

高速液体クロマトグラフィーによるはちみつ中の スクロースとツラノースの分離条件の検討

川村 沙羅楽*, 早乙女 航*, 原 裕樹*, 村井 昭夫*

Study of separation conditions of sucrose and turanose in honey by high performance liquid chromatography

KAWAMURA Sarara *, SOUTOME Wataru *, HARA Yuki * and MURAI Akio *

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, 277-0882 Japan

In the classification of honey, the tariff rate differs depending on whether or not it is natural honey that falls under the heading 04.09 of the Tariff Schedule. Therefore, it is important to analyze the content of sugars specified in the domestic classification opinions. When we analyze with HPLC according to Customs Analysis Method No.102, it is known that the peaks of sucrose and turanose, both of which are contained in honey, overlap under certain conditions. In this research, we found the conditions to separate sucrose and turanose using two types of HILIC columns and one type of mix-mode column with a combination of HILIC and ligand exchange. This research suggested the possibility of more accurate quantitative analysis of sucrose in honey.

1. 緒 言

2. 実 験

はちみつには関税率表第 04.09 項に分類される天然はちみつと、第 17.02 項に分類される砂糖等を添加し製造された人造はちみつがある。両者には税率格差があり、これらを判別することは非常に有用である。第 04.09 項に該当する天然はちみつは、国内分類例規において、しょ糖（以下、「スクロース」という。）、果糖及びぶどう糖の含有量等が規定されており、天然はちみつか否かを確認するためには、スクロース、果糖及びぶどう糖の含有量を確認する必要がある。

はちみつの分析については、税関分析法 No. 102 「はちみつの分析法」（以下、「税関分析法」という。）により定められている。スクロース、果糖及びぶどう糖の定量については、高速液体クロマトグラフィー（以下、「HPLC」という。）で測定することが税関分析法に規定されている¹⁾。HPLC に使用するカラムには例示があり、税関分析法に示された条件のもと、例示された条件に一致するカラムを使用して分析を行った結果、ツラノースとスクロースのピークが重なり合い、両者のピークが分離できない場合があることが確認されている。ツラノースは、はちみつに含まれる糖であり、スクロースの構造異性体である。はちみつのツラノース含有量は蜜源により異なるが、4.7 %程度含有するものも確認されている²⁾。

そこで本研究では、はちみつ中の糖分を定量するため、HPLC により標準試薬を用いて各糖分、特にスクロース及びツラノースの定量分析が可能な条件を検討した後、天然はちみつを用いた模擬試料によるスクロース及びツラノースのピークの分離について検討したので報告する。

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

ハンガリー産天然はちみつ（スクロースを含有しないことを事前に確認済みのもの）

2.1.2 試薬

スクロース、D-(+)-グルコース（以下、「グルコース」という。）、D-(-)-フルクトース（以下、「フルクトース」という。）、マルトースー水和物（以下、「マルトース」という。）、アセトニトリル（HPLC 用）、メタノール（HPLC 用）（以上、富士フイルム和光純薬）

D-(+)-ツラノース（以下、「ツラノース」という。）（東京化成工業）

2.2 装置

2.2.1 HPLC

装置 : LC-20 システム（島津製作所）

検出器 : 示差屈折率検出器（島津製作所）

カラム :

① COSMOSIL Sugar-D Packed Column

250 × 4.6 mm I.D., 粒径 5 µm （ナカライテスク）

② HILICpak VG-50 4E

250 × 4.6 mm I.D., 粒径 5 µm （Shodex）

③ SUGAR SZ5532

150 × 6.0 mm I.D., 粒径 6 µm （Shodex）

カラム①及び②は、親水性相互作用クロマトグラフィー（以下、「HILIC」という。）カラム、カラム③は、HILIC と配位子交換を

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

組み合わせたカラム（対イオン： Zn^{2+} ）である。

2.3 実験

2.3.1 標準試薬を用いた最適条件の検討

スクロース約 250 mg, ツラノース約 150 mg, グルコース約 1500 mg, フルクトース約 2000 mg, マルトース約 150 mg を混合し、税関分析法に従い、HPLC に用いる試料を調製した。次にカラム①～③を用いて、税関中央分析所報³⁾やアプリケーションノート^{4), 5)}等を参考に、下記に示す様々な測定条件により HPLC 分析を行い、スクロース及びツラノースのピークの分離度が 1.5 以上となり、完全分離⁶⁾する最適条件を検討した。

