

現在まで次のような結果を得た。表 1 にその結果を示す。

表 1 一般成分分析結果

タンク番号 (仕込日)	経過 日数	備 考	T.N.	NaCl	pH	エキス	R- OH	DS
123(2/2)	147	35日後 S 酵母50ℓ pH 5.6	1.76	17.2	5.09	21.0	1.73	4.90
124(2/3)	146	29日後 S 酵母30ℓ pH 5.6	1.76	17.3	5.16	20.9	1.68	4.20
109(2/9)	140	35日後 S 酵母65ℓ pH 5.59	1.75	17.3	5.08	21.4	1.78	5.56
110(2/10)	139	57日後 S 酵母40ℓ pH 5.49	1.74	17.4	5.01	21.7	1.74	5.25
113(2/18)	131	47日後 S 酵母20ℓ pH 5.49	1.71	17.3	4.91	22.9	0.84	6.89
114(2/24)	125	無添加	1.62	17.7	4.80	21.9	0.54	7.28
115(3/2)	119	仕込直後 S 酵母20ℓ	1.67	17.3	5.17	21.0	1.37	6.05
116(3/3)	118	19日後 T 酵母35ℓ, 29日後 S 酵母30ℓ pH 5.44	1.65	17.8	5.17	19.7	1.48	4.25
117(3/4)	117	33日後 S 酵母20ℓ pH 5.45	1.67	17.5	5.10	21.8	1.13	5.80
118(3/8)	113	31日後 S 酵母30ℓ pH 5.49	1.65	17.8	5.17	20.8	1.40	4.56
119(3/9)	112	28日後 S 酵母20ℓ pH 5.45	1.67	17.5	5.08	21.7	1.09	5.30
120(3/10)	111	12日後 T 酵母35ℓ, 22日後 S 酵母30ℓ pH 5.50	1.68	17.9	5.14	20.2	1.57	3.80
122(3/15)	106	無添加	1.57	17.7	4.88	21.3	0.54	7.66

T N, NaCl, エキスに関しては各区間に差異はほとんど認められなかったが、酵母添加区と無添加区ではアルコール生産量、pHおよび残存糖量に顕著な差異が認められ、又、外観的にも発酵状態に差が認められた。

官能的には、無添加区では生きさが幾分残っ

ているのに対し、酵母添加区においては、香りが高く濃じゅん味が感じられるようであった。しかし Sacch-酵母添加区と Torulopsis 酵母添加区での差異は認められなかった。今後、各区间での添加時期と添加量の差異を更に顕著にしたうえで、本実験を検討していく予定である。

3.4. Stevioside の定量

南園博幸, 東 邦雄

はじめに

Steviaは菊科の灌木で葉および茎には Steviosideと呼ばれる配糖体を含んでいる。Steviaからの Stevioside の単離については溶媒抽出¹⁾、イオン交換樹脂による分離精製法²⁾などがある。Steviosideの定量方法については、薄層クロマトグラフィーからスポットの面積を測るもの^{4,5,6)}、薄層自動検出計によるもの⁷⁾、酸または酵素で加水分解してガスクロマトグラフィーを行うもの⁷⁾、カルプライス反応を利用するものなど、近年その報告も多い。

今回の実験では、Steviaの水溶液を希硫酸にて加水分解し、エーテル抽出してのちメチル化してガスクロマトグラフィーを行った。

実験方法

1. Steviaの単離

Steviaの乾燥葉 100 g をメタノール 500 ml を用いて沸騰温度にて抽出する。抽出液は減圧濃縮して 100~150ml にし、ろ過して一夜放置すれば粗 Stevioside を得る。結晶を沸騰メタノー

ル 300 ml に溶かし, n-ヘキサン 50 ml を加えて再結晶する。収量 2.3 g, m.p 196~197 °C

窒素流量: 100 cm³/min

注入量: 1~2 μl

保持時間: ビレン 3分40秒

methyl-isosteviol 5分50秒

2. Steviosideの加水分解, メチル化

Stevioside 1~10 mgを含む水溶液 10 ml に10%硫酸 10 ml を加え, 水浴中に1時間置く。エーテル 30 ml で3回抽出し, 抽出液に無水硫酸ナトリウム 2 g を加えて脱水した後, 蒸発乾固し, ジアゾメタンにてメチル化する。

