

# 用高效液相色谱测定甜菊甙

聂 洪 勇

(湖南进出口商品检验局, 长沙)

甜菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 是一种低热、无毒、高甜度, 并有一定的医药价值的新型甜味物质, 70 年代以来国外已经广泛使用它作为食品、饮料中的甜味剂。近年来我国也广泛开展了甜菊的研究。

甜菊中有三种主要的甜菊甙 [Stevioside (SS), Rebaudioside A (RA), Rebaudioside C (RC)]。建立准确、快速、高灵敏度的甜菊甙的定量方法, 对于甜叶菊的良种选育、高产栽培、原叶加工、甜菊甙的提取、分离、精制等研究工作有十分重要的意义。目前国内报道的测定总甙含量有重量法、比色法<sup>[1]</sup>、薄层扫描法<sup>[2]</sup>等。这些方法均只能测定总甙含量, 准确度较低, 且操作费时。国外有气相色谱法<sup>[3,4]</sup>、薄层层析法<sup>[5,6]</sup>的报道, 这些方法也都不能令人满意。高效液相色谱法 (HPLC) 已被用于甜菊甙的测定。早期的做法是先进行 P-bromophenacyl esters 衍生化后, 再进行 HPLC 测定。该法操作麻烦, 且受到一些物质的干扰<sup>[7]</sup>。以后改用氨基柱, 只是在检测器和流动相的选用上有区别。桥本庸平用示差折射检测器, 以乙腈-水体系为流动相, 最低检出量为  $5\mu\text{g}$ <sup>[8]</sup>; yohei Hashimoto 等人用同样的流动相, 用紫外吸收检测器定量 ( $\lambda = 210\text{nm}$ ), 最小检出量达到  $1.0\mu\text{g}$  (SS)、 $1.5\mu\text{g}$  (RA)<sup>[9]</sup>。M. S. Ahmed 等人用异丙醇为流动相, 用紫外吸收检测器定量 ( $\lambda = 210\text{nm}$ ), 最小检出量为  $1\mu\text{g}$  (SS) 和  $2\mu\text{g}$  (RA)<sup>[10]</sup>; 该法已收入美国专利<sup>[11]</sup>。Hirokado Masako 等人采用乙腈-水体系为流动相, 以紫外检测器定量 ( $\lambda = 210\text{nm}$ ), 最小检出量为  $0.15\mu\text{g}$  (SS)<sup>[12]</sup>。这些方法比前述方法灵敏快速, 但样品处理麻烦, 灵敏度也需提高。

本文研究了三种甜菊 (SS, RA, RC) 在氨基柱上, 用乙腈-水体系为流动相的高效液相色谱行为, 以及在该体系下的紫外吸收特性。并对流动相的纯度与检测灵敏度之间的关系、样品的提取方法进行了探讨, 建立了高灵敏度、准确、快速的甜菊甙的高效液相测定法。

## 材 料 与 方 法

### 一、仪器

1. 液相色谱仪: 日本岛津 LC-4A 型, 不停流进样器 SIL-1A 型; 可变波长紫外检测器, SPD-2AS 型; 记录积分仪 CR-2AX 型, 日立 056 型记录器。

2. 微量注射器:  $10\mu\text{l}$  澳大利亚 S. G. E 型。

3. 色谱柱:  $250\text{mm} \times \phi 4\text{mm}$  (id) 不锈钢色谱柱, 内填充氨基结合键固定相 ( $10\mu\text{m}$ ), 日本岛津 PNH<sub>2</sub> · 10/S2504 型固定相。

### 二、样品

1. 甜菊甙标准品: Stevioside ① 日本产, 由湖南省中医药研究所提供。② 国产精制品, 由省分析测试所, 长沙有机化工厂, 郴州生物研究所分别提供。

2. 甜菊甙粗品 (实验产品或中间产品): 由长沙市化工研究所、湖南大学、长沙有机化工厂, 郴州生物研究所提供。

3. 甜叶菊原叶: 湖南常德、郴州、长沙等地 1983 年产。

### 三、试剂

1. 乙腈: 分析纯, 上海试剂厂出品, 经本室

\* 我局彭三和唐宏志参加了本研究工作。

精制提纯,使用前检查在 200nm 处无明显吸收。

2. 水:全玻璃重蒸水。
3. 甲醇,分析纯。
4. 三氯甲烷,分析纯。

#### 四、样品制备

1. 标准溶液:取 Stevioside 标准品用流动相作为溶剂配成 0.025, 0.075, 0.125, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的标准溶液系列。

