

韓国焼酎に含まれるステビア甘味料の分析

水田 完*, 梅田 寛*, 原 幸美*, 村上 孝之*, 山光廣*, 印出 進*

Analysis of Stevia Sweetener in Korean Shochu

Yutaka MIZUTA*, Hiroshi UMEDA*, Yukimi HARA*, Takayuki MURAKAMI*, Mitsuhiro YAMAZAKI*
and Susumu INDE*

*Tokyo Customs Laboratory

2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

Imported Shochu often contains some additives that are not approved for Shochu under the Japanese Liquor Tax Law, such as Stevia sweetener and aspartame. We therefore need to accurately determine whether such additives are present or not.

This report examined methods for analyzing especially Stevia sweetener that is added to many brands of imported Shochu. Thin layer chromatography, HPLC and GC/MS were used for the analysis. In a confirmation test using GC/MS, since information concerning the structure of Stevia components could be obtained, it was found that more highly accurate confirmation could be made. The Stevioside contents of imported Korean Shochu were determined using HPLC. There was no clear difference among the contents of respective samples. The mean values of Stevioside and Rebaudioside A contents of imported Korean Shochu were respectively approximately 0.001% and 0.0007%.

1. 緒 言

輸入される焼酎は韓国からのものが圧倒的に多く、その輸入量は年々増え続けている。日本の酒税法では、焼酎の添加物として、砂糖、酒石酸、くえん酸及び一部の合成着色料のみが認められており、これ以外の添加物が加えられたものは微量であっても、酒税法上、焼酎甲類ではなくスピリッツ類として分類され、輸入の際には高税率の酒税が課されている。したがって、添加物の確認は、税関分析において重要な分析の一つである。韓国国内で市販されている焼酎にはステビア甘味料、アスパルテム等の添加物が使われているものがあるが、これらは日本の酒税法では焼酎として認められていない。そのため、焼酎に含まれている微量の添加物の有無を確認する必要がある。本報では、その中でも特に多くの銘柄の焼酎に添加されているステビア甘味料について、ステビオサイドの確認試験法の他、含有量を求める方法として、ステビオサイド等の個々の配糖体から求める方法及び配糖体を酸で加水分解して得られるイソステビオールから求める方法について検討を行った。

2. 実 験

2. 1 試料及び標準試薬

韓国焼酎（試料 1～5、国内で市販されているもの）
ステビオサイド標準品（和光純薬製）
レバウディオサイド A 標準品（和光純薬製）
イソステビオール標準品（和光純薬製）

2. 2 薄層クロマトグラフィーによる確認試験

2. 2. 1 試薬及び器具

展開溶媒：クロロホルム：メタノール：水＝30：20：4（V/V）
発色剤：ジフェニルアミン：アニリン：アセトン：80%リン酸＝2g：2ml：100ml：15ml
薄層板：シリカゲル 60F254 10×20cm, 0.25mm 厚（MERCK 製）

2. 2. 2 実験方法

試料 100ml を濃縮乾固し、少量の水に溶解したものを薄層板上にスポットし、展開溶媒で展開させた。薄層板を乾燥させ、糖の発色液を噴霧した後、105℃の恒温乾燥器中で 10 分間加熱して発色させた¹⁾。1%程度の濃度に調製したステビオサイド

*東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海 2-56

標準液についても同様の操作を行い、試料の R_f 値と比較し、定性を行った。

2. 3 ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) による確認試験

2. 3. 1 試薬、装置及び測定条件

誘導体化試薬：トリメチルシリルジアゾメタン (10V/V% in Hexane, GL サイエンス製)

装置：HP6980 (GC) /HP5973 (MS) (Agilent 製)

カラム：HP-5MS (0.25 mm ID × 30 m L, 膜厚 0.25 μ m) (Agilent 製)

オープン温度：50°C (1min) → (20°C/min) → 320°C (5min)

