

【研究解説】

固相マイクロ抽出法を用いたハチミツ香気成分の分析法

久保良平¹・小野正人^{1,2}

要約

固相マイクロ抽出法を用いたハチミツ香気成分の分析法について解説した。その方法の応用例として、ハチミツ香気成分の由来の検証、蜜源植物とハチミツの香気成分の相関、ニホンミツバチのハチミツ香気成分の分析例についても紹介した。

キーワード：ハチミツ、ミツバチ、香気成分、固相マイクロ抽出法

緒言

明治10(1877)年にセイヨウミツバチが導入されて以来、日本の養蜂は大きく発展した。ハチミツは、野外に設置された巣箱の中に貯められるため、周囲に咲く蜜源植物の違いによって、その色、香りや風味が異なる(図1)。近年では計画的に採蜜された単花ハチミツが人気を集め、レンゲ、ニセアカシア、ミカンなど様々な蜜源植物由来の商品が販売されている。ハチミツの蜜源推定法として、含有花粉の分析が適用されるが、花粉の形態だけで種レベルまで鑑定するのは難しい植物も多く、万能ではない。そのため、ハチミツ中のアミノ酸や糖構成比、花粉のDNA解析など総合的なデータを駆使して蜜源植物を推定する方法も考案されている(中村, 2004)。

ハチミツを口に含んだ時に感じる風味は、香気成分によるところが大きく、嗜好性につながる重要なパラメーターである。同時に香気成分の組成は、有効な蜜源指標と考えられており、蜜源によっては指標物質となる成分が特定されている(Piasenzotto et al., 2003)。さらに、蜜源植物ごとに香気成分の構成比も異なる事が明らかになっている(Pérez et al., 2002)。しかしながら、揮発性のない糖分を多く含むハチミツ自体を香気成分の分析のためにガスクロマトグラフなどに注入することは不可能であり、香気成分だけを効果的に捕集するための特殊な前処理が必要となる。近年では香気捕集法として溶媒抽出を用いないヘッドスペース法が開発され、その中でも



図1 セイヨウミツバチの養蜂場と採蜜

固相マイクロ抽出法(solid-phase microextraction method: SPME法)は簡便で様々な食品の香気成分の解析に利用されるようになっている。ここではSPME法をハチミツの香気分析に適用した研究事例を紹介する。

1. SPME法とガスクロマトグラフ質量分析装置(GC/MS)を組み合わせた香気成分の解析

表1に示す機器と器具を用いて、ハチミツ香気成分の捕集と解析を行った。SPMEはマニュアルホルダー(図2A)とガラスファイバーに吸着剤(ポリジメチルシロキサン)が塗ってあるPDMS100 μ mファイバー(図2B)を図2Cのように組み合わせて使用した。

次にハチミツ香気成分の捕集手順を説明する。まず電子天秤を用いてスクリー管の重量をはかり、ゼロに設定をした(図3A)。葉さじを用い、スクリー管にハチミツを3g量り取り(図3B)、アルミホイルでスクリー

¹ 玉川大学学術研究所ミツバチ科学研究センター 東京都町田市玉川学園6-1-1

² 玉川大学農学部生産農学科 東京都町田市玉川学園6-1-1

久保良平 kubo@agr.tamagawa.ac.jp、小野正人 ono@agr.tamagawa.ac.jp

表1 使用した実験機器と器具

ガスクロマトグラフ/質量分析装置(GC/MS:GC-2010/PARVUM2)(島津製作所) カラム, DB-5MS(60m)(J&W Scientific Co.) SPMEマニュアルホルダー(スベルコ社)(図2A) SPMEファイバー(吸着剤), PDMS100 μ m(スベルコ社)(図2B) ウォーターバス(アズワン)(図2D) SPMEサンプリング台(スベルコ社)(図2E) 電子天秤 葉さじ 葉包紙 スクリュー管(13.5ml)(アズワン)(図2F)
--

* スクリュー管は事前に中性洗剤で内部をよく洗浄して十分な水洗いにより洗剤を完全に除去し、さらに蒸留水で内部をすすぐ。その後、温風乾燥機で200 $^{\circ}$ C、2時間加熱し乾燥後、スクリュー管の開口部を同様に加熱処理したアルミホイルで覆い蓋をして使用時まで保管した。

