

はちみつ及びはちみつ製品中のオリゴ糖類の分析

三浦 徹*, 梅田 寛*, 水田 完*, 竹元 賢治*, 村上 孝之*, 笹川 邦雄*

Analysis of Oligosaccharides in Honey and Honey Products

Toru MIURA*, Hiroshi UMEDA*, Yutaka MIZUTA*,
Kenji TAKEMOTO*, Takayuki MURAKAMI*
and Kunio SASAKAWA*

*Tokyo Customs Laboratory

2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

Focusing upon oligosaccharides in honeys and honey products, we examined the possibility of distinguishing between natural honeys and artificial honeys. With a filtration column used for pretreatment, honeys, honeys with oligosaccharides added, and honeys with isomerized sugar added were analyzed by thin layer chromatography, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, and varying patterns were obtained. For the honeys with isomerized sugar added and honeys with oligosaccharides added, it was possible to confirm spots or peaks of oligosaccharides by all of the methods. On the other hand, remarkable spots or peaks were not detected in natural honeys. The result suggested that the pattern analysis of oligosaccharides could be used to distinguish natural honeys from artificial honeys in the tariff schedule.

1. 緒 言

はちみつは、健康食品として古くから食されてきたが、昨今の健康食品ブームにより難消化性、整腸作用及び非ないし低う蝕性などの優れた機能特性を有するオリゴ糖を添加したはちみつ製品が市販されている。一方、ディスカウント店の増加により単価の安い異性化糖を添加した安価なはちみつ製品も市販されている。

現在、関税分類において天然はちみつとオリゴ糖や異性化糖を添加した人造はちみつの区別は、国内分類例規集に全糖分、果糖分及びしょ糖分の含有割合による基準があり、税関分析法No.102「はちみつの分析法」により分析方法が定められている。しかし、異性化糖の中にははちみつと極めて類似した糖組成を有するものも製造されており、前述した基準のみではこのような異性化糖入りはちみつと天然はちみつとの判別が困難となっている。

はちみつに異性化糖を添加したか否かは、安定同位体比質量分析法により精度よく判別できることが井上ら¹⁾によって報告されているが、特別な分析機器を使用せずに天然はちみつに異

性化糖が添加されたか否かの判別ができることが望ましいと考えられる。

そこで、AOAC 979.22²⁾及び三島ら³⁾の方法を参考に、ゲルろ過カラムを用いてはちみつ及びはちみつ製品中のオリゴ糖を分離し、薄層クロマトグラフィー（以下TLC）、高速液体クロマトグラフィー（以下HPLC）及びキャピラリー電気泳動（以下CE）を用いて分析し、天然はちみつと人造はちみつの判別の可能性を検討したので報告する。

2. 実 験

2. 1 試料及び試薬

2. 1. 1 試料

天然はちみつ	: 輸入品15種 国産品1種
国産異性化糖	: 果糖ぶどう糖液糖5種及びぶどう糖果糖液糖1種
国産オリゴ糖	: イソマルトオリゴ糖シロップ及びマルトトリオースシロップ
国産異性化糖入りはちみつ	: 果糖ぶどう糖液糖入りはちみつ

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海2-56

3 種

国産オリゴ糖入りはちみつ：フラクトオリゴ糖シロップ入り
はちみつ 2 種及びマルトオリゴ
糖シロップ入りはちみつ 1 種

2. 1. 2 試薬

マルトトリオース（和光純薬工業（株）製）
マルトテトラオース（和光純薬工業（株）製）
マルトペンタオース（和光純薬工業（株）製）
マルトヘキサオース（和光純薬工業（株）製）
マルトヘプタオース（和光純薬工業（株）製）
水酸化ナトリウム（和光純薬工業（株）製）
0.2N 塩酸（和光純薬工業（株）製）
1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン（PMP）（和光純薬工業（株）製）
メタノール（純正化学（株）製）
クロロホルム（純正化学（株）製）

2. 2 装置及び分析条件

2. 2. 1 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

クロマト管：ガラスクロマト管（L=300mm, i. d.=15mm）
充填剤：Sephadex G-15（Amersham biosciences 社製）
移動相：水

2. 2. 2 薄層クロマトグラフィー

薄層板：Silica gel 60 F254（MERCK 製）
展開溶媒：1-ブタノール：酢酸：水=2：1：1
発色剤：ジフェニルアミン-アセトン-80% リン酸（2g-2ml-100ml-15ml）

2. 2. 3 高速液体クロマトグラフィー

装置：HP-1090 system（Agilent 社製）
カラム：Shodex SP-0810（L=300mm, i. d.=0.8mm）
移動相：水
流量：0.5ml/min
カラム温度：80℃
検出器：Shodex RI-71
注入量：20 µl

2. 2. 4 キャピラリー電気泳動法

(1) キャピラリー電気泳動

装置：HP 3D CE（Agilent 社製）
キャピラリー：fused silica（I=72cm, L=80.5cm, i. d.=50 µm）
泳動液：50mM Tetraborate, pH9.3（Agilent 社製）
キャピラリー温度：20℃
印加電圧：+25kV
検出器：Diode-array
検出波長：Sig.250/ 2 nm, Ref.234/ 2 nm
注入法：400mbar*s

(2) 遠心分離器

装置：KOKUSAN H-18 AUTO SERIES（国産遠心器（株）

製）

回転数：3000rpm

分離時間：10min.