カラム①

条件①-I⁴⁾

カラム温度：30°C
移動相：アセトニトリル/水 = 85 / 15
流速：1.0 mL/min
試料注入量：17 μL
検出器温度：30°C

条件①-II

カラム温度：30°C
移動相：アセトニトリル/水 = 85 / 15
流速：1.0 mL/min
試料注入量：10 μL
検出器温度：30°C

条件①-III

カラム温度：40°C
移動相：アセトニトリル/水 = 85 / 15
流速：1.0 mL/min
試料注入量：10 μL
検出器温度：30°C

カラム②

条件②-I³⁾

カラム温度：60°C
移動相：アセトニトリル/アセトン/メタノール/水
= 43 / 43 / 8 / 6
流速：1.0 mL/min
試料注入量：10 μL
検出器温度：40°C

条件②-II

カラム温度：60°C
移動相：アセトニトリル/水 = 85 / 15
流速：1.0 mL/min
試料注入量：10 μL
検出器温度：60°C

条件②-III

カラム温度：60°C
移動相：アセトニトリル/水 = 87 / 13
流速：1.0 mL/min
試料注入量：10 μL
検出器温度：60°C

条件②-IV

カラム温度：60°C
移動相：アセトニトリル/水 = 9 / 1
流速：1.0 mL/min
試料注入量：10 μL
検出器温度：60°C

カラム③

条件③-I⁵⁾

カラム温度：60°C
移動相：アセトニトリル/水 = 8 / 2
流速：0.6 mL/min
試料注入量：10 μL
検出器温度：40°C

条件③-II

カラム温度：60°C
移動相：アセトニトリル/水 = 82 / 18
流速：0.6 mL/min
試料注入量：10 μL
検出器温度：60°C

条件③-III

カラム温度：60°C
移動相：アセトニトリル/水 = 83 / 17
流速：0.6 mL/min
試料注入量：10 μL
検出器温度：40°C

2.3.2 模擬試料の調製

ハンガリー産天然はちみつ 5 g に、スクロースを 5 % 程度となるよう添加し、これを模擬試料とした。模擬試料を HPLC に用いるため、税関分析法に従い試料調製を行った。

2.3.3 模擬試料を用いた分離確認

2.3.1 の検討により得られた最適条件において、2.3.2 で調製した模擬試料を用いて HPLC 分析を行い、ピークの分離度を確認した。

3. 結果及び考察

3.1 標準試薬を用いた最適条件の検討

カラム①を用いて 2.3.1 の検討を行った結果を Fig. 1 に示す。検討の結果、条件①-IIIにおいて、スクロースとツラノースのピークの完全分離が確認された。そこで条件①-IIIを最適条件として以降の実験を行った。

カラム②を用いて検討した結果を Fig. 2 に示す。条件②-III及び②-IVにおいて、スクロースとツラノースのピークの完全分離が確認されたが、条件②-IVについては、すべてのピークの確認までに 40 分以上の時間を要したため、本研究では条件②-IIIを最適条件として以降の実験を行った。

カラム③を用いて検討した結果を Fig. 3 に示す。条件③-II及び③-IIIにおいて、スクロースとツラノースのピークの完全分離が

確認されたが、条件③-IIIについてはすべてのピークの確認までに 40 分以上の時間を要したため、条件③-IIを最適条件として以降の実験を行った。

各カラムの最適条件における各糖分の保持時間を Table 1 に示す。

| Table 1 Retention time of sugar (min) | | Column | | |
|---------------------------------------|----------|--------|--------|--------|
| | | ① | ② | ③ |
| Sugar | Fructose | 8.755 | 7.978 | 13.103 |
| | Glucose | 11.658 | 10.939 | 15.433 |
| | Sucrose | 19.136 | 19.122 | 27.306 |
| | Turanose | 20.492 | 20.536 | 30.130 |
| | Maltose | 24.342 | 24.970 | 32.122 |

