市販蜂蜜の品質に関する研究(第1報)

Studies on the Quality of Commercial Honey (Part 1)

蜂蜜の糖類分別定量法の簡易化

A Simple Method for Determination of Sugars in Honey

(昭和45年3月4日受理)

岡 崎 邦 夫*
(Kunio Okazaki)

An attempt to simplify the A.O.A.C. method for determination of sugars in honey was made to evaluate the quality of commercial honey. For determination of reducing sugars 3,6-dinitrophthalic acid color reaction was used, for the amount of sample on charcoal column chromatography was reduced to one-fifth comparing of A. O. A. C. method.

Charcoal column chromatography separated honey sugars to following three fractions; 1) H₂O eluate (glucose and fructose), 2) 7%EtOH eluate (disaccharides), 3) 50% EtOH eluate (higher oligosaccharides). On the H₂O eluate, total sugars (color reaction) and glucose (I₂ oxidation method) were determined and fructose content was calculated from glucose and total sugars contents. On the 7% EtOH eluate, maltose was determined by color reaction and sucrose was determined after hydrolysis under condition which maltose was not hydrolysed.

The proposed method was applied to four commercial honeys and beekeeper's honeys and the obtained result was comparable to that of A. O. A. C. method.

緒 言

蜂蜜は古来栄養剤や医薬品として用いられてきたが、近時は嗜好品としての需要が高まり、そのために年々多量に輸入されているようである。そしてこれらや国内産のものも加工されて市販されているが、外観的には純粋なものと蜂蜜以外のものが混入されたものとを見分けることがはなはだ困難で、しばしば偽和食品として問題を提起し、品質規格の制定が望まれているものの一つである。

国内法で蜂蜜の規格に触れているのは日本薬局法¹⁾のみで、同法では人工転化糖、でんぷん、デキストリンや花粉以外の異物を含有しないものとなっている。

最近 FAO/WHO で食品国際規格制定の一部として蜂蜜の暫定規格が提案され²⁾、還元糖量と見かけの蔗糖量や人工転化糖の検出などにより純粋蜂蜜とそれ以外のものとを判別することになるようである。

このように日本薬局法や FAO/WHO の規格では混入された酸転化糖、でんぷん、デキストリンの検出に主眼がおかれているが、現在日本の食品加工技術ではこれら

以外の物質の混入をも可能にし、従来法だけでは偽和物質の検出はできず、少なくとも蜂蜜を構成する糖類の分別定量が必要と思われる。

蜂蜜の糖類分別定量法は A. O. A. C. の Methods of Analysis³⁾ に詳述されているが、この方法でのクロマトグラフィーや還元糖の定量法は多くの時間と労力を要し多数試料の分析は困難である。著者は3,6-ジニトロフタル酸法⁴⁾ (以下DNP酸法と略記)によると、微量の還元糖定量が可能な点に着目し、同法を応用することによりクロマトグラフィーを簡易化し、分析時間を大巾に短縮することができた。ついで市販および直接養蜂家より提供された試料を用い、A. O. A. C. 法と著者の改良法の両者で分別定量を行なった結果、両者の定量値はほぼ一致し改良法による糖類の分別定量は蜂蜜の品質判定の手段としうると考えるので報告する。

実 験 方 法

1 試薬および試料

試薬: a) 3,6-ジニトロフタル酸液……3,6-ジニトロフタル酸モノピリジン塩 1.5 g を水約 400 ml に温めて溶かし冷後水を加えて 500 ml にする。

* 大阪市立衛生研究所

b) アルカリ液……無水炭酸カリウム 125g を水400 ml に溶かし冷後チオ硫酸ナトリウム25gを加えて500mlにする。

試料：養蜂家が昭和44年5月、直接採取した蜂蜜を用いた。市販品は大阪市内で購入した。

2 蜂蜜の吸着クロマトグラフィー

Darco G 60, Celite 545 混合物(1:1) 7g をカラム(22×500 mm)に充填し水約 300 ml で洗浄する。試料10.0 g を温水中で溶解し 500 ml にする。10 ml を吸着させ水250 ml で単糖類を溶出する(フラクションA)。つぎに7%エタノール 250 ml で二糖類を溶出する(フラクションB)。さらに50%エタノール 100 ml でオリゴ糖を溶出する(フラクションC)。