2. 3 実験方法

2. 3. 1 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる前処理操作

Sephadex G-15 12gを量り取り、水によりスラリー状にした後、綿を詰めたガラスクロマト管に注ぎ入れ、水により充分洗浄した。水で2倍に希釈した試料3mlをカラムに添加し、試料が全てセファデックスカラムに浸透後、分液ロートにより移動相として水の自然滴下を開始し、同時に溶出液の回収を開始した。初めの10mlをデッドボリュームとし、その後13mlを分画した。分画した溶出液を25mlナスフラスコに移し入れロータリー式エバポレーターを用いて50℃で乾固した。析出した糖を1mlの水を用いて溶解し、得られた水溶液を以降の分析に用いた。

また、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの再現性を確認するため、同一の天然アカシアはちみつを3本のクロマト管を用いて分画した。

また、異性化糖添加実験として、天然アカシアはちみつに果糖ぶどう糖液糖の濃度が25, 50, 75%になるように添加したものを上記の操作により分画した。

2. 3. 2 薄層クロマトグラフィーによる分離

薄層板の下端より1.5cmの位置にて2.3.1にて得られた検液2 µlをスポットした。また、対照として、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースの各0.5wt%の混合水溶液をスポットし、展開した。展開終了後、薄層板を乾燥させ展開液を除去し、発色剤を均一に噴霧後、105℃の恒温乾燥器中で10分間加熱して発色させた。

2. 3. 3 HPLC法による分離

2. 3. 1にて得られた検液を0.45 µmのメンブランフィルターを用いてろ過後、HPLCを用いて分析した。

2. 3. 4 PMP誘導体化とCE法による分離

糖質をCEで分析するためにイオン性物質とする必要からPMP誘導体を調製した。

2. 3. 1にて得られた検液100 µlを10mlナスフラスコに移し取り、98℃の乾燥機中で乾固した。放冷後、0.3N水酸化ナトリウム溶液50 µl, 0.5M PMPメタノール溶液50 µlをそれぞれ加え、密栓後、70℃の水浴中で30分間反応を行った。反応後放冷し、0.3N塩酸50 µlで中和した後、水1 ml及び過剰のPMP試薬等の有機物除去のためクロロホルム1 mlを加え遠心分離管に移し入れ、遠心分離した。これにより得られた上澄液を0.45 µmのメンブランフィルターを用いてろ過後CEを用いて分析した。

3 結果及び考察

3. 1 オリゴ糖分画

3. 1. 1 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの再現性

異性化糖の添加の有無の指標となるオリゴ糖を検出するために、ゲルろ過カラムを用いて重合度の高いオリゴ糖を分画し、再現性を検証した。

アカシアはちみつを試料としたゲルろ過カラムの再現性の結果をFig. 1-3に示す。TLC, HPLC及びCEのいずれも若干の糖の溶出強度の違いが認められる。TLCにおいてはRf値0.46の単糖からRf値0.28の3糖までのスポットに濃淡の差異が認められたが、Rf値0.24の4糖のスポットに差異は認められず、Rf値0.20の5糖のスポットは確認できなかった。HPLCにおいては保持時間35分以降の単糖、28～32分の2糖及び3糖のピークに若干の強度の違いが見られたが、26.4分の4糖のピーク及び24.5分の5糖のピークは差異が認められなかった。CEにおいては泳動時間20分付近の単糖のピーク、18分付近の2糖のピーク及び16.5～17分の3糖のピークに溶出強度の違いが認められたが、15.7分の4糖のピーク及び15.1分の5糖のピークには差異が認められなかった。

以上の結果から、4糖以上のオリゴ糖については再現性はあることがわかった。

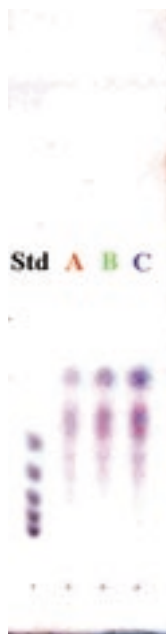


Fig. 1 TLC of an acacia honey by using different columns (A: column-A, B: column-B, C: column-C)