2. 粗品:取粗品直接用水和流动相配成样品浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的样液,进样前经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤或高速离心 5 分钟,作为 HPLC 样液。

3. 甜菊原叶:取样品干粉 0.25g,置于自制的速效提取装置中,用三氯甲烷 15ml 提取 15 分钟;弃去三氯甲烷液。残渣仍置于提取装置中加水 15ml,提取 20 分钟。提取液用流动相定容到 25.0ml;取 1.0ml 样液用流动相定容到 5ml,做为 HPLC 样液;进样前经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤或高速离心 5 分钟。

为考察本法提取效率,采用 M. S. Ahmed<sup>[10]</sup> 的提取方法作为对照:取样品干粉 0.25g 置索氏提取器中,用三氯甲烷 15ml 提取 3 小时;弃去三氯甲烷液,残渣再用甲醇 15ml 提取 5 小时;甲醇提取液用流动相定容到 25ml,取 1.0ml 用流动相定容到 5ml 作为 HPLC 样液;进样前应离心或过滤。

**五、色谱条件** 流动相(乙腈:水=80:19)流速 2.2ml/min,色谱柱温度 28 $^{\circ}\text{C}$ ,紫外检测器波长 200nm,量程 0.04 AUFS。进样量 10  $\mu\text{l}$ 。记录器纸速 5mm/min,量程 1mV,同时接入记录积分仪,记录  $t_{\text{R}}$  值及峰面积值。

**六、定量:**采用工作曲线法定量。取标准溶液系列,作 HPLC 测定,以样品浓度及测得峰面积绘制工作曲线或求出定量因子  $F$ ,按下式计算样品甙的含量。单种甙的含量为:

$$\text{甙 } i \text{ 含量 } \% = \frac{A_{\text{in}} \times F_i}{W} \times D \times 100$$

$$\text{总甙含量 } \% = \sum \text{甙 } i \text{ 的含量 } \%$$

式中  $A_{\text{in}}$  为  $i$  种甙的峰面积,  $F_i$  为  $i$  种甙

的定量因子,  $w$  为样品重量 (g),  $D$  为样品总的稀释因子 (mL)。

## 结果与讨论

### 一、甜菊甙的高效液相色谱行为

在氨基柱上以乙腈-水体系作为流动相,糖类物质具有极好的分离特性<sup>[13,14]</sup>。甜菊甙类是四环双萜的多种配糖体,所以在这一体系中亦具有良好的分离特性。各种甜菊甙的  $t_{\text{R}}$  值随着分子中配糖基的增多而增加。RC 比 SS 多一个鼠李糖基, RA 比 SS 多一个葡萄糖基,所以三者的  $t_{\text{R}}$  值按 SS、RC、RA 的顺序增加。流动相中水的比例增加时各种甙的  $t_{\text{R}}$  值减少;经反复选择,确定乙腈:水=80:19 时,三种主要甙类分离效果良好;在 8 分钟内即可完成一次测定。测得的  $t_{\text{R}}$ ,  $K'$ ,  $\alpha$ ,  $R_{\text{S}}$  值列在表 1

表 1

流动相:乙腈:水=80:19 流速 2.2ml/min							
	$t_{\text{R0}}$	$t_{\text{R}}$	$K'$	$\alpha$	$R_{\text{S}}$	N	分析时间
SS	0.925	3.98	3.30	1.28	1.58	1680	8min
RC		4.85	4.24				
RA		6.18	5.68	1.38	2.05		

### 二、紫外吸收特性与工作曲线

1. 三种甜菊甙的紫外特性 三种甜菊甙从 230nm 处开始出现吸收,吸收强度随波长变短而迅速增强,到 200nm 处仍有增强的趋势。因此选用的波长越短,检测的灵敏度越高。然而波长变短,流动相的紫外吸收也随着加强,又降低了检测灵敏度。在这里流动相的提纯很重要。

2. 工作曲线 用 SS 标准品(长沙有机化工厂精制)配成标准溶液系列,测定结果列在表 2。

经计算峰面积与浓度之间有良好的线性关系,相关系数  $r = 0.9997$ ,  $y$  轴上的截距为 0.162。

因我们无 RA、RC 的标准样品,根据有关文献的数据,以 SS 标准品的响应值为基础,通

表 2

溶液浓度 μg/μL	0.025	0.075	0.125	0.20	0.25	0.30	0.40	0.50
响应(峰面积)单位 面积	5.08	15.50	25.40	40.99	50.54	60.25	82.00	101.40

