ポストカラム反応法を利用したハチミツ中の異性化糖分析

三島 敏[§], 平岩 呂子, 荒木 陽子

アピ株式会社総合研究所

Analysis of Oligosaccharides in a Honey by High Performance Liquid Chromatography with a Post-column Reaction System

Satoshi Mishima[§], Nagako Hiraiwa and Yoko Araki

Research Institute, API Company Limited, 4-23, Shinhon-Machi, Kanoh, Gifu 500-8463

Many methods to detect some foreign oligosaccharides (mainly from corn fructose syrup) in a honey have been studied, and a combined method of charcoal treatment and thin layer chromatography (TLC) is recommended to use in Japan. But the method has some weak-points such as being time-consuming and uneven due to charcoal treatment. We have tried to improve an analytical method using the gel chromatography on Sephadex G-15 and high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a post-column reaction system. By this method, the foreign oligosaccharides (relative retention time to glucose, 0.71-0.78) could be detected even in a honey added 5% of syrup. We will, herein, propose a combined method of gel chromatography and high performance liquid chromatography for swift distinction between a real and a syrup-added honeys.

(Received Jun. 6, 2002 ; Accepted Nov. 13, 2002)

古代より世界各国で営まれてきた養蜂は、その産品であるハチミツが近代になって優れた健康食品であることが見直され、さらに、最近の研究開発が進み、世界各国のハチミツの消費の増大につながっている。

ハチミツはビタミン、ミネラルに富んだ天然甘味料として古くから珍重されてきたが、その供給量には限界があり、他の安い人工甘味料（以下異性化糖と表す）で増量される場合が多い商品として知られている¹⁾。異性化糖添加ハチミツを見分ける方法についての研究は従来から行われてきており^{2)~5)}、高分解能質量分析計による炭素の安定同位体比 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) で検出する方法³⁾ならびにグルコースのみからなるオリゴ糖を薄層クロマトグラフィー (TLC) で検出する方法⁵⁾については A.O.A.C. 公定法⁶⁾に採用されている⁷⁾。しかし、上述の質量分析計は非常に高価であるため一般企業における分析手法としては不向きであり、現在は TLC を利用した方法が広く産業界において採用されている。この TLC を利用した方法は、活性炭カラムを用いて、ハチミツ中に大量に含まれる単糖の除去後 TLC を行ない、3 糖以上からなるオリゴ糖を指標として異性化糖添加の有無を判別する方法である。ただし、この方法には、活性炭カラムによる前処理及び TLC 解析の操作の煩雑性

や熟練を要するなどの問題点が認められる。これらの問題点を克服すべく簡便な方法として示差屈折率検出器 (RI) を利用した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析が報告されている⁷⁾⁸⁾。しかし、この方法にも RI の安定性や検出感度の低さに問題があることから、詳細な解析例はいまだ少なく、実用化には至っていない。その一方で、血中のオリゴ糖を高感度に検出する目的で、HPLC カラムによる分離後のオリゴ糖に塩酸グアニジンの反応液を加え高温下で反応（ポストカラム反応）させることにより強い蛍光を発する性質を利用した方法が報告されている^{9)~11)}。この反応は、オリゴ糖のアルデヒド基（カルボニル基）と塩酸グアニジンのグアニジル基が高温下で誘導体を形成し蛍光を発する原理に基づいている。

今回、ハチミツ中のオリゴ糖の検出方法としてよりばらつき少なく、感度の良い方法の開発を試み、さらに TLC 解析法と HPLC 解析法との相関性について調べた。まず、オリゴ糖を検出する手段として、上述の塩酸グアニジン及び過ヨウ素酸混合液を用いたポストカラム反応による蛍光検出を利用した HPLC 解析法を行なった。さらに、単糖類の除去を目的とした前処理を、オリゴ糖の分子量の違いを利用したセファデックス G15 によるゲルろ過カラム操作により行なった。