3. 1. 2 異性化糖添加実験

異性化糖の添加の有無の指標となるオリゴ糖を特定するために、異性化糖添加実験を行った。

異性化糖添加実験の結果をFig. 4-6に示す。はちみつ中の異性化糖濃度が増加するに比例してTLCにおいてはRf値0.20以下の

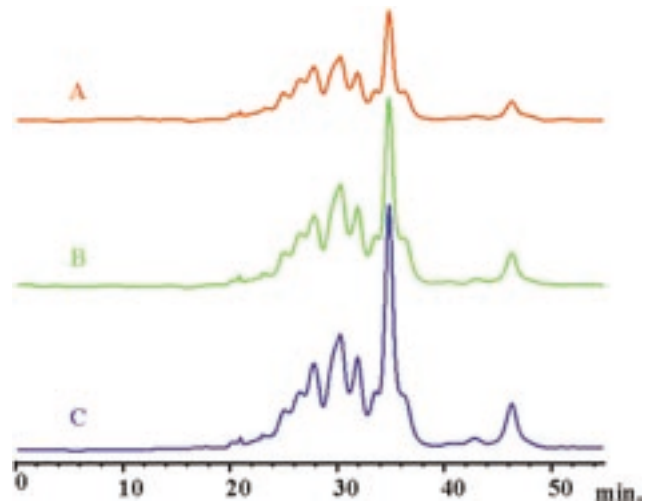


Fig. 2 HPLC chromatograms of an acacia honey by using different columns (A: column-A, B: column-B, C: column-C)

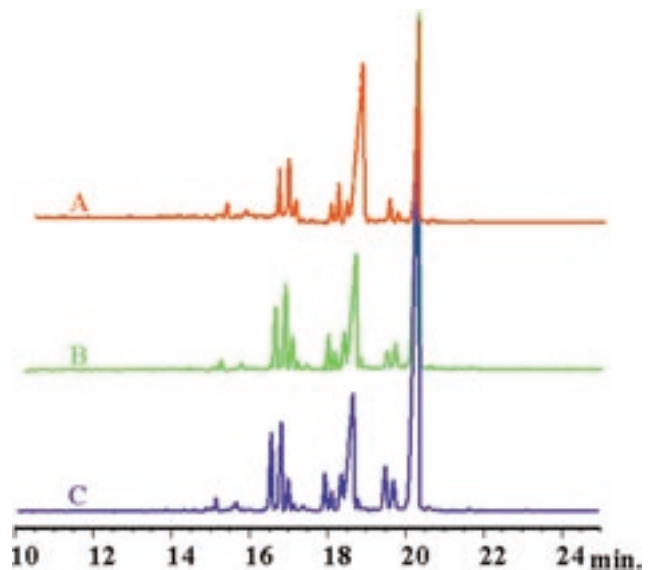


Fig. 3 Electropherograms of an acacia honey by using different columns (A: column-A, B: column-B, C: column-C)

オリゴ糖のスポット、HPLCにおいては保持時間20～22分間のピーク、CEにおいては泳動時間14.4分、14.7分及び15.4分のピークが特異的に出現、又は増加することがわかる。この特異的なスポット又はピークは、標準試薬との比較によりCEの泳動時間14.4分がマルトヘプタオース（7糖）、14.7分がマルトヘキサオース（6糖）、15.4分がマルトペンタオース（5糖）と同定できた。このことから異性化糖中に存在する5糖、6糖及び7糖の有無により天然はちみつと異性化糖入りはちみつの判別の可能性が見出された。また、HPLCの結果では保持時間20～24分間に一つの大きなピークとなったが、これは今回の条件では5糖以上が分離が不十分で重なるためであり、更なる条件の検討の必要はあるが、天然はちみつでは5糖以上のオリゴ糖は僅少であるので、判別においては問題はないと考えられる。

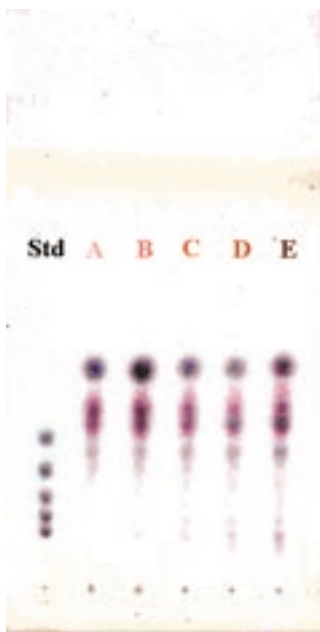


Fig. 4 TLC of an acacia honey added isomerized sugar syrup (Std: maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, A: acacia honey 100%, B: added 25% of isomerized sugar syrup, C: added 50% of isomerized sugar syrup, D: added 75% of isomerized sugar syrup, E: isomerized sugar syrup)

