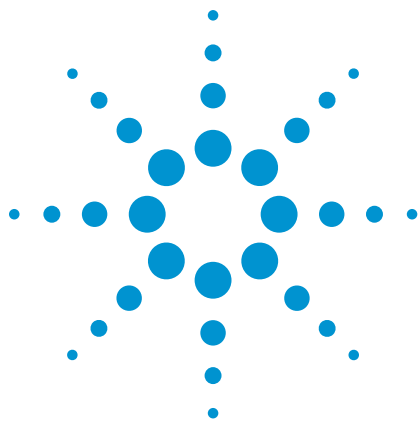




Agilent 1260 Infinity LC を使用した ステビア葉中のステビオシドおよび レバウジオシド A の定量

アプリケーションノート

食品テストおよび農業



著者

Srividya Kailasam
Agilent Technologies, Inc.
Bangalore, India

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity LC を使用したステビア葉抽出物に含まれるステビオシドおよびレバウジオシド A の定量について説明します。以前のアプリケーションノートから、Agilent ZORBAX 糖分析カラムは、この 2 つの化合物の分離に最も適していることが判明しています。重要なメソッドパラメータの堅牢性をバリデーションした後、線形ダイナミックレンジを求めました。検量線の作成に必要な標準試料の調製には Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用しました。いずれの化合物も、 R^2 値は 0.9999 を超え、1~1,000 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で優れた直線性を示しました。2 つの化合物の LOD と LOQ の値は、いずれも 1.0 $\mu\text{g/mL}$ であることがわかりました。実試料においても、良好な結果が得られました。

はじめに

ステビア葉から抽出したジテルペングリコシド (ステビオシドおよびレバウジオシド) は、食品や飲料において合成甘味料の代替品として使用されています。これらの化合物にはカロリーがなく、効果が高いため (ステビオシドはショ糖の 300 倍、レバウジオシドは 400 倍の甘味度)、ステビア葉抽出物は伝統的に糖尿病患者に対して使用されてきました^{1, 2}。ステビア抽出物は製品の品質に大きな影響を与えることから、抽出物中の様々なグリコシドの相対量を確認することが必要です。以前に公開したアプリケーションノートでは、Agilent ZORBAX 糖分析カラムを使用したこれら 2 つのジテルペングリコシドの定量について、70~700 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で検証しています³。今回のアプリケーションノートでは Agilent 1260 Infinity LC を使用して、最大 1,000 $\mu\text{g/mL}$ のステビオシドとレバウジオシド A を含むステビア葉抽出物のバリデーションの一部と定量について説明します。



Agilent Technologies

メソッド

機器およびソフトウェア

次のモジュールで構成される Agilent LC システム:

- Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity デガッサ (G1379B)
- Agilent 1260 Infinity オートサンブラ (G1367E)
- Agilent 1260 Infinity サーモスタット (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity DAD (G4212B)、Max-Light 60 mm 高感度フローセル搭載

ソフトウェア: Agilent ChemStation
リビジョン B.04.03

試料調製: Agilent 7696A サンプル
前処理ワークベンチ

試薬および材料

レバウジオシド A、ステビオシド、ステビア葉 (Sigma)、およびアセトニトリル (Labscan) を今回の検討で使用しました。

クロマトグラフィパラメータ

カラム Agilent ZORBAX 糖分析カラム
4.6 x 150 mm、
5 µm (p/n 843300-908)

移動相 A: 水 30 %
B: ACN 70 %

注入量 5 µL

ALS 6 °C

サーモスタット

流量 1.0 mL/min
(アイソクラティック分析)

カラム温度 30 °C

検出 205 nm、4 nm BW、参照: なし
PW > 0.25 秒 (20 Hz)

標準試料

標準物質を 30 % 水、70 % アセトニトリル混合液で調製しました。それぞれの化合物が 100 µg/mL の溶液を用いてメソッドのバリデーションを行いました。各標準物質の濃度が 0.5、1.5、2.5、5、10、25、50、100、250、500、1,000 µg/mL となるように 30 % 水、70 % アセトニトリル混合液で調製し、これらを用いて検量線を作成しました。

上記の各濃度溶液の調製には、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチ⁴を使用しました。レバウジオシド A とステビオシドの濃度が 1.0、2.5、5、10、25、50、100、250、500、1,000 µg/mL となるよう 2000 µg/mL の溶液を 30 % 水、70 % アセトニトリル混合液で段階的に希釈するプログラムを用いました。表 1 に、今回使用したワークベンチの各パラメータを示します。