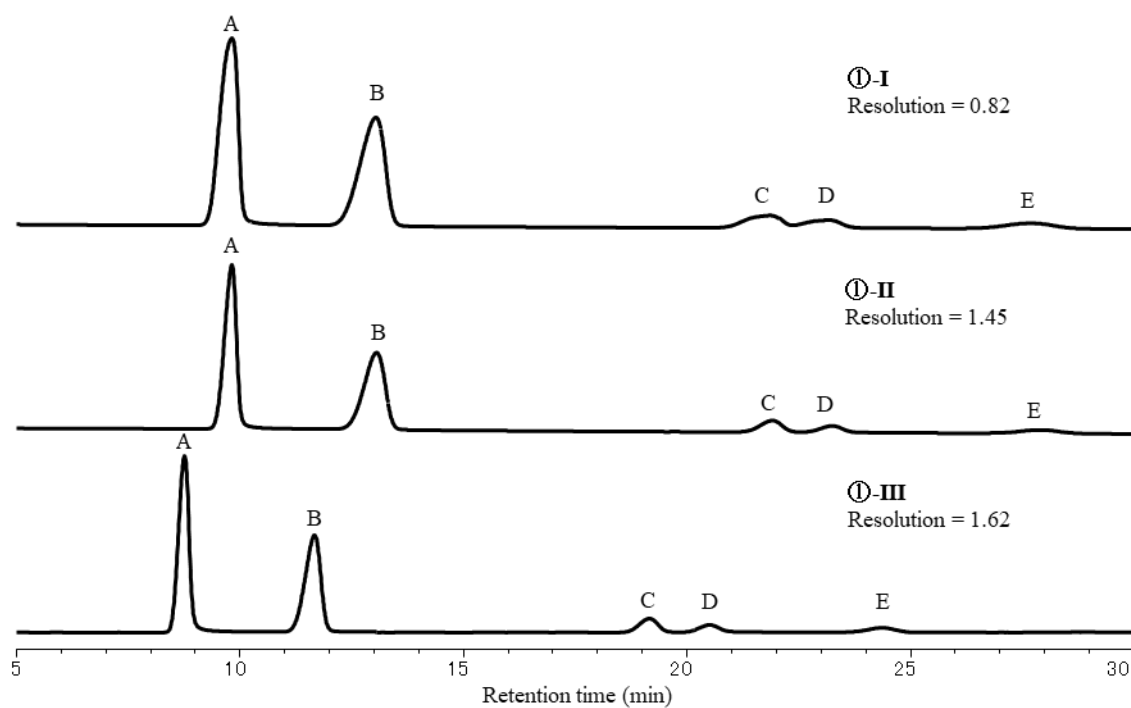


Fig. 1 Chromatogram of sugar with column①

A: Fructose, B: Glucose, C: Sucrose, D: Turanose, E: Maltose

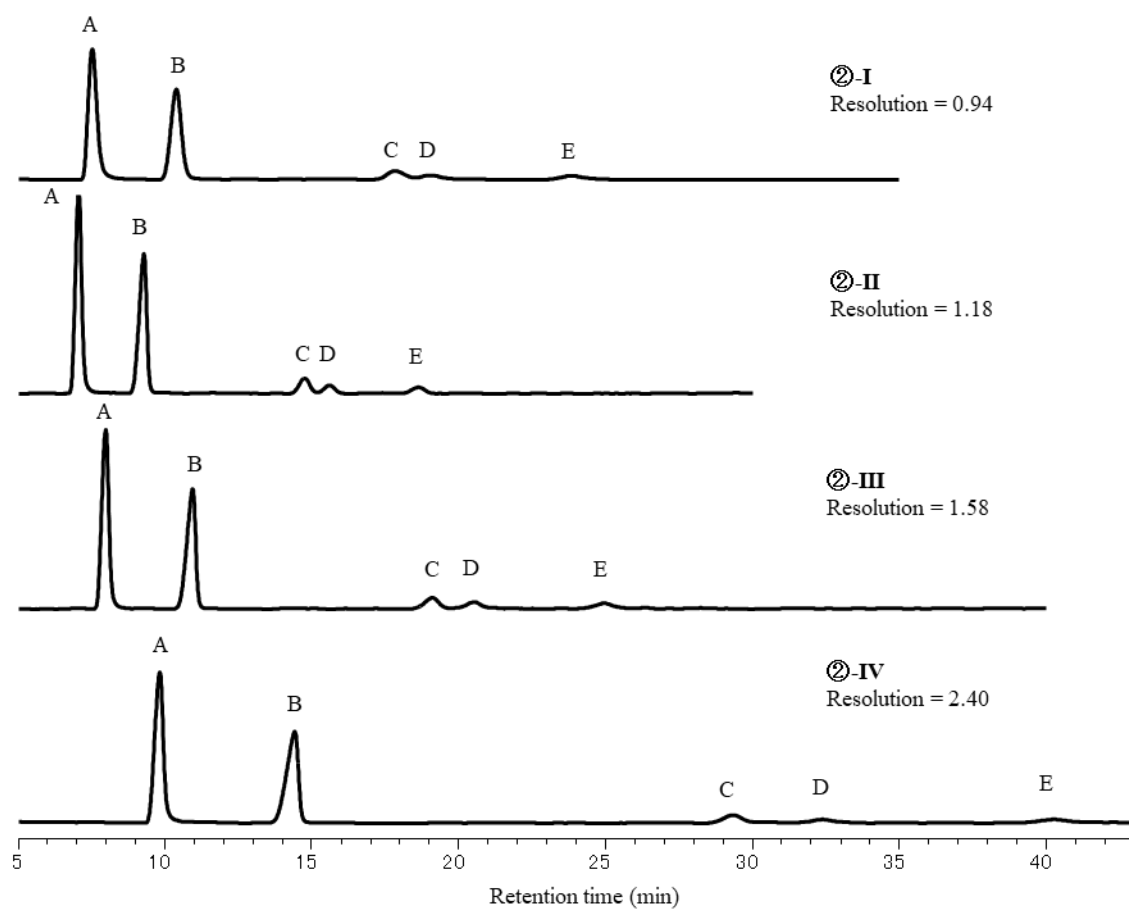


Fig. 2 Chromatogram of sugar with column②

