

安定同位体比質量分析計を用いたはちみつ及び果汁の分析

井上 純*, 伊藤 聡美*, 赤崎 哲也*, 熊澤 勉*

Analysis of Honey and Fruit Juice by Means of Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS)

Jun INOUE*, Satomi ITO*, Tetsuya AKASAKI* and Tsutomu KUMAZAWA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Some artificial honeys have a composition similar to that of natural honey and are not identifiable as such by any conventional analytical method. It is well known, however, that they can be identified through measuring the stable carbon isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$) using Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS) to confirm the presence of added sugar or isomerized sugar in the honey. Nonetheless, this method has not been feasible in Japan, because of the absence of such an instrument. The Central Customs Laboratory procured recently IRMS and conducted a study to examine its usefulness for the identification of artificial honeys. In this study, determination of added sugar in fruit juice was also attempted. The analysis showed a significant difference between the $\delta^{13}\text{C}$ values of natural and artificial honeys. The $\delta^{13}\text{C}$ values and isomerized sugar contents in artificial honeys and fruit juice were found to have a linear correlation, which would provide a convenient measure to determine isomerized sugar in these preparations.

1. 緒 言

現在、はちみつの分析は税関分析法No.102「はちみつの分析法」に基づいて糖類の定量分析等を行っているが、天然はちみつに異性化糖（HFCS：High Fructose Corn Syrup）を添加した人造はちみつの中には天然はちみつと糖類の組成が非常に似ているものもあり、そのような組成のはちみつは成分分析による区別が困難である。この1つの解決法として、難波ら¹⁾によってイソマルトースとマルトースをGCを用いて測定し、その比から異性化糖を検出する手法が検討された。一方、AOAC²⁾には安定同位体比質量分析計（IRMS）を用いて炭素の安定同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ ）を測定することで、天然はちみつへの砂糖や異性化糖の添加を確認する手法が規定されている。

現在、関税分類において、天然はちみつは税番第0409.00号に分類されるのに対して、人造はちみつは税番第1702.90号に分類され、天然はちみつに比べて2倍程度、もしくはそれ以上の高税率が適用されている。今回、新たに安定同位体比質量分析計が関税中央分析所に導入されたので、AOACの手法をもとに天然はちみつへの異性化糖の添加の有無を確認することが可能か検証を行った。

また果汁についても、第20.09項において「砂糖を加えたも

の」と「その他のもの」の間で税率格差が生じている。果汁に添加された異性化糖を検出できるか否かを確認するために、IRMSを用いて同様の測定を行い、これらの研究から幾つか有用な知見を得たので報告する。

2. 実 験

2. 1 分析試料

天然はちみつ（国産17種類，輸入品3種類）

人造はちみつ

異性化糖

夏みかん

2. 2 分析装置及び測定条件

元素分析計：FLASH EA 1112 SERIES（Thermo Quest社製）

燃焼炉温度 1020℃

還元炉温度 680℃

カラム温度 50℃

キャリアーガス（ヘリウム） 100ml/min

インターフェイス：Conflo III（Thermo Quest社製）

安定同位体比質量分析計：DELTA plus（Thermo Quest社製）

$\delta^{13}\text{C}$ 標準試料：グリシン（ $\delta^{13}\text{C} = -30.3\text{‰}$ ）

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

2. 3 実験方法

2. 3. 1 測定方法

試料を元素分析計内で燃焼させて試料中の炭素を全て二酸化炭素に変化させる。次に、その燃焼により生じたガスをGCで分離精製して純粋な二酸化炭素ガスにした後、質量分析計で質量数44,45,46の二酸化炭素のイオン強度を測定し、同様に測定した標準試料における二酸化炭素ガスのイオン強度と比較することで $\delta^{13}\text{C}$ を求める (Fig.1)。ここで、一般に $\delta^{13}\text{C}$ とは、試料中に含まれる ^{12}C に対する ^{13}C の質量の比率をPDB (Pee Dee

