

ステビオール配糖体の JECFA 分析法のクロマトグラフィー分離の向上

Jinchuan Yang, Paul D. Rainville, Stephanie Harden

Waters Corporation

要約

ステビオール配糖体は、天然のノンカロリー甘味料として、食品および飲料にしばしば使用されています。この化合物群は、ステビオールアグリコン構造が同じですが、グリコシド単位の数と種類が異なります（例：グルコース、ラムノース、キシロースなど）。FAO/WHO JECFA モノグラフ 26（2021）には、ステビオール配糖体に関する最新の国際標準が含まれており、主要なおよび微量のステビオール配糖体の測定に逆相液体クロマトグラフィー（RPLC）が推奨されています。ただし、これらの JECFA の推奨条件で得られるステビオール配糖体のクロマトグラフィー分離は不十分です（クリティカルペアの分離度が約 1.0）。この実験では、JECFA RPLC 分析法を改善することにより、Arc™ Premier システムで粒子径 2.5 μm のカラムを使用して分離度 1.5 以上、粒子径 2 μm 以下のカラムを使用してさらに高い分離度 2.0 を達成できました。分析法の最適化は、ICH Q14 Analytical Procedure Development（『ICH Q14 分析法開発』）ガイドラインの要素に従って行いました。改善された分析法は、正確で高感度かつ信頼性が高く頑健であることが示されており、市販のステビア抽出物の分析においてより効率的な分離が得られます。

アプリケーションのメリット

- ICH Q14 Analytical Procedure Development（『ICH Q14 分析法開発』）ガイドラインで推奨されている分析法最適化の強化アプローチに従って、ステビオール配糖体の LC-UV 分離を最適化
- クリティカルペアについてより高い分離度が得られ、複雑なステビア抽出物の分析に有益

はじめに

ステビオール配糖体 (SG) は、*Stevia rebaudiana* Bertoni (ステビア) という植物の葉の成分であり、ショ糖の 100 ~ 300 倍の甘味を有します。食品および飲料のノンカロリー甘味料としてしばしば使用されています。これまで 40 種類を超える SG が同定されています¹。最も含有量が多いのは、レバウジオシド A (Reb A) とステビオシド (SV) です。しかし、一部の微量の SG がますます簡単に入手できるようになり、これらは甘味がより強く苦い後味が少ないため、需要が増加しています^{1,2}。

液体クロマトグラフィー (LC) は SG の分析で使用される主な手法であり、逆相 (RP) C₁₈ カラムが SG の LC 分析で最も多く使用されるカラムです³⁻⁶。国連食糧農業機関および世界保健機関 (FAO/WHO) の合同食品添加物専門家会議 (JECFA) が 2006 年以降、SG に関する一連のモノグラフを発表しています。FAO/WHO JECFA モノグラフ 26 (2021) で発表された最新のモノグラフでは、主要な SG および微量の SG をそれぞれ測定するために、LC-UV および LC-UV-MS の 2 つの分析法を推奨しています¹。いずれの分析法でも、同じ C₁₈ カラムと同じグラジエント溶出を使用して、主要な SG (13 化合物) と微量の SG (17 化合物およびその異性体) を、合計実行時間 35 分で分離しています。これら 2 つの分析法の主な違いは、微量の SG の分析には質量分析計 (MS) を使用しているのに対して、主要な SG の分析には紫外/可視 (UV/Vis) 検出器を使用していることです。これらの分析法では、以前に発表された JECFA 分析法よりもクロマトグラフィー分離が向上していますが、まだ十分ではありません。これらの分析法では、クリティカルペア (Reb A/SV) の分離度が約 1.0 と推定されていますが、SG をさらに効率的に分離できることが強く望まれています。

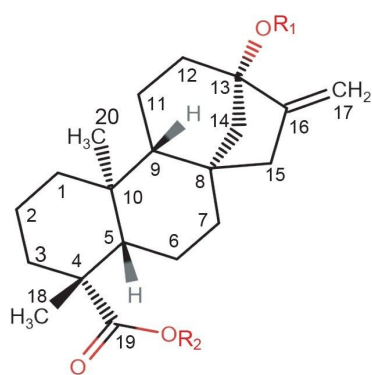
この試験の目的は、SG の RPLC でのクロマトグラフィー分離を、実行時間を延長せずに改善することでした。この目標を達成するため、5 種類の C₁₈ カラムをスクリーニングし、溶出条件を最適化するとともに、分析メソッドの性能を評価しました。分析法開発には、医薬品規制調和国際会議 (ICH) のガイドライン Q14 (最終バージョン、2023 年 11 月 1 日)⁷に記載されている分析法開発への強化アプローチの要素を使用しました。市販のステビア抽出物を開発した分析法で分析しました。