A: Fructose, B: Glucose, C: Sucrose, D: Turanose, E: Maltose

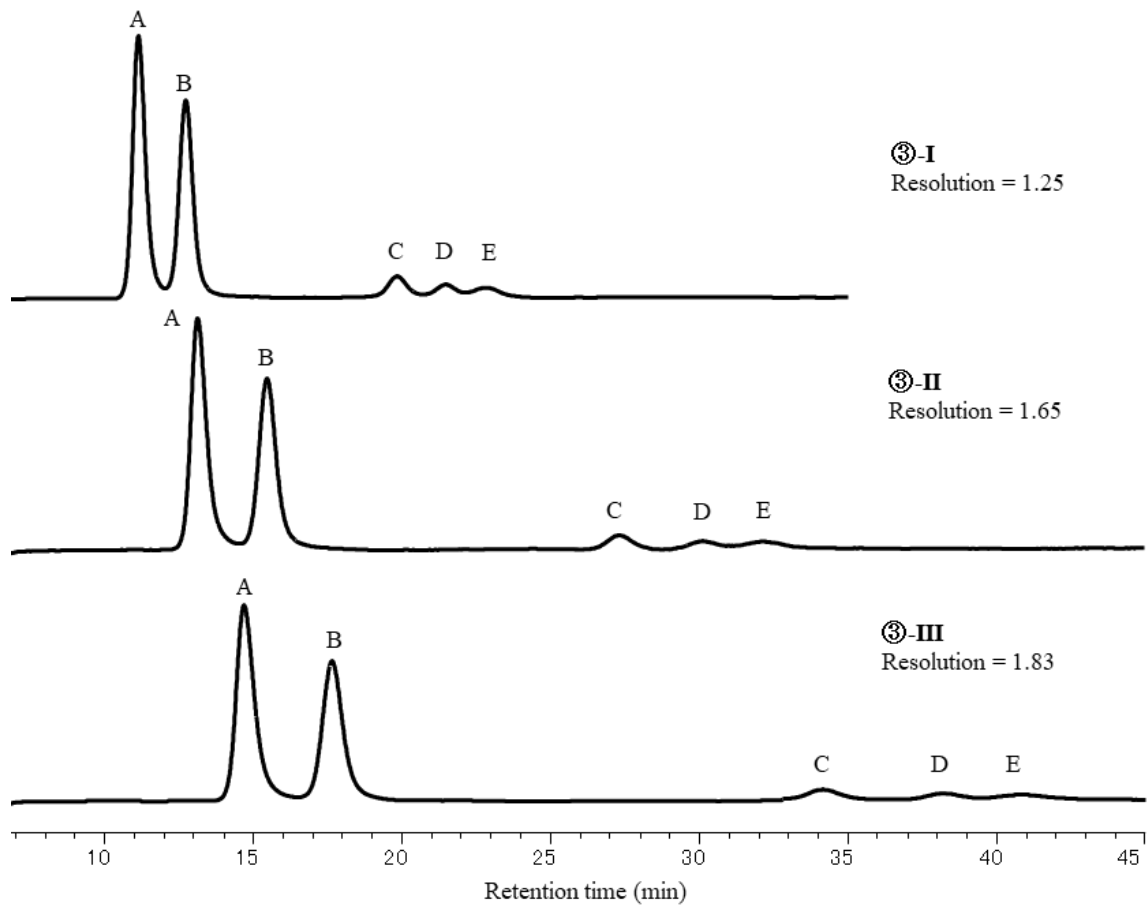


Fig. 3 Chromatogram of sugar with column③
A: Fructose, B: Glucose, C: Sucrose, D: Turanose, E: Maltose

