

天然甘味料ステビア製品中の甘味成分分析及び品質評価

平田 恵子*, 植松 洋子*, 鈴木 公美*, 飯田 憲司*,
安野 哲子*, 鎌田 国広*

Analysis of Stevia Glycosides in Stevia Products of Natural Sweetening and Evaluation of their Chemical Quality

Keiko HIRATA*, Yoko UEMATSU*, Kumi SUZUKI*, Kenji IIDA*,
Tetsuko YASUNO* and Kunihiro KAMATA*

Thin layer chromatography and HPLC methods were used to examine stevia extract, powdered stevia and α -glucosyltransferasetreated stevia in stevia products of natural sweetening, and four stevia glycosides in these products were analyzed by HPLC.

Contents of total glycosides in all (10) stevia extract products were more than 80%. Rebaudioside A only was detected in two products and in proportions of more than 90%. The total glycosides content in one powdered stevia product was 13.6%. Unreacted glycosides in three α -glucosyltransferasetreated stevia products were 2.8-4.9%.

The quality of these products was evaluated including the results of heavy metals testing and no food additive products of concern were found.

Keywords: ステビア抽出物 stevia extract, ステビア末 powdered stevia, 酵素処理ステビア α -Glucosyltransferasetreated stevia, ステビオサイド stevioside, レバウディオサイドA rebaudioside A, 薄層クロマトグラフィー TLC, 高速液体クロマトグラフィー HPLC, 重金属 heavy metal

緒言

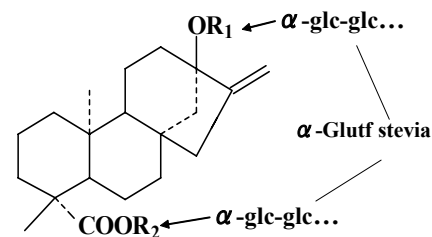
天然甘味料ステビアはステビア (*Stevia rebaudiana* BERTONI) の葉を起源とするもので既存添加物名簿¹⁾に記載されている。高い甘味度を有し低カロリーであることから、生活習慣病の原因ともなる肥満の回避を目的としてダイエット関連食品に添加されたり、糖尿病等の患者に砂糖の代替品として用いられることがある。ステビア製品にはステビア抽出物及びステビア末、酵素でグルコース及びフルクトースを糖転移 (α -1,4付加) している酵素処理ステビアがある。(Fig.1)

これらステビア製品は甘味度や甘味質を高めるなどの目的で多くの新開発製品が市場に出回っている²⁾が、未だ規格基準は定められていない³⁾。そのため、市販製品中の甘味成分の含有量を明確にすることや、有害物質の含有実態の把握等が早急に求められている。

そこで、ステビア製品の規格基準の作成を意図し、種類の確認及び甘味成分であるステビオール配糖体 (ステビオサイド、レバウディオサイドA、レバウディオサイドC及びズルコサイドA) をTLC及びHPLC法を用いて分析し、実態調査を行った。

また、原料由来や製造過程で混入するその他の成分を測定するため、日本食品添加物協会の自主規格 (以下自主規

格とする)⁴⁾試験の項目及び重金属の含有量調査を行うことにより、ステビア製品の品質の評価を行ったので併せて報告する。



	R1	R2
Stevioside	β -glc- β -glc β glc	β -glc
Rebaudioside A	β -glc- β -glc rham	β -glc
Rebaudioside C	β -glc- β -glc	β -glc
Dulcoside A	β -glc-rham	β -glc

Fig.1. Structures of Stevia Glycosides and α -Glucosyltransferasetreated Stevia
glc: glucopyranosyl rham: α -rhamnopyranosyl
 α -Glutf stevia: α -Glucosyltransferasetreated stevia

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 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, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

実験方法

1. 試料 1999年に市販のステビア製品でステビア抽出物の表示がある12製品, ステビア末の表示がある1製品及び酵素処理ステビアの表示がある1製品計10社14製品を用いた.

2. 試薬

1) 薄層板: 高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) シリカゲル (メルク社製)

2) 展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水 (15:12:3) 混液

全て試薬特級品を用いた.