サンプル前処理

ステビア葉を粉碎し、約 0.1 g の粉末を 20 mL ガラスバイアルに計量しました。10 mL の 30 % 水、70 % アセトニトリル混合液をバイアルに加え、攪拌しました。その後、超音波処理を 60 分行い、遠心分離し、上澄み液を 30 % 水、70 % アセトニトリル混合液で 10 倍に希釈しました。10 倍に希釈したサンプル溶液に、2,000 µg/mL のレバウジオシド A およびステビオシドを加え、添加テストを行いました。化合物添加の有無にかかわらず、5 mL の試料を LC に注入し、分析しました。

結果と考察

分離

様々な HPLC カラムとクロマトグラフィ条件を検討した結果、Agilent ZORBAX 糖分析カラムが、レバウジオシド A およびステビオシドの分析に最適であることがわかりました。100 µg/mL 標準溶液のクロマトグラムを図 1 に示します。

	溶媒プレ洗浄 1	排出洗浄	排出ポンプ	排出設定
洗浄回数	1	1	2	-
洗浄ボリューム (µL)	100	50	50	-
吸引速度 (µL/min)	1,000	200	200	200
排出速度 (µL/min)	1,000	200	200	200
ニードル深さオフセット (mm)	0	-2	-2	-2
粘性待ち時間 (秒)	-	0	0	0
タレット溶媒	A	-	-	-
エアギャップ (% シリンジ体積)	-	-	-	0

表 1
Agilent 7696A ワークベンチのパラメータ

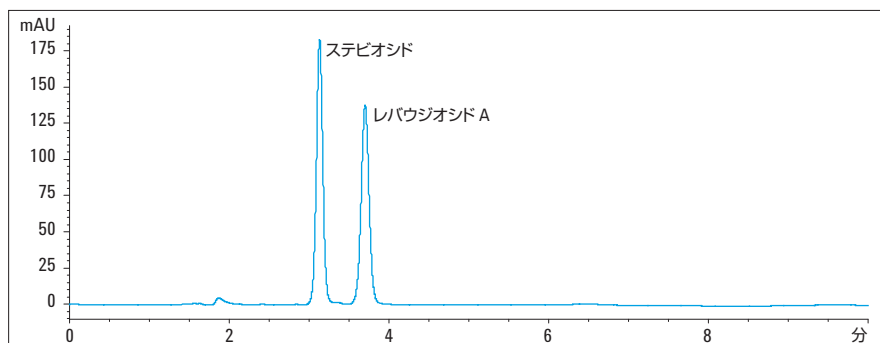


図 1
100 µg/mL 標準溶液のクロマトグラム

検出下限 (LOD) および定量下限 (LOQ)

LOD と LOQ の値は、ピーク高さを 0.1～0.4 分のピーク間ノイズで割ることにより求めました。1 µg/mL におけるステビオシドとレバウジオシド A のピークの S/N 比は 56.2 と 43.7 でした。0.5 µg/mL ではピークは検出されなかったため、1 µg/mL をこのメソッドの LOD および LOQ としました。

直線性

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して調製した各濃度の試料で、今回のメソッドの直線性を試験しました。濃度値に対してプロットした面積値が、両方の対象化合物について 1.0～1,000 µg/mL の範囲で良好な直線性を示しました。ステビオシドおよびレバウジオシド A のキャリブレーションデータを表 2 に示します。手動ではなく 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して検量線用の試料を調製すると R² 値が向上することがわかりました。

リテンションタイムと面積の精度

0.5～1,000 µg/mL の検量線用試料を手動で調製したところ、0.5 µg/mL の試料で積分できないほど非常に小さなピークが検出されました。その他の試料に関しては、10 回注入したうちの、最後の 6 回の繰り返し注入のデータを用いて、ピーク面積とリテンションタイムの RSD 値を計算しました。その結果、すべての濃度において 2 つの化合物のリテンションタイムの RSD は 0.13 % 以下でした。2 つの化合物のピーク面積の RSD は、5 % を上回った 1.5 および 2.5 µg/mL のステビオシドを除き、4 % 未満でした。

堅牢性

予備的なメソッドを開発した後、一連のメソッドパラメータを部分的に変動させて、メソッドの堅牢性を試験しました。パラメータの変動が結果に与える影響を確認するために、リテンションタイムとピーク面積の偏差を算出しました。パラメータが変動したときの、対象化合物のリテンションタイムとピーク面積の

偏差パーセンテージを表 3 に示します。リテンションタイムの偏差は、設定された限界値である 3 % 以内に全てのパラメータ変動において十分に収まりました。ピーク面積の偏差は、設定された限界値である 5 % 以内に検出波長を除く全てのパラメータ変動において収まることも確認できました。

化合物	R ²	直線回帰
ステビオシド	0.99991	面積 = 9.86 x 濃度 + 20.18
レバウジオシド	0.99995	面積 = 9.50 x 濃度 + 13.30

表 2
Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して調製したステビオシドおよびレバウジオシド A 標準試料のキャリブレーションデータ