実験方法

標準試料およびサンプル

ステビオシド、ステビオールピオシド (SVB)、ズルコシド A (Dul A)、ルブソシド (Rub)、レバウジオシド A、B、C、D、F (Reb A ~ D、F) を含むステビア JECFA スタンダードキットは、ChromaDex (コロラド州ロングモント) から購入しました。レバウジオシド E (Reb E) およびイソレバウジオシド A (Iso Reb A) も Chromadex から購入しました。レバウジオシド M、N、O、I (Reb M、N、O、I) は Sigma-Aldrich (ミズーリ州セントルイス) から購入

しました。図 1.に、この試験で使用した SG の構造を示します。これらの SG には、主要な SG および 2 種類の追加の SG (Reb I および Iso Reb A) 用の JECFA 分析法に含まれる 13 化合物が含まれています。5 種類の代表的な市販のステビア抽出物はオンラインで購入しました。これらの市販のステビア抽出物の詳細な説明を表 1 に示します。



化合物	略語	R ₁	R ₂
レバウジオンド E	Reb E	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-
レバウジオンド D	Reb D	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-
レバウジオンド N	Reb N	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-
レバウジオンド M	Reb M	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-
レバウジオンド I	Reb I	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-3)Glcβ1-
レバウジオンド A	Reb A	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ1-
ステビオンド	SV	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Glcβ1-
レバウジオンド F	Reb F	Xylβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ1-
レバウジオンド C	Reb C	Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ1-
ズルコンド A	Dul A	Rhaα(1-2)Glcβ1-	Glcβ1-
ルフソンド	Rub	Glcβ1-	Glcβ1-
レバウジオンド B	Reb B	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H-
ステビオールピオンド	SVB	Glcβ(1-2)Glcβ1-	H-
レバウジオンド O	Reb O	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-3)Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-
イソレバウジオンド A*	IsoReb A	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ1-

*: 二重結合が C15 と C16 の間にあることを除き、Reb A と同じ。

図 1. この試験で使用したステビオール配糖体 (SG) の構造

サンプルコード	形状	成分
A	液体	グリセリン、水、ステビア葉抽出物、天然風味、レモンジュース
B	液体	グリセリン、水、ステビア抽出物
C	液体	水、ステビア葉抽出物、サトウキビアルコール
D	粉末	ステビア葉抽出物
F	粉末	ステビア抽出物

表 1. この試験で使用した 5 種類の代表的な市販のステビア抽出物の説明

標準試料溶液およびサンプル溶液の調製

個々の標準ストック溶液は、標準試料 5 mg を正確に秤量し (0.1 mg 単位まで記録)、5 mL の希釈溶媒 (アセトニトリル/水混合液、3:7 v/v) で希釈することによって調製しました。標準混合ストック溶液は、それぞれの個別のストック溶液 1.0 mL を 20 mL ガラスバイアルに移し、穏やかな窒素流で蒸発乾燥させてから、2 mL 希釈溶媒に再溶解して調製しました。6 種類の作業用標準溶液は、標準混合ストック溶液をさまざまな量の希釈溶媒で希釈して、5、20、50、100、200、500 μg/mL の溶液として調製しました。

約 100 mg のサンプルを正確に秤量して 10 mL の希釈溶媒に溶解し、0.45 μm PTFE シリンジフィルターでろ過してから分析しました。高レベルの SG を含むサンプルでは、追加の希釈が必要になる場合があります。

分析条件

システム:	Arc Premier システム (BSM) (2998 PDA 検出器搭載)
検出:	UV (210 nm) および PDA (200 ~ 400 nm)
ソフトウェア:	Empower™ 3 CDS
MP A:	アセトニトリル/水 (2:8 v/v、0.02% ギ酸含有)
MP B:	0.02% のギ酸を含むアセトニトリル。
カラム温度:	45 °C
バイアル:	スクリーネックキャップ (製品番号 : 186000305) 付き 2 mL ガラス製スクリーネックバイアル (製品番号: 186000273)

粒子径 2.5 μm のカラムを使用した分離

カラム:	XSelect™ Premier HSS T3 VanGuard™ FIT カラム、130 Å、2.5 μm 、4.6 × 150 mm (製品番号 : 186009863)
注入量:	10.0 μL
グラジエント溶出プログラム:	表 2 参照。

時間 (分)	流速 (mL/分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)	曲線
初期条件	0.7	95.0	5.0	-
1.80	0.7	95.0	5.0	6
19.50	0.7	72.5	27.5	6
21.80	0.7	72.5	27.5	6
22.00	0.7	50	50	6
25.50	0.7	50	50	6
25.60	0.7	95.0	5.0	6
30.00	0.7	95.0	5.0	6

表 2. XSelect™ Premier HSS T3 VanGuard FIT カラム用のグラジエント溶出プログラム

粒子径 2 μm 以下のカラムを使用した分離

カラム: ACQUITY™ UPLC™ HSS T3 カラム、100 Å、1.8 μm、
3 × 150 mm (製品番号: 186004681)

注入量: 5.0 μL

グラジエント溶出プログラム: 表 3 参照。

時間 (分)	流速 (mL/分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)	曲線
初期条件	0.4	95.0	5.0	-
1.35	0.4	95.0	5.0	6
14.50	0.4	72.5	27.5	6
16.20	0.4	72.5	27.5	6
16.40	0.4	50	50	6
19.00	0.4	50	50	6
19.10	0.4	95.0	5.0	6
24.00	0.4	95.0	5.0	6