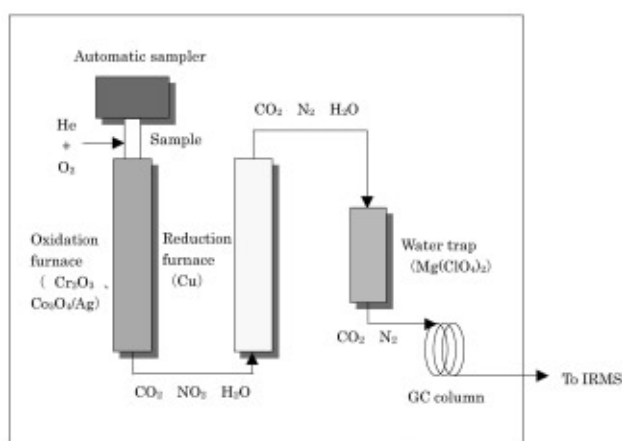


Fig. 1-1 Elemental analyzer of IRMS

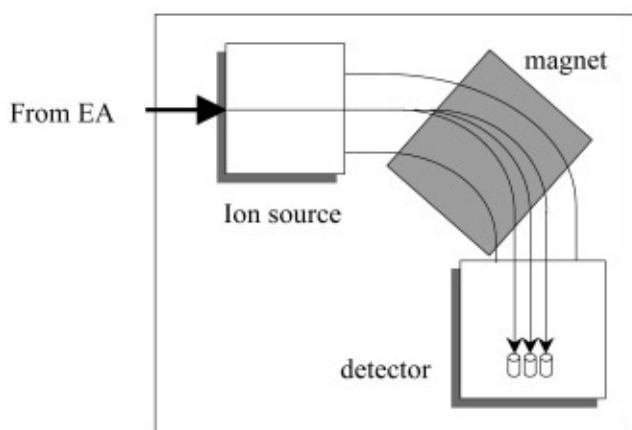


Fig. 1-2 Mass spectrometer of IRMS

Belemniteの略で、Belemnite (矢石類) の化石 (石灰石) のことである。) という標準物質からの偏差で表したもので、次の式で求められる。

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = (R/R_s - 1) \times 1000$$

$$R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} (\text{sample}) \quad R_s = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} (\text{standard})$$

本研究では、 $\delta^{13}\text{C}$ 標準試料として、グリシン ($\delta^{13}\text{C} = -30.3\text{‰}$) を用いて、試料の $\delta^{13}\text{C}$ を算出した。

2. 3. 2 天然はちみつ、人造はちみつ及び異性化糖

試料を錫箔に約400 μg 採取し、ホットプレート上で5分程度加熱して水分を除き、その後IRMSで $\delta^{13}\text{C}$ を測定した。

2. 3. 3 天然はちみつと異性化糖の混合物

天然はちみつに異性化糖を約10%、約30%、約50%、約80%混合した試料を調製し、その混合物をいずれも錫箔に約400 μg ずつ採取し、ホットプレート上で5分程度加熱して水分を除き、IRMSで $\delta^{13}\text{C}$ を測定した。

2. 3. 4 夏みかん果汁と異性化糖の混合物

夏みかん果汁は遠心分離器 (25000g, 10 min) で処理して固形分を除いた上澄み液を用いた。

夏みかん果汁に異性化糖を約2%、約5%、約10%混合した試料を調製し、その混合物をいずれも錫箔に約400 μg ずつ採取し、ホットプレート上で5分程度加熱して水分を除き、IRMSで $\delta^{13}\text{C}$ を測定した。

3. 結果及び考察

3. 1 はちみつ

天然はちみつ、人造はちみつ及び異性化糖の $\delta^{13}\text{C}$ を測定した。検体は各々10回ずつ測定し、Table 1に $\delta^{13}\text{C}$ の平均値と変動係数を示した。天然はちみつ20検体、人造はちみつ、異性化糖の $\delta^{13}\text{C}$ の値には明確な差異が認められた。

