GENESYS紫外可視分光光度計を用いた蜂蜜の色相およびHMF含有量の分析

Daniel Frasco, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA

はじめに

蜂蜜は、甘味料や加工食品の材料としてよく知られており、世界中のほとんどの国において工業的規模で製造されています。蜂蜜は、炭水化物、水、および多数の微量な成分から構成され、不純物の影響を受けやすい性質があります。

蜂蜜の品質は、製造プロセス中の過剰な加熱や不適切な貯蔵条件に影響されます[1-2]。蜂蜜の品質の決定は、生産者、規制当局、および研究者にとって重要な要素です。本研究では、蜂蜜の品質を評価するための二つの重要なパラメーターである色相およびHMF（ヒドロキシメチルフルフラール）含有量について、Thermo Scientific™ GENESYS™ 50紫外可視分光光度計を使用して調べました。

蜂蜜の色相分析

蜂蜜の色は、その植物起源に密接に関連し、蜂蜜の品質を評価するための重要なパラメーターです。蜂蜜の色相は、一般に風味や香りなどの感覚的な要素に関連しており、その採蜜源の花、ミネラル含有量、および保存条件などに影響されます[3]。

蜂蜜の色相の標準指定は、表1に示す米国農務省（USDA）分類に従ったPfundスケールを使用して表されます。Pfundスケールは、ウェッジを移動させて一致させた距離に基づいて蜂蜜を測定したカラーグレーダーに由来し、ミリメートル（mm）で表されます[4]。蜂蜜の色相のPfundスケールは、分光光度計を用いて、脱イオン水をブランクとし、純粋な蜂蜜サンプルの560 nmにおける吸光度を測定した値に3.15の係数を乗じて求めることができます。

表1. 蜂蜜の色相の名称

USDA色標準指定	色の範囲Pfundスケール（mm）	サンプル結果範囲
ウォーターホワイト	≦8	0～0.094
エクストラホワイト	＞8および≦17	0.094～0.189
ホワイト	＞17および≦34	0.189～0.378
エクストラライトアンバー	＞34および≦50	0.378～0.595
ライトアンバー	＞50および≦85	0.595～1.389
アンバー	＞85および≦114	1.389～3.008
ダークアンバー	>114	＞3.008

蜂蜜のサンプルを脱イオン水のブランクに対して測定しました。サンプルの吸光度を560 nmで測定し、係数3.15を掛けて、サンプル結果範囲と比較します。

GENESYS 50紫外可視分光光度計を使用し、市販のさまざまな蜂蜜の色相を決定しました。GENESYS内蔵の制御ソフトウエアで、波長560 nm、係数3.150としたメソッドを設定し（図1）、脱イオン水をブランクとして、気泡を避けるように注意しながら五つの異なる蜂蜜サンプルを10 mmキュベットに移して分析しました（図2）。各サンプルから得られた値を表2に示します。次に、蜂蜜サンプルの色相を、表1に記載された範囲に基づいて分類しました。購入した蜂蜜サンプルは、ホワイトからライトアンバーまでの範囲の色を表していました。

図1. GENESYS蜂蜜色相分析法パラメーター

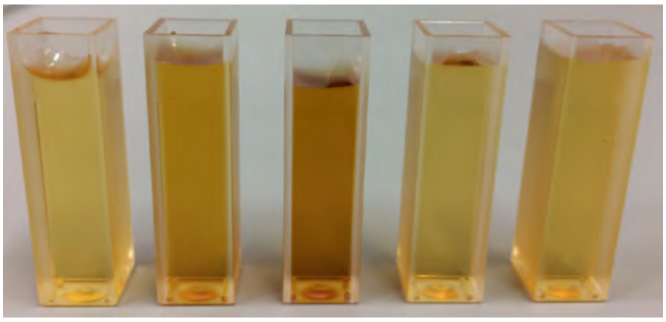

図2. 10 mmキュベット内の蜂蜜サンプル

表2. 計算による蜂蜜色の表示

蜂蜜サンプル	A_{560} x 3.150	蜂蜜色
蜂蜜1	0.373	ホワイト
蜂蜜2	0.928	ライトアンバー
蜂蜜3	1.208	ライトアンバー
蜂蜜4	0.405	エクストラライトアンバー
蜂蜜5	0.512	エクストラライトアンバー

蜂蜜中のHMF含有量

ヒドロキシメチルフルフラール（HMF）は、酸性条件下でのフルクトースの分解から、ほとんどの蜂蜜において経時的に自然に生じる成分です（図3）。

HMFの含有量のデータは、蜂蜜の品質を測定するためによく使用されます。高い含有レベルは、不適切な保管、砂糖添加物の混入、粘度を下げるための過度な熱処理の可能性を示します[5]。研究では、HMFおよびその誘導体が、ヒトの健康に対して正および負の両方の効果を有し得ることを示唆しています[2,6]。