表 3. ACQUITY UPLC HSS T3 カラム用のグラジエント溶出プログラム

分析法の最適化：実験計画法

グラジエント溶出は、まず一変数アプローチを使用して最適化し、次に多変数アプローチを使用して微調整しました。簡単に説明すると、（単一変数最適化において）分離に最大の影響を与えることがわかったグラジエント溶出プログラムの3つのパラメーター、つまり最初の移動相組成、最初のホールド時間、および最初のグラジエント溶出終了時間を、実験計画法ソフトウェア（Fusion QbD[®] ソフトウェア、S-Matrix Corp、カリフォルニア州ユリーカ）を使用して最適化しました。具体的には、中心複合計画に基づくサンプルキューを Fusion QbD ソフトウェアによって作成し、Empower 3 CDS にエクスポートしました。サンプルキューが終了し、クロマトグラフィーデータが Empower 3 CDS で解析された後、Fusion QbD ソフトウェアによって結果が取り出されて、モデリングおよび分析が行われました。Fusion QbD ソフトウェアによる統計分析に基づいて、分離度 1.70 以上の許容性能範囲を取得し、最適なクロマトグラフィー条件を決定しました。Fusion QbD ソフトウェアの支援により、最適条件での頑健性試験も実施しました。最適条件から逸脱した2つのレベルでの完全要因計画に基づくサンプルキューを（Fusion QbD ソフトウェアによって）作成し、最適条件からの小さな逸脱が分離度に及ぼす影響を調査しました。

結果および考察

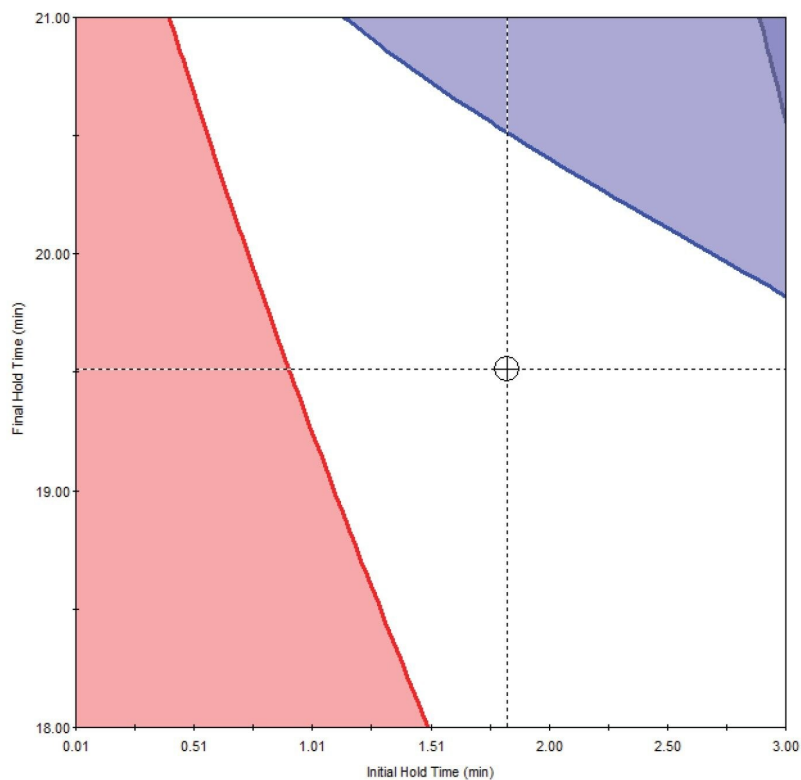
分析法開発

FAO/WHO JECFA モノグラフ 26 で推奨されているのと同じグラジエント溶出プログラムを使用して、5 種類の C₁₈ カラムをスクリーニングしました。スクリーニングしたカラムは表 4 の通りです。すべてのカラムで同等の分離が見られましたが、XSelect Premier HSS T3 カラムにおいて、クリティカルペア (Reb A/SV) について最良の分離が見られました。XSelect Premier HSS T3 カラムでの分離度を一段と向上させるために分離条件をさらに最適化しました。検討した条件は、カラム温度 (30 °C ~ 45 °C)、流速 (0.7 ~ 1.0 mL/分)、グラジエント溶出などです。これらの条件を、一変量アプローチを用いて検討しました。この最初の最適化では、クリティカルペア (Reb A/SV) の分離度 1.5 が得られました。