〒500-8463 岐阜市加納新本町 4-23

[§] 連絡先 (Corresponding author), mishima-satoshi@api3838.co.jp

実験方法

1. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

全国はちみつ公正取引協議会の推奨する TLC を利用した異性化糖添加ハチミツの検出試験法⁵⁾⁶⁾に従って、ハチミツ及び異性化糖の TLC 解析を行なった。ハチミツ中に大量に含まれる単糖を活性炭 (Darco G-60, 和光純薬工業, 大阪市) カラム (20 mm ID×450 mm) を用いて除去し, 50% エチルアルコールで溶出し, 得られた画分を TLC で以下の条件で検出した。(薄層版; シリカゲル G 20 cm×20 cm, 展開溶媒; 1-ブタノール: 酢酸: 水=2: 1: 1 (v/v/v), 発色試薬; アニリン, ジフェニルアミン, リン酸)

2. ポストカラム反応による高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

オリゴ糖の分子量の情報を得ることを目的として, Yamauchi ら⁹⁾¹⁰⁾の方法に準じたポストカラム反応による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 解析を行なった。分析条件は以下の通りである。分析カラム: Shodex Sugar KS-801 (ゲルろ過カラム, 8 mm ID×300 mm, 排除限界分子量: 1×10^3 , 理論段数/30 cm: 15 000 段以上), ガードカラム: Shodex Sugar KS-G, 移動相: 水, 流量: 0.6 ml/min, 温度: 65°C, ポンプ: 島津 LC-9A。

図 1 には, 分析カラムによる分離後のオリゴ糖に, 塩酸グアニジン及び過ヨウ素酸の入った反応液を加えて高温下のループ内でポストカラム反応を行ない, 発する蛍光を蛍光検出器で検出する機器の概要を示した (図 1)。反応液は 50 mM グアニジン塩酸塩 (4.7765 g/l), 0.5 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム (0.1071 g/l), 0.1 M ホウ砂 (38.137 g/l) の混合液を 6N 水酸化ナトリウム溶液で pH 12 に調製した溶液を用い, 0.5 ml/min の流量で, 150°C に設定した反応ボックス: 島津 CRB-6A 中の反応コイル (0.5 mm ID×2000 mm, ステンレス) で反応を行ない, 蛍光検出器で

図 1 ポストカラム反応を利用した HPLC 蛍光分析の流路図

1: 移動相; 2: 送液ポンプ; 3: 試料注入器; 4: 分析カラム; 5: カラム恒温槽; 6: 反応液; 7: 送液ポンプ; 8: 化学反応槽; 9: 冷却コイル; 10: 蛍光検出器

サンプル中のオリゴ糖を分析カラムにて分離後: 反応溶液と混合し 150°C 反応槽中で反応させることにより発せられる蛍光を検出する。

以下の条件で解析した。検出器: 島津 RF-535, (蛍光検出器, Range: 16, Sensitivity: Low, Response: Slow, Ex: 313 nm Em: 433 nm) データ処理機: 島津 C-R6A, (WIDTH: 9, SLOPE: 20, DRIFT: 0, MIN.AREA: 10, T.DBL: 20, STOP.TM: 22, ATTEN: 0, SPEED: 5)

3. 試料調製

異性化糖, 異性化糖無添加ハチミツ及び異性化糖添加ハチミツ (異性化糖 5-20% (w/w) 添加) の各サンプル 0.5 g を水で 10 倍希釈し, モルカット LGC (ミリポア; 分子量 10 000 カットオフ) を通し, 5 μ l を注入して HPLC 解析を行なった。糖標品 (グルコース, フルクトース, マルトース, ツラノース, スクロース, ラフィノース, エルロース, メレチトース, 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及びマルトヘキサオース) を 2 mg/ml の濃度で水に溶かし, 0.45 μ m フィルターを通したサンプル 10-20 μ l を注入して HPLC 解析に供した。活性炭カラム法 (前述) で調製したオリゴ糖画分は, 水で 20 倍希釈して, 0.45 μ m フィルターにて精密ろ過し, その 10 μ l を HPLC 解析に供した。

