mL) を求め、次式によって試料中のβ-カロテン含量 (g/kg) を計算する。

$$\beta\text{-カロテン含量 (g/kg)} = \frac{C \times V}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中のβ-カロテン濃度 (µg/mL)

V：試験溶液の量 (mL)

W：試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.002 g/kg

試薬・試液等

1. β-カロテン：食品分析用標準品
2. ピロガロール：[特級]
3. エタノール：エタノール(95) [特級]
4. 3w/v%ピロガロール・エタノール溶液：ピロガロール3gをエタノール100mLに溶かす。
5. 水酸化カリウム：[特級]
6. 塩化ナトリウム：[特級]
7. 2-プロパノール：[特級]
8. 酢酸エチル：[特級]
9. ヘキサン：[特級]
10. BHT：ジブチルヒドロキシトルエン [特級]
11. 0.1w/v%BHT・エタノール溶液：BHT1gをエタノール1000mLに溶かす。
12. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [特級]
13. THF：テトラヒドロフラン [特級]
14. 0.1w/v%BHT・THF溶液：BHT1gをTHF1000mLに溶かす。
15. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
16. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]
17. L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル：市販の純度97%以上のものを用いる。

[注]

- 1) 食品中のβ-カロテン分析法として、試料の性状を考慮し、ヘキサン、アセトン、エタノール及びトルエンの混液を使った溶媒抽出やけん化等によりβ-カロテンを抽出後、逆相系液体クロマトグラフィーにて分析する方法も提示されている^{文献1}。
- 2) β-カロテンは、光線によって分解されやすく、また空気酸化されやすいので、試料採取操作を含むすべての操作は可能な限り速やかに行うことが好ましい。
- 3) ピロガロールは、β-カロテンの分解を抑制するために用いる。
- 4) BHTは、β-カロテンの分解を抑制するために用いる。
- 5) 先に無水硫酸ナトリウムを加えると、固化してしまう。
- 6) 3濃度以上の検量線標準溶液を調製する。また、検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 7) β-カロテンは空気中で分解し易いので、純度を確認する必要がある。β-カロテンの純度試験：β-カロテン標準原液(約20mgを精密に量り、20mLに定容したもの) 1

mL を正確に量り、0.1w/v% BHT・THF 溶液で 50mL に定容後、455nm の吸光度を測定する。β-カロテンの吸光係数 ($E_{1\text{cm}}^{10\%}=2500$) を用いて標準溶液中の β-カロテンの正確な濃度を求める。

$$\beta\text{-カロテン濃度 } (\mu\text{g/mL}) = E \times 10000 / 2500$$

- 8) β-カロテンは、未開封のまま冷凍庫に保存しても劣化しやすいので、長期間置かないこと。
- 9) 酸化防止剤 BHT を 0.1% 濃度添加することにより、窒素ガス置換を行わなくても、β-カロテン検量線用標準溶液 (5 μg/mL) は 5℃ で 1 週間は変化しない。
- 10) カラムは内径を細く、長さはやや長い方が分離はよくなる。
- 11) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 12) マーガリン、キムチ、菓子、チーズおよび清涼飲料水に、β-カロテンを、0.005 又は 0.025 g/kg 添加したときの回収率は 88~114% (相対標準偏差 0.2~6.1%) (n = 3 の平均) であった。

ドーナツに、β-カロテンを、0.002 g/kg 添加した時の回収率は 94.3% (相対標準偏差 1.7%) (n = 5 の平均) であった。清涼飲料水に、β-カロテンを、0.002 g/kg 添加した時の回収率は 79.5% (相対標準偏差 4.0%) (n = 5 の平均) であった。また、調製粉乳に、β-カロテンを、0.002 g/kg 添加した時の回収率は 88.1% (相対標準偏差 2.9%) (n = 5 の平均) であった。さらにドーナツに、β-カロテンを、0.02 g/kg 添加した時の回収率は 96.8% (相対標準偏差 1.1%) (n = 5 の平均) であった。清涼飲料水に、β-カロテンを、0.02 g/kg 添加した時の回収率は 91.5% (相対標準偏差 1.8%) (n = 5 の平均) であった。また、調製粉乳に、β-カロテンを、0.02 g/kg 添加した時の回収率は 90.4% (相対標準偏差 2.0%) (n = 5 の平均) であった。

[文献]

- 1) 安井明美他編：日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂) 分析マニュアル・解説、141-147 (2023)、建帛社