

はちみつの糖度分析

崎原卓*, 三浦徹*, 三枝朋樹*

Sugar Content Analysis of Honey

Takashi SAKIHARA*, Toru MIURA* and Tomoki SAEGUSA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

Since the tariff rate for artificial honey is higher than natural honey in Japan, it is important to identify them. At the present, the official analysis method for honey adopts quantitative analysis of sugars with the combination of Lane-Eynon method and resorcinol-hydrochloric acid reaction. Besides this, HPLC is commonly used for quantitative analysis of sugars. Since HPLC requires less time and less proficiency than the present method, it is preferable to adopt HPLC as long as there are no substantial differences in the results between them. Therefore we tried these methods and compared the results. We found that HPLC gives lower fructose content and higher sucrose content than the present method.

1. 緒 言

2. 実 験

関税分類例規集によって天然はちみつの条件は果糖分が 30 % 以上、ショ糖分が 5 % 以下及び全糖分中の果糖分が 50 % 以上であることと定められている。現在のはちみつの分析は税関分析法 No.102「はちみつの分析法」(以下、現行法)に基づいて行われている。この分析法はレイン・エイノン法及びレゾルシン塩酸法の 2 つの分析法から成立しており、前法で全糖分、還元糖分及びショ糖分を定量し、後法と組み合わせることで果糖分を決定し天然はちみつであるか否かを判定している。一方、糖分の分析手段として上記の方法とは別に税関分析指針 I-1 がある。そこにはハーネス法、高速液体クロマトグラフィーによる方法(以下 HPLC 法)及び酵素法など数種類記載されているが、なかでも HPLC 法は糖の分析手段として一般的に行われている上、はちみつの国際規格で糖の定量手段に適用されている。HPLC 法は現行法と比較すると短時間で測定可能であり、結果に個人差が反映されにくく、はちみつ成分を分解せずに分離するという利点を持つ。よって、もし両分析法の定量値に違いがなければ、はちみつの分析を HPLC 法で行うことが望ましいと言える。そこで今回の両分析法を行い、両法の定量値を比較検討したのでここに報告する。

2. 1 試料及び試薬

2. 1. 1 試料

天然はちみつ: 18 種(アカシアはちみつ 2 種、ヒマワリはちみつ 2 種、クローバーはちみつ 3 種、マヌカはちみつ 4 種、甘露はちみつ 1 種、コーヒーはちみつ 1 種、オレンジはちみつ 1 種、レンゲはちみつ 1 種、菜の花はちみつ 1 種及び花種が特定されていない花蜜から成るはちみつ(以下、多花はちみつ) 2 種: 各はちみつの原産地は表及びグラフ中に記載した。)

なお、結晶化した試料についてはあらかじめ 55 °C に設定した恒温槽で融解した後使用した。

2. 1. 2 試薬

D(-)-フルクトース(和光純薬工業(株)製)

D(+)-グルコース(和光純薬工業(株)製)

スクロース(和光純薬工業(株)製)

塩酸(和光純薬工業(株)製)

1 mol/l 塩酸(和光純薬工業(株)製)

1 mol/l 水酸化ナトリウム液(和光純薬工業(株)製)

水酸化ナトリウム(粒状)(和光純薬工業(株)製)

アセトニトリル(和光純薬工業(株)製)

エタノール(和光純薬工業(株)製)

(+)-酒石酸ナトリウムカリウム四水和物(和光純薬工業(株)製)

硫酸銅(純正化学(株)製)

レゾルシノール(和光純薬工業(株)製)

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

塩化鉄(III)六水和物 (関東化学(株)製)
 メチレンブルー (東京化成工業(株)製)
 フェノールフタレイン (東京化成工業(株)製)
 グリセリン (関東化学(株)製)

2. 2 装置及び分析条件

2. 2. 1 高速液体クロマトグラフィー

装置: LC-10A (島津製作所(株)製)
 カラム: Asahipak NH2P-50 4E (Shodex 製)
 検出器: 示差屈折計 (RID-10A) (島津製作所(株)製)
 注入量: 10 μ l
 移動相: アセトニトリル: 水 = 75 : 25
 流速: 1 ml/min
 カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

2. 2. 2 紫外・可視分光光度計

装置: UV-2550PC (島津製作所(株)製)
 測定波長: 483 nm

2. 2. 3 薄層クロマトグラフィー (以下、TLC)

