

文章编号:1000-8551(2020)11-2533-08

甜叶菊中莱苞迪苷 D、莱苞迪苷 A 含量测定方法的优化及应用

郭志龙^{1,2} 陈 任^{1,2} 马 茜² 孙 放² 张 虹^{1,2} 张自萍^{1,2,*}(¹宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室,宁夏 银川 750021; ²宁夏大学生命科学学院,宁夏 银川 750021)

摘 要:为比较不同品系甜叶菊中甜味品质较好的莱苞迪苷 D(RD)、莱苞迪苷 A(RA)含量组成,在传统 C18、HSS T3、Amide 色谱柱中选择适宜固定相建立高效液相色谱(HPLC)方法进行测定与分析。结果表明,HSS T3 柱对甜菊糖苷选择性较好,可同时分离 RA、甜菜苷(ST)、莱苞迪苷 F(RF)、莱苞迪苷 C(RC)、甜茶苷(RBS)、莱苞迪苷 B(RB)、甜菊双糖苷(SB),其 HPLC 分析参数为:流动相 32% 乙腈和 68% 磷酸水(0.01%),等度洗脱,柱温 40℃,波长 210 nm,进样量 10 μ L,流速 1.0 mL \cdot min⁻¹;Amide 柱对 RD 分离能力最佳,其 HPLC 分析参数为:流动相 76% 乙腈和 24% 水,等度洗脱,柱温 40℃,波长 210 nm,进样量 10 μ L,流速 0.8 mL \cdot min⁻¹。分析比较 12 个扦插培育的甜叶菊品系,以编号 2 甜叶菊中 RD 含量及其占比最高,提示以其为原材料可生产含 RD 较高的甜菊糖苷;编号 3、5、7、11 甜叶菊中具较高含量的甜菊糖苷(主要为 RA),提示这些品种富含 RA 且甜菊糖苷产量较高;编号 1、8 甜叶菊中 RA+RD 占比较高,提示以其为原材料的甜菊糖苷甜味品质较好。本研究所建立的 HPLC 法为甜叶菊中 RD、RA 分析研究提供了方法参考,含量分析结果可为实际应用中选择适宜甜叶菊品种提供依据。

关键词:甜叶菊;莱苞迪苷 D;莱苞迪苷 A;高效液相色谱(HPLC)

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.11.2533

随着生活水平的不断提高,低糖健康饮食逐渐成为人们所追求的目标,甜菊糖苷因具有高甜度、低热量的特性引起了高度关注^[1-2]。甜叶菊 [*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.] 含有莱苞迪苷(rebaudioside, R) A、C、D、E,甜菊苷(stevioside, ST)以及杜尔可苷(dulcoside, D) A、C 等多个种类甜菊糖苷^[3]。由于不同种类甜菊糖苷在甜菊醇骨架上所连糖残基种类、数量不同^[4],因此表现出不同的甜度和口感,其中 RD、RA 甜味品质较好^[5]。另外, RD 和 RA 含量的占比是目前衡量甜叶菊品质的主要指标之一。不同品种甜叶菊生产的甜菊糖苷产品的糖苷组成及含量不同,导致产品的甜味品质也不同,因此选择适宜的甜叶菊品种进行产品开发显得极为重要。

甜菊糖苷的分析测定方法有毛细管电泳^[6]、红外光谱^[7]、高效液相色谱(high performance liquid

chromatography, HPLC)等,以 HPLC 为主,现有分析测定甜叶菊中 RA 的 HPLC 法主要以 C18 色谱柱为固定相,但 RA 在 C18 柱上的分离效果并不稳定,在流动相组成同为乙腈/水的条件下,周文清^[8]采用 C18 色谱柱可使 RA 与 ST 基线分离,而 Martins 等^[3]的研究中 RA 与 ST 之间分离度则较差。流动相组成同为乙腈/磷酸水的条件下,朱吟吟等^[9]研究发现, RA 与 ST 在 C18 色谱柱上分离度较好,而 Amery 等^[10]采用两根 ODS 柱串联的方式未使 RA 与 ST 完全分离。流动相组成同为乙腈/磷酸钠缓冲液条件下,GB 8270-2014^[11]、彭应枝等^[12]研究中 RA 与 ST 在 C18 色谱柱上可达到基线分离,而 Chaturvedula 等^[13]研究中即使通过改变柱温,也不能使 RA 和 ST 完全分离, Kovačević 等^[14]以乙腈/磷酸钾缓冲液为流动相也未实现 C18 色谱柱上 RA 与 ST 基线分离。NH₂ 色谱柱