注入口温度：280°C

2. 3. 2 実験方法

試料 100ml を採取し、秤量後、ロータリーエバポレーターで濃縮して得られた蒸発残渣に 20%硫酸 10ml を加え、還流冷却器をつけて沸騰浴上で 2 時間加熱した。冷却後、ジエチルエーテルを加えてエーテル層を分液抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、エーテルを留去した。得られた蒸発残渣にベンゼン 7 ml, メタノール 2 ml を加えて溶解させた後、トリメチルシリルジアゾメタン溶液 1 ml を加えて室温で 30 分放置したものを検液とし、GC/MS で分析を行った。

2. 4 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量分析

ステビア抽出物の定量分析法としては、①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) を個々に定量する方法、②配糖体を酸加水分解して得られるイソステビオールを総ステビオサイドとして定量する方法の 2 種類がある。今回、この 2 種類の方法をそれぞれ検証した。

2. 4. 1 ステビオール配糖体の分析

(1) 試薬、装置及び測定条件

合成吸着樹脂：ダイアイオン HP-20 (三菱化学製)

装置：HP-1100, HP-1090 (Agilent 製)

カラム：Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6mmID × 250mmL, 昭和電工製)

移動相：アセトニトリル：水=75：25 (V/V)

流量：1.0ml/min

カラム温度：40°C

検出器：DAD (210nm)

注入量：20 μ l

(2) 前処理 (吸着樹脂法)

試料 100ml を採取し、秤量後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、得られた蒸発残渣に純水 50ml を加えて溶解させる。この溶液を合成吸着樹脂 10ml を用いて作ったカラムに注ぎ、純水 50ml を通液して洗浄した後、85V/V%エタノール溶液 50ml を通液し、吸着成分を溶出させる。この液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固する。以後、この前処理操作を吸着樹脂法と呼ぶ。

(3) 定量分析

上記 2.4.1 (2) により得られた試料をアセトニトリル-水

混液 (50：50) で溶解し、20ml 容メスフラスコに定容したもの検液とし、高速液体クロマトグラフにより分析した。測定は、各試料につき 3 回ずつ行い、その平均値を採用した。

2. 4. 2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による総ステビオサイド (イソステビオール) の分析

(1) 装置及び測定条件

装置：HP-1100, HP-1090 (Agilent 製)

カラム：Hypersil ODS (4.0mmID × 125mmL) (Agilent 製)

移動相：アセトニトリル：0.1%リン酸=63：37 (V/V)

流量：0.8ml/min

カラム温度：40°C

検出器：DAD (210nm)

注入量：20 μ l

(2) 実験方法

吸着樹脂法 (2.4.1 (2)) により得られた試料に 20%硫酸 10ml を加え、還流冷却器をつけて沸騰浴上で 2 時間加熱した。流水中で冷却後、内容物を分液漏斗に移し、フラスコは水 10ml で洗浄して分液漏斗に加えた。フラスコはさらにエーテル 30ml ずつで 3 回洗浄し、洗液を分液漏斗に合わせ、よく振り混ぜた後、静置した。水層を除き、エーテル層を水 20ml ずつで 2 回洗浄した後、水層を除いた。ついで、エーテル層を別のフラスコに移し、分液漏斗はエーテル 10ml ずつで 2 回洗浄し、洗液はフラスコに合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、エーテルを減圧下留去した。得られた蒸発残渣をメタノールで溶解し、10ml 容メスフラスコに定容したものを検液とした。検液を高速液体クロマトグラフ装置により、2.4.2 (1) の条件で測定した。測定は各試料につき 3 回ずつ行い、その平均値を定量値として採用した。

3. 結果及び考察

3. 1 薄層クロマトグラフィーによる確認試験

ステビオサイドは、 R_f 値が約 0.6 の位置に青色のスポットが認められ、韓国焼酎 (試料 1 ~ 4) はいずれもステビオサイドを含有することが確認できた。