薄層板: Silica gel 60 (MERCK 製)
 展開溶媒: クロロホルム: メタノール: 水 = 30 : 20 : 4
 発色剤: ジフェニルアミン 1.2 g、アニリン 1.2 g、85%リン酸 10 ml 及びメタノール 100ml の混合溶液
 標準糖液: ブドウ糖、果糖、ショ糖、乳糖及び麦芽糖の約 0.5 % 水溶液

2. 3 実験方法

2. 3. 1 HPLC 法の分析手順

2. 3. 1 (1) 検量線用標準糖の作成

標準果糖、標準ブドウ糖及び標準ショ糖の検量線を作成する。

4 本の三角フラスコに標準果糖、標準ブドウ糖及び標準ショ糖をそれぞれ Table 1 のとおり正確に秤量した。

Table 1 Sugar contents included in standard sugar solution for the preparation of calibration curve

	①	②	③	④
Standard fructose (g)	0.50	1.00	1.50	2.00
Standard glucose (g)	0.30	0.70	1.10	1.50
Standard sucrose (g)	0.01	0.05	0.10	0.15

次に蒸留水を加えて溶解し全量を 40 ml にした後、内部標準試薬として 10 %グリセリン溶液を 10 ml 加えた。そしてこの溶液 0.7 ml をアセトニトリル 0.7 ml とよく混合させ、メンブレンフィルター (0.45 μ m) でろ過後 HPLC を用いて分析した。

2. 3. 1 (2) 分析試料の処理操作

分析試料をガラス棒でよくかくはんして均質にし、その約 2 g を正確に秤量した。以降の操作は 2. 3. 1 (1) の後段と同様に行った。

2. 3. 2 レイン・エイノン法及びレゾルシン塩酸法の分析手順

レイン・エイノン法及びレゾルシン塩酸法の分析手順は税関分析法 No.102 「はちみつの分析法」に準拠した。

2. 3. 3 TLC 法による分離

薄層板の下端より 1.5 cm の位置に試料をスポットし、約 2 時間展開させた。展開終了後、薄層板を乾燥させ発色剤を均一に噴霧した後、105 $^{\circ}$ C の恒温乾燥機で発色させた。

3. 結果及び考察

3. 1 結果

3. 1. 1 HPLC 法と現行法の糖分の比較

3. 1. 1 (1) 果糖分の比較 (Fig. 1)

果糖分の定量値は 18 サンプル中 16 サンプルで、HPLC 法による定量値が現行法による定量値と比べて低い値になった。HPLC 法と現行法の定量値の差は 0—6 % の範囲内にあり、最大差はアカシアはちみつで 5.52 %、最小差はマヌカはちみつで 0.04 % だった。5 % 水準で HPLC 法と現行法の定量値の間に有意差があると判定されたのは 18 サンプル中 12 サンプルだった。

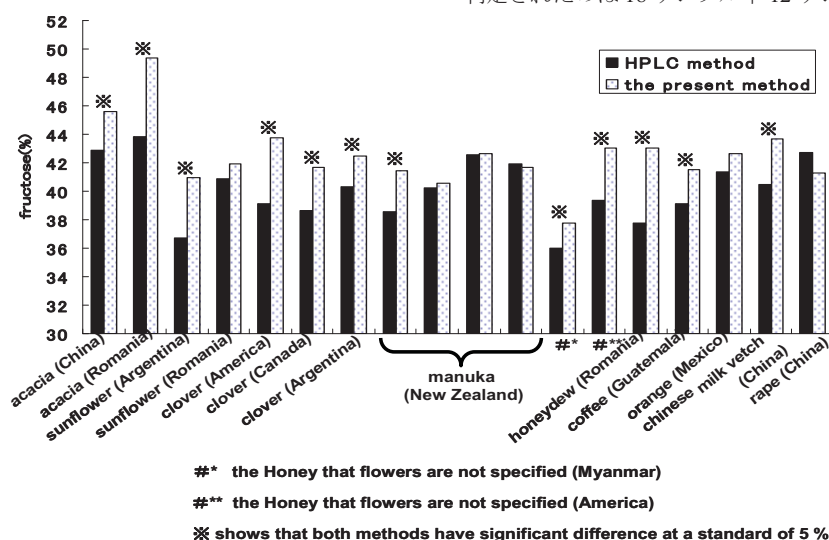


Fig. 1 Comparison of analytical results of fructose content in natural honey imported