收稿日期:2019-05-30 接受日期:2019-09-16

基金项目:宁夏大学引进人才科研启动项目(BQC2012001)

作者简介:郭志龙,男,主要从事天然产物研究与开发。E-mail:1793812497@qq.com

* 通讯作者:张自萍,女,教授,主要从事天然产物研究与开发。E-mail:zipingzhang@163.com

在 RA 的 HPLC 检测中也有应用^[15-16], 但该色谱柱存在柱寿命短、柱平衡耗时长以及重复性较差等问题。RD 在甜叶菊中含量相对较少, 已有关于 RD 的 HPLC 法多为甜菊糖苷产品中 RD 的测定, Rodenburg 等^[17]虽然考察了不同色谱方法下 RD 与其他多种甜菊糖苷标准品的分离效果, 但由于甜叶菊中含有氨基酸、有机酸、色素等杂质成分^[18], 尚不明确这些方法是否适用于甜叶菊中 RD 的测定。虽然已有关于 HPLC 法测定甜叶菊中 RD 的研究报道, 但 Arandagonzález 等^[19]和 Bergs 等^[20]研究表明 RD 并不能在 C18 色谱柱上与其他组分完全分离。

传统 C18 柱是一种键合十八烷基官能团的色谱柱, 对弱极性物质具有较好的保留能力; HSS T3 色谱柱为 Waters 公司采用 T3 bonding 以及先进的封端技术获得的一款新型 C18 色谱柱, 极性范围跨度大, 可 100% 兼容水相且对极性化合物有很好的保留能力; Amide 色谱柱属亲水作用液相色谱, 其以强极性官能团为固定相, 高比例有机相为流动相, 保留机理虽与氨基键合相色谱柱类似, 却具有比氨基键合相色谱柱更长的柱寿命, 也避免了氨基柱中重复性较差、柱平衡耗时的问题^[20]。由于甜菊糖苷是一类极性较强的化合物, 本研究尝试以传统 C18、HSS T3 和 Amide 3 种类型色谱柱为固定相, 建立并优化适用于甜叶菊中 RA、RD 不同种类甜菊糖苷的 HPLC 分析测定方法, 通过对 12 个扦插培育的不同品系甜叶菊中甜菊糖苷进行含量测定与分析, 旨在为实际应用中选择适宜的甜叶菊品种进行产品开发利用提供借鉴和指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

12 个甜叶菊品系均由宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室提供, 利用植物培养专用智能温室 (光照: 自然光照; 温度: $25 \pm 5^\circ\text{C}$; 湿度: $70\% \pm 20\%$) 同时扦插培育, 将各品系甜叶菊叶片于相同时间 (2018 年 8 月 6 日, 开花前) 分别采摘, 自然阴干后, 粉碎过 40 目筛备用。

甜菊苷 (ST)、莱菔迪苷 A (RA)、莱菔迪苷 B (RB)、莱菔迪苷 C (RC)、莱菔迪苷 D (RD) 标准品, 纯度 98%, 甜茶苷 (rubusoside, RBS), 纯度 $\geq 98\%$, 上海甄准生物科技有限公司; 莱菔迪苷 E (RE), 纯度 Grade P, 美国 Chromadex 公司; 莱菔迪苷 F (RF), 纯度 72.5%, 杜尔可苷 A (DA)、甜菊双糖苷 (steviolbioside, SB), 纯度 98%, 日本 Wako 公司; 甲醇、乙腈 (色

谱), 美国 Fisher 公司。

1.2 主要仪器与试剂

CQ-250-DST 超声波清洗机, 上海跃进医用光学器械厂; RE-52A 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; Visiprep 真空固相萃取装置, 美国 Supelco 公司; Waters XBridge® C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)、Waters Xselect® HSS T3 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)、Waters XBridge® BEH Amide 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)、2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品溶液的制备 取 0.2 g 甜叶菊叶片粉末, 加入 5 mL 70% 乙醇, 于 60°C 水浴超声提取 30 min, $2\,400\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。重复提取 2 次, 合并上清液常压过滤, 收集滤液于 45°C 减压浓缩至 5 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤后进行固相萃取 (solid-phase extraction, SPE) 纯化处理。

