

## 技術報告

## はちみつに含まれる HMF 定量分析法の開発

箭田 浩士<sup>§</sup> , 谷中かおる , 亀山眞由美

## A new method for the quantification of HMF in honey

Hiroschi Yada<sup>§</sup> , Kaoru Yanaka and Mayumi Ohnishi-Kameyama

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642 Japan

## Abstract

The method of HPLC sample preparation for 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) quantification in honey was developed. This method carried out as follows, dilute honey with ethanol/water =70/30 (v/v), centrifuge the solution, and filtrate the centrifugal supernatant with 0.2 μm membrane filter. HPLC samples prepared from the filtrate by dilution with water, which were indicated stable analytical values of HMF during one-night(16hrs). This method is useful for routine HMF quantification in honey, because no waste solution containing zinc acetate. We also described the HPLC condition, gradient elution with C18 column/ detection at 254 nm and 284 nm. This HPLC condition make easy to detect the peak which changed from HMF.

Keywords: はちみつ , HMF , 前処理法 , 定量分析

## 緒言

市販のはちみつ中に含まれる5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF)は、新鮮なはちみつには存在せず、殺菌工程における加熱や保存中の温度の上昇により生じることから、はちみつの鮮度及び加熱履歴に対する指標とされている<sup>1)2)3)</sup>。我が国では、はちみつ類の表示に関する公正競争規約施行規則(平成16年11月26日公正取引委員会告示第10号)において、AOAC 980 23<sup>4)</sup>(吸光分析法)による分析値が5.9 mg/100 g (59 ppm)以下と定められている。International Honey Commission (IHC)が Harmonised Methods of the International Honey Commission<sup>5)</sup>で示しているHMFの分析法には、吸光分析法(White法<sup>6)</sup>、Winkler法)とHPLC法<sup>7)</sup>があり、

Zappalàらはこれらの方法を比較して、HPLC法とWhite法が同程度の値を示し、Winkler法はそれよりも高い値を示すことを報告している<sup>8)</sup>。IHCでは、HPLC法による連続分析において分析までの間にHMFが減少することを避けるため、吸光分析法(White法)と同様にCarrez溶液と呼ばれる清澄剤を用いた試料調製法を推奨している<sup>9)</sup>。これは、はちみつ水溶液中で時間と共にHMFが減少する<sup>10)</sup>ためである。Spanoらは妨害ピークを含むはちみつ中のHMF分析法の検討において、Carrez溶液の有用性を示している<sup>11)</sup>。

しかしながら、Carrez溶液は劇物である酢酸亜鉛を含むことから、今回我々はCarrez溶液を用いずにHPLC分析時間内(16時間)におけるHMFの変化を抑制する方法を開発した。この方法の特徴は、試料前

<sup>§</sup>連絡先, yada33@affrc.go.jp

2009年10月30日受付 2009年10月30日受理

処理に劇物を含む Carrez 溶液を用いないことと、HPLC 分析条件下において定量に用いる284 nm に加えて254 nm でも検出することにより HMF の変化によって生じるピークの検出を容易に行えることである。本分析法を用いて、HMF の変化によって生じるピークが一部のはちみつ試料において検出されること、はちみつを水で希釈して調製した試料において HMF の減少に伴ってそのピーク強度が増加することを確認した。

Spano ら<sup>11)</sup>は、HMF の有害性を指摘しており、今後 HMF については、はちみつの品質の指標としてのみでなく、有害成分としての分析の必要性が生じることも考えられる。その際、劇物を含む廃液を生じない本分析法は、はちみつ中の HMF 定量のための新たな分析法として利用されることが期待される。

## 実験材料及び方法

### (1) 試薬ならびにはちみつ

#### i) 分析用試料調製ならびに HPLC 分析に用いた試薬

図 1 に示す、HPLC 分析用試料の前処理には、エタノール (HPLC 用, 和光純薬製), ディスポーザブルメンブレンフィルターユニット Dismic-13HP PTFE 0.2 μm hydrophilic (Advantec 製) を使用した。水は, Millipore-Q 超純水装置システム Synthesis-A10 (Millipore 製) で精製して用いた。

HPLC 分析には, アセトニトリル (HPLC 用, 和光純薬製) ならびにトリフルオロ酢酸 (特級, 和光純薬製) を使用した。HMF 標準品は和光純薬製を用いた。