4. ゲルろ過カラムによるオリゴ糖試料調製

オリゴ糖と単糖の分子量の違いを利用した分画を目的として, ゲルろ過カラム (セファデックス G15; アマシャムファルマシア社, 分画範囲 1 500 Da) を用いて, ハチミツ中の単糖の除去及びオリゴ糖の分画を行なった。セファデックス G15 カラム (V_0 : 18.6 cm³, カラム; 内径 1.5×15, バイオラッド社) を調製し, 水にてベッドボリュームの 3 倍量以上で洗浄後, 水で 2 倍希釈したハチミツ試料を 5 ml 量カラムに添加した。その溶出後, 10 ml の水を移動相として自然落下 (流速 0.4-0.7 ml/min) でオリゴ糖を溶出させ, 溶出液を 3 ml ずつ 3 画分回収し, 以降の分析には画分 2 を用いた。

活性炭カラムによる前処理は公正取引協議会の規定通りに行ない, 得られたサンプルを水で 20 倍希釈した後に 0.45 μ m フィルターを通し, 10 μ l を HPLC で解析した。

実験結果及び考察

1. 異性化糖特異的オリゴ糖の検出

日本産異性化糖 10% 添加ハチミツ, 中国産異性化糖 10% 添加ハチミツ, 異性化糖無添加ハチミツ及び異性化糖添加 (と判断された) ハチミツについて TLC 解析を行なった結果を図 2 に示した。現在の全国はちみつ公正取引協議会の規定では 3 糖 (図 2, レーン 5) より移動度の低いスポット (3 糖以上のオリゴ糖) が検出されるかどうか及び異性化糖無添加サンプル (図 2 レーン 3, レーン 6) との比較 (図 2, * で示す異性化糖特異的スポット) でハチミツ中の異性化糖の有無を判断している。しかし図 2 レーン 3 とレーン 6 とのパターンの違いにも示されるように同一サンプルでも TLC パターンが異なり再現性に乏しい。その

図 2 異性化糖無添加及び添加ハチミツの TLC パターン

1, 日本産異性化糖 10% 添加ハチミツ; 2, 中国産異性化糖 10% 添加ハチミツ; 3, 異性化糖無添加ハチミツ; 4, 異性化糖添加ハチミツ; 5, メレチトース及びラフィノース (3 糖) の混合液; 6, 異性化糖無添加ハチミツ; *, 異性化糖添加の有無の指標とされる異性化糖特異的スポット各サンプル (5 を除く) を活性炭カラム処理することにより単糖を除いた後に TLC 解析を行った。

操作及び判断は煩雑で熟練を要する方法であることが問題点としてあげられている。これに代わるハチミツ中の異性化糖分析として RI 検出法による HPLC 解析が既に検討されている⁷⁾⁸⁾が、その安定性や検出感度が低いという問題がある。かつ分析例も少なく、従来法との相関性を示すには至っていない。その一方で、より安定性の高く、還元糖及び非還元糖の高感度検出法として塩酸グアニジン及び過ヨウ素酸を用いたポストカラム反応による蛍光検出を利用した HPLC 解析法が報告されている⁹⁾¹⁰⁾。そこでこの方法を用いて日本産、中国産異性化糖及び異性化糖添加、及び無添加ハチミツ中に含まれている糖について HPLC 解析を行なった (図 3)。異性化糖の各サンプルからは、対グルコース相対保持時間 1.00 (グルコース), 1.06 (フルクトース), 0.87, 0.80, 0.81, 及び 0.72, 0.73 のピークが検出された (図 3 (1), (2))。このうち 0.72, 0.73 のピークは異性化糖無添加ハチミツからは検出されなかったことから (図 3 (3)), このピークが異性化糖に含まれている成分に由来する特異的ピークであると考えられた。各種糖標品の HPLC 解析の結果, 対グルコース相対保持時間は 2 糖 (マルトース, ツラノース及びスクロース) が 0.87, 3 糖 (ラ

フィノース, エルロース, メレチトース及びマルトトリオース) が 0.80 又は 0.81, 4 糖 (マルトテトラオース) が 0.78, 5 糖 (マルトペンタオース) が 0.76, 6 糖 (マルトヘキサオース) が 0.74 であった (データは非表示)。これらの結果との比較及び HPLC 解析に用いたカラムがゲルろ過モードであることから, 対グルコース相対保持時間 0.87 のピークは 2 糖, 0.80 又は 0.81 のピークは 3 糖, 0.67, 0.68, 0.72 及び 0.73 のピークは 6 糖以上のオリゴ糖であると考えられた (図 3, (1) - (4))。ただし, 異性化糖添加及び無添加ハチミツ中からのみ検出された 0.67 及び 0.68 のピーク (図 3, (3), (4)) については, これまでに解析した中国産及び日本産異性化糖 11 サンプルからは検出されていない (データは非表示) ことから糖とは別の成分である可能性も考えられた。