参考 Bovanová 等^[21] 和 Woelwer-Rieck 等^[22] 的 SPE 处理方法并略做改进, 具体操作如下: 先用 10 mL 甲醇活化 SPE C18 小柱 (Waters Sep-Pak® Vac 6cc, 1 g), 然后加入 5 mL 水置换甲醇, 取样品溶液 2.5 mL 上样, 依次用 5 mL 水和 8 mL 25% 乙腈淋洗, 最后加入 2.5 mL 80% 乙腈解析, 收集解析液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后进行 HPLC 分析。

1.3.2 HPLC 方法的建立及优化

1.3.2.1 色谱柱的选择 通过对比分析 C18、HSS T3 和 Amide 3 种不同色谱柱对甜叶菊中甜菊糖苷的分离效果, 选择确定适宜的色谱柱为固定相建立并优化色谱分析条件。

1.3.2.2 色谱分析条件的建立及优化 在 1.3.2.1 试验结果的基础上确定适宜的色谱柱为固定相, 摸索建立甜叶菊中甜菊糖苷含量测定的色谱分析条件, 并对流动相组成、柱温、洗脱方式、流速等色谱条件进行优化, 从而确定适用于甜叶菊中甜菊糖苷分离测定的 HPLC 方法。

1.3.2.3 色谱分析方法学评价

(1) 线性关系。依次配制 100、500、1 000、3 000、6 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度梯度的 RA 标准品溶液; 93.75、187.50、375.00、750.00、1 500.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度梯度的 ST 标准品溶液; 187.5、375.0、750.0、1 500.0、3 000.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度梯度的 RC 标准品溶液; 135.94、271.88、543.76、1 087.50、2 175.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度梯度的 RF 标准品溶液, 之后进行 HPLC 分析; 依次配制 31.25、62.50、125.00、250.00、500.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度梯度的

RD 标准品溶液,之后进行 HPLC 分析。

(2)精密度。取甜菊糖苷混合标准品溶液分别在色谱柱上重复进样 5 次,以峰面积计算 RA、ST、RF、RC、RD 甜菊糖苷的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

(3)重复性。分别取 0.2 g 甜叶菊叶粉末共 6 份,平行制备 6 份样品溶液,进行 HPLC 分析,以峰面积计算各甜菊糖苷组分的 RSD。

(4)稳定性。取甜菊糖苷样品溶液,分别于 4℃ 放置 0、4、8、12、24 h 后进行 HPLC 分析,考察样品溶液的稳定性。

(5)准确度。分别取 0.2 g 甜叶菊样品粉末共 5 份,平行制备 5 份样品溶液,分别添加适量的 RA、ST、RC、RF、RD 标准品溶液后进行 HPLC 分析,计算各甜菊糖苷的平均回收率。

(6)检测限和定量限。依次取 RA、ST、RC、RF、RD 标准品溶液进行 HPLC 分析,测其保留时间处的响应值与基线噪音值,计算信噪比,以信噪比约为 3:1 时的浓度作为检测限,以信噪比约为 10:1 时的浓度作为定量限。

1.3.3 不同品系甜叶菊中甜菊糖苷含量测定与分析
取 12 个品系甜叶菊叶粉末各 0.2 g,按 1.3.1 方法

制备样品溶液,依次进行 HPLC 分析。

1.4 数据分析

采用 Microsoft Excel 2016 进行试验数据的整理和计算,采用 Empower 2 软件以及 GIMP 2 软件进行图像处理。

2 结果与分析

2.1 HPLC 方法的建立及优化

2.1.1 色谱柱的确定 本试验首先参照 GB 8270-2014^[11]中 HPLC 条件考察了传统反向 C18 色谱柱对 RA 的分离能力,结果表明,RA 标准品(图 1-A)与甜叶菊中 RA(图 1-B)均不能在 C18 色谱柱上与 ST 基线分离,表明 C18 色谱柱对甜菊糖苷的选择性较差,不适用于测定甜叶菊中的 RA。