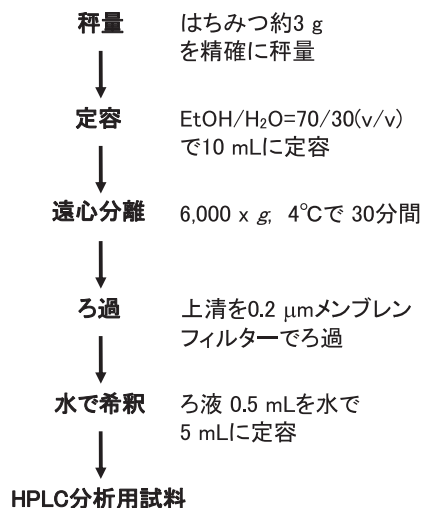


図 1 HPLC 分析用試料の前処理法

#### ii) 前処理法の検討に用いた試薬

表 1 に示す、前処理法の検討に用いた限外ろ過ユニット (遠心タイプ) は、以下の通りである。

Amicon Microcon YM-3/ YM-10/ YM-100 (それぞれ分画分子量3,000, 10,000, 100,000, ろ過膜材質: 再生セルロース, グリセリン含有, Millipore 製)。

Amicon Ultrafree-MC centrifugal filter devices (分画分子量5,000/ 10,000/ 30,000, ろ過膜材質: 再生セルロース, グリセリン不使用, Millipore 製)。

Biomax-5K/ 30K/ 100K Ultrafree-0.5 centrifugal filter & tube (それぞれ分画分子量5,000, 30,000, 100,000, ろ過膜材質: ポリエーテルスルホン, Millipore 製)。

表 1 に示す、前処理法の検討に用いた試薬ならびに

表 1 前処理法の検討結果の概要

	HMF の経時的変化	評価 (コメント)
限外ろ過		
Amicon Microcon (再生セルロース膜、グリセリン含有)	抑制	不適當 (分析値の増加)
Biomax-Ultrafree (ポリエーテルスルホン膜)	抑制	不適當 (吸着による分析値の減少)
Amicon Ultrafree-MC (再生セルロース膜、グリセリン不使用)	抑制	不適當 (分析値のバラツキが大きい)
酸添加		
酢酸 (0.3, 0.5% (v/v))	一部試料で抑制	不適當
ギ酸 (0.1, 1% (v/v))	抑制 (一部試料で増加傾向)	不適當
トリフルオロ酢酸 (0.05% (v/v))	抑制 (一部試料で増加傾向)	不適當
トリクロロ酢酸 (0.01% (v/v))	抑制されず	不適當
有機溶媒の使用		
アセトン/水 = 20/80 (v/v)	抑制不十分	不適當
アセトニトリル/水 = 10/90, 20/80 (v/v)	抑制不十分	不適當
アセトニトリル/水 = 50/50 (v/v)	評価できず	不適當 (2層に分離、抽出不可)
2-プロパノール/水 = 30/70, 40/60 (v/v)	評価できず	不適當 (ピーク幅広く定量に不向き)
エタノール/水 = 40/60, 70/30 (v/v)	抑制	最適化して前処理法を開発

表2．市販はちみつ14点の原産国，種類表示とHMF分析値

はちみつ	原産国	種類表示	HMF分析値 (ppm)
1	日本	-	27.09
2	カナダ	-	37.18
3	オーストラリア	ユーカリ	75.24
4	アルゼンチン、スペイン	柑橘類	146.00
5	中国	レンゲ	38.98
6	中国	アカシア，ナタネ，ピテックス	38.47
7	中国、アルゼンチン	-	52.43
8 <sup>a</sup>	中国	-	114.20
9 <sup>b</sup>	中国	-	57.65
10	日本	レンゲ	26.72
11	日本	-	16.91
12	中国	クローバー	65.68
13	日本	アカシア	23.53
14	アルゼンチン	クローバー	72.23

a：加糖はちみつ，b：ローヤルゼリー添加

有機溶媒は，以下の通りである．

ギ酸（カラムクロマトグラフ用特製試薬，ナカライテスク製），トリフルオロ酢酸（特級，ナカライテスク製），2-プロパノール（特級，ナカライテスク製），アセトン（特級，ナカライテスク製），酢酸（特級，和光純薬製），トリクロロ酢酸（特級，和光純薬製），メタノール（HPLC用，和光純薬製）．

