[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 54, No. 3, pp. 195~200, 1980]

ステビオシドの酸加水分解と二波長クロマトスキャナー による総ステビオシドの定量

岩村淳一, 木下了彦, 平尾子之吉

(近畿大学理工学部応用化学教室)

昭和 54 年 8 月 27 日 受 理

Hydrolysis of Stevioside and Determination of Total Stevioside with Dual-wavelength TLC Scanner

Jun-ichi IWAMURA, Ryohiko KINOSHITA and Nenokichi HIRAO

Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Engineering,
Kinki University, Kowakae, Higashiosaka-shi 577

Hydrolysis of stevioside [I] with mineral acid and trifluoroacetic acid have been studied, and the reaction of [I] with 2.5N trifluoroacetic acid gave an almost quantitative yield of isosteviol [II].

The amount of isosteviol [II] resulting from the reaction of stevioside and its derivatives in leaves *Stevia rebaudiana* Bertoni (industrial materials and marketed products) with 2.5N trifluoroacetic acid was determined with dual-wavelength TLC scanner.

Concentration vs. absorbance is linear in the range of 10 to 120 mg/ml.

Several merits of the method were as follows. 1) The operation is very simple, and requires short time. 2) The measurable range by this method is wider than that by the known methods.

(Received August 27, 1979)

緒 言

南アメリカパラグアイ原産のステビア (*Stevia rebaudiana* Bertoni) は、ステビオシドを特有成分としたキク科 (Compositae) に属する多年生草本で、ステビオシド [I] は、非糖部がステビオール [III], 糖部がグルコースとソホロースから成る配糖体で⁽¹⁾, その甘味度はショ糖の約 300 倍の甘味を持つことで着目されている天然甘味成分である⁽²⁾。ステビアはすでに日本の一部で実用栽培され、商品化されている。これらの栽培および商品管理の上から、ステビオシドの迅速かつ簡便な定量法が要求されている。すでに、ステビオシドを直接定量する方法⁽³⁾, ステビオシドを酸加水分解すると Garryfoline-Cauchichicine 型転位を經由して生じるイソステビオールを定量する間接法⁽⁴⁾などが報告されている。しかし、改良された方法でも定量 (乾燥葉) に 8~10 時間を必要とする^{(1)と(3)あるいは(4)}。

近年ステビアには、ステビオシドのほかに甘味を有す

るステビオシド類縁化合物の存在が報告されている⁽⁵⁾。

これらの甘味成分を杉沢ら⁽⁴⁾は 30% 硫酸を用い、30 分間加水分解するのが最適としている。また、日本食品添加物団体連合会による天然食品添加物規格では、ステビオシドおよびその類縁化合物を含む製品を 20% 硫酸を用い、2 時間酸加水分解を行っている⁽⁶⁾。

著者らは栽培、製造原体および市販品のステビオシドおよび類縁化合物を総ステビオシドとして、簡便に定量する方法の確立を企画し、ステビオシドおよびその類縁化合物を酸加水分解し、イソステビオールとした後、二波長クロマトスキャナー (CS) で定量した。この酸加水分解には鉍酸 (硫酸, 塩酸, 臭化水素酸) の他にトリフルオロ酢酸を用いた。鉍酸を用いたときは副生成物 [薄層クロマトグラフィー (TLC), ガスクロマトグラフィー (GC) による] の生成が認められたのに対し、有機酸を用いての加水分解では、選択的にイソステビオールが得られたので定量法とあわせて報告する。

実験の部

1. 試料および妨害物質の除去

1.1. 試料

1.1.1. 乾燥葉 北海道(試料 1), 九州(試料 2), 沖縄(試料 3), 韓国(試料 4) およびブラジル(試料 5) 産の市販品を乳鉢で粉碎して試料とした。

1.1.2. 製造原体 守田化学工業株式会社製 Lot. No. 31219 (試料 6), 40113 (試料 7), 40202 (試料 8), 40203 (試料 9), 40205 (試料 10), 308291 (試料 11), 308292 (試料 12) を試料とした。

1.1.3. 市販品 守田化学工業株式会社製ステビロン 50 (試料 13), ステビロン 500 (試料 14), ステビアロール (試料 15), 山陽国策パルプ株式会社製 STD (試料 16), 丸善化成株式会社製マルミロン 50 (試料 17), (株)多摩生化学研究所ステビックス (試料 18), ステビックス PW (試料 16) を試料とした。

1.1.4. 反応条件の選択に用いたステビオシド [I] 守田化学工業株式会社製, mp 214.2~215.4°C で TLC (展開溶媒: クロロホルム (C): メタノール (M): 水 (W)=6:3:1 の混合溶媒の下層部を用いた) で単一のスポットを示した。

