

高速液体クロマトグラフィーによる食品中の ステビア甘味成分の分析法

小 沢 秀 樹*, 広 門 雅 子*, 嶋 村 保 洋*,
中 島 和 雄*, 木 村 圭 介*, 安 田 和 男*

An Analytical Method for Stevia Sweeteners in Food by High Performance Liquid Chromatography

HIDEKI OZAWA*, MASAKO HIROKADO*, YASUHIRO SHIMAMURA*,
KAZUO NAKAJIMA*, KEISUKE KIMURA* and KAZUO YASUDA*

A simple and efficient method for detecting and determining stevioside and rebaudioside A for sweeteners in beverages and foods is described. Stevioside and rebaudioside A were extracted with water from a sample by dialyzing for two days. The extract was cleaned up with a Bond Elut C₁₈ cartridge. Clean-up was performed by washing the cartridge with 20 % acetonitrile, and the eluate by 80 % acetonitrile was collected and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Recoveries of stevioside and rebaudioside A in samples spiked at 10 $\mu\text{g/g}$ were 74.3 - 96.8 % and 69.0 - 96.6 %, respectively. Relative standard deviations of samples (CV value) were 0.1 - 3.9 %. The proposed method was applied to analysis of 18 commercially available samples with indication of stevia. Stevioside or rebaudioside A was detected in all these samples except FURIKAKE (Japanese rice seasoning), at levels of 2.2-179.0 $\mu\text{g/g}$ and 3.1-101.7 $\mu\text{g/g}$, respectively.

Keywords : 天然甘味料 natural sweetener, ステビオシド stevioside, レバウディオシド A rebaudioside A, 固相抽出 solid-phase extraction, 透析法 dialysis, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

ステビア抽出物は *Stevia rebaudiana* Bertoni の葉より抽出され、ステビオシド (以下 Stev. と略す) を主成分とする天然甘味料で、その甘味度はショ糖の約300倍と高く、低カロリー、非う蝕性等の性質を有することから清涼飲料、乳飲料、漬け物、冷菓等の食品に幅広く用いられている。

現在、天然甘味料として食品に使用されるステビア抽出物は食品衛生法でその表示が義務づけられているため、その使用実態を把握するためにはステビア抽出物の主成分である Stev. とレバウディオシド A (Reb. A) に対する汎用性の高い簡易分析法を確立しておくことは必要である。

これまでに、ステビオシド分析法として、薄層クロマ

トグラフィー (TLC)¹⁾、ガスクロマトグラフィー (GC)²⁾、キャピラリー電気泳動 (CE)^{3,4)}、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{5,9)} 等を用いた報告がある。今回、著者らは食品中のステビオシド分析法として、その簡易さ、精度等の点から汎用性の高い HPLC 法を用い、また、試料溶液の前処理には食品中のマトリックスの除去に有効で、多くの食品への適用可能な透析法¹⁰⁾ を用いて、簡便かつ精度の高い分析を確立したので報告する。

実験方法

1. 試料

ステビアの表示のある清涼飲料水、漬け物、菓子類等を都内の販売店で購入したものを試料とした。

2. 試薬

(1) Stev. 及び Reb. A 混合標準原液 : Stev. 標準品 (和

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

光純薬工業(株)製 (Stev. 定量用) 及び Reb. A 標準品 (和光純薬工業(株)製 (Stev. 定量用) 各20mgを50%メタノール溶液に溶解して全量を100mlとした。

- (2) 透析膜：透析用セルロースチューブ (36-32-500, Viskase sales社製) を使用した。
- (3) 固相抽出カートリッジ：Bond Elut Jr. C₁₈ (500 mg, バリアン社製) を使用した。リザーバー (60 ml, 日本ウォーターズ社製) を連結したBond Elut Jr. C₁₈を、予めメタノール 5 ml 次いで水 5 ml でコンディショニングを行った後、試料溶液を負荷した。
- (4) アセトニトリル及びメタノールは和光純薬工業(株)製HPLC用を用いた。
- (5) アジ化ナトリウム (NaN₃) は和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ (HPLC)：日本分光工業(株)製PU-1580型ポンプ, UV-1570型紫外/可視部吸収検出器, AS-950-10型インジェクター, CO-965型カラム恒温槽及びDGU-12A型デガッサーにより構成したものを用いた。データ処理にはJASCO BORWIN-NTクロマトデータ処理プログラム (日本分光工業(株), ver.1.5) を用いた。