#### iii) HMF標準液の調製

HMFは吸湿性が高いため，真空ポンプにより3時間以上減圧して水分を除き，減圧状態で秤量後，水を加えて10 mLに定容し，HMF標準液として調製した．HMF標準液の濃度は，Harmonised Methods of the International Honey Commission<sup>5)</sup>で示されているHMFのモル吸光係数（284 nm）= 16,830に基づき，284 nmの吸光度から確認した．

#### iv) 市販はちみつ（14種類）

表2に示した，2008年3月に日本国内で流通していたはちみつ14種類について近隣の店舗または通信販売で購入し，2008年9・10月に分析に供するまで室温にて保管した．

## (2) 分析用試料調製のための前処理法の検討

前処理は，はちみつ水溶液のHMF減少に酵素活性が関与しているとの考えから酵素活性を除去または阻害する目的で行っている．今回，前処理法として，はちみつ水溶液の限外ろ過，酸の添加，有機溶媒を含む抽出液使用のそれぞれについて検討した．

#### i) 限外ろ過

はちみつ約1 gを水で10 mLに定容し，遠心分離（6,000 × g, 10 min）した上清を限外ろ過ユニットで限外ろ過して分析試料とした．遠心上清を0.2 μmのメンブレンフィルターユニットでろ過して調製したものと共に一定時間毎に分析してHMFの経時的変化を調べた．

#### ii) 酸の添加

はちみつ約1 gを水で10 mLに定容し，遠心分離（6,000 × g, 10 min）した上清を0.2 μmのメンブレンフィルターユニットでろ過し，そのろ液に酸を添加して分析試料とした．酢酸とギ酸は0.11%（v/v），トリフルオロ酢酸は0.05%（v/v），トリクロロ酢酸は0.01%（v/v）となるように添加し，酸を添加しないものと共に一定時間毎に分析してHMFの経時的変化を調べた．

#### iii) 有機溶媒を含む抽出液の使用

水の代わりに用いた有機溶媒を含む抽出液は，エタノール/水=40/60ならびに70/30（v/v），アセトン/水=20/80（v/v），2-プロパノール/水=30/70ならびに40/60（v/v），アセトニトリル/水=10/90，20/80，50/50（v/v）である．はちみつ約3 gに抽出液を加え10 mLになるよう定容し，4 で遠心分離（6,000 × g, 30 min）した．その遠心上清を0.2 μmのメンブレンフィルターユニットでろ過した後，水で希釈して分析試料とした．比較として，水で調製したものと共に，HPLC-PDAで分析し，HMF分析値の経時的変化とピークの形状

について検討した。

### (3) 最終的に採用した前処理法による分析用試料の調製

検討の結果、以下の前処理法(図1)を採用し、分析用試料を調製した。はちみつ約3gを精秤し、エタノール/水=70/30(v/v)で10mLに定容後、ろ過を容易にするために4にて遠心分離(6,000×g, 30min)した。その遠心上清を0.2μmのメンブレンフィルターユニットでろ過し、ろ液0.5mLを水で5mLに定容してHPLC分析用試料とした。なお、結晶が析出したはちみつについては、加熱せずに全体を均一に攪拌して用いた。はちみつ約3gを10mLに定容するのに用いたエタノール/水=70/30(v/v)混合液は約8mLであったことから、HPLC分析用試料のエタノール濃度は約5.5%(v/v)であった。

また、今回採用した前処理法によりHMF減少が抑制されていることを確認するため、エタノール/水=70/30(v/v)の代わりに水で10mLに定容し比較用試料(水抽出)とした。その試料を用いて、分析用試料と共に8時間毎に3回分析して、HMFの経時的変化を確認した。

### (4) 検量線の作成

検量線作成に用いた標準液は、HMFをはちみつ分析用試料と同程度の5.5%(v/v)エタノール溶液とし、0.025(または0.1), 0.5, 5, 10ppmの4濃度に調製し、以下の条件で分析し、284nmのピーク面積により検量線を作成した。

装置: Agilent 1100 (Agilent Technologies 製)

カラム: Atlantis™ dC18 3μm, 2.1×150mm (Waters 製)