3. 1. 1 (2) ショ糖分の比較 (Fig. 2)

ショ糖分の定量値は 18 サンプル中 16 サンプルで、HPLC 法による定量値が現行法による定量値と比べて高い値になった。

HPLC 法と現行法の定量値の差は約 0-5 % の範囲内にあり、最

大差はアカシアはちみつで 4.22 %、最小差はマヌカはちみつで 0.21 % だった。5 % 水準で HPLC 法と現行法の定量値の間に有意差があると判定されたのは 18 サンプル中 14 サンプルだった。

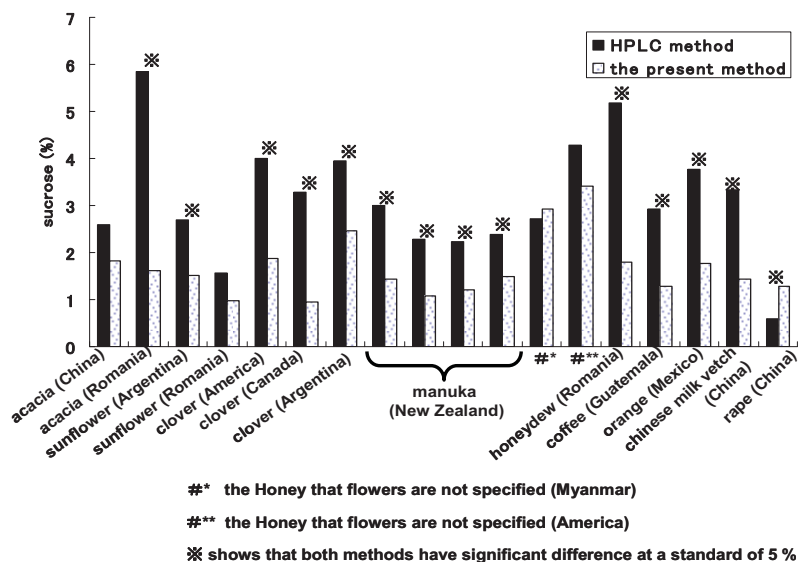


Fig. 2 Comparison of analytical results of sucrose content in natural honey imported

3. 1. 1 (3) 全糖分中における果糖分の比較 (Fig. 3)

全糖分中における果糖分の定量値は 18 サンプル中 13 サンプルで、HPLC 法による定量値が現行法による定量値と比べて低い値になった。なお、HPLC 法で定量された糖のクロマトグラムに果糖、ブドウ糖及びショ糖以外の糖のピークがほとんど見られなかったことから、HPLC 法では果糖分、ブドウ糖分及びショ糖分の

和を全糖分とし、果糖分とブドウ糖分の和を還元糖分とした。HPLC 法と現行法の定量値の差は 0-7 % の範囲内にあり、最大差はアカシアはちみつで 6.72 %、最小差はマヌカはちみつで 0.02 % だった。5 % 水準で HPLC 法と現行法の定量値の間に有意差があると判定されたのは 18 サンプル中 10 サンプルだった。

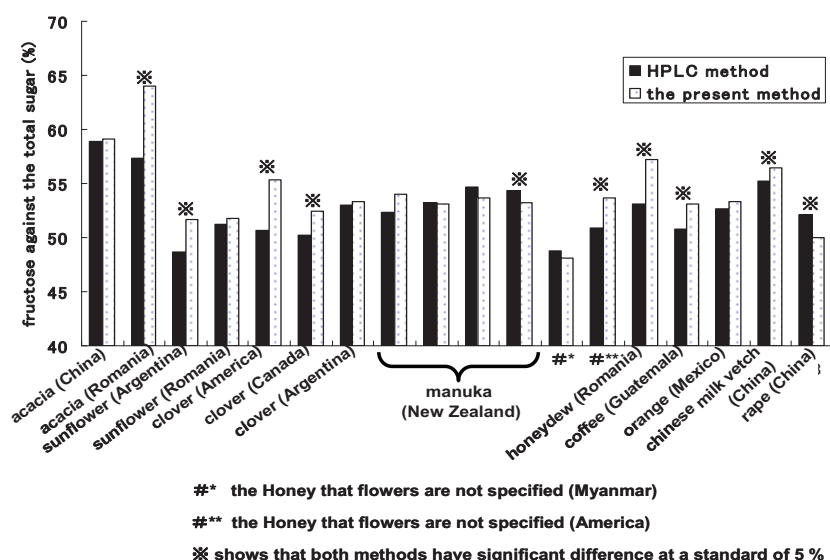


Fig. 3 Comparison of fructose / total sugar ratios determined in natural honey imported