4. HPLC分析条件

カラム：Capcell PAK UG 80 NH₂ (粒径 5 μm, 4.6 mm i.d. x 250 mm; (株)資生堂製), 移動相：アセトニトリル・水 (80:20), 流速：1.2ml/min, カラム温度：45℃, 検出波長：紫外部吸収 (UV 210 nm), 注入量：20 μl。

5. 試験溶液の調製

液体試料はそのままを、固体試料は細切したものを20g秤り、水 約40mlで透析膜に充填し上端を密封した。これをメスシリンダー中に入れ、アジ化ナトリウム溶液 (20mg/ml) 1 ml及び水とで全量を200mlとし、ときどき揺らしながら室温で48時間透析を行った。透析終了後、透析外液50mlをBond Elut Jr. C₁₈カートリッジに負荷し、水 5 ml 次いで20%アセトニトリル20mlで洗浄した。その後80%アセトニトリル約4.5 mlでStev.及びReb. Aを溶出させ、全量を5 mlとしたものをHPLC用の試験溶液とした (Fig. 1)。

6. 検量線

Stev.及びReb. A混合標準原液を80%アセトニトリル溶液で希釈し、6.25, 12.5, 25, 50, 100及び200 μg/mlの混合標準溶液を調製し、その20 μlをHPLCに付し、ピーク面積法により検量線を作成した。

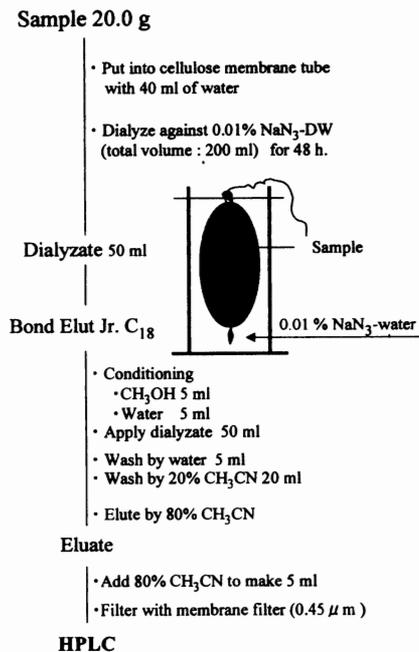


Fig.1. Schematic Diagram for Analytical Procedure of Stevioside and Rebaudioside A.

結果及び考察

1. クリーンアップ条件の検討

Stev.及びReb. Aの混合標準原液 1 ml (Stev. 200 μg, Reb. A 200 μg) を水50mlにて希釈した溶液をBond Elut Jr. C₁₈カートリッジに負荷し、5 mlの水、及び20mlの20%アセトニトリルにてカートリッジを洗浄した後、溶出液に80%アセトニトリルを用いて、その量を1~5 mlの範囲で変化させ、溶出されたStev.及びReb. AをHPLCを用いて定量した。その結果、Fig. 2に示すようにStev.及びReb. Aは4 mlの80%アセトニトリルで定量的に回収できることが分かった。さらに、あんず (乾燥実) の透析外液50mlに混合標準原液250 μl (Stev.及びReb. A: 各50 μg) を添加してBond Elut Jr. C₁₈カートリ

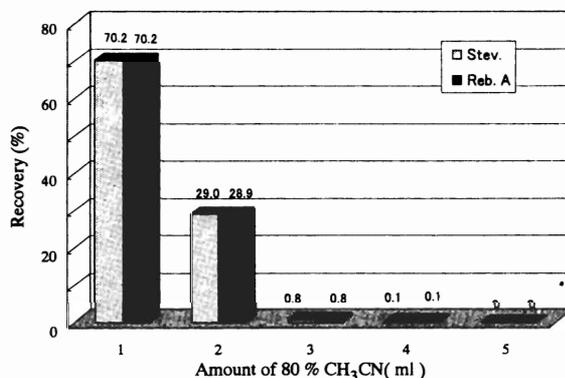


Fig.2. Elution of Stevioside (Stev.) and Rebaudioside A (Reb. A) with 80% CH₃CN from a Bond Elut Jr. C₁₈ Cartridge.