3. 装置 高速液体クロマトグラフ: 日本分光工業(株)製 PU-1580型ポンプ, UV-1570型UV検出器, CO-1560型カラムオープン, AS-1550型オートサンプラー, データ処理JASCO BORWIN-NT.

4. 標準原液 和光純薬工業(株)製ステビオシド (ステビオサイド) 標準品 (純度99.7%) 及びレバウジオシド A (レバウディオサイド A) 標準品 (純度99.0%) それぞれ約50 mg をアセトニトリル/水 (80:20) 混液に溶解し, 正確に100 mL とし, 標準原液とした.

5. 薄層クロマトグラフィー (TLC) によるステビア製品の確認 試料0.5 g に水10 mLを加え超音波で溶解後, ただし, ステビア末についてはろ過を行い, 試験溶液とした. 薄層板の下端より10 mmのところに標準溶液 (500 µg/mL) 及び試験溶液を1 µL塗布した. 10 cm展開後風乾し10%硫酸を噴霧した後, 100 10分間加熱後自然光で標準と試料のRf値を比較するとともに試料のスポットパターンを観察した.

6. HPLCによるステビア製品中のステビオール配糖体の測定

1) 試料溶液の調製 ステビア抽出物は約50 mgを精密に量り, アセトニトリル/水 (80:20) 混液30 mLを加え超音波を用いて溶解し, 同溶液で正確に50 mLとした. ステビア末は約200 mgを酵素処理ステビアは約500 mgを精密に量り, それぞれ水15 mLを加えた. 酵素処理ステビアは超音波を用いて溶解した後, アセトニトリル/水 (80:20) 混液を沈殿が生じ

ないように徐々に加えて正確に50 mLとした. ステビア末は超音波で10分間抽出した後, アセトニトリル/水 (80:20) 混液で正確に50 mLとし, ろ紙でろ過し試料溶液を得た. 各々の試料溶液は0.45 µmのマイクロフィルターでろ過後試験溶液とした.

2) HPLC条件 HPLC条件はFig. 3に示した.

3) 検量線 ステビオサイド及びレバウディオサイド A の標準原液をアセトニトリル/水 (80:20) 混液で1 mLあたり50~500 µgとなるように希釈し, 0.45 µmのマイクロフィルターでろ過後HPLC用標準溶液とし, 検量線を作成した. なお, ズルコサイド A については自主規格⁴⁾に従いステビオサイド標準溶液を用いて検量線を作製し, レバウディオサイド C は, レバウディオサイド A 標準溶液を用いて検量線を作製した後, それと同様に測定した試験溶液の測定値より含有量を算出した.

7. 乾燥減量及び強熱残分 食品添加物公定書⁵⁾ (以下公定書とする) の方法に従った. 乾燥減量の条件は自主規格⁴⁾に従い1 g, 105 °C, 2時間で行った.

8. 重金属及びヒ素 装置, 試薬及び試験方法は安野らの方法⁶⁾に従った.

結果及び考察

1. TLCによるステビア製品の確認

方法は食品中食品添加物分析法⁷⁾に準じた. ただし, 薄層板には展開時間が短く分離精度の良い高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) を用いた. また, 溶媒はステビオサイド等のRf値が約0.5となるように, 文献⁷⁾の方法よりメタノール及び水の割合が多いクロロホルム/メタノール/水 (15:12:3) を用いた. 噴霧試薬は10%の硫酸溶液を用い, 100 °Cで10分間加熱させることとした. その結果はFig. 2に示した.

ステビア抽出物表示の12製品 (製品No. 1~11及び14) 中8製品 (製品No. 1~3, 5~6及び8~10) はステビオサイド, レバウディオサイド A の標準溶液と同じRf値に二つの明瞭なスポットが認められた. これらは, 文献⁷⁾と同様のクロマト