3. 2 ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) による確認試験

ステビア甘味料は、ステビオールをアグリコン (非糖質部分) とする各種配糖体の混合物であり、ステビオサイド、レバウディオサイド A を主成分とする (Fig. 1)。これらの配糖体は分子量が大きくイオン化が困難であるが、20%硫酸で加水分解し、アグリコンのステビオールを誘導体 (メチル) 化することにより GC/MS による分析が可能であった²⁾。なお、ステビオール配糖体は、強酸で加水分解すると転位反応を起こし、イソステビオールを生成する (Fig. 2)^{3), 4)}。

韓国焼酎 (試料 1) を GC/MS で分析したところ、イソステビオールメチルエステルの分子イオンピーク (m/z 332) が確認できた (Fig. 3)。この結果、試料はステビオール配糖体を含有することが確認できた。

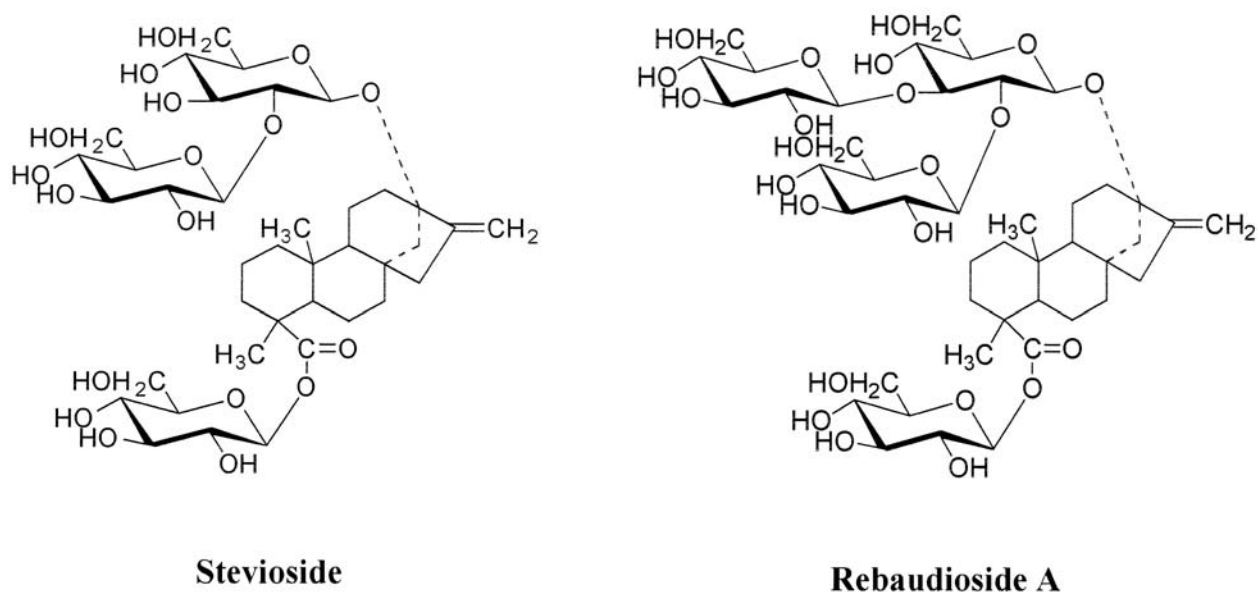


Fig. 1 Chemical structures of stevioside and rebaudioside A.