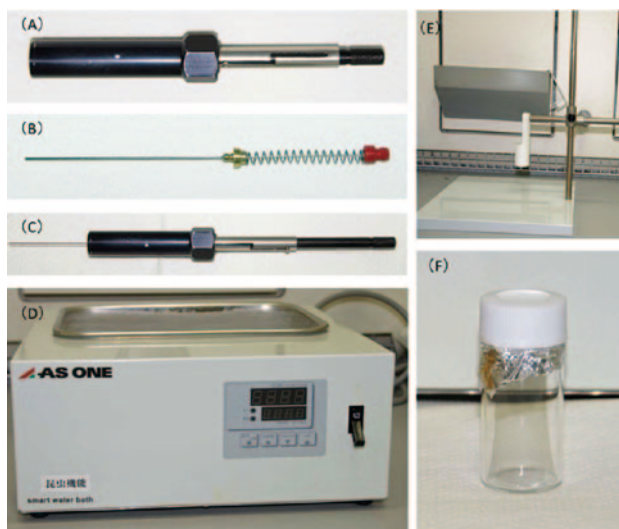


図2 使用した実験器具

(A) SPME マニュアルホルダー、(B) PDMS100 μ m ファイバー、(C) ファイバーを装着したマニュアルホルダー、(D) ウォーターバス、(E) SPME サンプリング台、(F) 13.5ml スクリュー管

管の口を覆った(図3C)。次に70 $^{\circ}$ Cに設定したウォーターバスにそのスクリュー管を入れ、ハチミツの入っているレベルまで温水に浸した(図3D)、気化熱で温度が下がらないようにアルミホイルで覆い、30分間ハチミツを温め、香气成分の揮発を促すと同時にスクリュー管のヘッドスペース部分にその成分を集めた(図3E)。その後温めた状態で、SPMEファイバーのニードルをスクリュー管内に挿入し、ファイバーを管内のヘッドスペースに露出させ10分間ハチミツの香气を捕集した(図3F)。最後に管内でファイバーを収納し、インジェクション部を250 $^{\circ}$ Cに設定したGC/MSに注入し、同時にファイバーを露出させた。カラム恒温槽の初期温度は50 $^{\circ}$ Cとし、昇温は5 $^{\circ}$ C/分であげ250 $^{\circ}$ Cまで5分間維持で分析した。なお、インターフェースの温度は260 $^{\circ}$ C、イオン

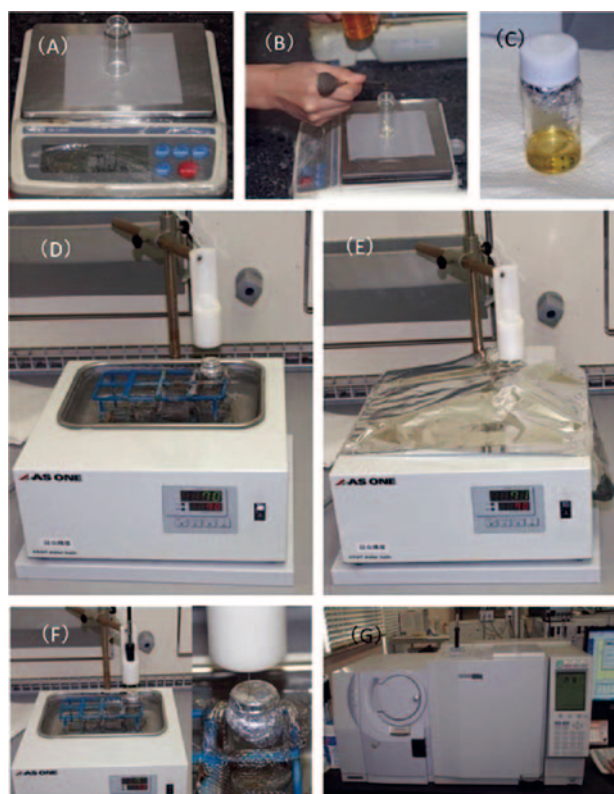


図3 香气成分の捕集手順

(A) 電子天秤を用いスクリュー管の重量でゼロ設定をする。(B) 葉さじを用いスクリュー管にハチミツを3g量り取る。(C) アルミホイルでスクリュー管の口を覆う。(D) 70 $^{\circ}$ Cに設定したウォーターバスにスクリュー管を入れる。(E) 保温用にアルミホイルで覆い30分間ハチミツを温める。(F) SPMEのニードルをスクリュー管のヘッドスペース部に挿入し、10分間ファイバーを露出させ香气成分を捕集する。(G) 管内でファイバーを収納し、GC/MSで香气を分析する。