为改善 RA 的分离效果,选择了对极性化合物保留能力比较强的新型反向 HSS T3 色谱柱,结果表明,RA 标准品(图 1-C)以及甜叶菊中 RA(图 1-D)均能在 HSS T3 色谱柱上与 ST 基线分离,而且色谱峰整体分离度也优于 C18 色谱柱,解决了 C18 色谱柱上 RA 和 ST 分离度差的问题,表明 HSS T3 色谱柱可用于测定甜叶菊中的 RA。

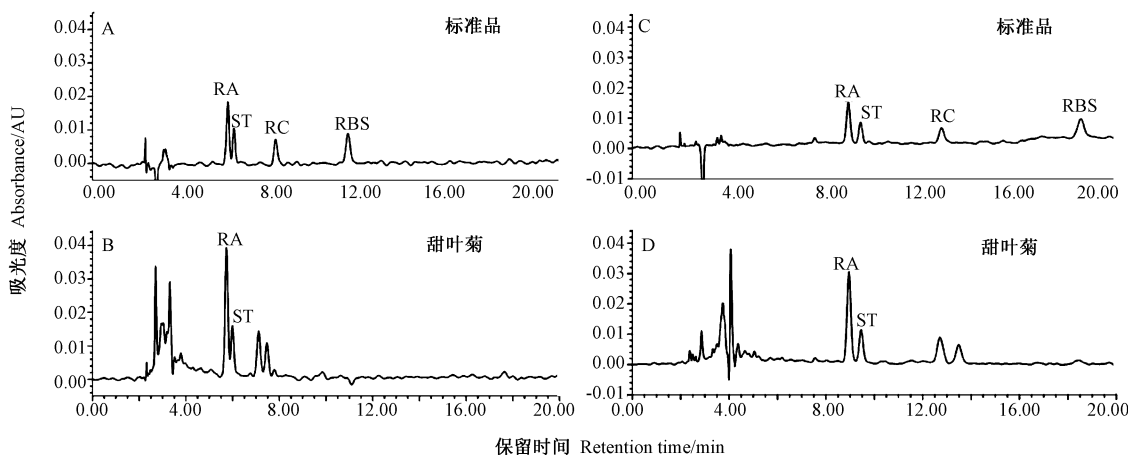


图 1 RA、ST 标准品以及甜叶菊中 RA、ST 在 C18(A、B) 色谱柱和 HSS T3(C、D) 色谱柱上的 HPLC 效果

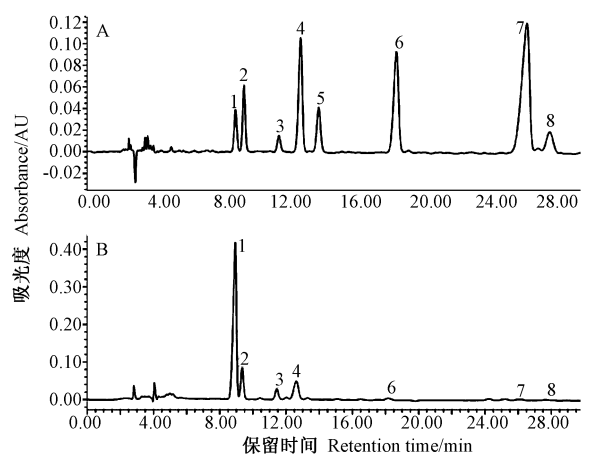
Fig.1 HPLC chromatograms of RA, ST in reference standard and *Stevia rebaudiana* Bertoni on C18 (A, B) and HSS T3 (C, D) columns

进一步试验发现 HSS T3 色谱柱可同时分离 RA、ST、RF、RC、DA、RBS、RB、SB 8 种标准物(图 2-A),还可同时分离甜叶菊中 RA、ST、RF、RC、RBS、RB、SB 7 种甜菊糖苷(图 2-B)。

但 RD 在 HSS T3 柱上的分离效果并不理想,RD 出峰时间过于靠前,不仅标准品 RD、RE 之间分离度较差(图 3-A),而且由于甜叶菊中 RD 含量较低,杂峰

干扰严重(2~4 min),无法采用 HSS T3 对甜叶菊中的 RD 含量进行测定(图 3-B)。

Amide 为一种亲水作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)模式的色谱柱,其保留机理与传统正相液相色谱类似,通过试验发现 Amide 柱上不仅可以避免标准品 RD 和 RE 间分离度较差的问题(图 3-C),而且甜叶菊中 RD 也可与其



Note: 1: RA. 2: ST. 3: RF. 4: RC. 5: DA. 6: RBS. 7: RB. 8: SB.