3 単糖類の分別定量

A) 全糖量の定量

フラクションAを10倍希釈し DNP 酸法で測定する。共栓試験管(16×160 mm)に希釈液2.0 ml 分注し DNP 酸液とアルカリ液を 1.0 ml ずつ加え沸騰水中で正確に10分間加熱したのち、直ちに流水で冷却し水を加えて全量を20.0 mlにする。同時に蒸留水2.0 ml についても同様に操作したものを対照とし、450 mμ で比色定量する。並行してブドウ糖の標準液を上記と同様に反応させ検量線を作成する。この検量線を用いて全糖量を求める

$$\text{全糖量}(\%) = A_1 \times 0.625$$

但し A_1 : 希釈液 2.0 ml 中の糖量 (μg)

B) ブドウ糖の定量

フラクションA液を2倍希釈する。希釈液 5.0 ml および空試験として水 5.0 ml を共栓試験管(30×200 mm)にそれぞれ分注し、N/100ヨード液 5.0 ml と0.15 M炭酸ナトリウム 1.0 ml を加えた後、20°C で90分暗所に放置する。0.2 N硫酸 3 ml 加え N/200 チオ硫酸ナトリウムを用いて滴定する。同時にブドウ糖標準液 (0.50～0.80 mg/5 ml) を同様に反応させ、N/200チオ硫酸ナトリウム 1.0 ml に対応するブドウ糖量を求める。

$$\text{ブドウ糖}(\%) = 50 \times B \times S$$

但し B: N/200- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の消費量

S: N/200- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 1.0 ml 当りのブドウ糖量 (mg)

C) 果糖の定量

$$\text{果糖}(\%) = \text{全糖量}(\%) - \text{ブドウ糖}(\%)$$

4 二糖類の分別定量

A) 全糖量の定量

フラクションB液 25.0 ml に 6 N塩酸 5 ml と水 5 ml を加え60°C で17分加水分解する。冷後中和して 50.0 ml にする。この液 2.0 ml とりDNP酸法で測定する。ブドウ糖の検量線で全糖量を求める

$$\text{全糖量}(\%) = A_2 \times 1/8$$

但し A_2 : 2.0 ml 中のブドウ糖量 (μg)

B) 麦芽糖としての二糖類の定量

フラクションB液 2.0 ml をDNP酸法で測定する。麦芽糖の検量線で麦芽糖量を求める。

$$\text{麦芽糖}(\%) = A_3 \times 1/16$$

但し A_3 : 2.0 ml 中の麦芽糖量 (μg)

C) 蔗糖の定量

$$\text{蔗糖}(\%) = [\text{全糖量}(\%) - \text{麦芽糖}(\%) \times 0.785] \times 0.95$$

5 オリゴ糖の定量

フラクションC液 25 ml に 6N 塩酸および水 5 ml ずつ加え沸騰水中で45分加水分解する。冷後中和して 50.0 ml にする。この液 2.0 ml を DNP 酸法で測定する。ブドウ糖の検量線を用いてブドウ糖量を求める。

$$\text{オリゴ糖}(\%) = A_4 \times 9/200$$

但し A_4 : 2.0 ml 中のブドウ糖量 (μg)

実験結果および考察

1 カラムクロマトグラフィーの簡易化

DNP 酸法は A. O. A. C. 法に比べて糖の定量感度が非常に高いので試料の吸着量は少量ですみ、したがってクロマトグラフィーの操作時間を短縮できる。しかし、蜂蜜中の二糖類含量を考慮すると試料として最低 0.2 g を要する。カラム径を同一にした場合、充填剤の使用量を A. O. A. C. 法の 1/3 即ち 7 g とした。この場合のカラム長は 7 cm となった。

Fig. 1. Charcoal celite adsorption chromatography of mono, disaccharides

蜂蜜を構成する主な糖類4種を吸着させ各糖の溶出状態を調べ結果を図1に示した。また回収率を測定する目的でこのカラムを用いて4種の糖を吸着、分離しDNP酸法で測定した結果を表1に示した。次に本法を天然の蜂蜜に応用する目的で採取した蜂蜜に4種の糖を添加し