カラム	XBridge™ Premier BEH C ₁₈	XSelect Premier HSS T3	CORTECS™ Premier C ₁₈	CORTECS Premier C ₁₈ +	CORTECS Premier T3
長さ (mm)			150		
直径 (mm)			4.6		
粒子径 (μm)	2.5	2.5	2.7	2.7	2.7
粒子	全多孔性 BEH™ 粒子	全多孔性ハイスレンジシリカ	ソリッドコアシリカ	ソリッドコアシリカ	ソリッドコアシリカ
結合	三官能性 C ₁₈ および エンドキャッピング	三官能性 C ₁₈ 、完全 エンドキャップ済み	中間範囲三官能性 C ₁₈ 、完全エンドキャップ済み	三官能性 C ₁₈ 、完全 エンドキャップ済み、荷電表面	T3 (C ₁₈) 結合およびエンドキャッピング

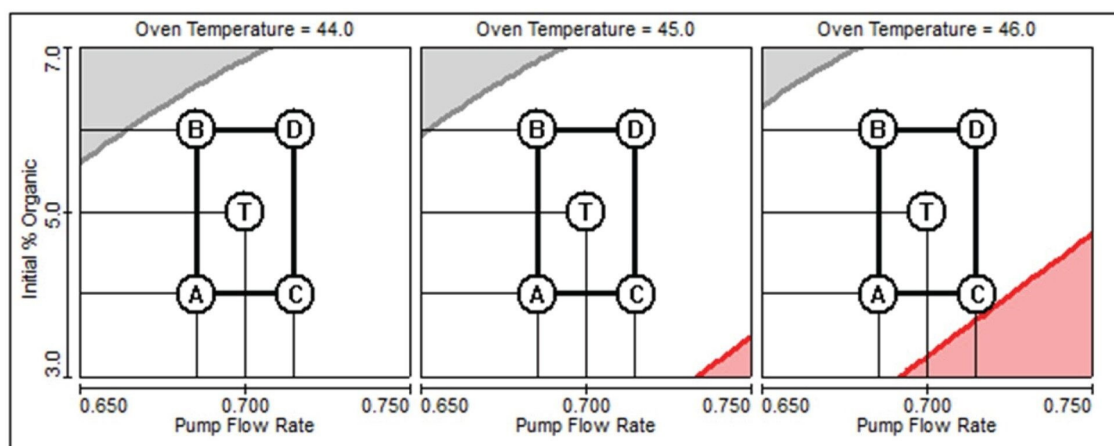
表 4. この試験でスクリーニングしたカラムの詳細

溶出時間や移動相組成などのグラジエント溶出パラメーターは、互いに強く依存していました。そのため、最適な分離度が得られるように、多変量アプローチを採ってグラジエント溶出条件を微調整しました。多変量アプローチは、ICH Q14 ガイドラインで推奨されています⁷。溶出条件を微調整することで、クリティカルペアの分離度 1.7 が得られました。図 2.に、最も困難な 4 つのペアの分離度 1.70 以上の許容性能範囲を示します。最適な LC 条件に関する頑健性試験も、ICH Q14 ガイドラインに従って実施しました。図 3.に頑健性試験の結果を示します。クリティカルペア (Reb A/SV) について 1.50 以上、その他の困難な SG のペア (Reb O/Reb D、Reb E/Reb O、SV/Iso Reb A) について 1.70 以上の分離度が得られました。表 5.に頑健性試験で使用した偏差の範囲を示します。



	Name	Goal	Lower Bound	Upper Bound	Crosshair Prediction	Contour Label	Color
<input checked="" type="checkbox"/>	Reb D - USPResolution	Maximize ▼	1.70		2.013	<input type="checkbox"/>	Gray ▼
<input checked="" type="checkbox"/>	Reb O - USPResolution	Maximize ▼	1.70		2.021	<input type="checkbox"/>	Red ▼
<input checked="" type="checkbox"/>	SV - USPResolution	Maximize ▼	1.70		1.721	<input type="checkbox"/>	Blue ▼
<input checked="" type="checkbox"/>	Iso Reb A - USPResolution	Maximize ▼	1.70		2.318	<input type="checkbox"/>	Green ▼

図 2. 初期移動相組成 5% B で得られた分離度 1.70 以上の許容性能範囲（空白範囲）。クリティカルペア *Reb E/Reb D* (*Reb D* と表示)、*Reb D/Reb O* (*Reb O* と表示)、*Reb A/SV* (*SV* と表示)、*SV/Iso Reb A* (*Iso Reb A* と表示) の分離度を最適化の目標として設定しました。



	Name	Goal	Lower Bound	Upper Bound	Color
<input checked="" type="checkbox"/>	Reb O - USPResolution	Maximize ▼	1.70		Gray ▼
<input checked="" type="checkbox"/>	Reb D - USPResolution	Maximize ▼	1.70		Red ▼
<input checked="" type="checkbox"/>	SV - USPResolution	Maximize ▼	1.50		Blue ▼
<input checked="" type="checkbox"/>	Iso Reb A - USPResolution	Maximize ▼	2.000		Green ▼

図 3. 頑健性試験の結果クリティカルペア (Reb A/SV) について分離度 1.50 以上、その他のステビオール配糖体のペアについて分離度 1.70 以上が得られました。表中の Reb O、Reb D、SV、Iso Reb A はそれぞれ、Reb E/Reb O、Reb O/Reb D、Reb A/SV、SV/Iso Reb A のペアを表します。