図 3 の結果では対グルコース相対保持時間 0.72, 0.73 のオリゴ糖のピークが異性化糖の特異的ピークであることが考えられた。実際に, 従来法 (TLC) で異性化糖添加ハチミツの指標とされる異性化糖特異的オリゴ糖スポット (図 2 の * で示すスポット) を TLC 板から抽出し, HPLC 解析を行なったところ, 対グルコース相対保持時間 0.78 以下の

図 3 異性化糖、異性化糖無添加及び添加ハチミツの HPLC パターン

(1), 日本産異性化糖 ; (2), 中国産異性化糖 ; (3), 異性化糖無添加ハチミツ ; (4), 異性化糖添加ハチミツ

Glc, グルコース ; Fru, フルクトース ; r.t, 保持時間 ; r.r.t, グルコースに対する相対保持時間
(r.r.t) が 0.80 (及び 0.81) のピークは 3 糖, 0.87 のピークは 2 糖を示す。各サンプルを水で 10 倍希釈後 5 μ l をカラムに注入して HPLC 解析を行った。図中の矢印及び表中のアンダーラインは異性化糖特異的オリゴ糖のピークを示す。

ピークとして検出された(データは非表示)。以上の結果から HPLC を利用した系での異性化糖添加の有無について、対グルコース相対保持時間 0.71-0.78 のピークを指標

として利用することが有効であると考えられた。

2. ゲルろ過カラムを利用した前処理法の検討

異性化糖添加有無の指標となる対グルコース相対保持時

間 0.71-0.78 のピークの検出に必要なハチミツ中の異性化糖の割合について調べるため、異性化糖無添加ハチミツに異性化糖を 5-20% 加えたサンプルを調製し解析した。異性化糖添加の指標となるピークは異性化糖 10% 以上において検出されることが判った(データは非表示)。従来法においては異性化糖 5% 添加ハチミツ中でもオリゴ糖スポットが検出されており、従来法レベルの検出感度にするためには HPLC に注入するハチミツサンプル濃度を上げることが必要と考えられた。従来法では活性炭カラム処理によってハチミツ中に含まれる大量のグルコース及びフルクトースの除去を行っている。これに変わる新たなハチミツの前処理法として、ゲルろ過カラム(セファデックス G15)を利用した方法について検討した。セファデックス G15 カラムにハチミツを添加後、オリゴ糖溶出し始めて 3 ml ずつ 3 分画を回収し、各分画の糖組成を HPLC 分析したところ、単糖のピークは 3 番目の画分に、異性化糖添加の指標となるピークは 2 番目の画分に最も多く検出された(データは非表示)。そこで、異性化糖無添加ハチミツに異性化糖を 5-20% 加えた各サンプルについてセファデックス G15 による前処理を行ない、2 番目の画分について解析した。異性化糖の指標となる対グルコース相対保持時間 0.71-0.78 のピークが異性化糖 5% サンプルからも検出され、異性化糖の割合とともにその量が増加することが判った(データは非表示)。この方法はハチミツ試料からのオリゴ糖を損失することなく前処理できることが確認された。これらの結果からゲルろ過カラム(セファデックス G15)を利用した前処理を行なったサンプルについて HPLC 解析を行なう系がハチミツ分析の新たな手法として利用できると考えられた。