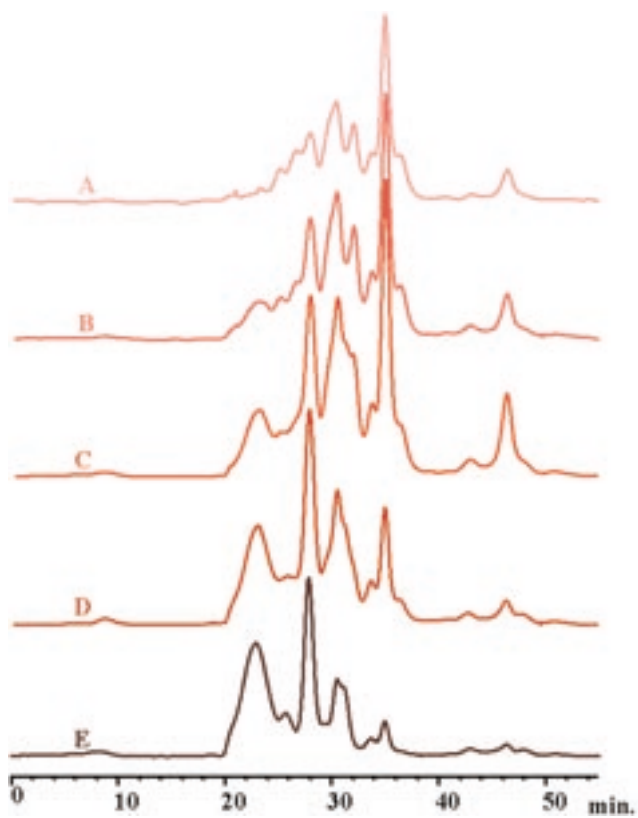


Fig. 5 HPLC chromatograms of an acacia honey added isomerized sugar syrup (A: acacia honey 100%, B: added 25% of isomerized sugar syrup, C: added 50% of isomerized sugar syrup, D: added 75% of isomerized sugar syrup, E: isomerized sugar syrup)

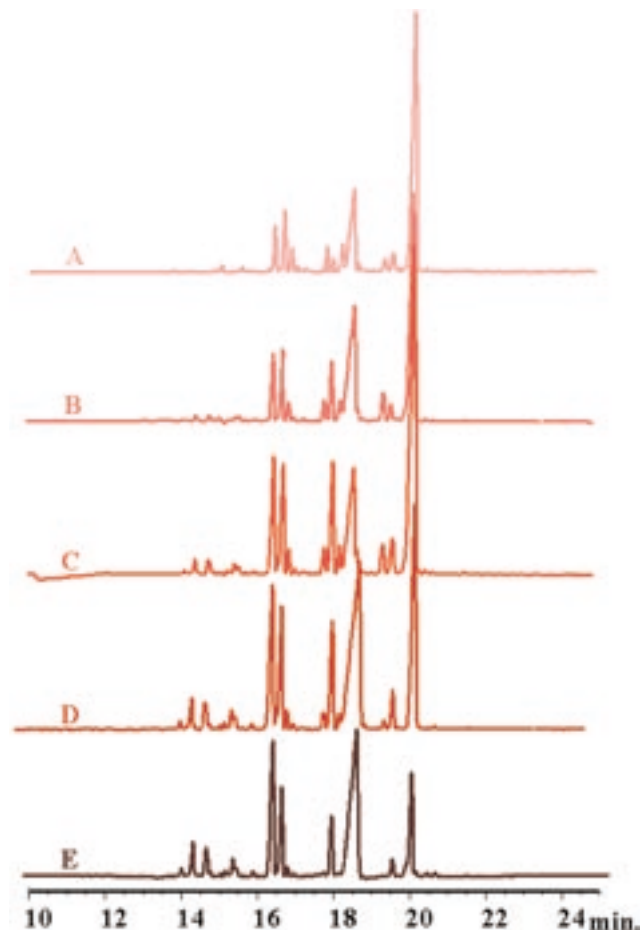


Fig. 6 Electropherograms of an acacia honey added isomerized sugar syrup (A: acacia honey 100%, B: added 25% of isomerized sugar syrup, C: added 50% of isomerized sugar syrup, D: added 75% of isomerized sugar syrup, E: isomerized sugar syrup)

3. 2 オリゴ糖組成

3. 2. 1 天然はちみつ

アカシア、れんげ、オレンジ、クローバー、アルファルファ、ラズベリー、ブラックベリー、セージ及び野草の花のはちみつの分析結果をFig. 7-9に示す。TLC、HPLC及びCEにおいて6糖及び7糖の位置に顕著なスポット又はピークは確認できなかった。なお、HPLCにおける保持時間20分のピークは今回用いたカラムの排除限界である。また、CEではブラックベリー及び野草の花のはちみつの15.4分の5糖の微小なピークを検出した。

アカシアはちみつについてはスイス、中国、フランス及びハンガリーと原産国の異なる4種類を分析したが、いずれも若干の糖の溶出強度は異なるものの、パターンは近似しており、このことから同じ花種は原産国によらずほぼ同一のパターンが得られることがわかった。

従って、今回分析を行った花種のはちみつには次の異性化糖及びオリゴ糖から検出される6糖及び7糖を含有していないか若しくは僅少であるという結果が得られたことにより、6糖及び7糖のオリゴ糖の有無により判別はできると考えられる。



Fig. 7 TLC of natural honeys (A: acacia-1 (Switzer land), B: acacia-2 (China), C: acacia-3 (France), D: acacia-4 (Hungary), E: milk vetch (China), F: orange-1 (U. S. A.), G: orange-2 (U. S. A.), H: orange-3 (U. S. A.), I: clover-1 (U. S. A.), J: clover-2 (U. S. A.), K: alfalfa (U. S. A.), L: raspberry (U. S. A.), M: blackberry (U. S. A.), N: sage (U. S. A.), O: wild flower-1 (France), P: wild flower-2 (France))