LC 条件	逸脱範囲	システム仕様
流速 0.7 mL/分	0.685 ~ 0.715 mL/分	流量正確性：±1.0%
初期移動相 B 5%	4% ~ 6%	混合正確性：±0.5%
カラム温度 45 °C	44 °C ~ 46 °C	カラム温度正確性：±0.5 °C

表 5. 頑健性試験および関連するシステム仕様における LC 条件の偏差の範囲

分析法の性能

PDA ライブラリーを Empower 3 CDS で作成し、各標準試料およびその保持時間の UV/Vis スペクトルをアーカイブしました。ピークは、保持時間および UV/Vis スペクトルによって同定しました。Empower のピーク純度機能も使用し

て、ピークの共溶出がないことを確認しました。SG は UV/Vis スペクトルが類似しているため、（標準試料が使用できる SG の場合）保持時間がピーク同定において最も信頼できるパラメーターであることがわかりました。

15 種の SG すべてにおいて、ピーク面積と濃度の間に直線的な関係があることが示されました（表 6）。検量線は最小二乗回帰モデルで近似しました。すべての化合物について、決定係数（ R^2 ）0.999 以上が得られました。これらの化合物の定量限界（LOQ）は、キャリブレーションの最低濃度レベルで得られたレスポンス（ピーク面積）の標準偏差（ $n=5$ ）の 10 倍を、検量線の傾きで除算して得られた値として推定しました。推定 LOQ の範囲は 0.001 ~ 0.004 mg/mL です（表 6）。

SG	式	R_2	LOQ (mg/mL)
Reb E	$Y = 2.60 \times 10^5 X + 6.22 \times 10^2$	0.9994	0.002
Reb O	$Y = 1.64 \times 10^5 X + 1.89 \times 10^2$	0.9993	0.001
Reb D	$Y = 2.47 \times 10^5 X + 3.12 \times 10^2$	0.9993	0.004
Reb N	$Y = 2.43 \times 10^5 X + 1.67 \times 10^3$	0.9995	0.003
Reb M	$Y = 1.88 \times 10^5 X + 3.48 \times 10^2$	0.9994	0.004
Reb I	$Y = 2.47 \times 10^5 X + 1.16 \times 10^3$	0.9992	0.003
Reb A	$Y = 3.02 \times 10^5 X + 3.82 \times 10^3$	0.9995	0.003
SV	$Y = 3.50 \times 10^5 X + 3.30 \times 10^3$	0.9992	0.002
Iso Reb A	$Y = 3.78 \times 10^5 X + 3.27 \times 10^3$	0.9994	0.004
Reb F	$Y = 2.70 \times 10^5 X + 7.15 \times 10^2$	0.9993	0.004
Reb C	$Y = 2.95 \times 10^5 X + 2.04 \times 10^3$	0.9994	0.001
Dul A	$Y = 3.22 \times 10^5 X + 1.71 \times 10^3$	0.9993	0.002
Rub	$Y = 4.26 \times 10^5 X + 4.33 \times 10^3$	0.9996	0.003
Reb B	$Y = 3.52 \times 10^5 X - 2.94 \times 10^2$	0.9993	0.002
SVB	$Y = 3.11 \times 10^5 X + 4.58 \times 10^2$	0.9993	0.003

表 6. ピーク面積と濃度の間の直線的な関係および推定定量限界

異なる形状（液体と粉末）を持ち、成分がさまざまな 3 種類のサンプル（サンプルの詳細については表 1 を参照）に、2 つのスパイクレベルで SG（Reb N および Reb M）をスパイクすることで、分析の正確性を評価しました。表 7 にスパイクの結果を示します。ほとんどの場合、平均回収率（ $n=2$ ）のデータは $100 \pm 10\%$ 以内でしたが、サンプル B で

の Reb M の低スパイクレベルで得られた 1 つの結果（111.8%）が例外でした。

	サンプル A		サンプル B		サンプル D	
	Reb N	Reb M	Reb N	Reb M	Reb N	Reb M
平均（ネイティブ）（%、w/w）	0.00%	0.00%	0.060%	0.272%	0.769%	1.845%
スパイクレベル（低）（%、w/w）	0.17%	0.22%	0.17%	0.22%	0.24%	0.30%
平均回収率（%）	95.9%	102.2%	106.5%	111.8%	99.9%	102.0%
スパイクレベル（高）（%、w/w）	1.71%	2.17%	1.74%	2.21%	2.36%	3.00%
平均回収率（%）	105.3%	99.7%	102.9%	106.3%	98.2%	99.1%

表 7. ステビオール配糖体の 3 種類のサンプルマトリックスにおける添加回収率の結果

保持時間の精度は、サンプル分析において QC 標準試料を用いて評価しました。15 種の SG の保持時間の相対標準偏差は 0.15% ~ 0.33% の範囲でした（結果は示していません）。