图 2 多个种类甜菊糖苷标准品(A)和甜叶菊(B)在 HSS T3 柱上的 HPLC 效果

Fig.2 HPLC chromatograms of various steviol glycosides reference standards (A) and *Stevia rebaudiana* Bertoni (B) on HSS T3 column

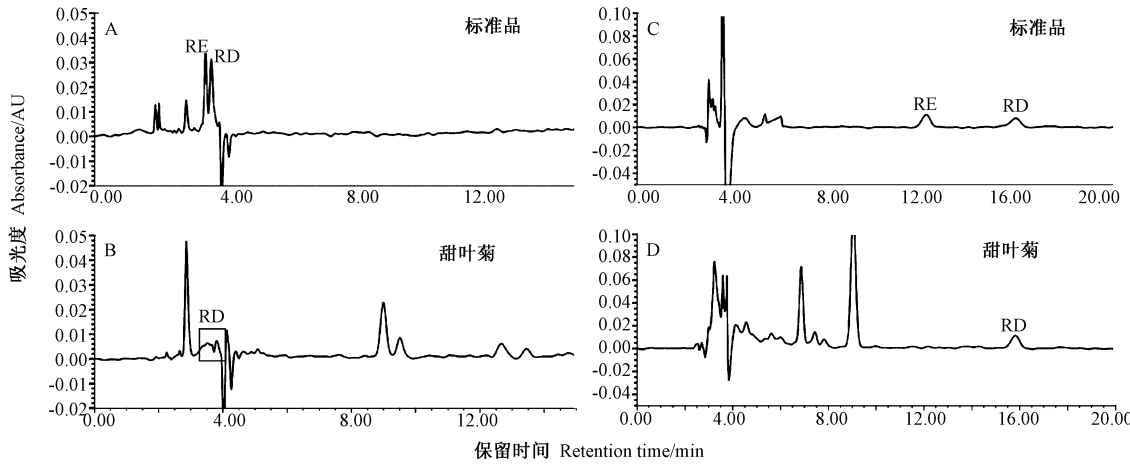


图 3 RD、RE 标准品以及甜叶菊中心 RD、RE 在 HSS T3 色谱柱 (A、B) 和 Amide 色谱柱 (C、D) 上的 HPLC 效果

Fig.3 HPLC chromatograms of RD, RE in reference standard and *Stevia rebaudiana* Bertoni on HSS T3 (A, B) and Amide (C, D) columns

2. 1. 3 色谱分析方法学评价 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归分析, 得 RA 回归方程为 $y = 1\,419.2x + 133\,826$, $r = 0.999\,1$, 线性范围 $100.00 \sim 6\,000.00\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ST 回归方程为 $y = 2\,437.9x + 44\,502$, $r = 0.999\,5$, 线性范围 $93.75 \sim 1\,500.00\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; RC 回归方程为 $y = 530.49x - 6\,288.8$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 $187.50 \sim 3\,000.00\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; RF 回归方程为 $y = 1\,745.6x + 3\,933.9$, $r = 0.999\,4$, 线性范围 $135.94 \sim 2\,175.00\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; RD 回归方程为 $y = 456x + 6\,511.1$, $r = 0.999\,7$, 线性范围 $31.25 \sim 500.00\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 结果表明该色谱分析条件下 RA、ST、RC、RF、RD 的线性关系良好。

他杂质成分达到基线分离(图 3-D)。因此,后续试验采用 Amide 色谱柱对甜叶菊中 RD 含量进行测定。

2. 1. 2 色谱分析条件的确定 对比分析 C18、HSS T3、Amide 3 种色谱柱对甜叶菊中甜菊糖苷的分离效果,选择 HSS T3 和 Amide 色谱柱为固定相,通过对流动相组成、柱温、洗脱方式、流速等色谱条件进行优化,确定甜叶菊中甜菊糖苷类化合物的色谱分析条件为:

以 HSS T3 色谱柱为固定相,乙腈:0.01%磷酸 = 32:68(v:v)为流动相,等度洗脱,柱温 40°C ,检测波长 $210\ \text{nm}$,进样量 $10\ \mu\text{L}$,流速 $1.0\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,采用该 HPLC 方法可对甜叶菊中 RA、ST、RF、RC、RBS、RB、SB 7 种甜菊糖苷进行检测分析。

以 Amide 色谱柱为固定相,乙腈:水 = 76:24(v:v)水为流动相,等度洗脱,柱温 40°C ,检测波长 $210\ \text{nm}$,进样量 $10\ \mu\text{L}$,流速 $0.8\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,采用该 HPLC 方法对甜叶菊中 RD 进行检测分析。

由表 1 可知,精密度、重复性、稳定性试验结果 RSD 值均小于 3%,表明该色谱分析条件精密度、重复性、稳定性良好;该色谱分析条件准确度良好。经测定分析,RA、ST、RC、RF、RD 的检测限依次为 30.00、25.33、56.85、41.78、9.98 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RA、ST、RC、RF、RD 的定量限依次为 100.00、93.75、187.50、135.94、31.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2. 2 不同品系甜叶菊中甜菊糖苷含量测定与分析

采用以 HSS T3 色谱柱和 Amide 色谱柱分别为固定相的 HPLC 方法对 12 个扦插培育的不同品系甜叶菊中甜菊糖苷进行分析测定。由表 2 可知,12 个品系中均含有 RA、ST、RF、RC;编号为 1、2、3、4、5、6、7、8、

表 1 精密度、重复性、稳定性以及准确度试验结果

Table 1 The result of precision, repeatability, stability and accuracy / %						
评价方法 Measurement estimation	评价指标 Evaluation index	RA	ST	RC	RF	RD
精密度 Precision	RSD	1.76	1.45	2.11	1.17	2.41
重复性 Repeatability	RSD	1.74	2.05	2.49	2.45	2.39
稳定性 Stability	RSD	1.54	1.88	2.15	2.06	2.09
准确度 Accuracy	平均回收率 Average recovery rate	100.33	102.32	98.47	96.02	103.12
	RSD	2.09	2.53	1.78	1.08	2.20

表 2 12 个甜叶菊品系中所含甜菊糖苷种类
Table 2 The species of steviol glycosides in 12 different *Stevia rebaudiana* Bertoni strains

编号 Number	RA	ST	RF	RC	DA	RBS	RB	SB	RD	RE
1	√	√	√	√	-	-	√	-	√	-
2	√	√	√	√	-	-	-	√	√	-
3	√	√	√	√	-	-	√	√	√	-
4	√	√	√	√	√	-	-	-	√	-
5	√	√	√	√	-	√	√	√	√	-
6	√	√	√	√	√	-	-	√	√	-
7	√	√	√	√	-	-	√	√	√	-
8	√	√	√	√	-	-	-	√	√	-
9	√	√	√	√	√	-	-	-	-	-
10	√	√	√	√	√	√	-	-	√	-
11	√	√	√	√	-	-	-	√	-	-
12	√	√	√	√	-	-	-	-	-	-

注:“√”表示检测出;“-”表示未检测出。下同。
Note: ‘√’ means detected. ‘-’ means no detected. The same as following.

10 的 9 个品系中含有 RD;编号 4、6、9、10 中含有 DA;编号 1、3、5、7 中含有 RB;编号 2、3、5、6、7、8、11 中含有 SB;含有 RBS 的只有编号 5 和编号 10 两个品系,在 12 个品系中均未检测出 RE。表明不同品系甜叶菊所含甜菊糖苷种类有所差异。

对 12 个甜叶菊品系中含量相对较多的 RA、ST、RF、RC、RD 进行定量分析,由表 3 可知,12 个不同品系中甜菊糖苷总量介于 63.36~167.31 mg·g⁻¹之间,其中 RA 含量介于 23.10~113.22 mg·g⁻¹之间,ST 含