蜂蜜に含まれ得るHMFの最大量は、地域に応じて国際的に規制されています（表3）。世界貿易を促進するために設立された国際機関であるコーデックス委員会は、HMFの最大量を40 mg/kg、熱帯気候の蜂蜜の場合は80 mg/kgとすることを推奨しています。しかしこれは、商業における自主的な適用を目的としたものであり、政府の規則として強制するものではありません。欧州連合（EU）は、コーデックス委員会と同じHMFを設定しました。現在、米国にはHMF濃度の法的制限はありません。

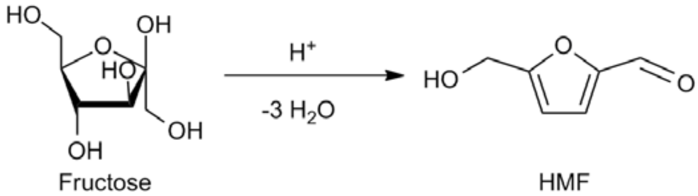

図3. フルクトースからのヒドロキシメチルフルフラールの生成

表3. 蜂蜜中の最大HMFの規制基準

規制指令	HMFの最大値
コーデックス委員会（CODEX STAN12-1981）	40 mg/kg、または熱帯気候由来蜂蜜80 mg/kg
欧州連合（指令110/2001）	40 mg/kg、または熱帯気候由来蜂蜜80 mg/kg
韓国食品コード	80 mg/kg

蜂蜜中のHMF含有量は、国際蜂蜜委員会によって確立されたホワイトメソッドによって、許容可能なHMF含有量として決定することができます[7]。

GENESYS紫外可視分光光度計をホワイトメソッドで使用するには、清澄な蜂蜜水溶液の284 nmでの吸光度を、HMF発色団が亜硫酸水素塩によって破壊された同じ蜂蜜の参照溶液に対して測定します。蜂蜜のHMF含有量は、以下の式を使用して計算されます:

$$\text{HMF (mg/蜂蜜kg)} = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times \text{係数}}{W}$$

W=蜂蜜のグラム単位の重量

$$\text{係数} = \frac{126 \times 1000 \times 1000}{16830 \times 10} = 748.66$$

126 =HMFの分子量

16830 =284 nmでのHMFのモル吸光係数

蜂蜜5 gをまず50 mLのビーカーに秤量し、水25 mLに溶解した後、50 mLのメスフラスコに移して調製しました。0.5 mLのCarrez溶液I (150 mg/mLフェロシアン化カリウム水溶液) をフラスコに加え、よく混合しました。
次に、0.5 mLのCarrez溶液II (300 mg/mL酢酸亜鉛水溶液) を添加し、混合しました。泡の形成を抑制するために1滴のエタノールを滴下し、脱イオン水を用いて最終容量50 mLとしました。次に試料をろ過し、最初の10 mLを廃棄しました。その後、残りのろ液5.0 mLを二つの試験管それぞれに移しました。
水5.0 mLを一つの試験管に加えて混合し、これを試料液としました。二つ目の試験管に0.2%亜硫酸水素ナトリウム溶液5.0 mLを加え、混合して参照溶液としました。両溶液を個別にラベル付けした光路長10 mm石英キュベットに移しました。

GENESYS内蔵制御ソフトウエアでメソッドを選択します。図4に示すように各溶液を284 nmおよび336 nmで測定するように設定します。各試料溶液を分析する際、各測定の前に、対応する参照溶液でゼロセットを行ってください。
次に、分光光度計によって得られた吸光度差 (284 nm～336 nm) に係数748.66を乗じ、蜂蜜サンプルの重量で割って、蜂蜜中のHMF含有量を決定します (上式参照) 。
五つの蜂蜜サンプルをそれらのHMF含有量について分析した結果を表4に示します。スキャンモードで得られたサンプルのスペクトルを図5に示します。コーデックス委員会およびEU両方の規格により、HMF濃度が30.1 mg/kgおよび38.3 mg/kgであった蜂蜜3および蜂蜜5のみがHMF指令に適合しました。