分析法の頑健性は、前述したように、分析法開発時に評価しています（「分析法開発」セクションを参照）。さらに、この分析法を、カラムハードウェアに若干のバリエーションがある 2 種類の追加の HSS T3 カラムで試験しました。1 つはガードカラム（2.5 μ m、3.9 \times 5 mm）を取り付けた XSelect Premier HSS T3 VanGuard FIT カラム（2.5 μ m、4.6 \times 150 mm）です。もう 1 つは XSelect HSS T3 カラム（2.5 μ m、4.6 \times 150 mm）で、従来のステンレススチール製ハードウェア（MaxPeak™ High Performance Surface ではない）に充填したものです。これらのカラムすべての充填剤とカラムサイズは基本的に同じでした。結果を表 8 で比較しています。3 種類のカラム（2.5 μ m）すべてで優れた分離度が得られ、最低分離度はクリティカルペア（Reb A/SV）で 1.51、残りの SG では 1.89 でした。MaxPeak High Performance Surface を採用したカラム（Premier カラム）では、従来のカラム（同じ粒子径）よりも良好な分離が見られました。この分析における MaxPeak High Performance Surface のメリットの詳細は別途詳述しています⁸。粒子径 2 μ m 以下のカラム（ACQUITY UPLC HSS T3 カラム）で得られた結果も表 8 に含めました。これらの結果については、最後のセクションで説明します。

	Reb E	Reb O	Reb D	Reb N	Reb M	Reb I	Reb A	SV	ISO Reb A	Reb F	Reb C	Dul A	Rub	Reb B	SVB
カラム	XSelect Premier HSS T3 カラム (2.5 μ m, 4.6 \times 150 mm)														
分離度 (USP HH)															
平均 (n = 5)	-	2.17	1.94	2.93	4.26	25.77	3.89	1.63	2.28	4.94	3.56	2.91	9.24	8.53	*
RSD (%)	-	0.21	0.05	0.2	0.09	0.15	0.15	0.18	0.16	0.13	0.15	0.16	0.1	0.11	*
カラム	XSelect Premier HSS T3 VanGuard FIT カラム (2.5 μ m, 4.6 \times 150 mm)														
分離度 (USP HH)															
平均 (n = 6)	-	2.01	1.99	2.86	4.24	25.65	3.94	1.69	2.25	4.99	3.60	2.99	9.46	8.61	*
RSD (%)	-	1.35	0.53	1.34	0.29	0.75	0.69	0.68	0.97	0.65	0.80	0.65	0.57	0.73	*
カラム	XSelect HSS T3 カラム (2.5 μ m, 4.6 \times 150 mm)														
分離度 (USP HH)															
平均 (n = 5)	-	1.90	1.89	2.56	4.10	23.81	3.65	1.51	2.18	4.64	3.39	2.71	8.83	8.35	2.70
RSD (%)	-	0.44	0.51	0.32	0.37	0.2	0.07	0.18	0.16	0.1	0.19	0.09	0.1	0.08	0.23
カラム	ACQUITY UPLC HSS T3 カラム (1.8 μ m, 3 \times 150 mm) **														
分離度 (USP HH)															
平均 (n = 6)	-	2.39	2.19	3.33	4.77	29.45	4.57	2.01	2.57	5.84	4.13	3.55	11.1	9.91	*
RSD (%)	-	0.18	0.33	0.13	0.27	0.13	0.12	0.06	0.14	0.11	0.07	0.13	0.06	0.05	

注：

* Reb B と SVB 間に 2.7 より大きい分離度を得られました。Reb B と SVB の間の小さいピークが原因で、元の数の計算が間違っているため、分離度は示していません。

** 結果は粒子径 2 μ m 以下のカラムの条件で得たものです。

表 8. さまざまな HSS T3 カラムでのステビオール配糖体の LC-UV 分離の分離度

サンプル分析

開発した分析法を使用してステビア抽出物サンプルを分析し（「実験方法」セクションに示す粒子径 2.5 μ m のカラム用のクロマトグラフィー条件）、結果を表 9 に示します。標準試料混合物およびサンプルの HPLC-UV クロマトグラムを図 4 に示します。サンプル A は、Reb A を主成分とする単純な SG プロファイルを示しています。B、C、D、F などの他のサンプルは、より複雑な SG クロマトグラフィープロファイルを示しています。これらのサンプルには、この HPLC-UV 分析法では同定できなかったピーク（おそらく微量の SG）が多く含まれています。JECFA モノグラフ 26 で推奨されているように、このような複雑な SG プロファイルを有するステビア抽出物の分析では、化合物の同定に質量分析計が必要であると考えられます。