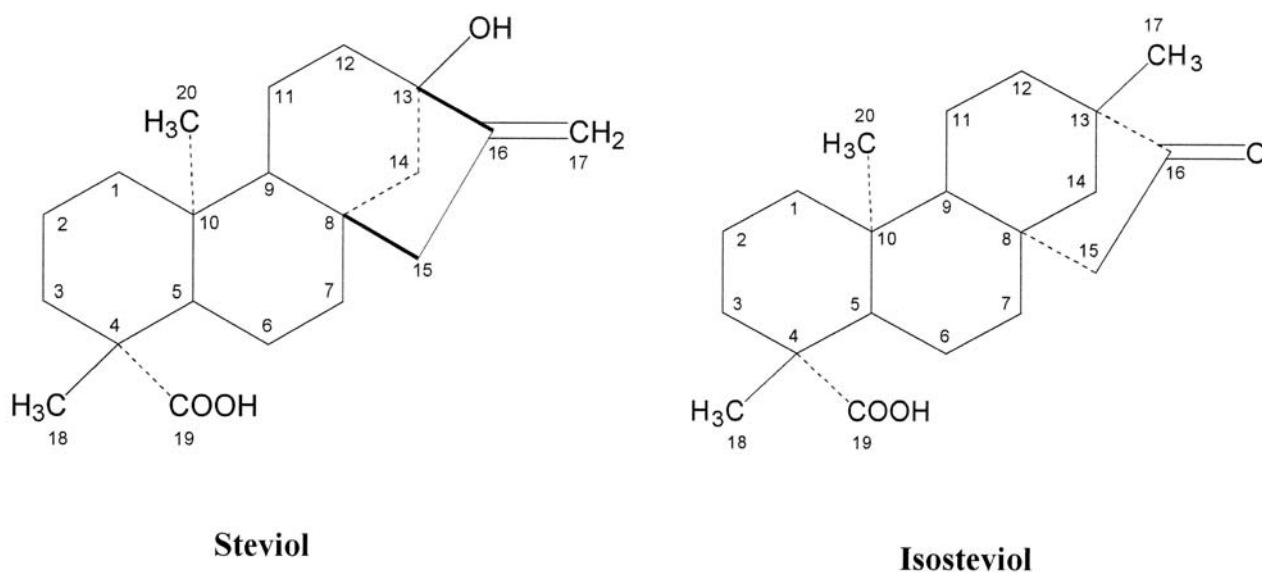


Fig. 2 Chemical structure of steviol and isosteviol.

3. 3 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による定量分析

3. 3. 1 個々の配糖体（ステビオサイド、レバウディオサイド A）の分析

ステビオサイド及びレバウディオサイド A の検量線は、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ ～ $5.0 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で直線性を示した ($r^2=0.999$)。ステビオサイドの検出限界は $0.10 \mu\text{g/ml}$ であり、レバウディオサイド A の検出限界は $0.24 \mu\text{g/ml}$ であった。同様に、定量限界はそれぞれ $0.33 \mu\text{g/ml}$, $0.81 \mu\text{g/ml}$ であった。なお、検出限界及び

定量限界は、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ ステビオサイド及びレバウディオサイド A 標準溶液測定時の標準偏差の 3 倍、10 倍として算出した。

韓国焼酎（試料 1）の HPLC による分析例を Fig. 4 に示す。得られた 6 本のピークの UV 吸収スペクトルはほぼ等しいため、ステビオサイド、レバウディオサイド A 以外にも配糖体を含有している可能性が示唆される。