1.2. 妨害物質の除去

1.2.1. 乾燥葉 封管試験が可能なスピッツ型酸加水分解試験管(以下とくに断わりのない限り試験管は本試験管を指すものとする) 10ml (株式会社大阪理工製作所製) に乾燥葉 1.000g (1 試料 3 本) を精秤し, これに蒸留水 0.5ml, エーテル 10.0ml を加えてより振り混ぜた後, 静置あるいは遠心分離(簡便な手動式のもの) し, 傾斜してエーテルを分け, エーテルを留去, これに 1.0ml のジオキサンを加えた。このジオキサン溶液の 1μl を取って TLC (展開溶媒: ベンゼン (B): 酢酸エチル (E)=6:4, あるいは C:M=97:3) でイソステビオール [II], あるいはステビオール [III] の定性試験を試みたところ, [II] および [III] の R_f 値に一致するスポットが認められたので, 抽出残渣にエーテル 5.0ml を加えて分離, 同操作をもう一度くり返し, 濃縮して調製したジオキサン中に [II] および [III] のスポットが認められないことを確認した後, 抽出残渣は一度抜かし, 酸加水分解試料とした。

1.2.2. 製造原体および市販品 B:E=6:4 あるいは C:M=95:5 を展開溶媒とした TLC では, [II]

あるいは [III] に相当するスポットは確認されなかった。ので, そのまま酸加水分解を行った。

2. 酸加水分解

2.1. 硫酸

2.1.1. 30% 硫酸 ステビオシド [I] 252.8mg, 30% 硫酸 5.0ml を共栓付 10ml スピッツ管に取り, 30 分煮沸浴上で反応した⁽⁴⁾。反応混合物に 5.0ml のエーテルを加えてよく振り混ぜ, 下層を取り出し(TLC では下層には [II] は確認されなかった), エーテル層は 1ml の水を加えて洗浄, 本操作を 3 回(硫酸および, 臭化水素酸系で実施し, 他の系では略した), 次に揮発性物質(エーテル, 塩酸, トリフルORO酢酸など)を減圧下で回収した後(塩酸, トリフルORO酢酸は 3ml の水を 3 回に分けて加え減圧下で回収した), メスフラスコにジオキサンで洗い込み, ジオキサンで全容 2.0ml とし, 定量に用いた(2.1.3. で得られた試料にはジオキサンを 0.40ml 加えて試料とした)。

2.1.2. 25% (6N) 硫酸 [I] 252.8mg, 25% 硫酸 5.0ml を試験管に取り, 封管し, 煮沸浴上で 1 時間反応した。

2.1.3. 20% 硫酸 [I] 50.0mg, 20% 硫酸 10.0ml を空冷管付きの 30ml の丸底フラスコに取り, 2 時間, 煮沸浴上で反応した⁽⁶⁾。

2.2. 塩酸 [I] 252.8mg, 6N 塩酸 5.0ml を試験管に取り, 2.1.2., 2.1.1. と同様に反応, 試料調製した。

2.3. 臭化水素酸 [I] 252.8mg, 48% 臭化水素酸 5.0ml を試験管に取り, 2.1.2. に準拠して反応した。このとき反応は 10 分間行った。

2.4. トリフルORO酢酸

2.4.1. ステビオシド [I] 252.8mg, 2.5N トリフルORO酢酸 5.0ml を試験管に取り, 2.1.2. と同様に反応した。この反応系で良好な結果が得られたので, 反応時間を変え, 最適条件の検索を試みた。

2.4.2. 乾燥葉 1.2.1. で処理した試料に 2.5N トリフルORO酢酸 5.0ml を加え, 2.1.2. と同様に反応した(2.4.1. から標準反応時間を 1 時間とした)。

2.4.3. 製造原体および市販品 試料 252.8mg, 2.5N トリフルORO酢酸 5.0ml を試験管に取り, 2.1.2. と同様に反応した。

3. 標準溶液の調製

3.1. イソステビオール ステビオシドを硫酸の存

在下, 加水分解し⁽⁷⁾, 得られたイソステビオールをカラムクロマトグラフィー, 再結晶(メタノール)で精製した. mp 225.4~226.6°C (文献値⁽⁷⁾ 234°C), このメチルエステル: mp 197.3~198.9°C (文献値⁽⁷⁾ 202~203°C) でこれらの GC および TLC では単一ピークおよび単一スポットを示した. また, メチルエステルの赤外線吸収(IR) スペクトルは文献⁽⁷⁾ のそれによく一致し, [II] のメチルエステルの NMR および MS スペクトルは, イソステビオールおよびイソステビオールのメチルエステルの構造をよく支持した.

[II] 500mg を精秤し, ジオキサンを加えて全容 10.0 ml とし, この標準溶液を希釈 (10.0 ml) することによ

り各濃度の標準溶液を調製した.

4. 試薬および TLC ジオキサンは試薬特級を, 他は試薬 1 級品を常法により精製して用いた. 発色試薬のヨウ素は試薬 1 級品をそのまま用いた. また, 展開溶媒の混合比は容量比で示した. TLC プレートは Merk 社製 DC-Fertigplatten Kieselgel 60F 254 を用いた.

5. 分析機器 mp, IR, NMR および MS スペクトルの測定は文献⁽⁸⁾ と同条件で測定し, mp は未補正で示した.

GC: 島津ガスクロマトグラフ GC-4C 型を用い, 3% OV-17 (Gaschrom Q, 60~80 メッシュ, ϕ 3mm $\times$ 2m, ガラス製) カラム, カラム温度 235°C, 窒素圧 1.0 kg/

Fig. 1. TLC Grams with Dual-Wavelength TLC Scanner of Authentic Sample and Extract (from Brazil). Plate: silicic acid. Solvent: CHCl_3 : MeOH : H_2O (60:30:10, lower layer). Detection: I_2 : λ_R 390nm, λ_R 620nm.

cm² で検出器に積算計 (Shimadzu Chromatopac-EIA) を連結した装置を用いた。

二波長クロマトスキャナー (CS) : シリカゲルプレートを用いて TLC (8cm 展開) を行い, ヨウ素発色 (波

長 λ_S 390nm, λ_R 620nm) したプレートを島津二波長スキャナー CS-910 型を用い, スリット幅 1.25×1.25mm の条件下, 反射ジグザグスキャンニング法で測定した。

Fig. 2. TLC Grams with Dual-Wavelength TLC Scanner of Reaction Products. Plate : Silicic acid. Solvent : CHCl₃ : MeOH (93 : 7). Detection : I₂ : λ_S 390nm, λ_R 620nm.

Table I. Hydrolysis and Yield, mp of Hydrolyzate and Purity of Isosteviol in the Hydrolyzate

Hydrolytic reagent	Reaction time (min)	Yield (%)	mp (°C)	Purity ^a	
				GC (%)	TLC (%)
30% H ₂ SO ₄	30	96.5	227.1~228.8	98.7	78.5
25% H ₂ SO ₄ ^b	60	91.2	227.6~228.5	96.9	77.0
20% H ₂ SO ₄	120	97.0	227.4~229.3	93.8	85.0
6N HCl ^b	60	88.8	227.8~228.0	97.9	62.0
48% HBr ^b	10	90.9	226.2~228.6	99.8	86.0
2.5N CF ₃ CO ₂ H	60	96.0	227.0~228.6	97.0	98.0

^a Calculation on the relative peak areas in the gas and TLC chromatograms.

^b In sealed tube.

結果および考察

1. 定量妨害物質の除去

乾燥葉試料に 0.5 ml の水を加えると、エーテル層に浮遊していた微粉末が容易に沈殿し、透明なエーテル層が得られた。各地産のエーテル層（第 1～3 回目抽出）の TLC グラムはよく類似していたので、試料 5 の例を Fig. 1 に示した。

Fig. 1 より明らかなように、第 3 回目エーテル抽出液中にはステビオール [II] およびイソステビオール [III] の R_f 値に相当するスポットは認められない。

2. 酸加水分解

硫酸、塩酸、臭化水素酸およびトリフルオロ酢酸を用いた加水分解で得られた反応生成物のエーテル可溶部の TLC グラムを Fig. 2 に、各条件における生成イソステビオールの収率、融点、純度を Table I に示した。

硫酸、塩酸および臭化水素酸を用いての加水分解では、[II] のほかにもスポットが認められた。すでに、定量に用いられている 30% 硫酸を用いての反応では R_f 値が [III] に相当するスポットが存在し、25% 硫酸を用いての封管中での反応生成物では、[III] に相当するスポットは量的には減少しているがやはり存在し、20% 硫酸 2 時間の場合はこのスポットは消失しているが、 R_f 値 (0.92) の高い個所に新たにスポットが出現していた。鉍酸を用いて得られた酸加水分解生成物中のイソステビオール [II] の含有率は 93.8～99.8% (GC による) ときわめて高い値を示しているが、TLC での含有率は 62.0～86.0% と低い値が観察された。また、すでに総ステビオールの定量法^(4,5)として報告されている 20% および 30% 硫酸を用いての酸加水分解での [II] の含有率で、GC では約 5%、TLC では約 8% の差が認められた。

Fig. 3. The Relationship between the Reaction Time and Yield of Resulting Isosteviol on the Reaction of Stevioside with 2.5N CF_3COOH .

これらの結果は従来の定量法^(4,5)において、定量方法よりもむしろステビオシドの酸加水分解試薬あるいは反応条件の再検討の必要性を示唆している。他方、トリフルオロ酢酸の場合、反応は特異的に進行し、ステビオシドは高収率で [II] に変換した。また、トリフルオロ酢酸による加水分解の最適条件を検討し、その結果を Fig. 3 に示した。

反応初期には R_f 値 0.74 と 0.36 にスポットが存在するが、45 分後には後者のスポットは消失し、[II] に相当するスポットのみが認められた。また、[II] の生成量の曲線から反応最適時間を 1 時間とした。

3. 定量に用いたスポットの確認

イソステビオール [II] に相当するスポット (B : E = 6 : 4 の R_f 値 0.67, C : M = 93 : 7 の R_f 値 0.74) をシリカゲル (60～80 メッシュ) を充填したカラム (ϕ 2 cm $\times$ 33 cm) を通し、B : E = 6 : 4 の溶媒で展開溶出させ、得られたスポットは TLC (上記 2 溶媒系) および GC (遊離酸およびメチルエステル) で単品であった。また、機器分析して得られたスペクトルデータおよび物理的性状は実験 3.1. で示した値によく一致した。

4. 検量線と定量

イソステビオール [II] をクロロホルム：メタノール = 93 : 7 の混合溶媒で 8 cm 展開し、ヨウ素発色して得た検量線は良好な直線関係が得られた (Fig. 4)。また、乾燥葉およびステビオシドとその関連化合物を含む製造原体あるいは市販品の総ステビオシドとしての定量結果を Table II に示した。

乾燥葉における回収率は、ステビア乾燥葉を一度 2.5N トリフルオロ酢酸で加水分解し、溶媒洗浄した後、葉に既知量のステビオシドを添加し、2.4.2. の手順で反応

Fig. 4. Calibration Curves of Isosteviol from Stevioside.

Table II. Content (%) of Stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni, Industrial Materials and Marketed Products^a

Leaves sample No.		Industrial materials sample No.		Marketed products sample No.	
1	4.8	6	78.0	13	64.8
(Hokkaido)		7	98.0	14	49.7
2	8.2	8	98.0	15	11.6
(Kyushu)		9	97.0	16	99.8
3	12.4	10	87.0	17	58.0
(Okinawa)		11	80.4	18	53.6
4	9.1	12	87.0	19	65.0
(Korea)					
5	9.5				
(Brazil)					

^a Average of nonaplicate runs.

し, CS を用いて定量した. この回収率は 99.8% と満足した値を示した. また, 製造原体あるいは市販品の一部を天然食品添加物規格の方法で定量し, 試料 8 では 99.2%, 試料 13 では 65.4% であった.

結 語

封管反応が可能な試験管を用い, トリフルオロ酢酸存在下, ステビオシドおよび関連化合物の酸加水分解では選択的にイソステビオール〔Ⅱ〕を生じた. 〔Ⅱ〕を TLC 展開し, ヨウ素発色させて二波長クロマトスキャナーを用いて定量した. 以上の操作には約 3 時間を要した (妨害物質の除去 0.5 時間, 酸加水分解と後処理 1.5 時間,

展開, 発色および定量 1 時間). この操作時間は従来の方法に比して, 著しく短縮されている.

試料の入手にご協力くださった守田化学工業株式会社 守田豊重氏に深謝致します.

- (1) H. B. Wood, R. Allerton, H. W. Diehl and H. G. Fletcher : *J. Org. Chem.*, **26**, 875 (1955); E. Mosettig, U. Begliner, F. Dolder, H. Lichti, P. Ouit and J. A. Waters : *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2305 (1963).
- (2) F. Bell : *Chem. Ind.*, **1954**, 897.
- (3) 三橋 博, 上野純子, 住田哲也 : 薬誌, **95**, 1501 (1975); **95**, 127 (1975).
- (4) 杉沢 博, 笠井輝代, 鈴木博雄 : 農化, **51**, 175 (1977).
- (5) H. Kohda, R. Kasai, K. Yamasaki, K. Murakami and O. Tanaka : *Phytochemistry*, **15**, 981 (1976); I. Sakamoto, K. Yamasaki and O. Tanaka : *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3437 (1977); 守田豊重, 藤田 功, 岩村淳一, 日本特許第 973099 号.
- (6) 日本食品添加物団体連合会 : 天然食品添加物規格, 東京, 1977, p. 51.
- (7) E. Mosetting and W. R. Nes : *J. Org. Chem.*, **20**, 884 (1955).
- (8) 岩村淳一 : 日化, **1977**, 1003; 岩村淳一, 小牧恭介, 駒井功一郎, 平尾子之吉 : 農化, **52**, 379 (1978).