変動させたパラメータ	ステビオシド		レバウジオシド A	
	リテンションタイムの偏差 (%)	面積の偏差 (%)	リテンションタイムの偏差 (%)	面積の偏差 (%)
流量 - 2 % (0.98 mL/min)	2.51	1.36	2.75	1.79
流量 + 2 % (1.02 mL/min)	-2.31	-2.55	-2.48	-2.48
カラム温度 - 5 % (28.5 °C)	-0.33	0.33	-0.47	-0.22
カラム温度 + 5 % (31.5 °C)	-1.04	-0.73	-1.5	-0.96
注入量 - 5 % (4.8 µL)	-0.54	-3.81	-0.93	-3.73
注入量 + 5 % (5.2 µL)	-0.85	4.33	-1.36	3.76
検出波長 - 3 nm (202 nm)	-1.16	19.09	-1.78	17.06
検出波長 + 3 nm (208 nm)	-1.30	-31.33	-2.01	-31.40

表 3
メソッドの堅牢性: メソッドパラメータの変動がリテンションタイムとピーク面積に与える影響

実試料での試験

ステビア葉抽出物に化合物を添加した溶液と添加していない溶液のクロマトグラムを図 2 に重ねて示します。化合物添加の有無における算出濃度の偏差を表 4 に示します。

結論

このアプリケーションノートでは、ステビアの葉から抽出した 2 つのジテルペングリコシド (ステビオシドおよびレバウジオシド A) の検出と定量について検討しました。開発したメソッドは、堅牢で高い感度と再現性を示しました。検量線を作成するために必要な各濃度の試料調製には Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用しました。両者の化合物ピークの面積は 1~1,000 µg/mL の範囲で直線になり、 R^2 の値が 0.9999 を超えることがわかりました。7696A サンプル前処理ワークベンチは、品質管理におけるルーチン分析に威力を発揮し、手動調製による検量線の誤差を軽減することができます。ステビア抽出物においても、化合物添加の有無における算出濃度の変動も良好な結果を示しました。

参考文献

1. N. W. Megeji, J. K. Kumar, Virendra Singh, V. K. Kaul and P. S. Ahuja, "Introducing Stevia rebaudiana, a natural zero-calorie sweetener", CURRENT SCIENCE, 88 (5), 801-804, 2005.
2. N. Kolb, J. L. Herrera, D. J. Ferreyra, and R. F. Uliana, "Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from Stevia rebaudiana: Improved HPLC Method", J. Agricultural and Food Chem, 49, 4538-4541, 2001.
3. "Isocratic Stevia Sweetener Analysis using Selective ZORBAX Columns", Agilent Application Note, Publication Number 5990-3933EN, 2010.

4. 「Agilent 7696 サンプル前処理ワークベンチを使用したヘッドスペース標準の自動サンプル前処理」アジレント・テクノロジー技術資料、資料番号 5990-9025JAJP, 2011.

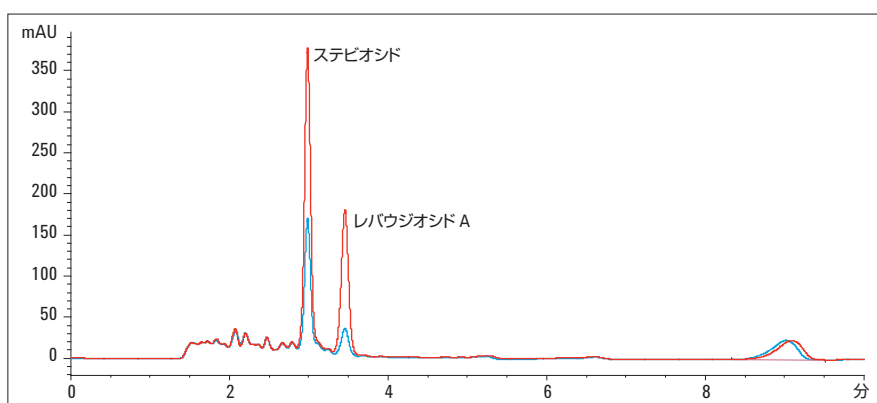


図 2
化合物添加ありおよび無しのステビア葉抽出物の重ね書きクロマトグラム

	10 倍に希釈した 抽出物中の算出濃度 (µg/mL)	希釈液に添加した 増量分 (µg/mL)	添加試料における 算出濃度 (µg/mL)	濃度の 偏差
ステビオシド	84.30	100	192.83	108.53 %
レバウジオシド A	21.56	100	114.57	93.01 %

表 4
化合物添加ありおよび無しの各化合物の算出濃度とその偏差

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
Published in Japan, December 1, 2011
5990-9524JAJP



Agilent Technologies