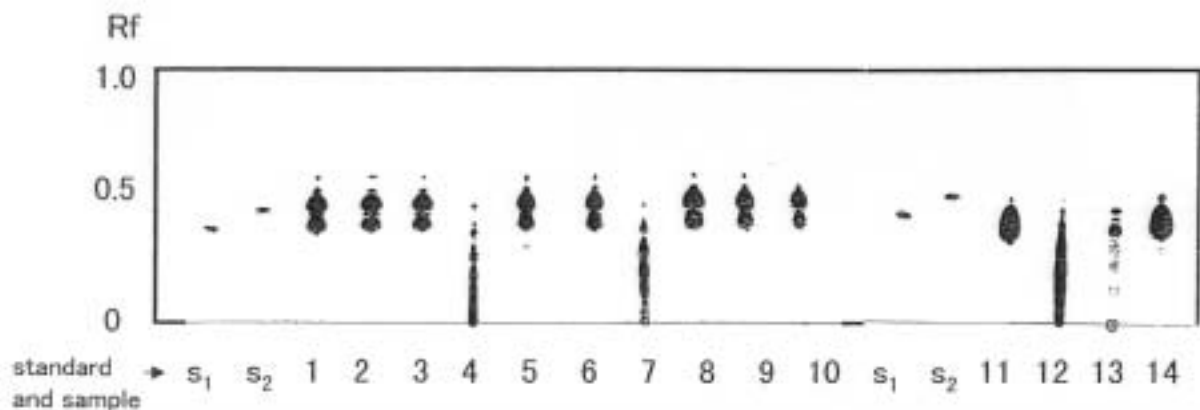


Fig. 2. Thin layer Chromatogram of Sweetening Stevia Products

TLC plate: HPTLC silica gel, Solvent: chloroform/methanol/water (15:12:3),

10% H₂SO₄ S₁: rebaudioside A, S₂: stevioside

グラムパターンを示し、表示通りステビア抽出物であると確認できた。他4製品の内No. 4及び7は原点から数点のスポットが見られNo. 12の酵素処理ステビア表示の製品と近似したパターンであった。No. 11及び14はレバウディオサイドAと同様のRf値に1つのスポットが認められた。

ステビア未表示のNo. 13はステビオサイド、レバウディオサイドAと同様のRf値にスポットが認められるが、他の成分のスポットもみられ精製度が悪いと考えられた。

以上の結果からステビア製品のクロマトグラムは4パターンあり、それぞれの種類で差がみられることが分かった。2. HPLCによるステビア製品中のステビオール配糖体の確認

食品中のステビア配糖体の測定に用いている⁸⁾アミノ基結合型カラムを用いて添加物製品の確認を行った。そのクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

ステビア抽出物表示のNo. 1~3, 5~6, 及び8~10は、ステビオサイド、レバウディオサイドAと同様の保持時間に2つの大きいピークが認められる他に微小のズルコサイドA及びレバウディオサイドCと考えられる^{4,8)}ピークが認められ、この4成分は良く分離し測定可能であった。No. 11及び14ではTLCと同様にレバウディオサイドAの1本のピークが観察され、レバウディオサイドA高含有の製品と考えられた。また、これら製品はTLCの結果と併せ、ステビア抽出物と判断した。

ステビア未表示の製品は保持時間が7分以降はステビア抽出物と同様であったが、6分までに多くのピークが出現した。これはステビア葉を粉碎しただけの¹⁾製法であるためと考えられた。しかし、定量する際に妨害ピークは認められなかった。

酵素処理ステビア表示の1製品(No. 12)及びTLCで同じパターンを示した2製品(No. 4及び7)は、すべてステビオサイド、レバウディオサイドAのピークの他にレバウディオサイドAより以降に多くの糖転移された配糖体ピークが認められた。さらに確認のため、これらの製品に自主規格⁹⁾に準じてグルコアミラーゼを作用させ、転移糖を加水分解した後のクロマトグラムを測定した。その結果レバウディオサイドA以降のピークは消え、ステビア抽出物と同様のクロマトグラムが得られた。従ってTLCの結果を併せ、ステビア抽出物表示のNo. 4, 7及び酵素処理ステビア表示のNo. 12の製品は酵素処理ステビアと確認した。