3. 従来法(TLC)と新法(HPLC)との比較

ゲルろ過カラムを利用した前処理サンプルの画分 2 について HPLC 解析を行なう手法(新法)と活性炭カラムによる前処理サンプルの TLC 解析による従来法の相関性について調べた。ハチミツ 54 サンプルについて新法で解析し従来法と結果を比較したところ、54 サンプル中 12 サンプルで異なる結果となった(表 1* 印)。従来法で異性化糖無添加と判断され、新法では異性化糖添加と判断された 12 サンプルを再解析したところ、同様に従来法と結果が一致せず新法では異性化糖添加ハチミツと判断された。これらの結果から新法が従来法より感度が高くハチミツ中の異性化糖を検出する有用な方法であると考えられた。また、表 1 の No. 13, 45 の TLC の結果に示すように、従来法では分析機関により異なる結果が得られたことから、従来法は再現性に乏しく、その感度も低いものと考えられた。

更に、従来法と新法の違いについて調べるため、従来法で異性化糖無添加と判断されたハチミツ 1 サンプル(図 4 (1))と異性化糖添加と判断された 2 サンプル(図 4 (2) (3))について比較した。従来法の前処理と新法の前処理に

よる溶出されてくる糖成分の違いを HPLC 解析したところ、今回解析した 3 サンプルともに新法のゲルろ過カラム処理サンプルでは異性化糖の指標となるピークが明確に検出された(図 4 (1) - (3) ゲルろ過処理、矢印及び斜線で示す)。これに対して、従来法の活性炭カラム処理サンプルからは異性化糖指標ピークの存在が示されるパターンになったものの、そのピークはゲルろ過カラム処理サンプル中よりも明らかに少なかった(図 4 (1) - (3) 活性炭処理、矢印及び斜線で示す)。この結果からハチミツからグルコース、フルクトースを除去し、より効率的にオリゴ糖を回収する前処理法として、活性炭カラム処理に比べ、ゲルろ過カラム処理の方が適していると考えられた。また、従来法で用いた活性炭カラム処理サンプルの HPLC パターンで示されるように対グルコース相対保持時間 0.80 以下のところに明らかなピークが見られるにも関わらず、記録計ではピークとして検出されないことがある(図 3)。この点を考慮して新法における判断基準としては HPLC 解析で対グルコース相対保持時間 0.70 以上 0.80 未満の領域に明確なピークでなくてもある程度の高さのある肩が見られれば異性化糖添加ハチミツとするべきであると思われた。

以上の結果からゲルろ過カラムによる前処理、ポストカラム反応による蛍光検出を利用した HPLC 解析を組み合わせた新法が、より簡便なハチミツ中の異性化糖分析法として、従来法レベルでは十分利用できると考えられた。ただし、異性化糖添加の有無の指標となるオリゴ糖成分の組成や含有率が、異性化糖各製品によって大きく異なることから、定量的解析は不可能であり、今回示した方法はあくまでも定性的分析手法であると考えられる。また、兼松らは異性化糖特異的に検出されるピークがトチハチミツから検出されることを報告している⁷⁾⁸⁾。今回、本法によりトチハチミツを分析した結果、対グルコース相対保持時間 0.76 付近で 5 糖からなるオリゴ糖と予想されるピークが検出され文献と一致した(データは非表示)。これについて詳細は不明であるが、トチハチミツのようなオリゴ糖を含有するハチミツも例外として認められることに注意すべきである。

また、従来の方法は、分析機関により判断が異なり、さらに本法と食い違いが認められる場合がある。即ち、新法においてはハチミツ試料からのオリゴ糖をロスすることなく前処理し、さらにポストカラム HPLC 法にて高感度で検出されるため、従来法では無添加ハチミツとされていたものでも異性化糖添加ハチミツと判断される場合がある。新法は正確にかつ再現性良く異性化糖の混入を判断でき従来法を代替する手法として有用である。現在、異性化糖特異的に検出される対グルコース相対保持時間 0.72 付近の 6 糖以上のオリゴ糖と考えられる成分に関して、単離精製後の構造解析を行なっている。また、トチハチミツでも検出される同保持時間成分についても検討中である。