3. 2. 2 異性化糖

異性化糖として製造会社の異なる果糖ぶどう糖液糖及びぶどう糖果糖液糖の分析結果をFig. 10-12のA～Eに示す。すべての果糖ぶどう糖液糖について6糖以上のオリゴ糖の顕著なスポット又はピークを確認することができる。3.1.1の実験には果糖ぶどう糖液糖Bを用いて分析を行ったが、Fig. 10-12からわかるように製造会社が異なっても果糖ぶどう糖液糖のオリゴ糖組成は近似していることから、他社の果糖ぶどう糖液糖が添加されていたとしても判別は可能であると考えられる。また、ぶどう糖果糖液糖と果糖ぶどう糖液糖のオリゴ糖組成も近似していることから、これがはちみつに添加されていても判別は可能であると考えられる。

3. 2. 3 オリゴ糖

オリゴ糖として、イソマルトオリゴ糖シロップ及びマルトトリオースシロップの結果をFig. 10-12のF～Hに示す。オリゴ糖についても6糖以上の顕著なスポット又はピークを確認することができた。このことから、オリゴ糖シロップがはちみつに添加されていたとしても今回の分析で判別は可能であるといえる。

3. 3 市販品への応用

3. 3. 1 異性化糖入りはちみつ

市販の果糖ぶどう糖液糖入りはちみつ（果糖ぶどう糖液糖20%、30%及び40%以下）について分析した結果をFig. 13～15のA～Cに示す。果糖ぶどう糖液糖入りはちみつについて6糖及び7糖の位置にスポット又はピークを確認することができ、

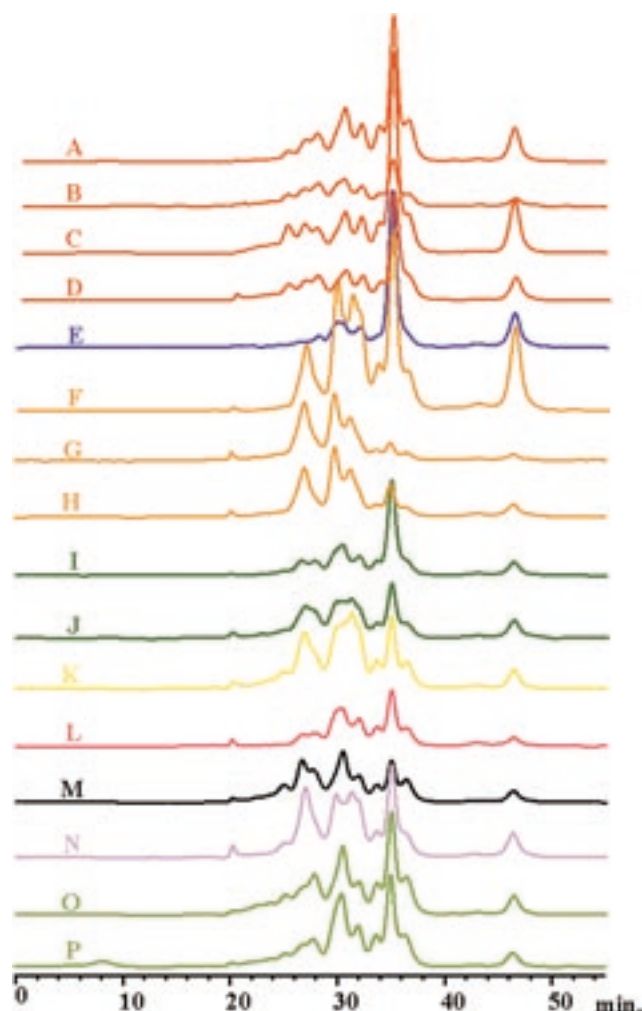


Fig. 8 HPLC chromatograms of natural honeys (A: acacia-1, B: acacia-2, C: acacia-3, D: acacia-4, E: milk vetch, F: orange-1, G: orange-2, H: orange-3, I: clover-1, J: clover-2, K: alfalfa, L: raspberry, M: blackberry, N: sage, O: wild flower-1, P: wild flower-2)

判別は可能であった。

3. 3. 2 オリゴ糖入りはちみつ

市販のオリゴ糖入りはちみつについて分析した結果をFig. 13～15のD～Fに示す。オリゴ糖入りはちみつについてはTLCにおいて6糖以上のオリゴ糖を確認できるものとできないものがあった。6糖以上のオリゴ糖を確認できないオリゴ糖入りはちみつ-3については、TLCにより天然はちみつと大きく異なる3～5糖までの赤色のスポットが顕著なことがわかり、HPLCにより天然はちみつと異なる5糖の大きなピークを確認できる。なお、CEにより5糖以上のピークを確認することはできないが、これはPMP誘導体化が糖の還元サイトで起こる反応であるためである。これらのことから還元サイトを持たず、今回のTLCの条件で赤く発色するフラクトオリゴ糖が添加してあると考えられる。また、オリゴ糖入りはちみつ-1についても同様に、CEでは5糖以上のピークを確認しにくい、TLC及びHPLCの結果からフラクトオリゴ糖が添加されていることがわかる。以上のことから、オリゴ糖シロップ入りはちみつについ