3. 1. 2 各はちみつの両分析法による測定結果の比較

今回分析した全はちみつの HPLC 法と現行法による測定結果を Table 2 に示す。全試料の平均値では、HPLC 法による定量値は現

行法による定量値と比べて果糖分及び全糖分における果糖の割合は低く、ショ糖分は高くなり、いずれも両法の間には 5 % 水準で有意差があると判定された。しかし、マヌカはちみつ（ニュージー

ーランド産)、菜の花はちみつ(中国産)及び多花はちみつ(ミャンマー産)ではHPLC法による定量値が現行法による定量値よりも果糖分が高く、ショ糖分が低くなる結果となった。また、現行法では多花はちみつを除く全てのサンプルが天然はちみつと判定

されたが、HPLC法では多花はちみつ(ミャンマー産)以外にアカシアはちみつ(ルーマニア産)、ヒマワリはちみつ(アルゼンチン産)及び甘露はちみつ(ルーマニア産)が人造はちみつであると判定された。

Table 2 Analytical results of sugars in natural honey imported

	acacia (China)		acacia (Romania)		sunflower (Argentina)		sunflower (Romania)	
	the present method	HPLC method	the present method	HPLC method	the present method	HPLC method	the present method	HPLC method
fructose (%)	45.61(0.50)	42.88(0.28)	49.33(0.98)	43.81(0.83)	40.98(0.94)	36.70(0.16)	41.96(0.46)	40.85(0.83)
glucose (%)		27.27(0.81)		26.83(0.66)		36.10(0.31)		37.32(0.22)
sucrose (%)	1.81(0.83)	2.60(0.27)	1.62(0.16)	5.84(0.18)	1.52(0.31)	2.69(0.80)	0.97(0.12)	1.57(0.41)
total sugar (%)	77.18(0.48)	72.75(0.97)	77.08(0.08)	76.48(0.53)	79.34(0.25)	75.49(0.68)	81.08(0.11)	79.74(0.73)
reducing sugar (%)	75.27(0.23)	70.15(1.08)	75.37(0.10)	70.64(0.56)	77.74(0.13)	72.80(0.16)	80.06(0.05)	78.17(1.05)
fructose against the total sugar (%)	59.10(0.61)	58.94(0.42)	64.00(1.26)	57.28(1.04)	51.65(1.33)	48.62(0.59)	51.75(0.61)	51.23(0.61)

	clover (America)		clover (Canada)		clover (Argentina)		manuka① (New Zealand)	
	the present method	HPLC method	the present method	HPLC method	the present method	HPLC method	the present method	HPLC method
fructose (%)	43.75(0.75)	39.12(0.31)	41.69(0.47)	38.60(1.13)	42.50(1.16)	40.30(0.44)	41.46(0.22)	38.57(0.80)
glucose (%)		34.05(1.12)		34.99(0.39)		31.80(0.65)		32.09(1.77)
sucrose (%)	1.87(0.07)	4.01(0.37)	0.94(0.06)	3.29(0.91)	2.46(0.21)	3.95(0.44)	1.43(0.09)	3.00(0.88)
total sugar (%)	79.13(0.08)	77.18(0.88)	79.57(0.04)	76.88(2.42)	79.64(0.03)	76.05(0.65)	76.78(0.18)	73.66(1.95)
reducing sugar (%)	77.16(0.07)	73.17(0.95)	78.58(0.06)	73.59(1.51)	77.05(0.20)	72.10(0.21)	75.27(0.06)	70.66(1.88)
fructose against the total sugar (%)	55.29(0.77)	50.69(0.93)	52.39(0.57)	50.21(0.22)	53.37(1.47)	52.99(1.04)	54.00(0.26)	52.36(1.74)