なお、酵素処理ステビアは転移糖がグルコースの製品とフルクトースの場合とあるが、今回の製品はグルコースの製品であった。

3. 製品中のステビオサイド、レバウディオサイドA、レバウディオサイドC及びズルコサイドAの含有量

市販のステビア製品中のステビオサイド、レバウディオサイドA、レバウディオサイドC及びズルコサイドAの含有量を測定した結果をTable 1に示した。

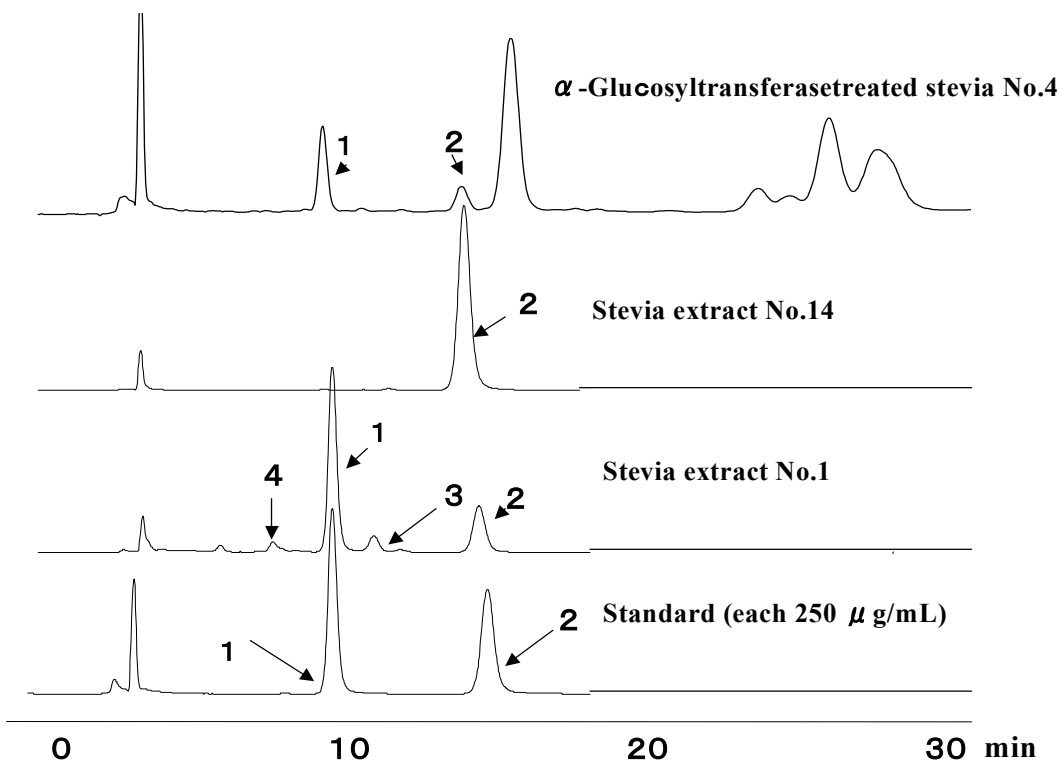


Fig.3. HPLC Chromatograms of Stevia Extract, Powdered Stevia and α -Glucosyltransferasetreated Stevia
HPLC conditions : column, Asahipak NH 2 P-50 (4.6mm i.d. \times 250mm); mobile phase, acetonitrile/water (80:20);
flow rate, 0.8ml/min; column temp., 40 ; injection, 10 μ L; detection, 210nm.,

1: stevioside 2: rebaudioside A 3: rebaudioside C 4: dulcoside A

Table 1. Contents of Stevia Glycosides in Stevia Extract, Powdered Stevia and α -Glucosyltransferase treated Stevia Products