流速: 0.2 mL/min

溶媒A: トリフルオロ酢酸/水=1/1,000 (v/v)

溶媒B: アセトニトリル

グラジエント条件: B濃度2%(0min)から52%(10min)までの直線グラジエント

検出波長: 254nm(モニター用), 284nm(定量用)

注入量: 10μL

カラム温度: 45

分析用試料トレイ温度: 20

連続分析では、B濃度95%で15分洗浄後、分析初期条件(B濃度2%)で15分間平衡化した後、次の分析を行った。

### (5) 検出限界, 定量限界, 不確かさの推定

検出限界(LOD), 定量限界(LOQ), 不確かさを推定するため、HMF濃度の異なるはちみつ13(低濃度), 14(高濃度), (表2参照)について、それぞれ7反復の分析を行った。

### (6) 添加回収試験

添加回収試験はHMF濃度の低いはちみつ11(表2参照)をマトリックスとして、7反復分析(低濃度)の標準偏差から推定された定量限界の2倍ならびに10倍に相当する量を添加し、それぞれの添加量で3点ずつ行った。

### (7) Carrez 溶液を用いた前処理法

比較のため、Carrez 溶液を用いた試料調製を次の方法により行った。試料はちみつ約5gを精秤し、水約25mLに溶解し、0.5mLのCarrez 溶液(150mg/mLフェロシアン化カリウム・三水和物水溶液)ならびに0.5mLのCarrez 溶液(300mg/mL酢酸亜鉛・二水和物水溶液)を添加・混合し、水で50mLに定容した。静置後、上清を0.2μmのメンブレンフィルターユニットでろ過してHPLC分析の試料とした。

## 実験結果および考察

### (1) 前処理法の検討

前処理法の検討結果について、概要を表1に示す。

#### i) 限外ろ過

限外ろ過については、使用したろ過ユニット全てのろ液でHMFの減少が抑制されることを確認したが、Amicon Microcon(ろ過膜材質: 再生セルロース, グリセリン含有)ではHMFの分析値が平均で15%程度大きくなった(HMF 29.92ppmのはちみつの場合)。また、Biomax-ultrafree(ろ過膜材質: ポリエーテルスルホン)では、HMF 5ppmの標準溶液をろ過した場合に10-20%程度ピーク面積が減少したことから、HMFの吸着が確認された。前述の問題が認められなかったAmicon Ultrafree-MC(ろ過膜材質: 再生セルロース, グリセリン不使用)においても、9点の相対標準偏差が2.6%(HMF 32.30ppmのはちみつ)とバラツキが大きかったことから、現在市販されている限外ろ過膜による前処理法は、はちみつ中のHMF分析に不相当であると判断した。