	manuka② (New Zealand)		manuka③ (New Zealand)		manuka④ (New Zealand)		the honey that flowers are not specified (Myanmar)	
	the present method	HPLC	the present method	HPLC	the present method	HPLC	the present method	HPLC
fructose (%)	40.55(1.74)	40.23(0.61)	42.62(0.58)	42.58(0.33)	41.66(0.33)	41.93(0.59)	37.73(0.22)	36.03(0.34)
glucose (%)		33.03(0.27)		33.15(0.32)		32.79(0.21)		35.14(0.60)
sucrose (%)	1.08(0.07)	2.27(0.16)	1.21(0.17)	2.22(0.58)	1.49(0.27)	2.39(0.17)	2.92(0.34)	2.71(0.33)
total sugar (%)	76.37(2.53)	75.53(0.67)	79.33(0.11)	77.95(0.75)	78.22(0.31)	77.11(0.78)	78.49(0.27)	73.88(0.87)
reducing sugar (%)	75.23(2.61)	73.26(0.55)	78.06(0.26)	75.73(0.21)	76.65(0.08)	74.72(0.61)	75.42(0.09)	71.17(0.89)
fructose against the total sugar (%)	53.10(1.23)	53.26(0.52)	53.72(0.74)	54.62(0.43)	53.26(0.41)	54.38(0.32)	48.07(0.43)	48.77(0.43)

	the honey that flowers are not specified (America)		honeydew (Romania)		coffee (Guatemala)		orange (Mexico)	
	the present method	HPLC	the present method	HPLC	the present method	HPLC	the present method	HPLC
fructose (%)	43.04(0.61)	39.35(0.08)	43.08(0.62)	37.79(0.76)	41.51(0.63)	39.10(0.26)	42.68(0.63)	41.38(0.76)
glucose (%)		33.69(1.27)		28.20(0.80)		35.03(0.43)		33.45(0.64)
sucrose (%)	3.42(0.22)	4.29(0.97)	1.80(0.25)	5.19(0.21)	1.27(0.34)	2.92(0.23)	1.78(0.48)	3.78(0.18)
total sugar (%)	80.12(0.17)	77.33(2.30)	75.35(0.30)	71.18(1.39)	78.08(0.37)	77.05(0.42)	79.96(0.38)	78.61(0.98)
reducing sugar (%)	76.52(0.09)	73.04(1.33)	73.46(0.09)	65.99(1.32)	76.74(0.10)	74.13(0.65)	78.09(0.21)	74.83(1.10)
fructose against the total sugar (%)	53.72(0.85)	50.89(1.44)	57.17(1.02)	53.09(0.45)	53.16(1.10)	50.75(0.14)	53.38(0.83)	52.64(0.51)

	chinese milk vetch (China)		rape (China)	
	the present method	HPLC	the present method	HPLC
fructose (%)	43.66(0.47)	40.51(0.20)	41.25(0.78)	42.74(1.16)
glucose (%)		29.53(0.32)		38.64(1.28)
sucrose (%)	1.43(0.35)	3.33(0.20)	1.29(0.08)	0.59(0.28)
total sugar (%)	77.40(0.36)	73.37(0.42)	82.47(0.16)	81.97(2.11)
reducing sugar (%)	75.89(0.09)	70.04(0.47)	81.11(0.10)	81.38(2.16)
fructose against the total sugar (%)	56.41(0.64)	55.21(0.07)	50.02(0.85)	52.14(0.87)

	average	
	the present method	HPLC
fructose (%)	42.50(2.35)	40.14(2.18)
glucose (%)		32.95(3.28)
sucrose (%)	1.68(0.68)	3.15(1.25)
total sugar (%)	78.64(1.78)	76.23(2.62)
reducing sugar (%)	76.87(1.88)	73.09(3.37)
fructose against the total sugar (%)	54.09(3.52)	52.67(2.72)

※total sugar in HPLC = fructose + sucrose + glucose

※reducing sugar in HPLC = fructose + glucose

The values in parentheses are standard deviation (individual: n=3, average: n=18)