ステビオール配糖体	サンプル A		サンプル B		サンプル C		サンプル D		サンプル F	
	濃度 (%, w/w)	RSD (%)	濃度 (%, w/w)	RSD (%)	濃度 (%, w/w)	RSD (%)	濃度 (%, w/w)	RSD (%)	濃度 (%, w/w)	RSD (%)
Reb E					0.167	7.1				
Reb O			0.163	4.0	0.431	4.7	1.107	6.5	2.418	9.2
Reb D			0.181	2.8	0.489	5.3	1.303	6.1	2.576	6.2
Reb N			0.184	2.2	0.363	4.5	1.110	6.4	2.441	7.5
Reb M			0.734	4.1	0.824	4.1	3.289	6.1	5.358	6.7
Reb I			5.007	5.0	2.951	4.4	9.659	6.4	6.950	6.8
Reb A	2.164	2.9	1.002	5.2	2.519	4.3	8.593	6.7	6.882	7.2
SV	0.235	3.5	8.552	5.2	1.983	4.0	4.766	6.9	5.028	6.9
Iso Reb A			0.043	57	0.211	21	0.745	31	1.638	8.7
Reb F	0.024	8.7	0.140	6.4	0.779	2.7	2.084	6.7	3.366	6.8
Reb C	0.096	4.2	0.409	4.7	1.182	4.0	3.226	6.9	6.560	7.2
Dul A			0.072	7.8	0.151	3.7	0.221	8.1	0.543	8.0
Rub			0.137	6.7	0.121	3.9	0.258	9.1	0.253	7.6
Reb B	0.018	21	0.063	4.6	0.352	4.6	0.761	6.9	2.597	7.1
SV B			0.475	5.2	0.177	4.8	0.280	8.3	1.256	7.5
合計	2.54		17.16		12.70		37.40		47.87	

表 9. ステビア抽出物サンプルの分析結果のサマリー

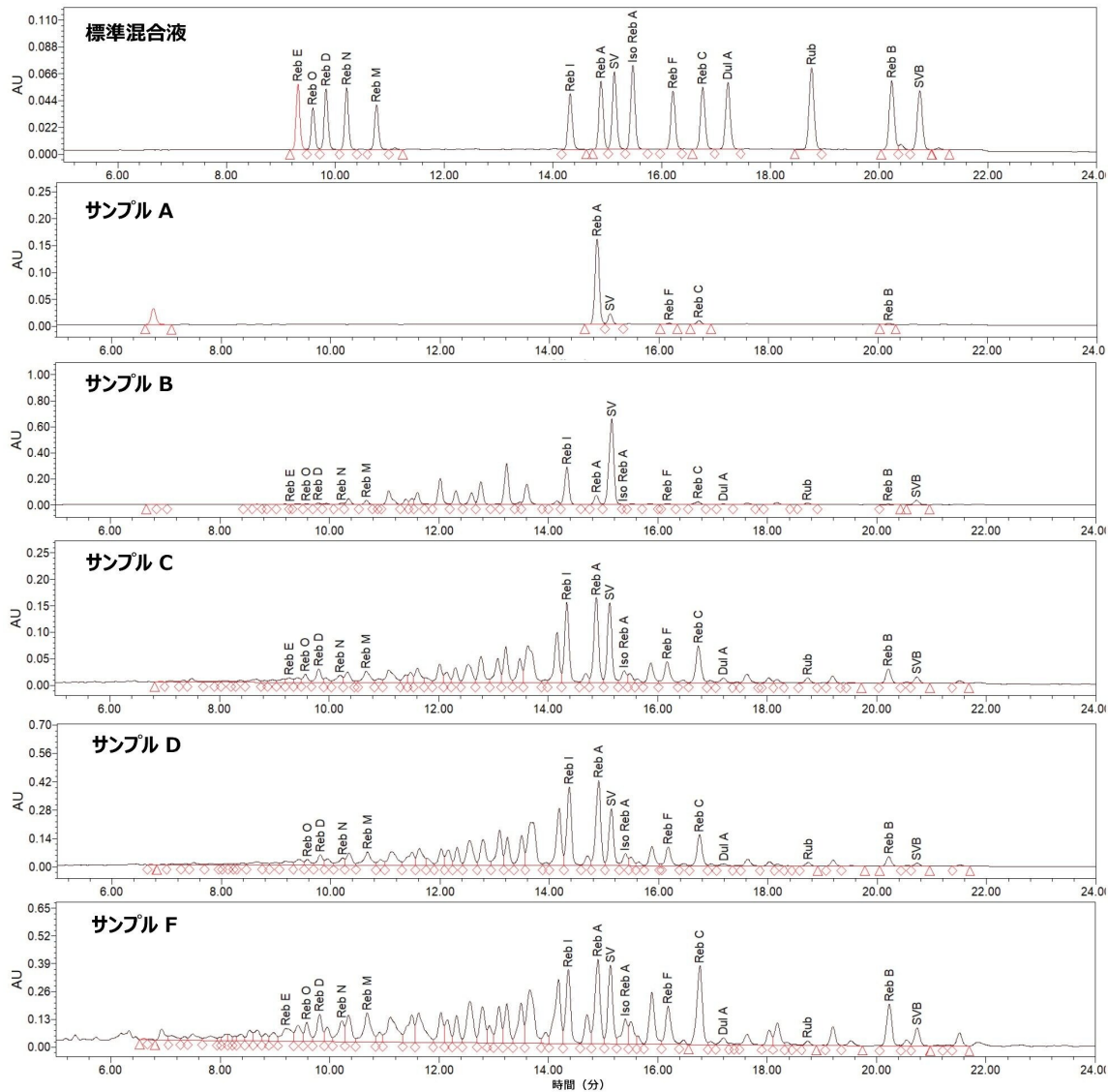


図 4. 開発した条件を使用して、XSelect Premier HSS T3 VanGuard FIT カラム (2.5 μm 、4.6 \times 150 mm) で得られた 15 種のステビオール配糖体標準混合液およびステビア抽出物製品 (サンプル A、B、C、D、F) の HPLC-UV クロマトグラム