Table 1 $\delta^{13}\text{C}$ of natural honey, artificial honey and HFCS

Sample		$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	Coefficient of variation (%)
Natural honey	Japan	A	-23.8 0.36
		B	-26.2 0.55
		C	-23.5 0.57
		D	-24.6 0.72
		E	-24.9 0.43
		F	-25.4 0.83
		G	-25.9 0.61
		H	-25.9 0.67
		I	-23.8 0.20
		J	-25.7 0.22
		K	-26.5 0.41
		L	-28.1 0.43
		M	-26.4 0.23
		N	-25.0 0.31
	O	-24.8 0.37	
	P	-24.1 0.35	
	Q	-24.4 0.25	
Imported	R	-24.8 0.45	
	S	-26.8 0.20	
	T	-24.7 0.46	
Average		-25.3	
Artificial honey		-16.0	2.09
HFCS		-11.0	0.77

一般に植物はC₃植物（大多数の双子葉植物）とC₄植物（単子葉植物及び一部の双子葉植物）の大きく2種類に分類され、C₃植物とC₄植物の間には $\delta^{13}\text{C}$ に明確な差異が認められることが知られている。これは、二酸化炭素を吸収して糖類を合成する炭酸固定回路がおおの違うことが原因である。天然はちみつの原料となるレンゲ、アカシヤ、リンゴ等の蜜源植物や果実のなる植物はC₃植物であり、異性化糖の原料となるとうもろこしはC₄植物であり、一般的な $\delta^{13}\text{C}$ の範囲は、C₃植物は -22‰ ～ -35‰ であるのに対して、C₄植物はC₃植物と比べて $^{13}\text{CO}_2$ を取りこみやすいため -8‰ ～ -20‰ で、Table.1に示した結果と一致している。

天然はちみつ20検体の $\delta^{13}\text{C}$ の値から天然はちみつの母平均 μ を自由度19のt分布を用いて推定すると、 $-26.3\text{‰} < \mu < -24.2\text{‰}$ （信頼係数99.9%）である。また、 χ^2 分布を用いて母標準偏差 σ を推定すると $0.78\text{‰} < \sigma < 2.38\text{‰}$ （信頼係数99.9%）である。これらの値から天然はちみつを測定した時に得られる $\delta^{13}\text{C}$ の値の推定が可能である。Fig.2には、天然はちみつの95%及び99%が取り得る $\delta^{13}\text{C}$ の測定値の範囲を示した。

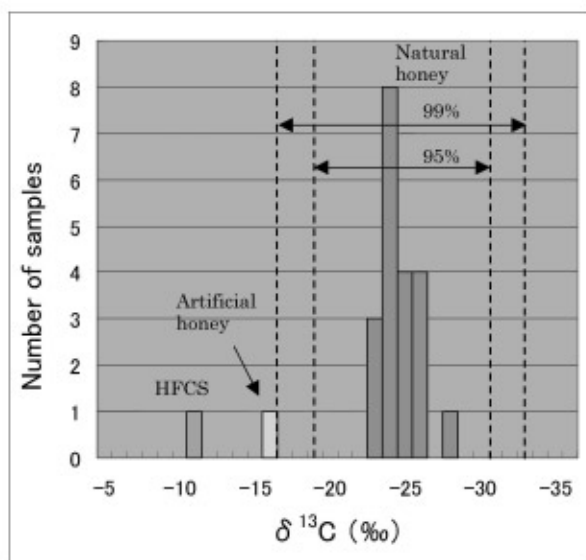


Fig. 2 $\delta^{13}\text{C}$ range of natural honey, artificial honey and HFCS

3. 2 天然はちみつと異性化糖の混合物

Fig.3は天然はちみつO（ $\delta^{13}\text{C} = -24.8\text{‰}$ ，標準偏差 $\sigma = 0.092\text{‰}$ ）と異性化糖（ $\delta^{13}\text{C} = -11.0\text{‰}$ ）の混合物の $\delta^{13}\text{C}$ と天然はちみつの比率についてグラフ化したものである。天然はちみつの比率が0～100%の間で6種類の混合物を調製し測定したが、全ての範囲で良好な直線性を示している。