ッジ負荷し同様な操作を行ったところ、十分なクリーンアップ効果が得られることが分かった。

2. 透析時間の検討

サッカリンなどの抽出には簡便な透析法¹⁰⁾が用いられているがステビア成分に適用された報告はない。そこで、ウスターソース20gに混合標準原液1 ml (Stev.: 200 μ g, Reb. A: 200 μ g) を添加し、透析時間による回収率への影響を調べた。その結果、24時間の透析ではStev. 及び Reb. Aの回収率は74.2%及び69.8%と低かったが、48時間以上の透析では90%以上の回収率が得られることが分かった (Fig. 3)。したがって、以後の操作では透析時間を48時間とした。

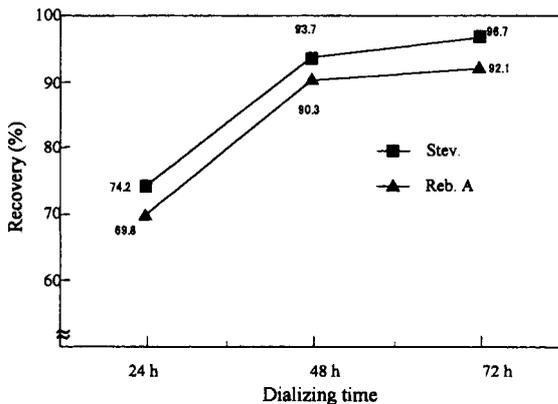


Fig.3. Effect of Dialyzing Time on the Recoveries of Stev. and Reb. A spiked to Apricot (Dry Fruit) at 10 μ g/g.

3. 検量線

Stev.及びReb. Aの6.25~200 μ g/mlの混合標準溶液を調製し、検量線の直線性について検討したところ、良好な直線性を示した (Stev.: $r=0.9994$, Reb. A: $r=0.9998$) (Fig. 4)。

4. 添加回収実験

あらかじめStev.及びReb. Aが検出されないことを確認した市販食品を用いて添加回収試験を行った。試料20gに対しStev.及びReb. Aを10 μ g/gになるように混合標準原液を添加し、よく混和した。これを室温で15分以上放置した後、Fig. 1に従って操作して回収率を求めた。その結果をFig. 5及びTable 1に示した。いずれの試料の

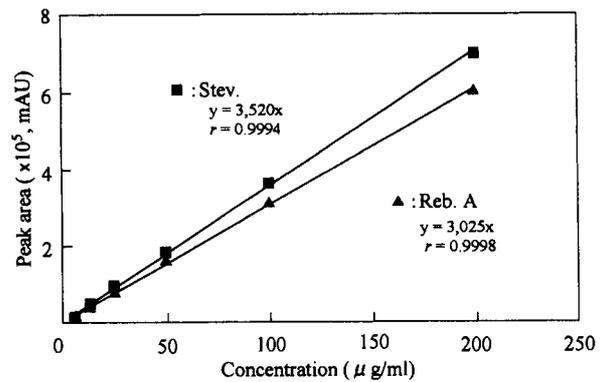


Fig.4. The Calibration Curves of Stev. and Reb. A.