源は200 $^{\circ}$ Cとした。キャリアガスにはヘリウムを用い、流量は1.7ml/minとした。分析はスプリットレスモードで行った。イオン化法はEIモードを用いた。

化合物の推定は、ハチミツの各ピークから得られたマススペクトルとワイリーのライブラリーソフトのマススペクトルとの類似度(相同)検索にて行った。物質の同定は類似度検索をもとに、類似度の高い化合物の標準品の香气をSPME法で1秒間捕集し、ハチミツと同じGC/MS分析条件で分析した。その後ハチミツから得られた未知のピークの保持時間とマススペクトルを、標準品のピークの保持時間およびマススペクトルと比較し、両者が一致する事で化合物の同定を行った。標準品が入手できない場合は類似度検索のみを行い、化合物の推定を行った。

2. ハチミツの香気成分の由来

ハチミツの香気の由来を明らかにするためには、外部から香りの混入がない状態でミツバチにハチミツを生産させる必要があった。具体的には、造巣行動が盛んなセイヨウミツバチとニホンミツバチの分蜂群をそれぞれ捕獲し（図4A）、巣枠のみを入れた飼育箱に移し、その飼育箱をメッシュケージ（網目2mm、サイズ2×2×2m）内に設置した（図4B）。ミツバチはそのケージから外部に出ることはできない構造となっており、3日間絶食させて分蜂時に持ち出した蜜胃中のハチミツを消費させた。その後、50%スクロース溶液のみをミツバチに給餌することで（図4C、D）、自らのワックスで造った巣房内にスクロース溶液だけを原料としたハチミツを貯蔵し



図4 閉鎖系で飼育されたミツバチからの採蜜手順

(A) 分蜂群を捕獲（写真はニホンミツバチの分蜂群）。(B) 巣枠のみの巣箱に分蜂群を導入し、その巣箱を網室内の閉鎖系に設置して飼育。(C) セイヨウミツバチと (D) ニホンミツバチに50%スクロース溶液のみを給餌。(E) セイヨウミツバチと (F) ニホンミツバチそれぞれのミツバチが巣板を形成。(G) 50%スクロース溶液のみで生産されたハチミツを採取。

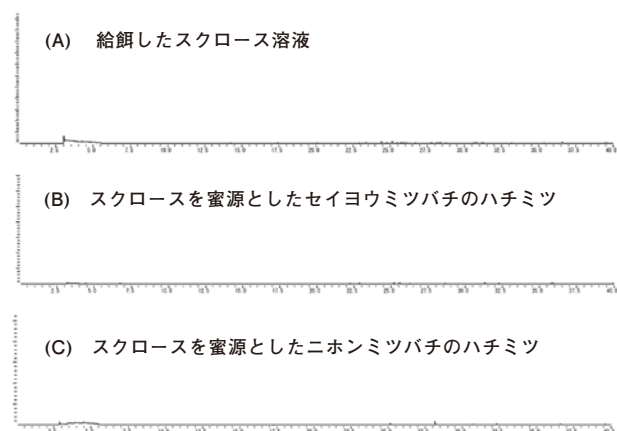


図5 閉鎖条件下においてスクロース給餌で飼育された2種のミツバチ群から採集されたハチミツの香気成分

た（図4E、F）。その巣房内からハチミツを採取し（図4G）、SPME法を用いてスクロース由来のハチミツの香気分析を行った。セイヨウミツバチとニホンミツバチから採取したそのハチミツの香気成分を分析した結果、それぞれのハチミツから検出されたピークは、ケージの中で餌として与えたスクロース溶液の香気成分とほぼ一致している事が明らかとなった（図5A、B、C）。これらの結果から、ハチミツの香気はミツバチ自身が付加しているのではなく、蜜源植物として訪花した花の蜜と花粉の香気に由来する事が実証された（久保・小野，2010）。

3. 蜜源植物が異なるハチミツの香気成分の比較

先行研究において、蜜源の違いがハチミツの香気プロファイルに大きく影響を与えることが分かっている（Piasenzotto et al., 2003）。ハチミツの純度によっても香気プロファイルに影響を与える可能性は考えられるが、34種の蜜源植物（レンゲ、アカシア、トチ、ヤマザクラ、ミカン、リンゴ、キハダ、クロガネモチ、シナノキ、ソバ、ケンポナシ、カキ、ハギ、ハゼ、ビワ、クローバー、ナタネ、クリ、ユリノキ、ヤブガラシ、ヒマワリ、アレチウリ、キツタ、タマネギ、カボチャ、ダイコン、コーヒー、ミント、ユーカリ、ラベンダー、ローズマリー、マヌカ、セージ、甘露：図6）から得られたハチミツの香気成分を同一条件で分析した。得られたクロマトグラムは図7に示した。クロマトグラムを比較すると、先行研究と同様に蜜源の違いで香気プロファイルは大きく変わる事が明らかとなった。そして、ミカン、シナノキ、ソバ、クリ、ビワなどは香気プロファイル中にその蜜源の指標となりうるアルコール（Anisalcohol）、アルデヒド（Cinnamic aldehyde, Anisaldehyde）、ケトン（Aminoacetophenone）、