Table 1. Analysis of known sugar mixtures

Mixture No.	Glucose			Fructose			Maltose			Sucrose		
	Present	Found		Present	Found		Present	Found		Present	Found	
	mg	mg	%	mg	mg	%	mg	mg	%	mg	mg	%
1	40.0	39.7	99.3	40.0	40.2	100.5	10.0	9.8	98.0	5.0	4.7	94.0
2	50.0	50.2	100.4	50.0	49.3	98.6	15.0	15.3	102.0	5.0	4.8	96.0
3	60.0	59.5	99.2	60.0	58.9	98.2	15.0	15.2	101.3	5.0	5.2	104.0
4	70.0	68.8	98.3	70.0	69.1	98.7	20.0	19.3	96.5	10.0	9.7	97.0
AV.		99.3			99.0			99.5			97.8	

Table 2. Recovery of sugars added to honey*

No.	Glucose		Fructose		Maltose		Sucrose	
	honey	honey+** sugar added	honey	honey+** sugar added	honey	honey+** sugar added	honey	honey+** sugar added
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
1	69.0	139.0	75.4	146.0	11.3	30.9	0.66	10.80
2	69.3	140.2	74.7	144.3	11.1	31.2	0.62	10.92
3	69.2	139.5	75.1	144.7	11.3	30.9	0.68	10.78
AV.	69.2	139.6	75.1	145.0	11.2	31.0	0.65	10.83
Recovery (%)	100.6		99.2		99.0		101.8	

* 0.200 g honey was applied to each analysis

** following sugar mixtures were added to honey

{ Glucose 70.0 mg
Fructose 70.0
Maltos 20.0
Sucrose 10.0

Table 3. Comparison of present method with A. O. A. C. method

Mixture No.	Calcd.		A. O. A. C. method				Present method			
			Found				Found			
	Glu.	Fru.	Glu. (mg)	Error(%)	Fru.(mg)	Error(%)	Glu.(mg)	Error(%)	Fru.(mg)	Error(%)
	mg	mg								
1	30.0	0	30.0	0	0	0	30.2	+0.7	0	0
2	30.0	10.0	30.5	+1.7	9.1	-9.0	30.1	+0.3	9.8	-2.0
3	30.0	20.0	30.3	+1.0	18.7	-6.5	30.4	+1.3	19.8	-1.0
4	30.0	30.0	30.3	+1.0	28.8	-4.0	29.7	-1.0	30.4	+1.3
5	30.0	40.0	29.8	-0.7	38.9	-2.7	30.5	+1.7	39.4	-1.5
6	30.0	50.0	29.6	-1.3	49.2	-1.6	30.7	+2.3	49.5	-1.0
7	30.0	60.0	29.2	-2.7	59.5	-0.8	31.0	+3.3	59.1	-1.5

Glu.: Glucose Fru.: Fructose

その回収率の結果を表2に示した。各糖の回収率は良く少量の充填剤で分析できることを認めた。本法のカラムを用いると吸引しなくてもクロマトグラフィーが実施できるので、同時に多数の試料を処理することができる。

2 ブドウ糖と果糖の分別定量

ブドウ糖と果糖の混液中のブドウ糖を定量する場合、Willstätter-Schudel 法では大きく果糖の影響を受ける。

貝沼らの改良法⁵⁾を用いると誤差は非常に少ない。またDNP 酸法は操作が簡単でしかもブドウ糖と果糖の検量線が一致するので全糖量を測定できる利点がある。そこでDNP酸法と貝沼らの方法を組み合わせた本法とA. O. A. C.法を比較検討するため果糖濃度を変えて分別定量しその結果を表3に示した。本法において果糖がブドウ糖の2倍量存在するとき、ブドウ糖の定量に若干の影響があ