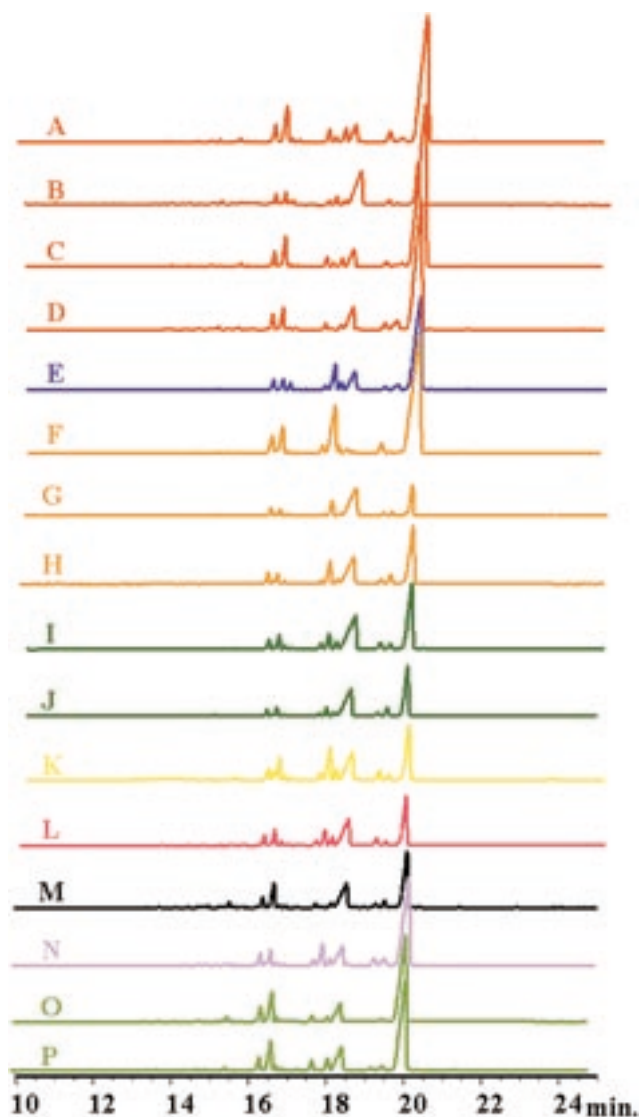


Fig. 9 Electropherograms of natural honeys (A: acacia (Switzer land), B: acacia (China), C: acacia (France), D: acacia (Hungry), E: milk vetch, F: orange-1, G: orange-2, H: orange-3, I: clover-1, J: clover-2, K: alfalfa, L: raspberry, M: blackberry, N: sage, O: wild flower-1, P: wild flower-2)

でも判別は可能であった。

4 要 約

TLC, HPLC及びCEを用いて分析し、試料中のオリゴ糖組成から天然はちみつと人造はちみつの判別を試みた。

天然はちみつは、TLCにより6糖以上のオリゴ糖を確認できないか、できてても極わずかであった。

異性化糖入りはちみつは、6糖以上のオリゴ糖を確認することができた。

オリゴ糖入りはちみつは、6糖以上のオリゴ糖を確認できるものとできないものがあった。フラクトオリゴ糖入りはちみつは、6糖以上のオリゴ糖を確認できなかったが、TLC及びHPLCにより、フラクトオリゴ糖の添加がわかった。

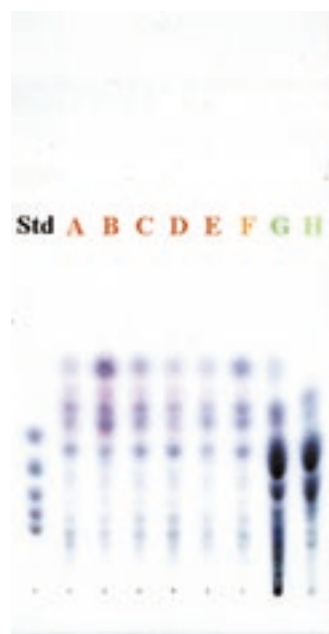


Fig. 10 TLC of syrups (A: fructose glucose syrup (FGS)-A, B: FGS-B, C: FGS-C, D: FGS-D, E: FGS-E, F: glucose fructose syrup, G: maltotriose syrup, H: isomaltooligosaccharides syrup)