过他们的摩尔吸光系数  $\epsilon$  值及分子量  $M$  换算后,可得到相应的校正系数。

### 三、原叶样品的提取率

用 M. S. Ahmed 方法,三种甙的提取较完全<sup>[10]</sup>。我们用 Ahmed 方法的提取率作对照(定为 100% 提取),研究了速效提取法的效率。测得结果列在表 3,表明二种方法的提取率相同,而本法更省时间。

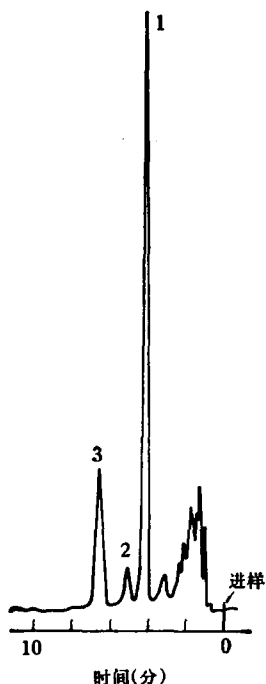


图 1 曲型样品的 HPLC 色谱图

峰号 1: Stevioside 2: Rebaudioside C  
3: Rebaudioside A.

(上接第39页)

功地构建了无肠毒素的 K88<sub>a</sub> 抗原工程菌株;(2)工程菌株具有良好免疫原特性,制成菌苗后,注射至妊娠母猪,仔猪吃了初乳,对强毒菌攻击的抵抗性高,而对对照组仔猪死亡严重;(3)成功地在受体菌克隆了 K99 抗原基因,并获得了良好表达,经动物结肠实验无毒;(4)构建的猪腹泻致病菌抗原基因重组体(K88<sub>a</sub>-

表 3

样号		原叶 1		原叶 2		提取时间
测定结果 %	Ahmed	10.53	10.53	10.57	13.87	1天
	本法	10.75	10.72	10.86	13.96	半小时
提取率% (以 Ahmed 法为 100%)		101.6	102.7	101.8	100.6	

### 四、方法的精密性

重复测定几组样品,计算出标准偏差值在 0.23%—0.37%;变异系数在 0.46—2.2%。

### 五、对实际样品的测定

用本法测定了湖南省的甜叶菊加工工艺研究的试验样品及中间半成品及产品近 200 个,典型的样品色谱图见图 1。本法在实际应用中效果良好,为准确评价各种工艺方案提供了可靠的数据。

### 参 考 文 献

- [1] 韦业成:《食品科学》,7,25,1983。
- [2] 卞咏梅:《植物生理学通讯》,3,15,1981。
- [3] 三桥博等:《药学杂志》,95(1),127,1975。
- [4] 坂本征则等:《药学杂志》,95(12),15,1975。
- [5] Jacques Metivier et al.: *J. Experimental Botany*, 30 (117), 805, 1979。
- [6] Teruaki, H. et al.: *Japan Kokai*, 75, (67), 192, C.A. 83 (1975), 110845 C.
- [7] Ahmed, M.S. et al.: *J. Chromatography*, 192, 387, 1980。
- [8] 桥本庸平:《日本特许公报》,昭 54—9991,1,25,1979。
- [9] Yonel gashimoto, et al.:《生药学杂志》,82(4),209, 1978。
- [10] Ahmed, M.S. et al.: *J. Chromatography*, 236, 523, 1982。
- [11] Dobberstein, et al.: U.S.P., 4361697, 11, 30, 1982。
- [12] Hirokado Masako, et al.:《食品卫生学杂志》,21 (6), 451,1980。
- [13] 陆德培等:《生物化学与生物物理学报》,14(5), 501, 1982。
- [14] 黄克武等:《生物化学与生物物理学报》,14(5), 508, 1982。

[本文于 1984 年 7 月 18 日收到]

K99), 转化受体菌,获得良好表达,即具有合成两种抗原能力;(5)“工程菌”及双功能“工程菌”的构建成功为研制预防猪、牛、羊幼畜腹泄病在理论上或实践上都是可行的,目前,这两个单位遵照“科学技术必须面向经济建设”的战略方针,抓紧时间,既重视基础研究,又加强其应用研究,要以更大的干劲,充满信心为早日将“工程菌苗”实用化而共同努力。(柯 为)