図6 蜜源植物の例

(A) レンゲ、(B) クローバー、(C) ヒマワリ

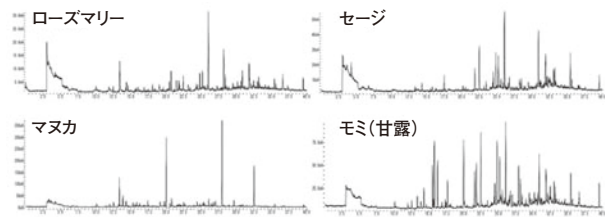
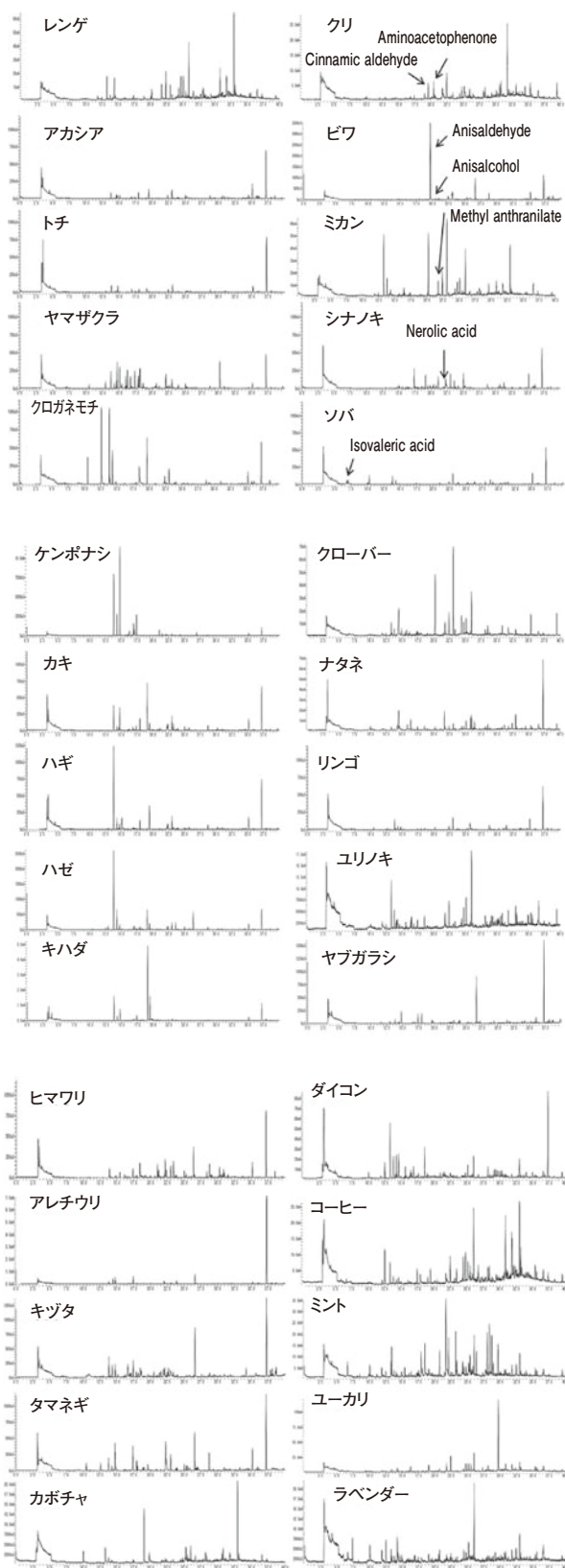


図7 蜜源植物が異なるハチミツから捕集した香り成分のクロマトグラムの比較

カルボン酸 (Nerolic acid、Isovaleric acid)、エステル (Methyl anthranilate) が認められた。今後これらの蜜源植物の花蜜、花粉の香りも分析し、詳細に比較していく必要がある。また、定性的には共通成分 (Benzaldehyde、Linalool oxide、2-Phenylethanol、Benzyl alcoholなど) も多く確認され、アカシア、トチ、リンゴなど香りプロファイルが似ているハチミツは成分の構成比、量など定量的パラメーターを活用する事で、香り分析が蜜源推定法として有効になると考えられる。