試料 1 ～ 4 のステビオサイド及びレバウディオサイド A の定量結果を Table. 1 に示す。いずれも 3 回の測定の平均値であり、

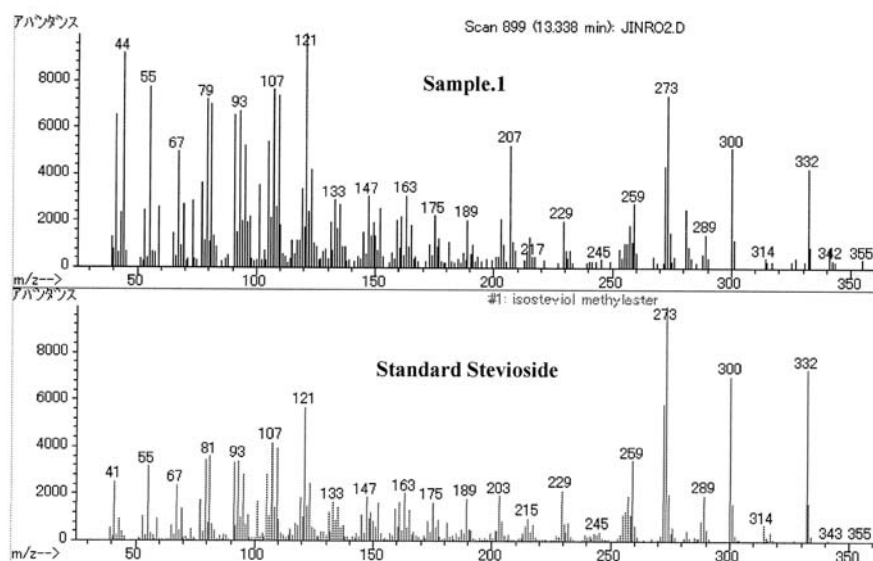


Fig. 3 Mass spectra of respectively hydrolyzed and methyl esterified sample No.1 and standard stevioside.

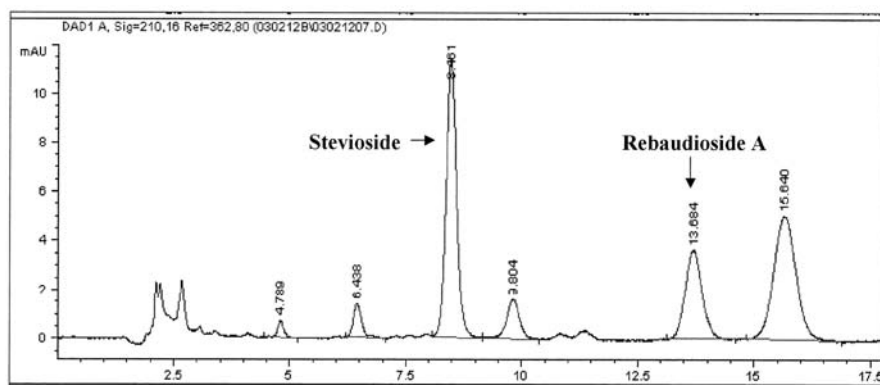


Fig. 4 Liquid chromatogram of sample No.1.

Table 1 Quantitative results of Stevioside and Rebaudioside A.

	Stevioside %	Rebaudioside A %
Sample.1	0.0012	0.0008
Sample.2	0.0012	0.0007
Sample.3	0.0010	0.0008
Sample.4	0.0011	0.0006

Table 2 Recovery test of Stevioside and Rebaudioside A.

Sample	Recovery rate %	Relative standard deviation %, n=3
Stevioside	98.1	2.53
Rebaudioside A	97.8	1.93

100%に近い値を示し、変動係数の値も概ね良好であった。

ステビオサイド及びレバウディオサイドAの含有量は、それぞれ約0.001%、0.0007%と極微量であった。

添加回収試験は、ステビア甘味料を含有しない韓国焼酎（試料5）をブランク試料とした。これに標準のステビオサイド及びレバウディオサイドAを一定量添加し、添加回収試験用の試料とした。吸着樹脂法により前処理を行った後、定量分析を行い、回収率を算出した。回収率をTable.2に示す。回収率は

3. 3. 2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による総ステビオサイド (イソステビオール) の分析

試料加水分解物のクロマトグラムの一例をFig.5に示す。試料1～4についてイソステビオールの分析を行い、これを総ステビオサイドとして定量した。分析結果をTable.3に示す。4種類の試料はいずれもイソステビオールを約0.003%含有し、この数値を総ステビオサイドに換算したところ（換算係数：