表 1 ハチミツの分析結果

No.	従来法 (TLC)			新法(HPLC)	各ピークの対グルコース相対保持時間						サンプル名	
	分析 a	分析 b	分析 c									
1		—		*+	0.65	<u>0.71</u>	<u>0.77</u>	0.80	0.87	1.00	1.06	LA 湖北
2		—		*+		0.65	0.68	<u>0.71</u>	0.80	1.00	1.06	LA 湖北
3		—		—			0.69	0.80	0.87	1.00	1.06	LA 吉林
4		—		—		0.65	0.69	0.80	0.87	1.00	1.06	ELA 吉林
5		—		—		0.65		0.80	0.87	1.00	1.06	ELA 吉林
6		—		*+			<u>0.73</u>	0.80	0.87	1.00	1.06	ELA 吉林
7		—		—			<u>0.68</u>	0.81	0.87	1.00	1.06	LA 河南
8		—		*+	0.66	<u>0.77</u>	0.81	0.87	1.00	1.06		LA 河南
9		—		*+		<u>0.71</u>	0.81	0.87	1.00	1.06		LA 湖北
10	+	+		+		<u>0.71</u>	0.80	0.87	1.00	1.06		LA 湖北
11		—		—		0.69	0.81	0.87	1.00	1.06		LA 湖北
12		+		+	0.66	<u>0.71</u>			1.00			LA 湖北
13	+	—		+	0.68	<u>0.77</u>	0.81	0.87	1.00			ELA 湖北
14		—		—		0.66	0.81	0.87	1.00	1.06		ELA 湖北
15		—		—		0.68	0.80	0.87	1.00	1.06		ELA 湖北
16		—		—		0.68	0.80	0.87	1.00	1.06		ELA 湖北
17		—		—		0.67	0.80	0.87	1.00			ELA 湖北
18		—		—		0.67	0.80	0.87	1.00			ELA 湖北
19			+	+	0.64	<u>0.73</u>	0.80	0.87	1.00	1.06		白荆条浙江
20			—	—	0.64	0.68	0.80	0.87	1.00	1.06		白荆条浙江
21			—	—		0.64	0.80	0.87	1.00	1.06		白荆条浙江
22		—		*+	0.66	<u>0.77</u>	0.80	0.87	1.00			ELA 河南
23		—		—		<u>0.66</u>	0.80	0.87	1.00	1.05		ELA 河南
24		—		—		0.68	0.80	0.87	1.00	1.03		ELA 河南
25		—		*+	0.64	<u>0.72</u>	0.81	0.87	1.00	1.06		ELA 遼寧
26		—		*+	0.63	<u>0.71</u>	0.81	0.87	1.00	1.06		ELA 湖北
27		+		+		<u>0.71</u>	0.87		1.00			ELA 湖北
28		—		—	0.62	0.69	0.80	0.87	1.00	1.06		ホワイト浙江
29		—		—	0.63		0.80					ホワイト浙江
30		—		—	0.64		0.80	0.87	1.00			ホワイト浙江
31		—		—	0.64		0.81	0.87	1.00			ホワイト浙江
32			—	—			0.80	0.87	1.00			ELA 湖北
33			+	+	0.68	<u>0.72</u>	0.81	0.87	1.00	1.06		ELA 湖北
34			+	+	0.68	<u>0.71</u>	0.81	0.87	1.00	1.06		ELA 湖北
35			+	+	0.63	0.68	<u>0.71</u>	0.81	0.87	1.00	1.06	ELA 湖北
36			+	+		0.63	<u>0.71</u>	0.81	0.87	1.00	1.06	ELA 湖北
37			—	—		0.66		0.81	0.87	1.00		
38			—	—	0.68		0.81	0.87	1.00	1.06		ELA 湖北
39		—		—				0.87	1.00	1.06		ELA 湖北
40		—		*+	0.67	<u>0.77</u>	0.81	0.87	1.00	1.06		ELA 湖北
41		—		*+	0.67	<u>0.72</u>	0.81	0.87	1.00	1.06		ELA 湖北
42		—		*+	0.67	<u>0.71</u>	0.81	0.87	1.00			アカシア河南
43		—		—	0.67		0.81	0.87	1.00			アカシア河北
44		—		*+	0.67	<u>0.73</u>	0.80	0.87	1.00			ELA 遼寧
45	+	—		+	0.66	<u>0.77</u>	0.81	0.87	1.00	1.05		LA 湖北
46	—			—		0.67	0.80	0.87	1.00	1.05		ホワイト浙江
47			+	+	0.64	<u>0.77</u>	0.80	0.87	1.00	1.05		アカシア山東
48			—	—		0.68	0.80	0.87	1.00			レンゲ湖北
49	—			—		0.67	0.80	0.87	1.00	1.04		ホワイト浙江
50	+			+	0.64	0.68	<u>0.77</u>	0.80	0.87	1.00	1.05	ELA 湖北
51			—	—			0.64	0.81	0.87	1.00	1.06	アカシア河北
52	+			+	0.64	<u>0.77</u>	0.80	0.87	1.00	1.06		ELA 河南
53		—		—	0.65	0.68	0.80	0.87	1.00	1.06		リンデン吉林
54		—		—	0.65	0.68	0.80	0.87	1.00	1.06		リンデン吉林