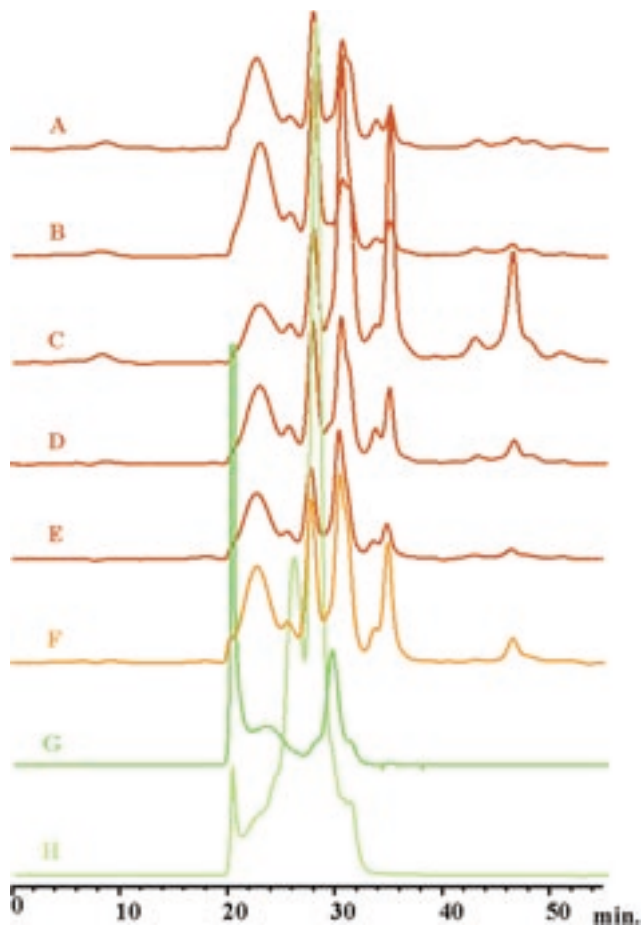


Fig. 11 HPLC chromatograms of syrups (A: fructose glucose syrup (FGS)-A, B: FGS-B, C: FGS-C, D: FGS-D, E: FGS-E, F: glucose fructose syrup, G: maltotriose syrup, H: isomaltooligosaccharides syrup)

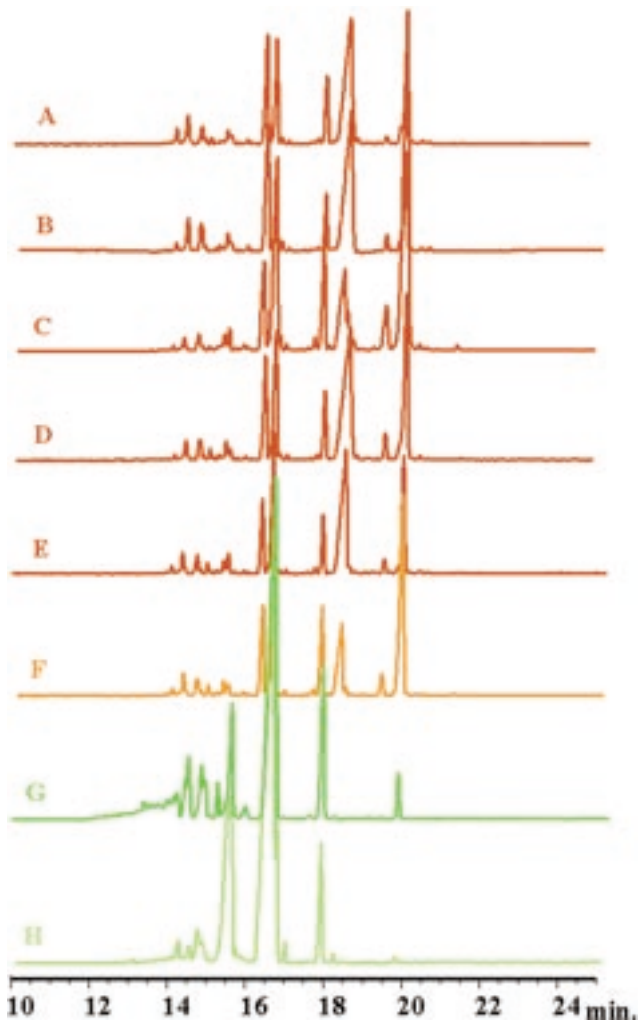


Fig. 12 Electropherograms of syrups (A: fructose glucose syrup (FGS)-A, B: FGS-B, C: FGS-C, D: FGS-D, E: FGS-E, F: glucose fructose syrup, G: maltotriose syrup, H: isomaltotriose syrup)

これらのことから、TLC、HPLC及びCEによるオリゴ糖のクロマトパターンの分析は、関税率表上の天然はちみつと人造はちみつとの判別の一つの手法となりうるということがわかった。

(謝辞)

本実験にあたり、試料の提供とともに貴重なご助言をくださいました菓子総合技術センター及び全国はちみつ公正取引協議会の皆様に厚く感謝申し上げます。



Fig. 13 TLC of honey products (A: a honey added 20% of FGS, B: a honey added 30% of FGS, C: a honey added 40% or below of FGS, D: a honey added oligosaccharides syrup-1, E: a honey added oligosaccharides syrup-2, F: a honey added oligosaccharides syrup-3)