4. ニホンミツバチのハチミツ香り成分

ニホンミツバチの伝統的な養蜂 (図8) において、採蜜はセイヨウミツバチのように年に複数回に亘り計画的に行われるのではなく、数か月間から数年間かけて巣内に長期間貯蔵された段階で行われる事が多い。したがって、単花ハチミツではなく百花蜜の形で流通する。ニホンミツバチのハチミツは熟成が進んでおり香りも独特なもの



図8 ニホンミツバチの伝統養蜂 (和歌山県古座川町)

表2 ニホンミツバチから採取した百花蜜の香気成分表

ピークNo.	保持時間	面積	面積(%)	高さ	高さ(%)	化合物名
1	3.388	6824370	40.26	2029936	39.28	Ethanol
2	3.965	62469	0.37	26142	0.51	Ethyl acetate
3	4.052	88909	0.52	43901	0.85	Isobutyl alcohol(97)
4	5.194	252062	1.49	35222	0.68	2-Methyl-1-butanol
5	13.7	1340123	7.91	514250	9.96	cis-Linalool oxide
6	14.202	376135	2.22	142363	2.76	trans-Linalool oxide
7	14.542	52546	0.31	22168	0.43	Linalool
8	14.667	284693	1.68	67610	1.31	Hotrienol(87)
9	16.048	121101	0.71	39793	0.77	Ketosisophorone
10	16.781	428367	2.53	68899	1.33	Nonanol
11	16.958	102342	0.6	28693	0.56	Epoxylinool(79)
12	17.885	747620	4.41	196984	3.81	Decanal
13	19.042	130971	0.77	30804	0.6	UK
14	19.416	554737	3.27	123831	2.4	Phenethyl acetate
15	20.523	147918	0.87	47177	0.91	Ethyl nonanoate(79)
16	21.777	393974	2.32	85020	1.65	1-Hydroxylinool(83)
17	23.571	102823	0.61	38524	0.75	Tetradecane
18	23.88	185491	1.09	56879	1.1	Undecanal(89)
19	24.46	53457	0.32	25363	0.49	Farnesene
20	24.655	92619	0.55	35748	0.69	α -Bergamotene(85)
21	24.928	197317	1.16	56578	1.1	Geranylacetone
22	25.616	747950	4.41	160986	3.12	1-Dodecanol
23	25.964	108436	0.64	43666	0.85	UK
24	26.294	461597	2.72	168335	3.26	Pentadecane
25	26.47	448503	2.65	162823	3.15	UK
26	27.164	92682	0.55	33217	0.64	3,8-Dimethyl undecane(89)
27	28.687	218542	1.29	75987	1.47	Ethyl dodecanoate
28	30.805	759964	4.48	249282	4.83	9-Octadecene(96)
29	31.319	454181	2.68	157435	3.05	Heptadecane
30	33.462	201867	1.19	67413	1.31	Ethyl tetradecanoate
31	35.323	175327	1.03	68631	1.33	9-Eicosene(93)
32	35.844	294220	1.74	107812	2.09	Nonadecane
33	37.783	407363	2.4	134424	2.6	Ethyl hexadecanoate
34	39.949	42005	0.25	18732	0.36	UK

UK: 不明物質

* 化合物名後の数字はマススペクトルのライブラリーソフトとの類似度を示したもので、推定される化合物名を示している。数字の無い化合物は同定した成分を示す。

が多い傾向にある。例としてニホンミツバチのハチミツ香気プロファイルと成分表を示す(表2、図9)。セイヨウミツバチのハチミツと比較すると、特徴として、EthanolやEthyl acetateなど熟成の過程で生じる成分が主成分となり、エステル類(Phenethyl acetate、Ethyl dodecanoate、Ethyl tetradecanoateなど)、アルコール類(Linalool oxideなど)やエーテル類が検出される。巣内でのハチミツの熟成度によって違いがあるが、通常のセ