2 μm 以下のカラムの使用による分離度のさらなる向上

図 4 からわかるように、ステビア抽出物の複雑な SG プロファイルには、さらに高いクロマトグラフィー分離度が必要です。より高い分離度を得るために、開発したこの分析法を同じ固定相を持つ 2 μm 以下のカラム (ACQUITY UPLC HSS T3 カラム、1.8 μm 、3 \times 150 mm) に移管し、グラジエント溶出パラメーターを、カラムカリキュレーターアプ

リ（バージョン 2.0、Waters™ Corp.。粒子径 2 μm 以下のカラムおよび関連するクロマトグラフィー条件の詳細は、「実験方法」セクションに記載）を用いて粒子径 1.8 μm のカラム（3 × 150 mm）用の新しいパラメーターに変換しました。2 μm 以下のカラムを使用することで、すべての SG ペアについて 2.0 以上の分離度が達成されました（表 8 を参照）。粒子径が小さくカラム長と粒子径の比（L/dp）が大きいことが、クロマトグラフィー分離度の向上に役立ちました。ACQUITY UPLC HSS T3 カラムは、SG 分析において究極のクロマトグラフィー分離度が必要な場合に適した選択肢になる可能性があります。この試験を実施した時点では、MaxPeak High Performance Surface バージョンの ACQUITY UPLC HSS T3 カラムは使用できなかったことに注意してください。

結論

2998 PDA 検出器と XSelect Premier HSS T3 カラムを搭載した Arc Premier システムでのステビオール配糖体の分析用に、JECFA グラジエント LC-UV 分析法を最適化しました。SG のクロマトグラフィー分離が大幅に向上しました。クリティカルペア（Reb A/SV）について、XSelect Premier HSS T3 カラム（2.5 μm、4.6 × 150 mm）では 1.5 以上の分離度が確実に得られ、ACQUITY UPLC HSS T3 カラム（1.8 μm、3 × 150 mm）では（同じクリティカルペアについて）分離度 2.0 が達成されました。直線性、感度、正確性、精度、頑健性においても優れた分析性能が実証されました。開発したこの分析法は、ステビオール配糖体の有用な代替分析法になる可能性があります。

参考文献

1. FAO and WHO.2021. Compendium of Food Additive Specifications.Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 91st Meeting – Virtual meeting, 1–12 February 2021.FAO JECFA Monographs No.26. Rome.<https://doi.org/10.4060/cb4737en> <<https://doi.org/10.4060/cb4737en>> .
2. Prakash, I.; Markosyan, A.; and Bunders, C. Development of Next Generation Stevia Sweetener: *Rebaudioside M*. *Foods* 2014, 3, 162–175; doi: 10.3390/foods3010162.
3. Bartholomees, U.; Struyf, T.; Lauwers, O.; Ceunen, S.; Geuns, J. M. C. Validation of an HPLC Method for Direct Measurement of Steviol Equivalents in Foods.*Food Chem.*2016, 190, 270–275.
4. Bergs, D.; Burghoff, B.; Joehnck, M.; Martin, G.; Schembecker, G. Fast and Isocratic HPLC-Method for Steviol Glycosides Analysis from Stevia Rebaudiana Leaves.*J. Verbraucherschutz Lebensmittelsicherh.*2012, 7, 147–154.
5. Zimmermann, B.F. Beaming steviol Glycoside Analysis into the Next Dimension.*Food Chem.*2018, 241, 150–153.

6. Gardana, C.; Scaglianti, M.; and Simonetti, P. Evaluation of steviol and its Glycosides in Stevia Rebaudiana Leaves and Commercial Sweetener by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.A* 1217 (2010) 1463–1470.
7. ICH. Analytical Procedure Development Q14, (Final Version, 1 Nov 2023)
https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q14_Guideline_2023_1116.pdf <
https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q14_Guideline_2023_1116.pdf> .Accessed 1 January 2024.
8. Yang, J; Rainville, P.; Harden, S. Reversed-Phase Liquid Chromatography of Steviol Glycosides - Benefits of MaxPeak High Performance Surfaces. Waters Application Brief, [720008234](#), 2024.

ソリューション提供製品

Arc Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

2998 フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 <<https://www.waters.com/1001362>>

Empower クロマトグラフィードータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>

720008236JA、2024 年 2 月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシーポリシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [法的通知](#)および[プライバシー通知](#) [Cookies](#)
[Cookie](#) [環境設定](#)