3.2 模擬試料を用いた分離確認

3.1 で決定した最適条件において、模擬試料を用いて HPLC によりそれぞれ分析を行った結果を Fig. 4～Fig. 6 に示す。

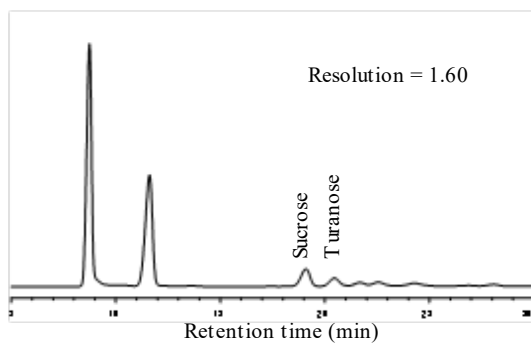


Fig. 4 Chromatogram of honey with column①

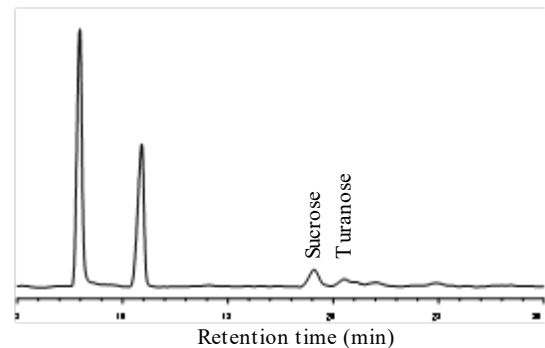


Fig. 5 Chromatogram of honey with column②

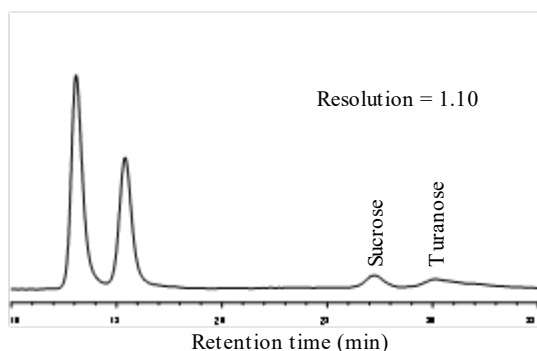


Fig. 6 Chromatogram of honey with column③

カラム①を用いた実験では、スクロースとツラノースのピークの分離度が 1.60 となり完全分離が確認された。カラム②においては、分離度が算出できなかった。カラム③においてはピークの分離度が 1.10 と低い値となった。

カラム②を用いた実験においてピークが完全分離しなかった理由については、ツラノースのピークがはちみつに含まれる他の成分のピークと重なったことによりピーク後部が判別できなくなり、ツラノースの半値幅が計算できなくなったこと、カラム③については、ツラノースのピークがはちみつに含まれる他の成分のピークと重なったことにより見かけ上ピークが大きくな

ったことが原因と考えられる。この 2 つの条件についても、標準試薬を用いた実験においてスクロースとツラノースのピークが完全分離していることや、クロマトグラムの形状を確認し、総合的に判断した結果、スクロースとツラノースのピークは分離しているものと考えた。

また、使用したカラムのうち、HILIC カラムである HILICpak VG-50 4E は税関分析法 No.108「菓子類のしょ糖分の定量分析法」に記載のあるカラムであることから、同一のカラムで複数の税関分析法に対応することができ、カラムの交換の必要性がなくなり、汎用性もあり経済的である。

4. 要 約

本研究では、税関分析法 No.102「はちみつの分析法」における HPLC を用いた糖類の定量において、スクロースとツラノースのピークが分離する条件を検討した。その結果、2 種の HILIC カラム並びに 1 種の HILIC 及び配位子交換のミックスモードカラムを用いて、スクロースとツラノースのピークが分離する 3 つの条件を設定することができた。

文 献

- 1) S. Bogdanov, P. Martin, C. Lullmann : Harmonized Methods of the European Honey Commission, *Apidologie*, **Extra Issue**, Chapter 1. 7. 2 (1997) .
- 2) I. R. Siddiqui, B. Furgala : *Journal of Apicultural Research*, **6**, 139 (1967)
- 3) 増田 靖子, 徳島 将光, 五十嵐 智大, 松本 啓嗣 : 関税中央分析所報, **60**, 11 (2020)
- 4) ナカライテスク. “COSMOSIL Sugar-D”. ナカライテスク, <https://www.nacalai.co.jp/products/283/> (参照2025-04-04)
- 5) Shodex. “アセトニトリル混合比と溶出時間 (SZ5532)”. <https://www.shodex.com/ja/dc/03/02/57.html> (参照2025-04-04)
- 6) 日本薬局方解説書編集委員会 : “第十六改正日本薬局方 条文と注釈”, P.88 (2011), (廣川書店).