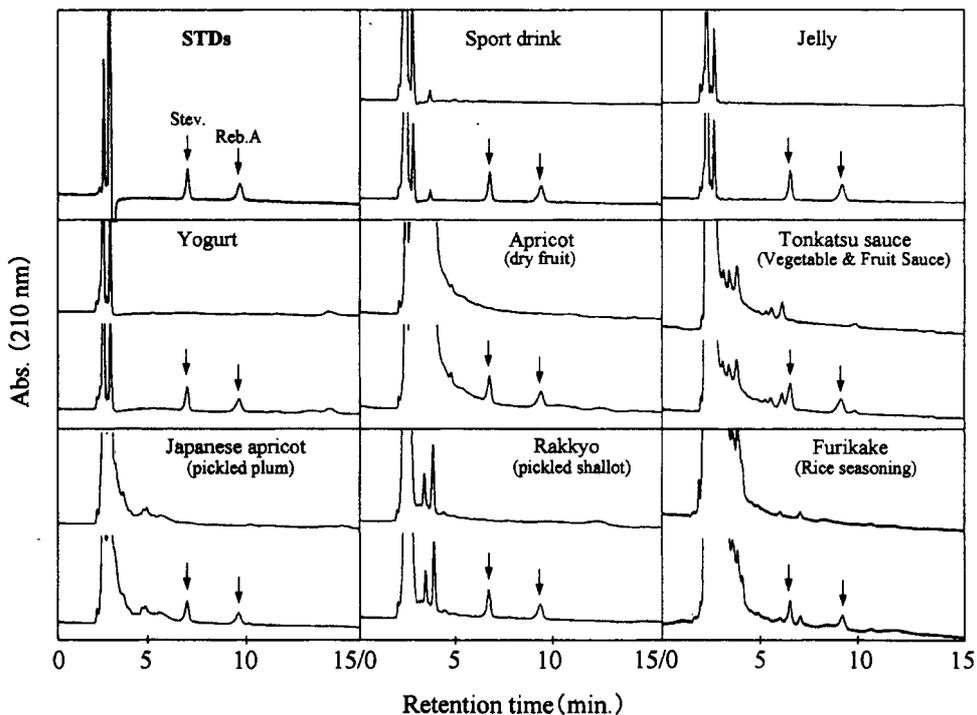


Fig.5. HPLC Chromatograms of Stev. and Reb. A spiked to the foods at the level of 10 μ g/g. Upper profile of each window : unspiked.

Table 1. Recoveries of Stev. and Reb. A from Various Foods spiked at 10 $\mu\text{g/g}$.

Samples		Recovery (%) ¹⁾	
		Stev.	Reb. A
Soft drinks	Sports drink	96.8±2.2	96.6±1.4
Pickles	Plum (Japanese apricot)	80.9±2.9	89.0±0.1
	Rakkyo (shallot)	91.1±1.3	81.1±0.9
Sauces	Worcestershire	93.7±1.9	90.3±3.5
	Vegetable & Fruit (semi-sweet)	89.4±1.6	84.4±1.4
	Vegetable & Fruit (semi-sweet)	91.5±1.2	89.2±1.6
	Vegetable & Fruit (Tonkatsu)	88.2±1.9	85.4±1.0
Sweets	Fruit jelly	92.3±1.6	95.0±1.1
Dairy products	Yogurt	92.2±4.3	95.3±2.5
Dry Fruits	Soft Apricot	93.7±1.0	90.3±0.6
Rice seasoning	Furikake (dried bonito) ²⁾	74.3±2.2	69.0±1.0

1) Average of three experiments (Mean±SD).

2) 10g of sample was used.

場合にも、HPLCクロマトグラム上にはStev.及びReb. A に対する妨害ピークは認められなかった。また、回収率はふりかけでStev. 74.3%, Reb. A 69.0%と低い値であったが、その他の食品ではStev. 80.9~96.8%, Reb. A 81.1~96.6%と高い値が得られた。CV値についても3回の分析で0.1~4.3%と良好な結果が得られた。ソースでは、HPLCクロマトグラム上においてStev.に近接するピーク

が存在したが³⁾、10 $\mu\text{g/g}$ 添加時での定量値への影響は1%程度と少なかった。

5. 市販食品における分析結果

ステビア抽出物の添加表示がある市販食品18検体の測定結果をTable 2に示した。分析した18検体中ふりかけ以外の食品すべてからステビアを検出した。

清涼飲料水では甘味質の良いとされるReb. Aが 40μ

Table 2. Analysis of Stev. and Reb. A in Various Foods.

Samples	$(\mu\text{g/g})$		Stev./Reb. A ratio	
	Stev.	Reb. A		
Soft drinks	Sports drink	ND	40.3	—
	Soft drink	4.9	33.6	0.15
	Sports drink	2.2	ND	—
Pickles	Rakkyo (shallot)	52.2	21.6	2.42
	Plum (Japanese apricot)	179.0	101.7	1.76
	Plum (Japanese apricot)	3.9	3.5	1.11
	Bettara (Japanese radish)	55.9	51.3	1.09
	Takuan (Japanese radish)	104.1	47.8	2.18
Sauce	Worcestershire	17.1	7.1	2.41
	Vegetable & Fruit (semi-sweet)	16.7	6.9	2.42
	Vegetable & Fruit (Tonkatsu)	18.8	7.7	2.44
Dressing	Japanese type	6.5	3.1	2.10
Sweets	Fruit jelly	4.2	29.2	0.14
Dairy product	Yogurt	3.7	76.0	0.05
Dry fruit	Soft apricot	39.2	17.7	2.21
Dry marine products	Squid	57.1	27.2	2.10
	Squid	39.0	18.6	2.10
	Furikake (Rice seasoning)	ND	ND	—