#### ii) 酸添加

0.3または0.5%(v/v)の酢酸添加によって、いくつかのはちみつでHMFの減少が抑制されたが、はち

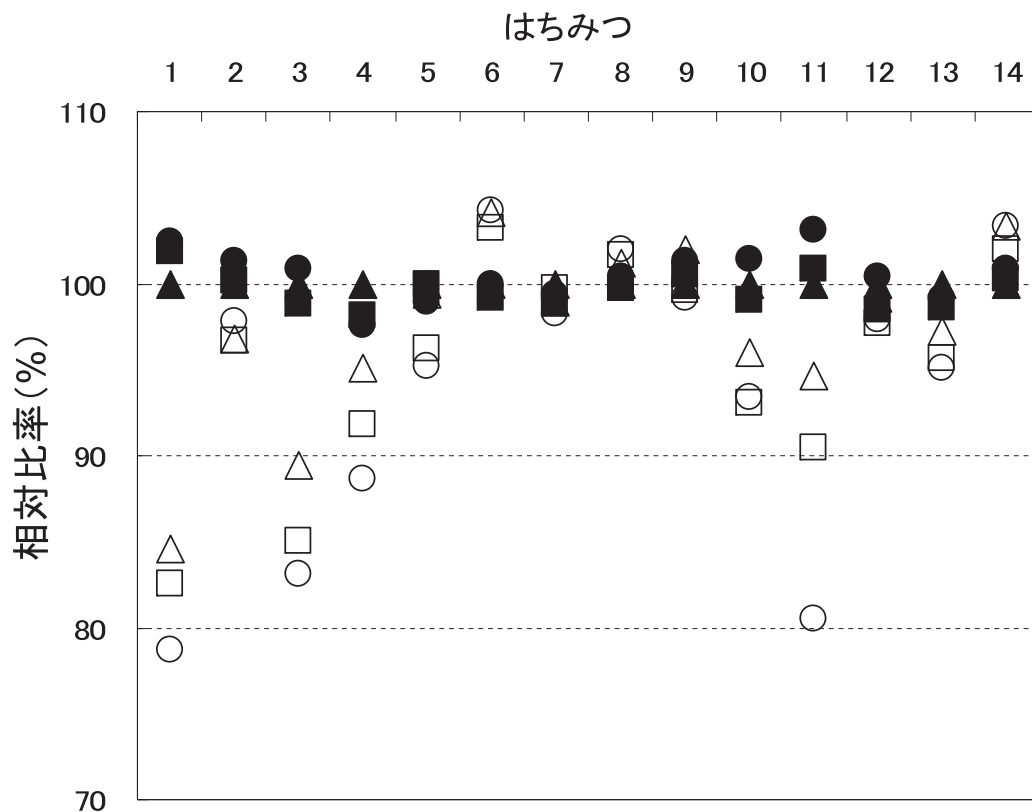


図2 前処理法の相違による、はちみつ中のHMF分析値の経時的変化

新規前処理法で得た分析用試料の1回目(○), 8時間後(●)および16時間後(△)の分析値と, エタノールを用いずに調製した比較用試料の1回目(□), 8時間後(◇)および16時間後(○)の分析値。相対比率は新規前処理法で得た試料の1回目の値を100%として示した。

みつ3(表2参照)においては酸を添加しない場合と差がなかった。さらに,ギ酸(0.1, 1%(v/v))ならびにトリフルオロ酢酸(0.05%(v/v))の添加では, HMFの分析値が高くなる傾向があった。トリクロロ酢酸(0.01%(v/v))の添加では, HMFの減少は抑制されなかった。

### iii) 有機溶媒の使用

アセトン/水=20/80(v/v)とアセトニトリル/水=10/90, 20/80(v/v)ではHMFの減少抑制が十分でなく, アセトニトリル/水=50/50(v/v)では, はちみつを溶解すると2層に分離し, 均一の状態ではちみつを溶解することが出来なかった。2-プロパノール/水=30/70, 40/60(v/v)においては水で10倍希釈してもピーク形状が幅広くなり, 定量分析には使用できないと判断した。エタノール/水=40/60(v/v)では18時間後のHMFの変化が-1.4%, 70/30(v/v)では+0.2%であることから, 抽出溶液のエタノール濃度と水による希釈の程度について最適化を行なうことにより, 16時間の分析時間内のHMFの変化を抑制することのできる前処

理法の開発に成功した。

### (2) 検量線ならびに検出限界・定量限界

一連の分析試料の前後に分析した標準溶液4点より検量線を作成し,  $r^2$ はすべて0.9999以上であった。3回繰り返しの分析では, 分析回数毎に検量線を作成した。

2濃度で実施した7反復の分析結果は, 低濃度(平均23.34 ppm)における標準偏差は0.17 ppm, 相対標準偏差は0.73%で, 高濃度(平均72.93 ppm)における標準偏差は0.78 ppm, 相対標準偏差は1.1%であった。この結果から, LODを0.51 ppm(低濃度における標準偏差の3倍), LOQを1.72 ppm(低濃度における標準偏差の10倍)と推定した。また, それぞれの濃度における不確かさを標準偏差の2倍の0.34 ppm(23.34 ppm)ならびに1.55 ppm(72.93 ppm)と推定した。