3. 2 考察

3. 2. 1 塩酸による加水分解が不十分である可能性

HPLC 法による糖の定量値と現行法による糖の定量値に差が生じた要因について、0.1N 塩酸によるショ糖の加水分解が不完全である可能性が考えられる。

税関分析法 No.102 の果糖分とショ糖分の算出方法を以下に示す。

$$\text{果糖分(\%)} = 5 \times F / S - (\text{全糖分(\%)} - \text{還元糖分(\%)}) / 2$$

$$\text{ショ糖分(\%)} = (\text{全糖分(\%)} - \text{還元糖分(\%)}) \times 0.95$$

ただし、F=糖液の吸光度から検量線により得られた

1ml あたりの全果糖量(μg)

S=採取したサンプル量(g)

上記の式において、「全糖分」とは酸で加水分解した後の還元糖の量のことであり、「還元糖分」とは加水分解する前の還元糖の量のことであり、この差を利用して、そのままでは還元性を示さないが加水分解されると還元性を示すショ糖の量を求めている。酸による加水分解が不十分であれば全糖分は真の値よりも低く定量されることになるので、果糖分は真の値よりも高く、ショ糖分は真の値よりも低く計算される。したがって、現行法において加水分解が不十分であれば、HPLC 法と比べて果糖分は高く、ショ糖分は低くなると考えられ、これが現行法と HPLC 法の定量結果に違いを生じた原因であると考えられる。

3. 2. 2 TLC による追加実験 (Fig.4)

そこで、はちみつ中のショ糖が 0.1N 塩酸により完全に加水分解されているか否かを確かめるため、クローバーはちみつ（アルゼンチン産）を用いて TLC による定性分析を行った結果、0.1 N 塩酸で加水分解処理を行った試料中にショ糖の存在が確認された。また 1 N 塩酸を用いて加水分解処理を行った試料中にもショ糖の存在が確認された。

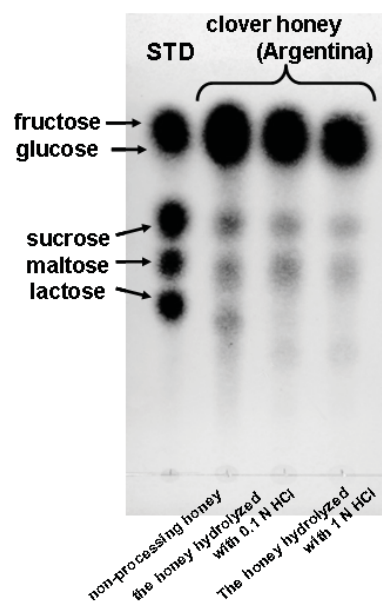


Fig.4 TLC of sugars contained in clover honeys hydrolyzed

3. 2. 3 考察

今回の研究で菜の花はちみつ、多花はちみつ及びマヌカはちみつ以外のはちみつでは、HPLC 法による定量値が現行法による定量値と比べて果糖分では低く、ショ糖分では高い値になることがわかった。また、クローバーはちみつ中のショ糖が 0.1 N 塩酸で完全に加水分解されなかったことから、他のはちみつ中のショ糖も 0.1 N 塩酸で完全に加水分解されず、その結果 HPLC 法と現行法による糖の定量値に差が生じる可能性があることがわかった。

更に、はちみつ中のショ糖は試料の蔵置場所の温度やはちみつ中の酵素の影響を受けること、及びレゾルシン塩酸法による果糖分の定量ではブドウ糖の発色による影響が報告されている^{1), 2), 3)}。また、はちみつ中にはこれまで挙げてきた糖以外に麦芽糖やオリゴ糖の存在が確認されており⁴⁾、このことも HPLC 法の測定結果が現行法の測定結果と異なる要因になると考えられ、今後更なる検討を必要とする。

4. 要 約

はちみつの糖分析において HPLC 法と現行法による定量値を比較した。その結果 HPLC 法と現行法による定量値では、果糖分、ショ糖分及び全糖分中の果糖分に差がみられたことから、はちみつの分析を単純に HPLC 法に代替するのは問題があると考えられる。

文 献

- 1) 平松一, 各務和宏, 中川鎭晃: 関税中央分析所報, 5, 27 (1967)
- 2) 福井作蔵: “生物化学実験法 1 還元糖の定量法 (第 8 刷)”, p.79 (1982) (学会出版センター)
- 3) 入江隆夫, 出来三男: 関税中央分析所報, 6, 101 (1968)
- 4) 三浦徹, 梅田寛, 水田完, 竹元賢治, 村上孝之, 笹川邦雄: 関税中央分析所報, 44, 25 (2004)