Table 4. Comparison of present method with A. O. A. C. method

Mixture No.	Calcd.		A. O. A. C. method				Present method			
			Found				Found			
	Mal.	Suc.	Mal.(mg)	Error(%)	Suc.(mg)	Error(%)	Mal.(mg)	Error(%)	Suc.(mg)	Error(%)
1	mg	mg								
1	40.0	0	39.2	-2.0	0	0	40.1	+0.3	0	0
2	40.0	20.0	40.3	+0.8	20.4	+2.0	40.5	+1.3	19.7	-1.5
3	80.0	30.0	79.1	-1.0	29.2	-2.7	80.5	+0.6	30.4	+1.3
4	80.0	40.0	81.3	+1.5	40.5	+1.3	78.8	-1.5	39.2	-2.0
5	120.0	50.0	121.5	+1.3	50.1	+0.2	121.4	+1.2	50.7	+1.4
6	120.0	60.0	121.5	+1.3	58.4	-2.7	118.8	-1.0	61.1	+1.8

Mal.: Maltose Suc.: Sucrose

るが、蜂蜜中の果糖は通常ブドウ糖の1～1.3倍のようであるからこの程度では殆んど影響がないと考えてよい。A. O. A. C. 法において果糖の定量はブドウ糖を酸化分解したのち Shaffer-Somogyi 法で測定しているが、この方法は煩雑で多くの時間を要し、かつ表3に示したように果糖濃度が低い場合、誤差が大きくなる。これはブドウ糖をヨード酸化後10倍希釈され Shaffer-Somogyi 法で測定する際の果糖濃度が 0.5 mg/5 ml 以下となり、定量性がなくなるものと考えられる。本法によれば果糖定量時の誤差は小さく、かつ簡易に分別定量ができる。

3 麦芽糖と蔗糖の分別定量

百瀬ら⁹⁾によると DNP 酸法で乳糖の示す吸光度をブドウ糖の検量線からブドウ糖量として読むと、実際の乳糖量に 0.785 を乗じた値になる。また乳糖と麦芽糖の検量線が一致する³⁾ ので本法の場合これを応用し、先ず麦芽糖量を求め、次に全糖量を測定し次式

蔗糖(%) = {全糖量(%) - 麦芽糖(%) × 0.785} × 0.95
により蔗糖量を算出できる。これは本法の加水分解条件では蔗糖は完全に転化糖となり、麦芽糖は全く分解しないので前式が成立する。本法と A. O. A. C. 法との比較検討した結果を表4に示したが、両法ともほぼ等しい値が得られた。

4 再現精度の測定

定量値の再現性を調べるため同一試料中の3種の糖を本法で6回測定し、測定値の変動係数を求めた結果を表5に示した。麦芽糖の変動係数が3.08%と他に比べると高くなっているが、含有量が少ないので蜂蜜の分別定量法としては満足できるものであろう。

5 採取蜂蜜および市販蜂蜜の糖類分別定量

前項までに述べた方法と A. O. A. C. 法を用い、2種類の採取蜂蜜と4種類の市販品を分析した結果を表6に示した。両方法による定量値はほぼ一致し、著者の改良法が蜂蜜の糖類分別に適用しうることを知った。また各糖

Table 5. Reproducibility of analytical value

Number of measurment	Quantitative value (%)		
	Glucose	Fructose	Maltose
1	34.38	37.21	5.31
2	34.81	37.74	5.74
3	33.95	36.83	5.42
4	34.24	36.57	5.58
5	34.58	37.12	5.47
6	33.73	36.79	5.79
Average	34.28	37.04	5.55
Standard deviation	0.364	0.277	0.171
Coefficient of variation (%)	1.06	1.02	3.08

の定量値を詳細に検討すると、養蜂家より提供された2種類の試料間では各糖の含量比は大差なく、White⁷⁾ の分析値に近似しているが、市販品については試料毎に相異なる。これは蜂蜜の種類、あるいは加工の程度に相当な異なりがあるためと推測できる。とくに市販品 No. 6 では全糖量が約67%となり、他のものに比し約10%低くなっているのは注目に値する。加工時に添加される主な物質は転化糖とされているが、この結果はそれ以外の物質も加えられることを示唆しているようで、この点については後報で詳述する予定である。