はちみつ11(表2参照)をマトリックスとした添加回収試験の結果は, LOQの2倍(3.40 ppm)添加では

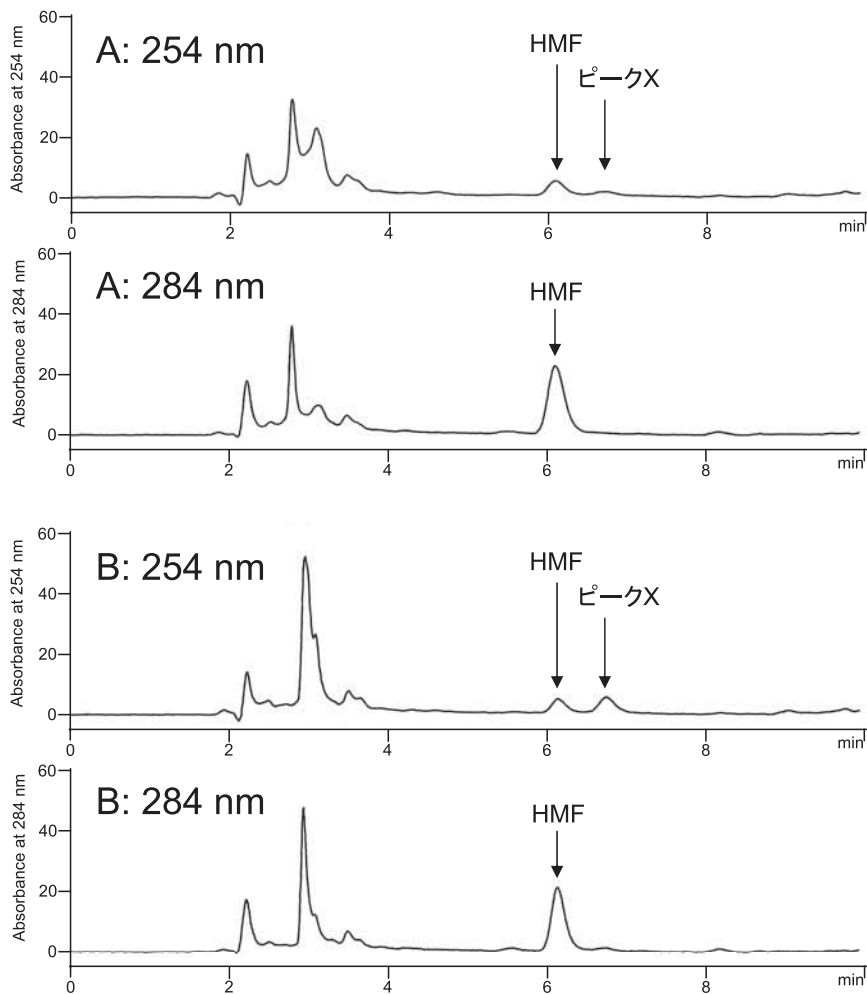


図3 前処理法の相違による、はちみつ中のピークXの強度

はちみつ1を新規前処理法で調製した分析用試料の3回目(A)とエタノールを用いずに調製した比較用試料の3回目(B)の254 nmと284 nmにおけるHPLCクロマトグラム

回収率104.2%, 100.0%, 89.6% (平均97.9%)であり, LOQの10倍(17.0 ppm)添加では, 回収率98.1%, 97.5%, 89.6% (平均95.1%)であり, いずれの濃度においても精度管理の一般ガイドライン(厚生労働省)<sup>10</sup>に示されている70・120%の範囲内であった。

### (3) 分析結果に関する考察

市販はちみつ14製品について, 分析用試料と比較用試料(水抽出)を連続分析した。それぞれの試料は, 前処理開始から3.5~8時間後に一回目の分析を行い, その8時間後, 16時間後にも分析を行い, 合計3回分析した。HMFの分析値(分析用試料1回目の結果)を表2に, 表2の分析値を100%とした場合のHMFの経時変化(相対比率%)を図2に示した。図2に

白抜き点で示した比較用試料(水抽出)では, 14点中4点(はちみつ1, 3, 4, 11)で16時間内に90%以下となり, このうち2点(はちみつ1, 3)では一回目の分析においてもHMF分析値が90%以下であった。黒点で示した分析用試料においては, 2回目(8時間後)の分析値は98.1・101.8%, 3回目(16時間後)では97.6・103.1%であり, 14点のはちみつ全てでほぼ一定の分析値を与え, 本前処理法によってHMFの減少が抑制されることが分かった。

水抽出におけるHMFの減少が顕著であったはちみつ1ならびに3について, 本前処理法とCarrez溶液を用いた前処理法を比較したところ, 本前処理法では, はちみつ1, 3共に16時間後のHMFの相対比率が100.2%であった。一方, Carrez溶液を用いた場合,