ND: not detected

g/g程度使用されているものがあつた。漬け物ではらっきょう、梅干し、べつたら漬け、たくあん漬けを分析した結果、Stev.は3.9~179.0 $\mu\text{g/g}$, Reb. Aは3.5~101.7 $\mu\text{g/g}$ が検出された。中でも、梅干しでStev. 179.0 $\mu\text{g/g}$, Reb. A 101.7 $\mu\text{g/g}$ と高濃度に検出されるものがあつた。ソースは同一メーカー製のウスターソース、中濃ソース及びとんかつソースを分析したが、いずれもStev. は18 $\mu\text{g/g}$ 程度、Reb. A は7 $\mu\text{g/g}$ 程度検出された。その他の食品では、和風タイプのドレッシングでStev. 6.5 $\mu\text{g/g}$, Reb. A 3.1 $\mu\text{g/g}$, フルーツゼリーでStev. 4.2 $\mu\text{g/g}$, Reb. A 29.2 $\mu\text{g/g}$, ヨーグルトでStev. 3.7 $\mu\text{g/g}$, Reb. A 76.0 $\mu\text{g/g}$, あんず(乾燥果実)でStev. 39.2 $\mu\text{g/g}$, Reb. A 17.7 $\mu\text{g/g}$, さきいかでStev.が57.1及び39.0 $\mu\text{g/g}$, Reb. Aが27.2及び18.6 $\mu\text{g/g}$ 検出された。

ステビアの葉の中のStev. 及びReb. Aの存在比率はStev./Reb. A 比1.4~4.0という報告があるが⁹⁾、今回の分析結果から、現在使用されているステビア抽出物の甘味製剤は3種類に大別できることがわかつた。すなわち、清涼飲料や菓子類に用いられる味質の優れたReb. Aの比率を高めたStev./Reb. A 比が0.2以下の製剤、べつたら漬け等漬け物で使用されていたStev./Reb. A 比が1程度の製剤、及び18検体中9検体で使用されていたStev./Reb. A 比が2程度の製剤である。このことから、食品の種類によって甘味の質を変えるためStev./Reb. A 比が異なる製剤を使用していることがわかつた。

まとめ

HPLCによるステビア甘味成分のStev.及びReb. Aの分離定量法を検討した。試料溶液の前処理に透析法を用い、 C_{18} カートリッジでのクリーンアップを行うことにより、多くの食品に適用でき、操作が簡便な分析法を確立した。添加回収試験の結果、回収率はふりかけを除きStev. 80.9~96.8%, Reb. A 81.1~96.6%, 3回の繰り返し実験

でのCV値は5%以下と良好な結果が得られた。本法をステビア抽出物の添加表示のある市販食品18検体に適用したところ、Stev. が2.2~179.0 $\mu\text{g/g}$, Reb. A が3.1~101.7 $\mu\text{g/g}$ 検出された。ふりかけ1検体はStev.及びReb. Aいずれも検出されなかつた。

ステビア抽出物はその味質を変化させるため甘草(グリチルリチン)と併用されることもある。またアセスルファムK等の他の低カロリー甘味料と併用される可能性もあることから、それらを含めた新たな甘味料の一斉分析法の検討が必要であると考えられる。

文 献

- 1) 岩村淳一, 木下了彦, 石間紀男, 他: 農化, **56**, 87-91, 1982.
- 2) 中嶋巖, 広門雅子, 宇佐美博幸, 他: 東京衛研年報, **30**, 153-156, 1979.
- 3) Mauri, P., Catalano, G., Gardana, C., *et al.*: *Electrophoresis*, **17**, 367-371, 1996.
- 4) Liu, J., Ong, C. P., and Li, S. F. Y., : *J. Chromatogr. Sci.*, **35**, 446-450, 1997.
- 5) 松本幸一郎, 済田清隆, 桐ヶ谷忠司, 他: 横浜衛研年報, **35**, 71-73, 1996.
- 6) Kitada, Y., Sasaki, M., Yamazoe, Y., *et al.*: *J. Chromatogr.*, **474**, 447-451, 1989.
- 7) Fujinuma, K., Saito, K., Nakazato, M., *et al.*: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 799-802, 1986.
- 8) Bovanova, L., Brandsteterova, E., Baxa, S.: *Z. Lebensm. Unters Forsch A*, **207**, 352-355, 1998.
- 9) Hashimoto, Y., Moriyasu, M., Nakamura, S., *et al.*: *J. Chromatogr.*, **161**, 403-405, 1978.
- 10) 日本薬学会編: "衛生試験法・注解1990" p493-495 (1990) 金原出版.