また、天然はちみつの $\delta^{13}\text{C}$ の変動範囲を $\pm 3\sigma$ とすると、異性化糖を含まない天然はちみつの $\delta^{13}\text{C}$ の推定値は $-25.1\text{‰} < \delta^{13}\text{C} < -24.5\text{‰}$ の範囲内にあり、異性化糖を約3%以上添加した場合はその添加を確認することができる。

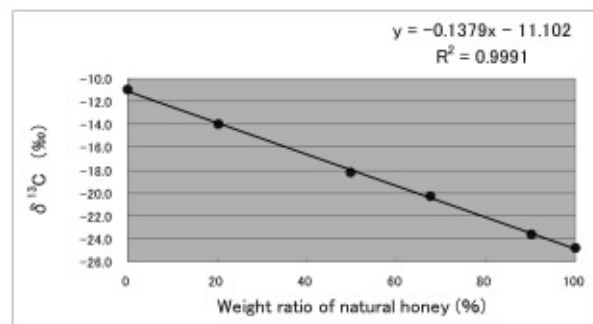


Fig. 3 Relationship between weight ratio of natural honey and $\delta^{13}\text{C}$ value

3. 3 夏みかん果汁と異性化糖の混合物

Fig.4は夏みかん果汁と異性化糖の混合物の $\delta^{13}\text{C}$ と夏みかん果汁の割合について、グラフ化したものである。夏みかん果汁、異性化糖はそれぞれ水分を88.1%、31.2%含有しているため、それを考慮して水分を除いた固形分としての重量比を求めプロットした。この測定結果も全ての範囲で良好な直線性を示している。

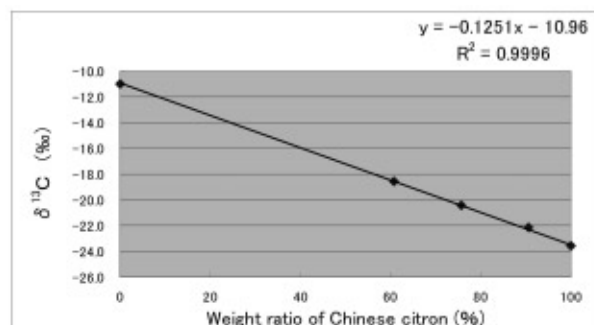


Fig. 4 Relationship between weight ratio of Chinese citron and $\delta^{13}\text{C}$ values

夏みかん果汁の $\delta^{13}\text{C}$ の平均値は -23.6‰ ，標準偏差は 0.47‰ であり、天然はちみつと比べると標準偏差はかなり大きい。これらの値から人造はちみつと同様に異性化糖の検出限界を求めると、 -22.2‰ が夏みかん果汁の $\delta^{13}\text{C}$ の最大値となり、夏みかん固形分が89.4%未満すなわち夏みかん果汁の割合に換算すると98.0%未満が境界線である。したがって、異性化糖を約2%以上添加した場合にはその添加を検出することができる。

4. 要 約

IRMSを用いて天然はちみつ、異性化糖、人造はちみつ、果汁及び加糖した果汁の $\delta^{13}\text{C}$ を測定した。その結果、天然はちみつと人造はちみつの $\delta^{13}\text{C}$ には明確な差異が認められた。

また、はちみつ又は果汁と異性化糖の混合物について、異性

化糖の含有割合と $\delta^{13}\text{C}$ の間には良好な直線性が認められたことから、原料が入手できれば、はちみつや果汁中に添加された異性化糖の定量も可能と考えられる。

文 献

- 1) 難波茂, 笹川邦雄, 中津純: 関税中央分析所報, 21, 43 (1980)
- 2) AOAC Official Method 978.17: "AOAC Official Methods of Analysis", 44, 27 (1995)