



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0868—2017
代替 SN/T 0868—2000

出口甜叶菊中总糖甙含量的测定

Determination of steviosides in stevia leaf for export

2017-05-12 发布

2017-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 0868—2000《进出口甜叶菊中总糖甙含量的测定方法 比色法》。

本标准与 SN/T 0868—2000 相比,主要技术变化如下:

——修改了标准名称;

——增加了高效液相色谱法作为本标准的第一法。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:曲栗、曹晨、王传现、樊祥、顾莹、盛永刚、韩丽、王敏、邓晓军。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 0868—2000。

出口甜叶菊中总糖甙含量的测定

1 范围

本标准规定了出口甜叶菊中总糖甙含量的测定方法。

本标准适用了甜叶菊中总糖甙的检测和确证。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

第一法 高效液相色谱法

3 方法提要

试样中的总糖甙用水超声提取,用带有紫外检测器的液相色谱仪(波长 200 nm)测定,以色谱峰的保留时间定性,外标法定量。

4 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 乙腈-水溶液(78+22,体积比):取 78 mL 的乙腈,加入 22 mL 的水,混匀。

4.3 标准物质:甜菊糖甙(CAS 号 57817-89-7)纯度 $\geq 98\%$ 。

4.4 标准物质:瑞鲍迪甙 A(CAS 号 58543-16-1)纯度 $\geq 98\%$ 。

4.5 标准物质:瑞鲍迪甙 C(CAS 号 63550-99-2)纯度 $\geq 98\%$ 。

4.6 标准物质:杜克甙 A(CAS 号 64432-06-0)纯度 $\geq 98\%$ 。

4.7 标准物质:甜菊双糖甙(CAS 号 41093-60-1)纯度 $\geq 93\%$ 。

4.8 甜菊糖甙标准储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取甜菊糖甙标准物质 10.0 mg(精确至 0.1 mg),用 4.2 溶液溶解,并定容至 10 mL。所配制溶液于 0℃~4℃冰箱可保存 6 个月。

4.9 瑞鲍迪甙 A 标准储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取瑞鲍迪甙 A 标准物质 10.0 mg(精确至 0.1 mg),用 4.2 溶液溶解,并定容至 10 mL。所配制溶液于 0℃~4℃冰箱可保存 6 个月。

4.10 瑞鲍迪甙 C 标准储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取瑞鲍迪甙 C 标准物质 10.0 mg(精确至 0.1 mg),用 4.2 溶液溶解,并定容至 10 mL。所配制溶液于 0℃~4℃冰箱可保存 6 个月。

4.11 杜克甙 A 标准储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取杜克甙 A 标准物质 10.0 mg(精确至 0.1 mg),用 4.2 溶液溶解,并定容至 10 mL。所配制溶液于 0℃~4℃冰箱可保存 6 个月。

4.12 甜菊双糖甙标准储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取甜菊双糖甙标准物质 10.0 mg(精确至 0.1 mg),用 4.2 溶液溶解,并定容至 10 mL。所配制溶液于 0℃~4℃冰箱可保存 6 个月。

4.13 总糖甙混合标准中间溶液:1.0 mg/mL。分别准确吸取甜菊糖甙、瑞鲍迪甙 A、瑞鲍迪甙 C、杜克甙 A 和甜菊双糖甙标准储备溶液 2 mL 于 10 mL 容量瓶中,配制成浓度为 1.0 mg/mL 混合标准中间溶液。所配制溶液于 0℃~4℃ 冰箱可保存 3 个月。

4.14 总糖甙混合标准工作溶液:根据需要吸取适量混合标准中间溶液,用 4.2 溶液稀释成适当的混合标准工作溶液。混合标准工作溶液现用现配。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪:配有二极管阵列检测器或紫外检测器。

5.2 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子(ESI)源。

5.3 分析天平:感量为 0.1 mg 和 0.01 g。

5.4 涡旋混合器。

5.5 离心机:转速不低于 4 000 r/min。

5.6 超声波清洗器。

6 分析步骤

6.1 试样处理

称取约 0.5 g 试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,用水定容至 50 mL,振荡,超声提取 15 min,吸取 500 μ L,加入 500 μ L 乙腈振荡混匀,15 000 r/min 离心 5 min,过 0.22 μ m 有机相滤膜,供 HPLC 测定。

6.2 液相色谱测定

6.2.1 色谱参考条件

色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:氨基柱,250 mm \times 4.6 mm(内径),5 μ m,或性能相当者。
- b) 柱温:室温。
- c) 流动相:乙腈-水(78+22,体积比)。
- d) 流速:0.8 mL/min。
- e) 检测波长:220 nm。
- f) 进样量:10 μ L。

6.2.2 色谱测定

在仪器最佳工作条件下,用标准工作溶液分别进样,以峰面积为纵坐标,以标准工作溶液浓度为横坐标,绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定线性范围内。在上述色谱条件下,混合标准溶液色谱图参见附录 A。

6.3 液相色谱-质谱/质谱确证

6.3.1 色谱参考条件

色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:氨基柱,150 mm \times 4.6 mm(内径),5 μ m,或性能相当者。
- b) 流动相:乙腈-水(78+22,体积比)。

- c) 流速:0.5 mL/min;
d) 进样量:5 μ L。

6.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 电离方式:电喷雾电离,负离子。
b) 扫描方式:选择反应监测(SRM)。
c) 雾化气、气帘气、辅助加热气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体;使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求,参考质谱条件参见附录 B 中表 B.1,五种甜菊糖甙标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图见附录 C。

6.3.3 定性测定

按照液相色谱-质谱/质谱条件测定样品和标准工作溶液,如果检测的质量色谱峰保留时间与标准品一致,定量测定时采用标准曲线法测定。定性时应当与浓度相当标准工作溶液的相对丰度一致,相对离子丰度允许偏差不超过表 1 的规定的范围,则可判定样品中存在对应的被测物。

5 种甜菊糖甙标准溶液的多反应监测色谱图参见附录 C。

表 1 液相色谱-串联质谱法确证试验时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
允许的相对偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

6.4 空白试验

除不加试样外,均按以上操作步骤进行。

7 结果计算和表述

试样中甜菊糖甙的含量按式(1)进行计算:

$$X = \frac{c \times V}{m \times 1\,000} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X ——试样中甜菊糖甙的含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);
 c ——样液中甜菊糖甙的测定值,单位为微克每毫升(μ g/mL);
 V ——试样的最后定容体积,单位为毫升(mL);
 m ——试样质量,单位克(g);
1 000 ——由 μ g/mL 换算成 mg/mL 的换算因子;
100 ——由 mg/g 换算成 mg/100g 的换算因子。

甜菊糖甙、瑞鲍迪甙 A、瑞鲍迪甙 C、杜克甙 A 和甜菊双糖甙各组分之和即为总糖甙含量。

8 定量限和回收率

8.1 定量限

甜叶菊中的甜菊糖甙、瑞鲍迪甙 A、瑞鲍迪甙 C、杜克甙 A 和甜菊双糖甙的定量限为 0.05%。

8.2 回收率

试样添加浓度及回收率试验数据见表 2。

表 2 试样中甜菊糖甙、瑞鲍迪甙 A、瑞鲍迪甙 C、杜克甙 A 和甜菊双糖甙的回收率

添加浓度/%	回收率范围/%				
	甜菊糖甙	瑞鲍迪甙 A	瑞鲍迪甙 C	杜克甙 A	甜菊双糖甙
0.05	81.6~92.8	82.8~95.2	84.8~104.2	84.8~103.6	80.2~91.2
0.5	83.4~101.6	80.8~93.4	83.4~98.6	82.4~94.2	78.6~101.2
5.0	82.4~94.6	82.4~106.4	80.8~96.2	82.8~95.2	79.6~92.2

第二法 比色法

9 方法提要

甜叶菊叶经沸水煮沸,用硫酸铝沉淀和正丁醇提取,以除去样品中色素、还原糖及其他杂质,得到的总糖甙水溶液与蒽酮-硫酸溶液共同加热,生成绿色的络合物,比色法测定样品中的总糖甙,外标法定量。

10 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 10.1 硫酸铝:化学纯。
- 10.2 水饱和正丁醇:将正丁醇用水饱和后备用。
- 10.3 蒽酮显色剂:精确称取 0.20 g 蒽酮,溶于 100 mL 75%硫酸溶液中(需用时现配)。
- 10.4 标准物质:甜菊糖甙(CAS 号 57817-89-7)纯度 $\geq 98\%$ 。
- 10.5 标准物质:瑞鲍迪甙 A(CAS 号 58543-16-1)纯度 $\geq 98\%$ 。
- 10.6 标准物质:瑞鲍迪甙 C(CAS 号 63550-99-2)纯度 $\geq 98\%$ 。
- 10.7 标准物质:杜克甙 A(CAS 号 64432-06-0)纯度 $\geq 98\%$ 。
- 10.8 标准物质:甜菊双糖甙(CAS 号 41093-60-1)纯度 $\geq 93\%$ 。
- 10.9 甜菊糖甙标准储备溶液:2.5 mg/mL。准确称取甜菊糖甙标准物质 25 mg(精度至 0.1 mg),用水溶解并定容至 10 mL。所配制溶液于 0℃~4℃冰箱可保存 6 个月。
- 10.10 瑞鲍迪甙 A 标准储备溶液:2.5 mg/mL。准确称取瑞鲍迪甙 A 标准物质 25 mg(精确至 0.1 mg),用水溶解并定容至 10 mL。所配制溶液于 0℃~4℃冰箱可保存 6 个月。
- 10.11 瑞鲍迪甙 C 标准储备溶液:2.5 mg/mL。准确称取瑞鲍迪甙 C 标准物质 25 mg(精确至 0.1 mg),用水溶解并定容至 10 mL。所配制溶液于 0℃~4℃冰箱可保存 6 个月。
- 10.12 杜克甙 A 标准储备溶液:2.5 mg/mL。准确称取杜克甙 A 标准物质 25 mg(精确至 0.1 mg),用水溶解并定容至 10 mL。所配制溶液于 0℃~4℃冰箱可保存 6 个月。
- 10.13 甜菊双糖甙标准储备溶液:2.5 mg/mL。准确称取甜菊双糖甙标准物质 25 mg(精确至 0.1 mg),用水溶解并定容至 10 mL。所配制溶液于 0℃~4℃冰箱可保存 6 个月。
- 10.14 总糖甙混合标准工作溶液:0.5 mg/mL。分别准确吸取甜菊糖甙、瑞鲍迪甙 A、瑞鲍迪甙 C、杜

克甙 A 和甜菊双糖甙标准储备溶液 400 μL 于 10 mL 容量瓶中,用水定容至 10 mL,配制成浓度为 0.5 mg/mL 总糖甙混合标准工作溶液。所配制溶液于 0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱可保存 3 个月。

11 仪器和设备

11.1 分光光度计。

11.2 分析天平,感量 0.1 mg 和 0.01 g。

11.3 超纯水制备系统。

11.4 旋转蒸发器。

12 分析步骤

12.1 试样处理

称取样品 1 g(精确至 0.01 g)于 150 mL 烧杯中,加入 60 mL 预先煮沸的蒸馏水,用玻璃棒搅拌浸湿。在沸水浴中加热 1 h。取出,过滤至 250 mL 容量瓶中,滤纸上的残渣用 60 mL 热水洗入原烧杯中,在水浴中加热 1 h,过滤于 250 mL 容量瓶中,重复操作 4 次。滤液合并于同一 250 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。

吸取上述滤液 25 mL 于 100 mL 烧杯中,加入 0.2 g 硫酸铝(10.1)。待溶解后,用碱调节 pH=7,静置 1 h。将此溶液过滤于 125 mL 分液漏斗中。用水洗涤残渣,最后使体积成 50 mL。用水饱和正丁醇(10.2)50 mL,25 mL,25 mL 分三次提取,提取液收集于 125 mL 鸡心瓶中,在旋转蒸发器上浓缩至干,用蒸馏水溶解浓缩物并移入 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。

12.2 测定

吸取 10 mL 蒽酮显色剂(10.3)于 25 mL 比色管中,将比色管移入冰浴中冷却 10 min 后,准确加入 1 mL 样液,并用玻璃棒不断搅拌,使溶液混合均匀。

取 6 支 25 mL 试管,分别加入 10 mL 蒽酮显色剂,放入冰浴中,分别吸取总糖甙混合标准工作溶液 0.00 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.30 mL、0.40 mL、0.50 mL 于试管内,分别加水 1.00 mL、0.90 mL、0.80 mL、0.70 mL、0.60 mL、0.50 mL,用玻璃棒搅拌均匀,将样品溶液、试剂空白液及总糖甙混合标准工作溶液的试管放入沸水浴中加热 10 min,并不断搅拌。取出,于冰浴中冷却至室温。以蒽酮试剂作空白,于 610 nm 处 1 cm 比色皿测吸光度,以标准系列的总糖甙含量(mg/mL)为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制标准曲线。样品溶液测出的吸光值与标准曲线比较求出含量。

13 结果计算和表述

按式(2)计算试样中的总糖甙含量:

$$X = \frac{c \times 250 \times 100}{m \times 25} \times \frac{100}{1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X ——试样中总糖甙含量,单位为克每百克(g/100 g);

c ——样液中甜菊糖甙的测定值,单位为毫克每毫升(mg/mL);

m ——试样质量,单位克(g);

1 000 ——由 mg/mL 换算成 g/mL 的换算因子;

100 ——由 g/g 换算成 g/100 g 的换算因子。

附 录 A
(资料性附录)
标准溶液液相色谱图

标准溶液液相色谱图见图 A.1。

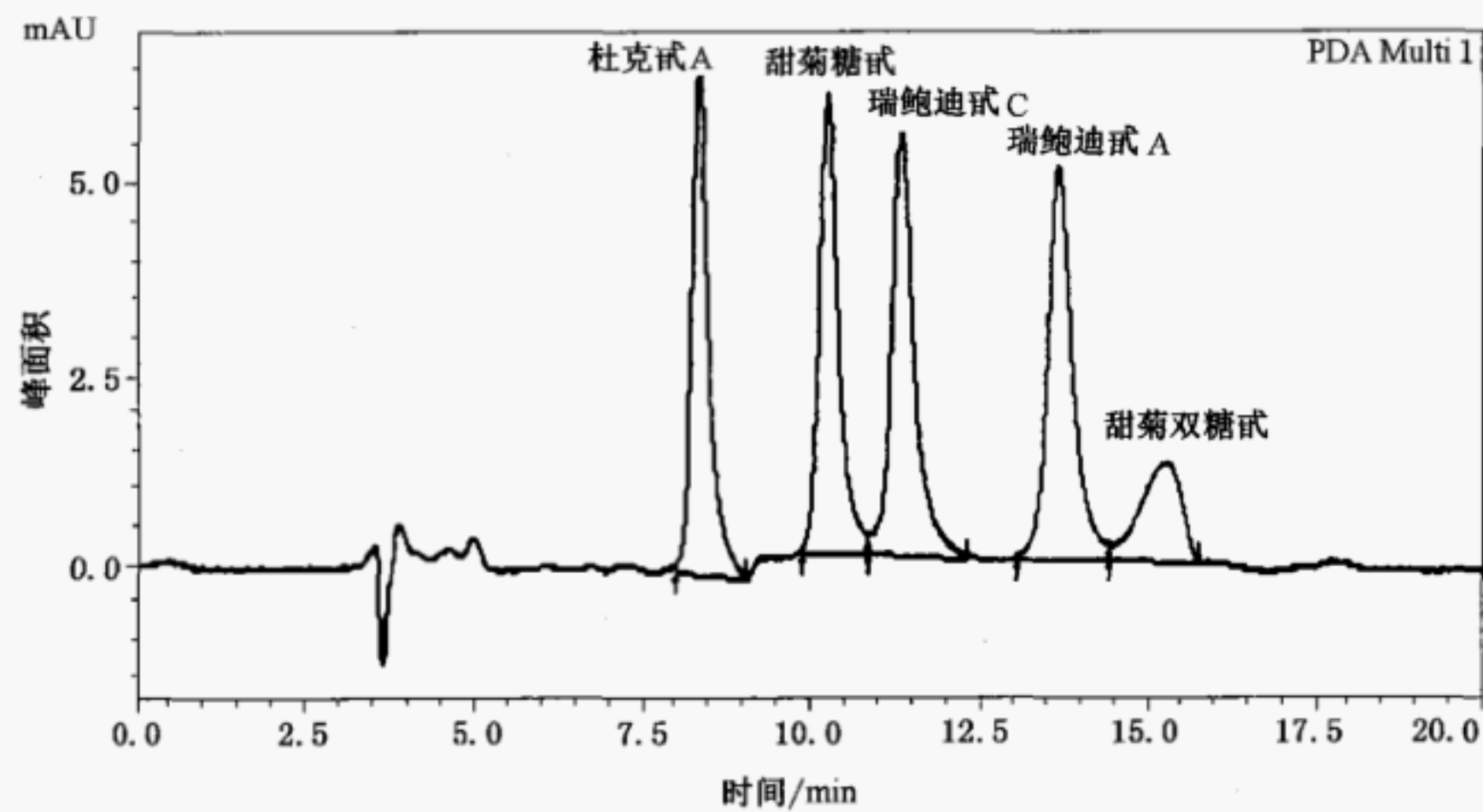


图 A.1 甜菊糖甙、瑞鲍迪甙 A、瑞鲍迪甙 C、杜克甙 A 和甜菊双糖甙标准溶液液相色谱图(10 $\mu\text{g/mL}$)

附 录 B
(资料性附录)
质谱参考条件

质谱参考条件:

- a) 电喷雾电压: -4 500 V;
- b) 离子源温度 500 °C;
- c) 雾化器压力 65 psi(14.5 psi=100 kPa);
- d) 气帘气压力 35 psi(14.5 psi=100 kPa)。

表 B.1 定性离子对、定量离子对、去簇压力及碰撞能量

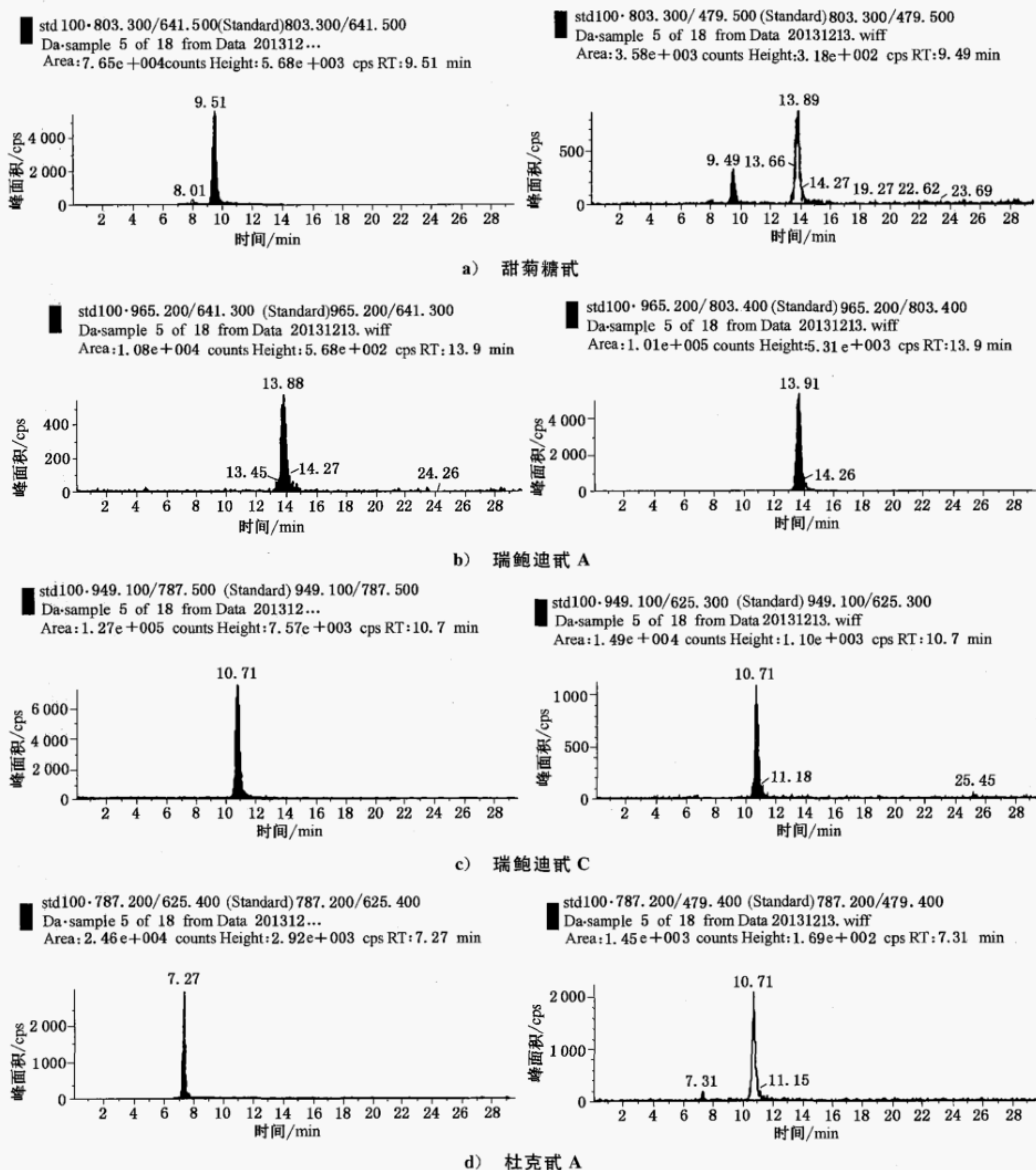
甜菊糖甙类 化合物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇压力 E/V	碰撞气能量 E/V	碰撞室出口电压 E/V
甜菊糖甙 Stevioside	803.3/641.5 803.3/479.5	803.3/641.5	-88	-33 -79	-17 -19
瑞鲍迪甙 A Rebaudioside A	965.2/641.3 965.2/803.4	965.2/803.4	-150	-82.5 -36	-15 -26
瑞鲍迪甙 C Rebaudioside C	949.1/787.5 949.1/625.3	949.1/787.5	-141	-42 -81	-21 -15
杜克甙 A Dulcoside	787.2/625.4 787.2/479.4	787.2/625.4	-126	-27 -72	-16 -12
甜菊双糖甙 Steviolbioside	641.2/479.2 641.2/317.1	641.2/479.2	-172	-54 -64	-13 -20

附录 C

(资料性附录)

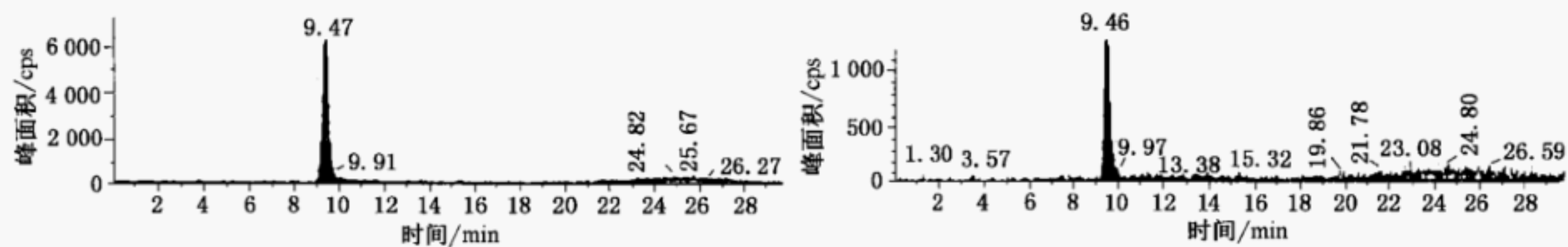
五种甜菊糖甙标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图

五种甜菊糖甙标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图见图 C.1。

图 C.1 五种甜菊糖甙标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图(浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$)

std100-641.200/479.200 (Standard) 641.200/479.200
 Da-sample 5 of 18 from Data 20131213.wiff
 Area:1.05e+005 counts Height:6.96e+003 cps RT: 9.47 min

std100-641.200/317.100 (Standard) 641.200/317.100
 Da-sample 5 of 18 from Data 20131213.wiff
 Area:1.84e+004 counts Height:1.26e+003 cps RT:9.46 min



e) 甜菊双糖甙

图 C.1 (续)

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
出口甜叶菊中总糖甙含量的测定
SN/T 0868—2017

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

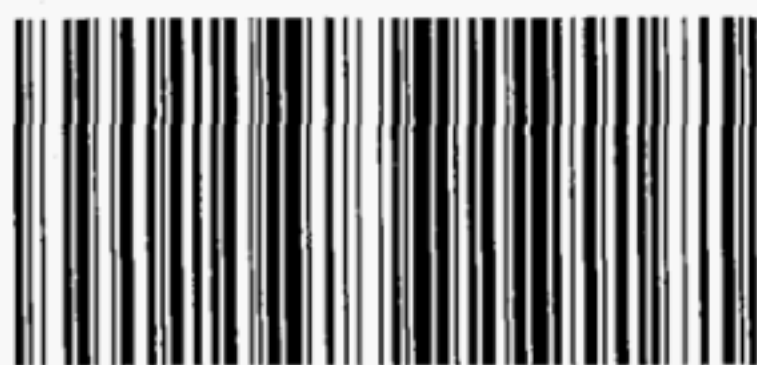
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字
2018年5月第一版 2018年5月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066·2-32820 定价 18.00 元



SN/T 0868—2017