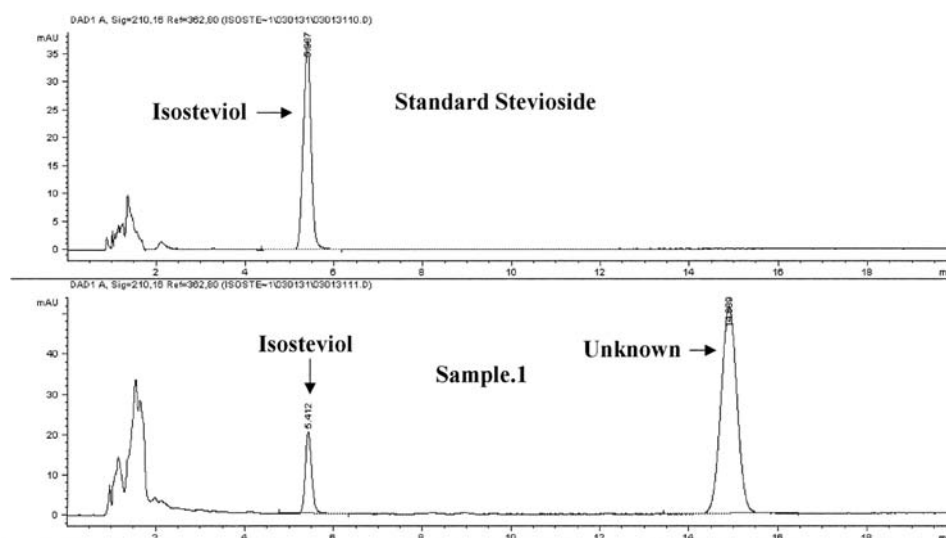


Fig. 5 Liquid chromatograms of sample No.1 and standard stevioside after hydrolysis.

Table 3 Quantitative results of Isosteviol.

	Isosteviol %	Total Stevioside %
Sample.1	0.0028	0.0071
Sample.2	0.0028	0.0071
Sample.3	0.0023	0.0059
Sample.4	0.0029	0.0073

804.88/318.46=2.5274), 約 0.007%であった。

回収率は、ステビオサイド標準品を酸で加水分解し、HPLCで定量することにより算出した。加水分解用の酸として、20%硫酸及び2.5N-TFAをそれぞれ用いた。回収率の結果をTable 4に示す。20%硫酸を用いた方が良い回収率を示し、約97%であった。また、変動係数の値も良好であった。

4. 要 約

韓国焼酎に含まれるステビア甘味料の分析を薄層クロマトグラフィー、GC/MS、HPLCを用いて行った。GC/MSにより、クロマトグラフィーによる定性では不十分であった化合物の構造に関する情報が得られ、より精度の高い確認試験が可能となっ

Table 4 Recovery test of Isosteviol

Sample	Recovery rate %	Relative standard deviation %, n=3
20%-H ₂ SO ₄	97.0	1.04
2.5N-TFA	93.8	1.58

た。HPLCによるステビオサイドの検出限界及び定量限界は、それぞれ0.10 µg/ml, 0.33 µg/ml, レバウディオサイドAの検出限界及び定量限界は、それぞれ0.24 µg/ml, 0.81 µg/mlであった。定量分析は、HPLCにより、①ステビオール配糖体を個々に定量する方法、②ステビオール配糖体を加水分解して得られるイソステビオールを総ステビオサイドとして定量する方法の2種類の方法を用いた。市販の韓国焼酎中のステビオサイド及びレバウディオサイドA含有量は約0.001%, 0.0007%であり、総ステビオサイド含有量は約0.007%であった。前処理に吸着樹脂を用いることにより、夾雑物の多い試料でも安定した定量値を得ることが可能となった。今回報告した分析方法は、韓国焼酎以外にもステビア甘味料を含有する食品に適用することが可能である。

文 献

- 1) 山光廣, 佐藤宗衛: 関税中央分析所報, 27, 147 (1987).
- 2) 日本食品添加物協会編: 第二版 化学的合成品以外の食品添加物 自主規格, P. 119.
- 3) 岩村淳一, 木下了彦, 平尾子之吉: 農化, 54, 195 (1980).
- 4) 杉沢博, 笠井輝代, 鈴木博雄: 農化, 51, 175 (1977).