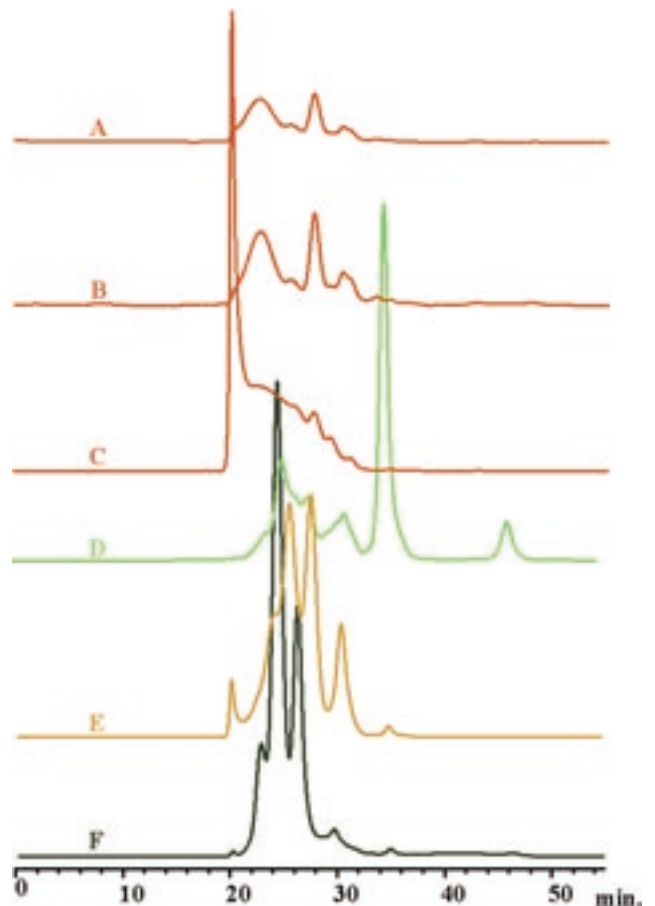


Fig. 14 HPLC chromatograms of honey products (A: a honey added 20% of FGS, B: a honey added 30% of FGS, C: a honey added 40% or below of FGS, D: a honey added oligosaccharides syrup-1, E: a honey added oligosaccharides syrup-2, F: a honey added oligosaccharides syrup-3)

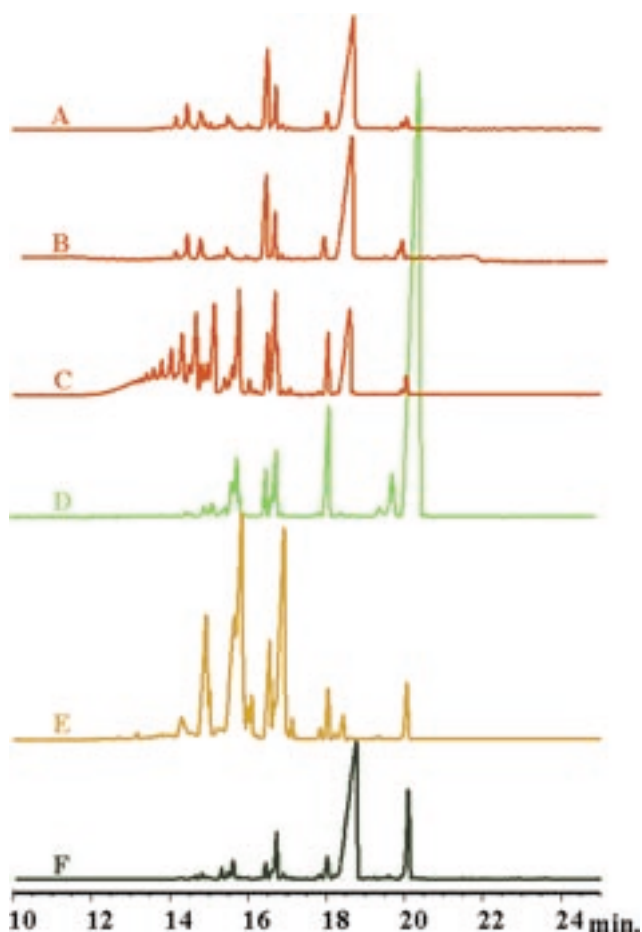


Fig. 15 Electropherograms of honey products (A: a honey added 20% of FGS, B: a honey added 30% of FGS, C: a honey added 40% or below of FGS, D: a honey added oligosaccharides syrup-1, E: a honey added oligosaccharides syrup-2, F: a honey added oligosaccharides syrup-3)

文 献

- 1) 井上純, 伊藤聡美, 赤崎哲也, 熊澤勉: 関税中央分析所報, **42**,5 (2002).
- 2) AOAC Official Method 979.22: "AOAC Official Methods of Analysis", **44**,27 (1980)
- 3) 三島敏, 平岩呂子, 荒木陽子: 日本食品化学工学会誌, **50**,2,78 (2003)