Product			Stevia Glycoside (%)				
No.	Declared	Found	Stevioside	Rebaudioside A	Rebaudioside C	Dulcoside A	Total
1	Stevia extract	Stevia extract	48.8	27.6	0.7	4.1	81.2
2	Stevia extract	Stevia extract	51.1	27.3	13.8	3.2	95.4
3	Stevia extract	Stevia extract	54.2	28.8	11.3	2.5	96.8
4	Stevia extract	α -Glucf stevia *	1.1	1.7	ND	ND	2.8
5	Stevia extract	Stevia extract	54.7	23.7	5.0	3.9	87.3
6	Stevia extract	Stevia extract	49.2	26.5	6.8	4.4	86.7
7	Stevia extract	α -Glucf stevia *	1.2	2.0	ND	ND	3.2
8	Stevia extract	Stevia extract	52.7	24.8	7.5	3.2	88.2
9	Stevia extract	Stevia extract	55.2	23.5	5.2	3.3	87.2
10	Stevia extract	Stevia extract	56.1	24.1	6.7	3.7	90.6
11	Stevia extract	Stevia extract	ND	93.4	ND	ND	93.4
12	α -Glucf stevia *	α -Glucf stevia *	0.5	4.4	ND	ND	4.9
13	Powdered stevia	Powdered stevia	3.3	8.5	1.4	0.4	13.6
14	Stevia extract	Stevia extract	ND	96.8	ND	ND	96.8

* : see Fig.1 ND<0.1%

ステビア抽出物8製品 (No. 1~3, 5~6, 及び8~10)では, ステビオサイドが48.8~56.1%, レバウディオサイドAが23.5~28.8%, レバウディオサイドCは0.7~13.8%, ズルコサイドAは2.5~4.4%であった. また, 4成分の総含有量は全て80%以上と精製度の高い製品であった. 1980年の報告では⁹⁾ステビオサイド及びレバウディオサイドAの合計含有量は0.65~8.82%であり, 甘味成分が高含有の製品が市販されるようになって来ていると考えられた. 他の2製品 (No. 11, 14)はレバウディオサイドAのみが90%以上検出された. これは他の配糖体に比べ甘味度が高いレバウディオサイドAを高濃度に含有する製品として製造されていると考えられ, ステビア抽出物の中でも異なった成分組成のものがあることがわかった.

ステビア末1製品 (No. 13)はそれぞれの配糖体の含有量は低く, 総含有量は13.6%であった.

酵素処理ステビアの3製品 (No. 4, 7及び12)は, 転移が未反応のステビオサイド及びレバウディオサイドA含有量を示した. すべての製品で2成分の総含有量は5%以下であった. 今回の方法においては酵素処理ステビア中の配糖体の定量は, 糖が転移している配糖体についての含有量が測定できないことが明らかとなった. 現在, 転移により付加された糖の含有量及び配糖体総含有量測定方法について検討中である.

今回, ステビア製品の種類にはステビア抽出物, ステビア末及び酵素処理ステビアがあることから, 定量はTLC及びHPLCを用いて種類の確認を行った後に行うこととした. これは, 種類を明確にして各種類ごとの品質評価を行う必要があるためである.

4. 乾燥減量及び強熱残分

製品中の水分及び揮発性成分の含有量を調べるため乾燥減量を, 主に無機成分を調べるため強熱残分を測定しその

Table 2. Loss on Drying and Residue on Ignition of Stevia Products

Kind of Product	Loss on Drying	Residue on Ignition
	(%)	(%)
Stevia extract	0.9-5.4	ND-0.3
Powdered stevia	7.8	12.7
α -Glucf stevia *	3.3-6.6	ND-0.1

* : see Fig.1 ND<0.1%

結果をTable 2に示した.

乾燥減量はステビア抽出物が0.9~5.4%, ステビア末は7.8%, 酵素処理ステビアが3.3~6.6%であった. 強熱残分はステビア抽出物及び酵素処理ステビアが0.3%以下に対し, ステビア末は12.7%と高く, 原料由来の無機成分が残存していることが考えられた. なお, 自主規格⁴⁾では, ステビア抽出物及び酵素処理ステビアの乾燥減量は6.0%以下, 末が12.0%以下と規定されている. しかし, 酵素処理ステビアの1製品が自主規格⁴⁾に適合しなかった. 強熱残分は全ての製品で規定値(ステビア抽出物及び酵素処理ステビアは1.0%以下, ステビア末は20.0%以下)の範囲内であった.

5. 重金属及びヒ素

有害金属である鉛(Pb), カドミウム(Cd), クロム(Cr), 水銀(Hg)及びヒ素(As)の含有量の測定結果をTable 3に示した.