要 約

わが国の食品加工技術から考え、日本薬局法、FAO/WHO の食品国際規格案のみでは蜂蜜の品質判定は困難で、糖類の分別定量を行なう必要があると考え、まず A. O. A. C. 法より簡易な定量法の設定を試みた。すなわち、1,3,6-ジニトロフタル酸法を用いると微量の糖類を正確に定量でき、クロマトグラフィーを簡易にし分析時間

Table 6. Carbohydrate analysis of honey by present method and A. O. A. C. method

Honey	H ₂ O %	Glucose %		Fructose %		Maltose %		Sucrose %		High sugars %	
		Present method	A.O.A.C. method	Present method	A.O.A.C. method	Present method	A.O.A.C. method	Present method	A. O. A. C. method	Present method	A. O. A. C. method
1*	20.15	34.84	34.18	37.41	37.83	5.95	5.62	0.43	0.35	0.13	0.19
2*	24.52	32.80	33.29	37.20	37.61	3.56	3.37	0.42	0.59	0.21	0.12
3**	20.12	31.84	31.31	38.16	37.74	6.87	6.39	0.89	0.73	0.51	0.36
4**	19.35	36.48	36.94	35.40	34.97	5.91	5.68	1.21	0.96	0.40	0.26
5**	23.17	34.32	33.84	36.62	36.14	3.89	4.21	0.31	0.24	0.25	0.12
6**	21.87	30.14	30.07	30.49	29.81	5.31	5.30	0.44	0.54	0.67	0.55

* honey, supplied directly beekeeper

** commercial honey

を短縮できる。またブドウ糖と果糖の検量線が一致するのでクロマトグラフィーでの単糖類溶出フラクションについて全糖量を求め、その値から別に求めたブドウ糖量を差し引けば正しく果糖量が定量できる。

2 麦芽糖と乳糖との検量線が一致し、その Optical Density がブドウ糖の 0.785 倍であるので、二糖類溶出フラクションについてまず麦芽糖量を求め、ついで麦芽糖が加水分解されない条件下で蔗糖を転化糖に変えて全糖量を求め、その値から麦芽糖のブドウ糖換算値を差し引けば蔗糖量が定量できる。

3 本改良法での測定値の変動係数はブドウ糖 1.06%、果糖 1.02%、麦芽糖 3.08% で再現精度は高い。

4 採取蜂蜜 2 件、市販蜂蜜 4 件について本法と A. O. A. C. 法の両法で構成糖量を測定した結果、両法の結果はほぼ一致し、A. O. A. C. 法に比べ定量操作が簡易で品質判定の一手段として用いうることを示した。

終りにのぞみ、本実験に当りご指導ならびにご校閲をいただいた当所川北兵蔵食品栄養課長、試料を提供下さった茨木養蜂園稲田四弘氏に厚く感謝します。

本報告の要旨は第 23 回日本栄養・食糧学会総会において発表した。

文 献

- 1) 第 7 改正日本薬局法第 2 部解説書, p. 420, 広川書店(1966)
- 2) FAO/WHO: "Draft Provisional Standard for Honey" (1968)
- 3) Association of Official Agricultural Chemist: "Official Methods of Analysis of A. O. A. C." 10th ed. 502 (1965)
- 4) Momose, T., Mukai, Y., Watanabe, M.: *Talanta*, **5**, 275 (1960)
- 5) 貝沼圭二, 田所克子, 鈴木繁男: 澱粉工業会誌, **12**, 56 (1965)
- 6) 百瀬 勉, 向井良子: 薬学雑誌, **81**, 227(1961)
- 7) White, J. W., JR., Maher, J.: *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists.*, **37**, 478 (1954)

菜種および大豆中の利用可能炭水化物

表題の炭水化物を化学的方法とヒナによる定量法で測定した。菜種および大豆中の可溶性糖とでんぷんの合計量はそれぞれ、15.0%、23.6%であった。生物的分析法では生理的有效値としてそれぞれ 6.9%、14.1%の値を得たが、生物的分析法の値が低いのは、腸における吸収性も加味されてきたためであろう。

Available Carbohydrate in Rapeseed Meal and Soybean Meal as Determined by a Chemical Method and a Chick Bioassay.

by Lodhi, G. N., Renner, R., Clandinin, D. R.: *J. Nutr.*, **99**, 413~418 (1969)

(堀 井)