はちみつ1で101.1%, はちみつ3で99.7%であったことから, 両方の前処理法で同様に HMF の減少が抑制されることが確認された。

次に, はちみつ1の分析用試料ならびに比較用試料(水抽出)の分析の3回目(分析開始から16時間後)の HPLC クロマトグラムを図3に示した。図3中のピークXは, HMF 標準溶液において HMF の減少に伴い生じる HMF の変化物と考えられる物質のピークであり, PDA で測定した UV スペクトルでは260 nm 付近に吸収極大を示す。ピークXは一部のはちみつ分析用試料でも認められ, 比較用試料(水抽出)においては HMF の減少に伴ってピーク強度が増加した。このことから, ピークXは, はちみつの加熱履歴や分析用試料の適否の新たな指標となる可能性がある。IHC が示す HPLC 法<sup>5)</sup>の分離条件(ODS カラム, メタノール/水 = 1/9 (v/v) アイソクラティック)では, ピークXは保持時間が安定せず非常に幅広いピークになることから, ピークXの確認にも本分析法で用いた HPLC 分析条件が有効であると考えられる。

## 要約

はちみつ中の HMF を HPLC で連続分析する際に問題になる, はちみつ水溶液における HMF の経時的な減少を抑制するための前処理法を今回開発した。この前処理法により, 劇物に指定されている酢酸亜鉛を使用せずに, 一部はちみつの分析用試料で生じる HMF の減少を連続分析の間(16時間)抑制することが出来た。また, 本分析法で用いた HPLC 分析で284 nm に加え254 nm で検出することにより, はちみつ水溶液中の HMF の減少に伴って生じるピークの確認が可能になった。

## 参考文献

- 1) Bogdanov, S., Ruoff, K. and Oddo, L., P., Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review, *Apidologie* 35, pS4-S17(2004)
- 2) Tosi, E., Ciappini, M., Ré, E. and Lucero, H., Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content, *Food Chemistry*, 77, 71-74(2002), Chapter 44, p 32, AOAC INTERNATIONAL
- 3) Tosi, E. A., Ré, E., Lucero, H. and Bulacio, L., Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallization phenomena and fungal inhibition, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 37, p669-678(2004)
- 4) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, Chapter 44, p32(2006)
- 5) HARMONISED METHODS OF THE INTERNATIONAL HONEY COMMISSION, [http://www.agroscope.admin.ch/imkerei/01810/01821/index.html?lang=en&download=NHZLpZeg7t,lnp6I0NTU04212Z6ln1ad1IZn4Z2qZpnO2Yuq2Z6gpJCDeHt6gmym162epYbg2c\\_JjKbNoKSn6A--](http://www.agroscope.admin.ch/imkerei/01810/01821/index.html?lang=en&download=NHZLpZeg7t,lnp6I0NTU04212Z6ln1ad1IZn4Z2qZpnO2Yuq2Z6gpJCDeHt6gmym162epYbg2c_JjKbNoKSn6A--)より PDF ファイルとして入手可能(平成21年10月27日確認)
- 6) White, J. W., Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62(3), p509-514(1979)
- 7) Jeuring, H. J. and Kuppens, F. J. E. M., High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63(6), p1215-1218(1980)
- 8) Zappalà, M., Fallico, B., Arema, E. and Verzera, A., Methods for the determination of HMF in honey: a comparison, *Food Control*, 16, p273-277(2005)
- 9) Wunderlin, D. A., Pesce, S. F., Amé, M. V. and Faye, P. F., Decomposition of hydroxymethylfurfural in solution and protective effect of fructose, *J. Agric. Food Chem.*, 46, p1855-1863(1998)
- 10) Känzig, A., Kaufmann, D. and Bogdanov, S., Stability of hydroxymethylfurfural during determination by HPLC, <http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/IHC-reports/Kaenzig2001.pdf> より PDF ファイルとして入手可能(平成21年10月27日確認)
- 11) Spano, N., Casula, L., Panzanelli, A., Pilo, M. I., Piu, P. C., Scanu, R., Tapparo, A. and Sanna, G., An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey The case of strawberry tree honey, *Talanta*, 68, p 1390-1395(2006)
- 12) 「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」(厚生省生活衛生局食品保険課長通知, 平成9年4月1日付衛食第117号), 食品分析法の妥当性確認ハンドブック, 第一版, 永田忠博編, サイエンスフォーラム, 東京, p297-300, 2007年