ステビア抽出物1製品及びステビア末を除いた12製品中のPbは0.5 μ g/g以下, Cdは0.1 μ g/g以下, Crは5 μ g/g以下, Hgは0.01 μ g/g以下, Asは0.1 μ g/g以下であった. ステビア抽出物1製品はHgが0.03 μ g/g検出されたが, 他の結果については上記同様であった. ステビア末ではPbが0.7 μ g/g, Cdが0.6 μ g/g, Crが12 μ g/g, Hgが0.03 μ g/g検出された. これは, 抽出物より精製度が低いいため, 原料の植物から由

来した金属が残存していると考えられた。また、公定書⁵⁾に従った重金属試験の結果は全て20 µg/g以下であった。これらの結果は第57回FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会(JECFA)においてその他の甘味料中の鉛の限度が1 mg/Kg(Cd, Hg, As基準値なし)と提案されている¹⁰⁾この規準値や他の食品添加物の規格値⁶⁾と比較しても特に高濃度の金属は検出されなかった。

Table 3. Contents of Heavy Metal Residues in Stevia Products

Kind of Product	Heavy Metal (µg/g)				
	Pb	Cd	Cr	Ag	As
Stevia extract	<0.5	<0.1	<5	<0.01 (0.03/1) ¹⁾	<0.1
Powdered stevia	0.7	0.6	12	0.03	0.6
α-Glutf stevia ²⁾	<0.5	<0.1	<5	<0.01	<0.1

¹⁾: 1 sample in 10 samples was detected 0.03 µg/g

²⁾: see Fig.1

結 論

1. 天然甘味料のステビア製品についてステビア抽出物,ステビア末及び酵素処理ステビアの確認をTLC及びHPLCにより行った。3種の確認はTLCのスポットパターン, HPLCによる配糖体のクロマトグラムパターンで判明できた。ステビア抽出物表示の2製品は酵素処理ステビアであることが分かった。表示は今後規格が設定された際には重要な点であり,正しい表示に改める必要があると考える。

2. 製品中のステビオール配糖体の含有量をHPLCにより測定したところ,ステビア抽出物10製品中のステビオサイド,レバウディオサイドA,ズルコサイドA及びレバウディオサイドCの総含有量はすべて80%以上であった。ただし,その中の2製品はレバウディオサイドAのみを90%以上含有

する製品であった。ステビア末1製品中の配糖体総含有量は13.6%で甘味成分は少なく精製度が低いと考えられた。酵素処理ステビア3製品は糖転移されていない未反応の配糖体の測定となり,5%以下であった。

3. 甘味成分含有量及び有害物残留結果を併せてステビア製品の品質を評価する時,酵素処理ステビアの表示が異なっていた点,ステビア末において原料由来の金属が若干検出されたこと以外は添加物製品として特に衛生学的に問題にすべき製品はなかった。

謝辞 本調査を実施するにあたり,試料収集にご協力いただいた東京都食品指導センターに深謝致します。

文 献

- 1) 厚生労働省生活衛生局長通知,“既存添加物名簿収載品リスト”平成8年5月23日,衛化第56号(1996)
- 2) 食品化学新聞社編:月刊フードケミカル,12,53-66,2001,食品化学新聞社,東京
- 3) 日本食品添加物協会編:第7版食品添加物公定書,131-489,1999,日本食品添加物協会,東京。
- 4) 日本食品添加物協会編:第2版化学的合成品以外の食品添加物自主規格,119-124,1993。
- 5) 日本食品添加物協会編:第7版食品添加物公定書,11-20,1999,日本食品添加物協会,東京。
- 6) 安野哲子,萩原輝彦,斎藤和夫:東京都衛研年報,51,193-196,2000。
- 7) 日本食品衛生協会編:第二版食品中の食品添加物分析法2000,349-350,2000,日本食品衛生協会,東京。
- 8) Kitada, Y., Sasaki, M., Yamazoe, Y.: *J. chromatogr.*, 474, 447-451, 1989。
- 9) 中嶋巖,広門雅子,中島和雄他:東京都衛研年報,31-1,180-184,1980
- 10) 日本食品添加物協会編: *JAFAN*, 21, 164, (2001)。