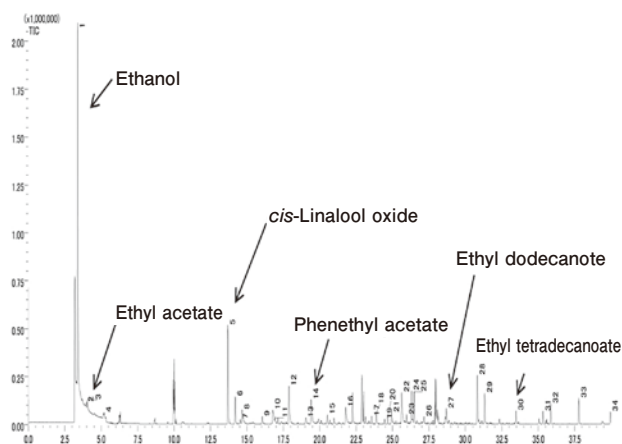


図9 ニホンミツバチ百花蜜から捕集した香気成分のクロマトグラム

イヨウミツバチの百花蜜から検出されるアルデヒドやケトンも多く、それらが一体となってニホンミツバチのハチミツの風味を形成していると考えられる。

まとめ

SPME法を用いる事により、従来特殊な前処理を必要としていたハチミツの香気成分の捕集を簡便かつ短時間で行えることが示された。ハチミツの高い糖分により香気成分は保持されているので、湯煎による加熱処理で揮発を促し、ヘッドスペース部に濃縮させる工夫が効果的である。その処理により、SPMEファイバーに効率よく揮発性の成分だけを吸着させることが可能となる。さらに、条件を均一にして香気プロファイルの比較分析を行えば、蜜源植物の異なるハチミツ間で、いわば目に見えない風味を可視化し、それぞれの特徴を浮き彫りにすることができることも分かった。

ハチミツの香気成分の由来は蜜源植物であることが証明できたので、今後はその花蜜および花粉の香気成分を分析し、ハチミツから検出される香気成分と比較することで、ハチミツの香気成分から蜜源植物を逆探知するのに使える“指標成分”の発見および蜜源別香気プロファイルのパターンを明らかにし、精度の高い蜜源植物の推定(特定)法として発展させていくことが期待される。

一方で、蜜源植物種によってはハチミツ中に含まれる花粉の量が少ない傾向にある、あるいは蜜源と花粉源が異なる場合もありハチミツの香気に変化する可能性も考えられる。そのため単一の推定法を用いるのではなく、ハチミツ中の花粉分析や花粉のDNA解析など他の推定

法と組み合わせた上で判定基準を作っていく事も重要な課題となる。

引用文献

久保良平, 小野正人 (2010) 真社会性ハナバチの情報源としての花香成分. 昆虫と自然 45: 12-15.
中村純 (2004) ハチミツ中の蜜源指標. ミツバチ科学 25 (1):

41-46.

Pérez, A. R., C. Sánchez-brunete, R. M. Calvo and J. L. Tadeo. (2002) Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 2633-2637.
Piasenzotto, L., L. Gracco and L. Conte (2003) Solid phase microextraction (SPME) applied to honey quality control. *J. Sci. Food. Agric.* 83: 1037-1044.

Analysis of Honey Aromas Using Solid-phase Microextraction Method

Ryohei Kubo¹, Masato Ono^{1,2}

Abstract

We explained the analysis of honey aromas using solid-phase microextraction (SPME) method and GC-MS. The origin of honey fragrance, comparison of honeys of European honeybee (*Apis mellifera*) obtained from thirty-four unifloral nectar plants, and the characteristics of honey extracted from the combs of Japanese honeybee (*A. cerana japonica*) were investigated using this technique. To determine the origin of volatile honey components, reproductive swarms of European and Japanese honeybees were caught and kept in hives in wire-mesh cage to prohibit flower visiting. The bees were fed only 50% sucrose solution, and the colonies constructed combs without visiting flowers. The stored honey in the combs originating from sucrose solution was analyzed. Total ion chromatogram (TIC) profiles of the sucrose honeys and sucrose solution were compared. No remarkable volatile chemicals were detected in the sucrose honeys. The results show that honeybees do not affect the volatile components of honey and the volatile honey components originate completely from plant nectar and pollen. TIC profiles of thirty-four unifloral honeys were greatly varied by the difference of nectar plants, and marker substances to presume nectar plants were found from orange, linden, buckwheat, chestnut and loquat honeys. Some alcohols and esters were characteristically detected from mature honey of Japanese honeybee.

Keywords: honey, honeybee, aroma, SPME

¹ Honeybee Science Research Center, Tamagawa University Research Institute, 6-1-1 Tamagawa-gakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan

² Department of Agri-Production Sciences, College of Agriculture, Tamagawa University, 6-1-1, Tamagawa-gakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan