天然甘味料製剤中のステビア成分の分析法

(昭和 55 年 5 月 23 日受理)

広門雅子* 中嶋 巖* 中島和雄*
溝入 茂* 遠藤英美*

An Analytical Method for Stevia Components in Natural Sweetener Preparation

Masako HIROKADO, Iwao NAKAJIMA, Kazuo NAKAJIMA,
Shigeru MIZOIRI and Fusayoshi ENDO(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
24-1, Hyakunincho 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo)

An analytical method was established for the detection of stevia components in natural sweetener preparation by thin layer chromatography (TLC) on silica gel. Stevia components were developed with chloroform-methanol-water (30:23:4) and detected by spraying the chromatograms with anisaldehyde-sulfuric acid. Five stevia components yielded distinct green spots. The detection limits for these stevia compounds by this method were 0.1 μ g.

High performance liquid chromatography (HPLC) was applied for the quantitative determination of stevioside and rebaudioside A among stevia components. One gram of natural sweetener preparation was dissolved in 20 ml of 50% methanol solution and cleaned up by column chromatography on silica gel. Stevia components were eluted from the silica gel column with chloroform-methanol-water (30:40:15). Stevioside and rebaudioside A in the eluate were analyzed quantitatively by HPLC. The analytical conditions for HPLC were as follows: column, Unisil Q-NH₂; mobile phase, acetonitrile-water (83:17); detector, 210 nm. The limits of detection by HPLC were 0.1 μ g of stevioside and 0.2 μ g of rebaudioside A.

Fourteen commercial products were analyzed. Stevioside, rebaudioside A, B and C and steviolbioside were detected, and quantitative measurements indicated the presence of 0.47 to 37.9% stevioside and 0.26 to 11.9% rebaudioside A.

(Received May 23, 1980)

まえがき

ステビアは *Stevia rebaudiana* BERTONI の葉から抽出される天然の甘味料で、その甘味度はショ糖 (濃度 2%) の約 300 倍と強くしかも低カロリーのため、サッカリンの代替として広い範囲の食品 (珍味、清涼飲料、チューインガム等) に利用されている。

ステビア甘味成分は現在までに 8 種類確認されており¹⁾、いずれもステビオール骨格を有するジテルペン配糖体^{1)~3)}で、その主体甘味成分はステビオサイド (Stev)

およびレバウディオサイド A (Reb A)⁴⁾ である。

ステビア葉中のステビア成分の定量法についてはすでに報告^{4)~9)}されているが、製剤や食品中からの分離分析法についてはいまだ検討されていない。

著者らは甘味料製剤中のステビア成分を薄層クロマトグラフィー (TLC) で確認し、主甘味成分の Stev および Reb A を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離定量する方法を検討した。天然甘味料製剤中には他の甘味物質 (グリチルリチン酸・糖)、有機酸およびデンプンなど配合されているが、HPLC の際カラム保持に悪影響を及ぼすデンプンなどの多糖類をカラムクロマ

*東京都立衛生研究所: 東京都新宿区百人町 3-24-1

トグラフィーで除去し、グリチルリチン酸および有機酸など酸性物質はプレカラムを用い除去することにより良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料および試薬

天然甘味料製剤：市販品14種を用いた。

ステビオサイド (Stev), レバウディオサイド A (Reb A), レバウディオサイド B (Reb B) およびステviolパイオサイド (Stev-b) 標準品：いずれも丸善化成(株)製のものをメタノールより再結晶したものを用いた。

グリチルリチン酸 (Gly) 標準品：グリチルリチン酸モノアンモニウム (甘草懇話会基準品) をメタノールより再結晶した。

Stev, Reb A, Reb B, Stev-b および Gly 標準溶液：各標準品約 100 mg をはかり、それぞれに 50 v/v% メタノール 20 ml を加えて水浴上で加熱して溶かした。

Stev-Reb A 標準溶液：Stev および Reb A 標準品をそれぞれ約 100 mg を精密にはかり、これらを合せ 50 v/v% メタノール 15 ml を加えて水浴上で加熱して溶かし、冷後 50 v/v% メタノールで 20 ml にメスアップした。

グルコース (G) および乳糖 (L) 標準溶液：いずれも和光純薬工業(株)製のものをを用い、50 v/v% メタノールに加熱して溶かし、1% 溶液とした。

デンプン (S) 標準溶液：可溶性デンプン (和光純薬工業(株)製) 約 100 mg をとり、50 v/v% メタノール 10 ml を加えて水浴上で約 5 分間加熱し、冷後ろ紙を用いてろ過し、このろ液を用いた。

TLC 用シリカゲル：Merck社製 Kieselgel 60 (20×20 cm) を 105°, 30 分間活性化し、デンケーター中で放冷したものを用いた。

カラムクロマト用シリカゲル：Merck 社製 Kieselgel 40 (70~230 メッシュ, ASTM) を用いた。

アニスアルデヒド-硫酸：アニスアルデヒド 0.5 ml を 9 ml のエタノールに溶かし、0.5 ml の硫酸および 0.1 ml の氷酢酸を加えた。

その他の試薬：すべて試薬特級を用いた。

2. 器具および装置

ミリポアフィルター：FH 型, 孔径 0.5 μ m。

カラムクロマト管：内径 2 cm, 長さ 20 cm のコック付きガラス管に、Kieselgel 40 のクロロホルム懸濁液を流し込み、高さ 6.5 cm の層とした後、クロロホルム-メタノール-水 (30:40:15) 混液 50 ml, ついでクロロホルム-メタノール (2:1) 混液 10 ml で順次洗ったものを用いた。

3. 実験操作

3.1 TLC による定性法

試料約 1 g を 50 v/v% メタノール 20 ml に水浴上で溶かし、冷後ミリポアフィルターでろ過し、このろ液

を試験溶液とした。次に Stev, Reb A, Reb B, Stev-b, Gly, G, L および S 各種標準溶液および試験溶液それぞれ約 1 μ l を Kieselgel 薄層板上に別々にスポットし、展開溶媒クロロホルム-メタノール-水 (30:23:4) を用いて約 15 cm (約 2 時間) 展開した。薄層板を取り出し風乾後アニスアルデヒド-硫酸を噴霧し、120°, 15 分間加熱した後、スポットの呈色と Rf 値よりステビア甘味成分の確認を行った。

3.2 定量法

試験溶液の調製：試料約 1 g を精密にはかり、50 v/v% メタノール 15 ml を加え水浴上で約 5 分間加熱し、冷後 50 v/v% メタノールで 20 ml にメスアップした後、ミリポアフィルターを用いてろ過し、このろ液を試験溶液とした。

カラムクロマトグラフィーによる前処理：調製したシリカゲルカラム (内径 2 cm, 高さ 6.5 cm) に試験溶液 1 ml を注入し、シリカゲル層表面まで流した。クロロホルム-メタノール (2:1) 混液 10 ml でクロマト管内を洗い (流出速度 2 ml/min), ついでクロロホルム-メタノール-水 (30:40:15) 混液 25 ml でステビア甘味成分を溶出させた (流出速度 2 ml/min)。この溶出液を 50° 以下、減圧下で濃縮乾固し、残留物に水 1 ml を加えて溶かし、これを検液とした。

HPLC による Stev および Reb A の定量：検液 2 μ l を HPLC に注入し、下記条件下で分析した。同様に Stev-Reb A 標準溶液を 50 v/v% メタノールで希釈して、0.25, 0.5, 1, 2, 2.5 mg/ml を作製し、それぞれを HPLC に 2 μ l 注入し、そのピーク高を求め Stev および Reb A 量 (μ g) とピーク高との関係をプロットして検量線を作成し、その検量線から試料中の Stev および Reb A の含量を求めた。

Operating condition of HPLC

Instrument:

Pump	Nihonbunko SP-048 type
Detector	Nihonbunko UVIDEK 100-II type, wave-length 210 nm
Column	4 mm ϕ ×250 mm, packing material Unisil Q-NH ₂
Eluent	CH ₃ CN-H ₂ O (83:17), flow rate 1.2 ml/min, pressure 70 kg/cm

実験結果および考察

1. TLC の展開溶媒の検討

Sakamoto ら³⁾が Stevia 葉抽出成分の分離に用いた展開溶媒クロロホルム-メタノール-水 (15:6:1) はステビア 4 成分のスポットのまとまりは良好だが Rf 値が低く、他の糖との分離が悪いためこの溶媒系についてさらに検討を加えて、ステビア 4 成分と他の糖との分離条件を検討した。メタノールに対し水の比率が非常に高いと、その混合溶媒は分離を生じ、また水に対しメタノ

Fig. 1. Relationship between R_f values of sweeteners and volume of methanol in mixture of CHCl_3 - MeOH - H_2O (15 : M : W) on thin layer chromatography
 ×—×, Steviolbioside; ○—○, Rebaudioside A; ●—●, Starch; ■—■, Rebaudioside B; □—□, Glucose; △—△, Stevioside; ▲—▲, Lactose.

Fig. 2. Thin layer chromatograms of a natural sweetener preparation (1) and eight standard components (2)

Plate : Silica gel
 Solvent : CHCl_3 - MeOH - H_2O (30 : 23 : 4)
 Detection : Anisaldehyde- H_2SO_4
 Stev-b : Steviolbioside
 Stev : Stevioside
 Reb-A, B, C : Rebaudioside A, B, C
 G : Glucose L : Lactose
 S : Starch Gly : Glycyrrhizic acid

ールの比率が非常に高いとステビア成分および糖類はテーリングを起こすので、混合溶媒が分離せず、ステビア成分がテーリングしない範囲でクロロホルムを一定 (15 ml) にし水 (W) とメタノール (M) の溶媒量を検討した。W=0, 1, 2, 3, 4, 7.5 の場合についてすなわちクロロホルム—メタノール—水 (15 : M : 0), (15 : M : 1), (15 : M : 2), (15 : M : 3), (15 : M : 4), (15 : M : 7.5) の混合溶媒について、それぞれ溶媒が分離しない範囲で M の量を変化させ、それらの溶媒で TLC を行った後、各成分の R_f 値を求めた。その結果を Fig. 1 に示した。W=0 のとき各成分ともほとんど原点近くに止まり、W および M の量が大きくなるにしたがいステビア成分および糖類の R_f 値は高くなったが、デンプンの R_f 値はどの溶媒系でも 0 であった。ステビア 4 成分および他の糖類のスポットのまとまりが良く分離が良好であった溶媒は W=3 の M=16, 18 であるが、同時に存在する天然甘味料のグリチルリチン酸が Reb A の R_f 値と一致し確認を妨害したので、W=2 で M=11, 11.5, 12 のうちステビア成分の最も分離の良好な M=11.5 を用いることにした。この展開溶媒クロロホルム—メタノール—水 (15 : 11.5 : 2) による Stev, Reb A, Reb B, Stev-b, Gly, G, L, S 各種標準溶液および試験溶液の TLC クロマトグラムを Fig. 2 に示したが、各成分の R_f 値は、Stev-b : 0.45, Reb B : 0.36, Stev : 0.28, Reb A : 0.21, G : 0.17, L : 0.08, S : 0 であった。またレバウディオサイド C (Reb A の glucose が rhamnose に置換された配糖体)¹⁾ は、Stev および Reb A とよく分離した。アニスアルデヒド—硫酸で発色させた時の呈色は、ステビア 5 成分がすべて緑、G が深緑、L が深緑、S が黒緑であ

り, ステビア 4 成分の検出限界はそれぞれ $0.1 \mu\text{g}$ であった. なおグリチルリチン酸の R_f 値は $0.10 \sim 0.15$ で紫色に呈色するため, ステビア成分と区別できることが判明した.

2. カラムクロマトグラフィーによるデンプンの除去の検討

デンプン含有試料をそのまま HPLC に付す場合, カラム分離に影響しカラムの寿命を短くする等問題があるので, デンプンの除去法を検討した.

TLC の結果から, シリカゲルカラムでクロロホルム-メタノール-水系の溶媒を用いればデンプンを除去できると考えられた. そこで吸着剤にシリカゲルを用い, まずステビア成分および糖類をカラム上層に吸着させる溶媒を検討した. Fig. 1 より各成分の R_f 値の低いクロロホルム-メタノール系 (15 : M) 溶媒が考えられた. M の値が小さい程良好だが, 試験溶液が 50% の水を含むため (ステビア成分の溶解度が最も高い溶媒), M が 7 以下だと試験溶液注入時に溶媒分離を生じるので, $M=7.5$ すなわちクロロホルム-メタノール (15 : 7.5) を用いることとした. また溶出溶媒としては, ステビア 4 成分の R_f 値が高く, しかも 4 つのスポットが接近している溶媒系 $W=7.5$ で $M=19, 20, 21$ が考えられたが, このうち $M=19$ の場合は混合溶媒のバランスがくずれやすく, また $M=21$ はステビア成分のスポットのまとまりが悪くなる傾向を示したので, $M=20$ すなわちクロロホルム-メタノール-水 (15 : 20 : 7.5) を用いることにした.

ついで吸着溶媒にクロロホルム-メタノール (15 : 7.5), 溶出溶媒にクロロホルム-メタノール-水 (15 : 20 : 7.5) を用いて, ステビア 4 成分の流出フラクションを検討した. 溶出液 5 ml ずつを分取し, 各フラク

ションを濃縮した後, TLC で確認したところ, 5~15 ml の間にステビア 4 成分が溶出してくることが認められた. したがって溶出液 0~25 ml を分取することにした. またデンプンについても同様に行ったところ, いずれのフラクションにもデンプンは確認されなかったので, シリカゲルに吸着され除去されたと考える.

つぎに, Stev および Reb A の濃度 0.25 mg, 1 mg, 2.5 mg についてそれぞれカラム回収実験を行ったところ, Table 1 のごとく良好な結果が得られた. また試料 1 g について 3 回繰り返しカラム操作を行ったところ, Stev 4.73, 4.68, 4.70 mg, Reb A 0.99, 1.00, 1.00 mg と再現性も良好であった.

3. HPLC による分離条件の検討

ステビア成分が配糖体であることから, 一般に糖分離に用いられるシリカゲル担体に NH_2 基を導入した順相系のカラムを用いて検討を行った. 移動相にアセトニトリル-水系を用い Stev, Reb A および Reb C の分離条件を検討した. Reb C の標準品が得られなかったので, Stev, Reb A および Reb C を含有するステビア糖 K (ステビア甘味成分 50% 含有) を用いた. ステビア 3 成分の分離が最も良好であったアセトニトリル-水の溶媒比は 83 : 17 である. この移動相による Stev-Reb A 標準溶液およびステビア糖 K のクロマトグラムを Fig. 3 に示した. なお Reb B, Steb-b, G, および L 等は検出波長 210 nm に吸収をもたないため, これらは Stev および Reb A の定量を妨害しないことが判った.

市販甘味料製剤中には他にカラムクロマトグラフィーで除去できない酸性物質 (有機酸塩, グリチルリチン酸,

Fig 3. HPLC chromatograms of stevia components in natural sweetener preparation and some standard components

Column, Unisil Q- NH_2 (5μ , $4 \text{ mm} \times 25 \text{ cm}$); Eluent, $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (83 : 17) Flow rate, 1.2 ml/min; Detector, UV 210 nm

(I) Stevioside, (II) Rebaudioside A, (III) Rebaudioside C; ---, Standard; —, Sample

Table 1. Recoveries of Stevioside and Rebaudioside A by Silica Gel Column Chromatography

	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
Stevioside	0.25	0.218	87.2
		0.219	87.9
	1.0	0.935	93.5
		0.941	94.1
	2.5	2.329	93.2
		2.360	94.4
Rebaudioside A	0.25	0.225	90.2
		0.225	90.2
	1.0	0.947	94.7
		0.995	95.5
	2.5	2.392	95.7
		2.407	96.3

サッカリンなど) が配合されているが、これらは HPLC 分析の際、UnisilQ-NH₂ に吸着されカラムの寿命を短くするので、同系のプレカラム (UnisilQ-NH₂, 4 mm × 5 cm) を用い、これを適宜取り替えることにより本カラムを長時間保持することができた。

4. 検量線

Stev および Reb A とも 0.5~5 µg の範囲で良好な直線性を示した。(Fig. 4)

5. 市販天然甘味料中のステビア成分の定性および定量

市販天然甘味料製剤 14 種について TLC を行った結果、14 種とも、Stev, Reb A, Reb C, Reb B および Stev-b の 5 成分が確認された。

Stev および Reb A の定量結果を Table 2 に示した。

Fig. 4. Calibration curves of stevioside (I) and rebaudioside A (II) by HPLC

Table 2. Contents of Stevioside and Rebaudioside A in Natural Sweetener Preparation

Sample	Stevioside (%)	Rebaudioside A (%)	Total of stevia components ^{a)} (%)
1	4.20	3.59	8.59
2	1.57	0.96	4.32
3	2.03	1.46	5.31
4	2.59	0.91	5.79
5	7.10	3.09	12.6
6	3.81	0.94	7.48
7	4.77	1.05	8.06
8	0.60	0.26	1.38
9	4.63	1.81	8.83
10	2.36	0.82	5.00
11	2.16	1.66	4.94
12	37.9	11.9	70.7
13	0.47	0.18	1.23
14	5.12	1.56	6.80

Stev 含量は 0.47~37.9%, Reb A 含量は 0.26~11.9% で、ほとんどの試料中から Stev が Reb A の約 2 倍量検出された。また Stev と Reb A の含量の和は総ステビオサイド^{b)}の約 70% に相当し、これらはステビア成分の主成分であることが判明した。

ま と め

天然甘味料製剤中のステビア成分を定性する目的で TLC 法を、主甘味成分の Stev および Reb A を定量する目的でカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ法および HPLC 定量法を検討した。試料を 50 v/v % メタノールに溶かし、そのまま TLC に付した。展開溶媒にクロロホルム-メタノール-水系を用い、その溶媒比を種々検討したところ、30:23:4 が最も良好であった。発色試薬にアニスアルデヒド硫酸を用いた。ステビア成分はすべて緑色を呈し、その検出限界はそれぞれ 0.1 µg であった。

HPLC の際妨害するデンプンを除去する目的でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを検討した。溶出溶媒にクロロホルム-メタノール-水 (30:40:15) を用いたところ、ステビア成分は 0~15 ml に溶出し、デンプンは吸着され溶出しなかった。カラム回収率は 2.5 mg 添加で Stev 93.8% および Reb A 96.0% と良好で再現性も良かった。HPLC ではシリカゲル担体に NH₂ 基を導入した順相系のカラムを用い、移動相にアセトニトリル-水 (83:17) を用いて良好な分離が得られた。検量線は 0.5~5 µg の範囲で直線性を示した。

市販品 14 種につき本法を応用したところ、すべての製品中から Stev, Reb A, Reb C, Reb B, Stev-b の 5 成分が検出され、主甘味成分の Stev 含量は 0.47~37.9%, Reb A 含量は 0.26~11.9% であった。Stev と Reb A の含量の和は総ステビオサイドの約 70% に相当し、これらはステビア甘味料の主成分であることが判明した。

なお本研究の要旨は日本食品衛生学会第39回学術講演会 (1980年 5 月, 東京) において発表した。

文 献

- 1) Sakamoto, I., Yamasaki, K., Tanaka, O.: Chem. Pharm. Bull., 25, 3437~3439 (1977).
- 2) Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Marukami, K., Tanaka, O.: Phytochemistry, 15, 981~983 (1976).
- 3) Sakamoto, I., Yamasaki, K., Tanaka, O.: Chem. Pharm. Bull., 25, 844~846 (1977).
- 4) Hashimoto, Y., Moriyasu, M.: 生薬学雑誌 32, 209~211 (1978).
- 5) 坂本征則, 神田博史, 村上国子, 田中 治: 薬誌. 95, 1507~1510 (1975).
- 6) 三橋 博, 上野純子, 住田哲也: 同上, 95, 127~130 (1975).

-
- 7) 鍋田憲助, 伊藤研治, 杉沢 博: 農化. **51**, 179
~181 (1977).
- 8) 日本食品添加物 団体 連合会: 天然食品添加物規
格, (1977).
- 9) 岩村淳一, 木下了彦, 平尾子之吉: 農化. **54**,
195~200 (1980).