中国産ハチミツ 54 サンプルを a, b, c の 3 ケ所の分析機関において従来法で分析した。一方で、同じサンプルについて新法に従って HPLC 解析を行なった。異性化糖添加と判断されたハチミツは+, 異性化糖無添加と判断されたハチミツは—と示し, 新法ではアンダーラインで示す異性化糖特異的のピークが検出されたハチミツを異性化糖添加ハチミツと判断した。判断結果が新法と従来法とで異なった場合*で示した。

図 4 活性炭カラム処理及びゲルろ過カラム処理ハチミツの HPLC パターン

(1), 異性化糖無添加ハチミツ ; (2) 及び (3), 異性化糖添加ハチミツ

ハチミツから単糖を除去するために行っている前処理について従来法と新法との比較を HPLC 解析にて行った。斜線部及び矢印は異性化糖特異的オリゴ糖のピークを示す。

要 約

様々な蜜源からのハチミツ 54 サンプル、中国産異性化糖 9 サンプルおよび国内産異性化糖 2 サンプルの糖分析をゲルろ過法と HPLC 法との組み合わせ法（新法）で検討した。その結果、新法では従来の TLC 法における①①分析に長時間を要すること②異性化糖の存在の判断が条件により異なりばらつくこと等の問題点を解決し、異性化糖添加ハチミツの検出に優れた評価手法であることが確認された。

従来法は、分析機関により判断結果が異なることがあり、さらに新法の結果が従来法の結果とも食い違いが認められる場合がある。即ち、新法においてハチミツ試料からのオリゴ糖を損失することなく前処理し、さらにポストカラム HPLC 法にて高感度で検出されるため、従来法では無添加ハチミツとされていたものでも異性化糖添加ハチミツと判断される場合がある。新法は正確にかつ再現性良く異性化糖の混入を判断でき従来法を代替する極めて有用な手法として提案したい。

本研究にあたり TLC 法についてご助言を頂きました全国はちみつ公正取引協議会の相田由美子氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) Lucchesi, C.A., *Anal. Chem.*, **51**, 224A (1979).
- 2) 兼松 弘, 丸山武紀, 新谷 助, 今村正男, 伊藤新次: 栄養と食糧, **31**, 507 (1978).
- 3) White, J.W. Jr. and Doner, L.W., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**, 746 (1978).
- 4) Doner, L.W. White, J.W. Jr. and Phillips, J.G., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 186 (1979).
- 5) Kushnir, I., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 917 (1979).
- 6) Horwitz, W., *Official Methods of Analysis of the Assoc. Off. Anal. Chem.*, 13th Ed., Section 31 (1980).
- 7) 兼松 弘, 牛草寿昭, 丸山武紀, 新谷 助, 相田由美子, 大西 勝: 日本栄養・食糧学会誌, **36**, 518 (1983).
- 8) 兼松 弘, 牛草寿昭, 丸山武紀, 新谷 助, 相田由美子: ミツバチ科学, **5**, 121 (1984).
- 9) Yamauchi, S. Nakai, C. Nimura, N. Kinoshita, T. and Hanai, T., *Analyst*, **118**, 769 (1993).
- 10) Yamauchi, S. Nakai, C. Nimura, N. Kinoshita, T. and Hanai, T., *Analyst*, **118**, 773 (1993).
- 11) 木下俊夫: 薬学雑誌, **118**, 31 (1998).

(平成 14 年 6 月 6 日受付, 平成 14 年 11 月 13 日受理)