5. Stevia水溶液調製

乾燥 Stevia をさらに 105 °C, 1時間乾燥し, 1~2 g を精秤して, 水に浸せきする。全量 100 ml にして, ろ液を試験液とする。

3. 内部標準溶液

メタノールから再結晶したビレン 100 mg をクロロホルムに溶して 200 ml にする。この 1 ml を内部標準として加える。

4. ガスクロマトグラフィー

装置: 柳本 G 800

カラム: ステンレス 3 mm φ × 1 m

充填剤: Silicone OV-17 (1.5%) Shimalite W

カラム温度: 210 °C

注入口温度: 260 °C

水素流量: 50 cm³/min

結果と考察

Steviosideの加水分解

濃度 5 mg/10 ml の Stevioside 水溶液を用いて硫酸分解条件について検討するため, 分解時間 1~5 時間, 硫酸濃度を 5~25% に変えて, methyl-isosteviol とビレンのピーク高比を求め表 1 の結果を得た。分解時間および硫酸濃度の影響についての分散分析表は表 2 のとおりである。Fo が非常に小さいので $F_o' \leq 1/F_o$ を計算すればいずれも $F_o' < F_{\phi}^{\phi E} (0.01)$ となり, ピーク高比には有為の差はないことがわかる。すなわち, Stevioside は希硫酸で容易に分解されと考えられるため, 加水分解は 5% 硫酸, 1 時間とした。

表 1 Steviosideの加水分解

(Stevioside 5 mg/10 ml, 数値はピーク高比)

硫酸% \ 分解時間 (hr)	1	2	3	5
5	1.10	1.02	1.09	1.07
10	0.98	1.07	1.10	1.04
15	1.13	1.05	1.05	1.00
20	1.11	1.10	1.03	1.00
25	1.08	1.03	1.06	1.14

表 2 分散分析表

	S	ϕ	V	Fo	Fo'	$F_{\phi}^{\phi E} (0.01)$
分解時間	0.274	3	0.091	0.31	3.17	27.1
硫酸濃度	0.215	4	0.053	0.18	5.45	14.4
E	3.469	12	0.289			

検量線

Steviaより単離したSteviosideを用いて、 $1 \sim 20 \text{ mg} / 10 \text{ ml}$ について、ピーク高比を求め検量線を作った。この範囲で検量線は直線を示した。

Stevia中のStevioside含量

乾燥Steviaを乳鉢ですりつぶし、標準ぶるいを用いて、

A 2000μ 以上

B $350 \sim 2000 \mu$

C 350μ 以上

に分けた。Aは茎、Bは葉脈および葉柄、Cは大部分が葉肉であった。各部のSteviosideの量を測定したところ、表4に示したようにC(葉肉)に多く含まれていることがわかった。また市販のSteviosideを含む甘味剤についても分析したところ、5.0%であった。

表3 検量線

Stevioside $\text{mg} / 10 \text{ ml}$	ピーク高比
1	0.18
2	0.45
5	1.06
10	2.09
15	3.20
20	4.08

表4 分析結果

サンプル名	含有量(%)
A	3.2
B	4.0
C	12.5
市販甘味剤	5.0

おわりに

Steviosideのガスクロマトグラフィーによる定量分析について検討した。

Stevia中にはSteviosideの他にRebaudiosideと呼ばれる同族体があり、硫酸分解法ではSteviosideと同時に検出される。このため、今回の実験では厳密な定量分析としては不十分な点もあり、簡易分析として利用する予定である。また今後必要に応じて、他の分析法および添加試料の定量法についても検討したい。

なお、実験にあたって資料提供など便宜をはかっていただいた農業試験場河野利治氏、および守田化学(株)に深く感謝いたします。

文 献

- 1) M. Bridel, R. Lavieille, Bull. soc. chim. boil 13 636 (1931)
- 2) Harry B. Wood, R. Allerton, Harry W. Diehl, Hewitt G. Fletcher, J. Org. Chem., 20 781 (1955)
- 3) Erik Vis, Hewitt G. Fletcher, J. Am. Chem. Soc. 78 4709 (1956)
- 4) 三橋 博, 農林水産業特別試験研究費補助金による研究報告書(新甘味料ステビオサイドの抽出) (1975)
- 5) 三橋 博, 上野純子, 住田哲也, 薬学雑誌 95(1), 127 (1975)
- 6) 三橋 博, 上野純子, 住田哲也, 薬学雑誌 95(12), 1501 (1975)
- 7) 杉沢 博, 笠井輝代, 鈴木博雄, 農化 51(3), 175 (1977)
- 8) 明石春雄, 食品工業 12(下), 20, (1977)