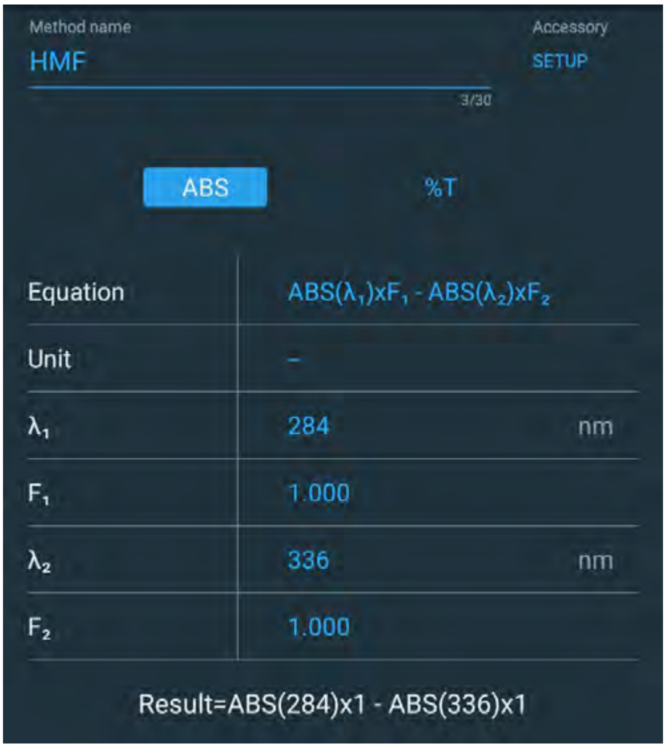

図4. GENESYS HMF分析方法パラメーター

表4. 蜂蜜試料中のHMF含有量の計算値

蜂蜜試料	吸光度 (284 nm ～ 336 nm)	HMF (mg/kg)
蜂蜜1	0.360	43.9
蜂蜜2	0.443	64.5
蜂蜜3	0.197	30.1
蜂蜜4	0.331	50.1
蜂蜜5	0.226	38.3

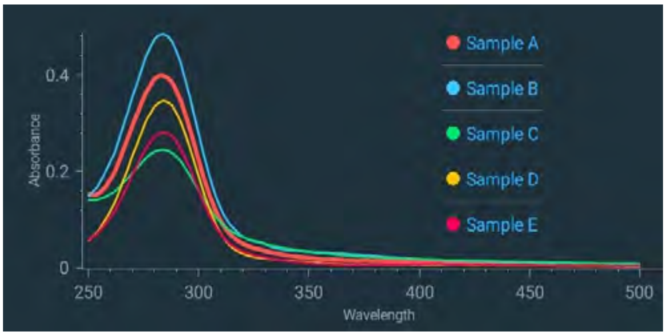

図5. 蜂蜜試料のUV-Visスペクトル

結論

Thermo Scientific GENESYS 50紫外可視分光光度計は、蜂蜜サンプルの色およびHMF含有量の両方を決定し、蜂蜜サンプルの品質を評価するための有効なツールです。
GENESYS分光光度計タッチスクリーンから操作できる内蔵制御ソフトウエアにより、ユーザーは複数の波長での吸光度値を簡単に取得し、計算を自動的に適用して分析を簡素化できます。

分析した五つの蜂蜜サンプルは、Pfundスケールによると、一つはホワイト、二つはエクストラライトアンバー、二つはライトアンバーでした。同じ五つのサンプルをホワイトメソッドを用いて分析し、それらのHMF含有量を測定しました。サンプルのうち、最大HMF含有量についてのコーデックス委員会および欧州連合（EU）指令に適合したのは二つのみであり、これらは加熱または不適切な保管が原因であると考えられます。

参考文献

1. Morales V, Luz Sanz M, Martín-Álvarez PJ, et al. (2009) *J Sci Food. Agric* 89:1332–1338.
2. Pita-Calvo C, Guerra-Rodríguez ME, Vázquez M (2017) *J Agric Food Chem* 65:690–703.
3. Naab OA, Tamame MA, Caccavari MA (2008) *Span J Agric Res* 6(4): 566–576.
4. USDA Agricultural Marketing Service. *United States Standards for Grades of Extracted Honey.* Effective May 23, 1985. USDA,Washington DC
5. Flanjak I, Primorac L, Bilić B, et al. (2016) *Technologica acta* 9:37–41.
6. Shapla UM, Solayman M, Alam N, et al. (2018) *Chem Cent. J* 12:35.
7. White JW (1979) *J Assoc Off Anal Chem* 62(3):509–514.

詳細はこちら **thermofisher.com/uv-vis**

© 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転載を禁じます。 UV026-A2008OB
ここに記載の会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
また、記載されている製品は研究用機器であり、診断目的およびその手続き上での使用はできません。
記載の価格は 2020 年 8 月現在のメーカー希望小売価格です。消費税は含まれておりません。
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
実際の販売価格は、当社販売代理店までお問い合わせください。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL：0120-753-670　FAX：0120-753-671
Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan　@ThermoFisherJP

thermofisher.com