量介于 1.47~40.13 mg·g⁻¹之间,RC 含量介于 5.44~31.57 mg·g⁻¹之间,RF 含量介于 4.22~15.40 mg·g⁻¹之间,RD 含量介于 0~10.28 mg·g⁻¹之间。

甜叶菊中的 RD 占比、RA 占比以及 RD+RA 占比可作为衡量甜叶菊品质的主要指标之一。编号 1、8 中 RA+RD 占比较高,RA+RD 占比分别为 73.60%和 73.69%,RA 占比分别为 66.14%、63.92%,RD 占比分别为 7.46%、9.77%,提示以编号 1 和 8 的甜叶菊品系为材料生产甜菊糖苷产品甜味品质较好;编号为 11、7、5、3 的 4 个品系中甜菊糖苷总量及 RA 占比较高,甜菊糖苷总量分别为 167.31、145.88、153.71、140.71 mg·g⁻¹,RA 含量分别为 113.22、101.18、100.06、95.16 mg·g⁻¹,RA 占比分别为 67.67%、69.36%、65.10%、67.63%;编号 2、8、1 甜叶菊品系中 RD 含量较高,分别为 10.28、8.02、5.40 mg·g⁻¹,且 RD 占比分别为 16.22%、9.77%、7.46%,以编号 2 甜叶菊品系中 RD 含量及占比最高,说明以编号 2 的甜叶菊品系为原材料可生产高含量的 RD。综上,12 个扦插培育的不同品系甜叶菊中 RD、RA 含量组成有较大差异,实际产生中应根据需要选择适宜的甜叶菊品种加以应用。

3 讨论

反相高效液相色谱在天然产物检测分析中扮演着主要角色,其中 C18 色谱柱在甜菊糖苷的分离检测中应用最多,本研究首先考察了 C18 色谱柱对 RA 的分离能力,结果发现,RA 与 ST 不能在 C18 色谱柱上基线分离,与 Chaturvedula 等^[13]和 Kovačević 等^[14]的研究结果一致。为改善 RA 的分离效果,本研究尝试采用一种新型的反向色谱柱——HSS T3 色谱柱,该色谱柱采用先进的 T3 键合技术,对极性化合物保留能力强于 C18 色谱柱,结果表明,相同进样浓度条件下,HSS T3 色谱柱不仅实现了 RA、ST 基线分离,避免了 C18 色谱柱上 RA、ST 之间分离度差的问题,还可同时分离甜叶菊中 RF、RC、RBS、RB、SB 等多种甜菊糖苷。而反向色谱分离模式的 HSS T3 色谱柱却对甜叶菊中 RD 选择性较差,为改善 RD 的分离效果,本研究尝试采用一种 HILIC 分离模式的色谱柱——Amide 柱,该色谱柱保留机理与 NH₂ 柱类似,为正相色谱在水溶性流动相领域的延伸;正相液相色谱是基于溶质在极性固定相和非极性流动相表面之间的亲水效应建立的一种色谱模式,结果显示,不仅 RD、RE 标准品分离度较好,而且甜叶菊中 RD 也可与杂质组分达到基线分离,

表 3 12 个甜叶菊品系中所含甜菊糖苷含量

Table 3 The contents of steviol glycosides in 12 different *Stevia rebaudiana* Bertoni strains

编号 Number	RA 含量 RA content /(mg·g ⁻¹)	ST 含量 ST content /(mg·g ⁻¹)	RF 含量 RF content /(mg·g ⁻¹)	RC 含量 RC content /(mg·g ⁻¹)	RD 含量 RD content /(mg·g ⁻¹)	总量 Total /(mg·g ⁻¹)	RA 占比 The proportions of RA/%	RD 占比 The proportions of RD/%	RA+RD 占比 The proportions of RA+RD/%
1	47.88	1.47	12.20	5.44	5.40	72.39	66.14	7.46	73.60
2	33.50	5.93	5.52	8.13	10.28	63.36	52.87	16.22	69.10
3	95.16	12.52	8.94	21.94	2.15	140.71	67.63	1.53	69.16
4	42.37	28.12	4.22	17.12	1.62	93.45	45.34	1.73	47.07
5	100.06	9.53	15.40	26.87	1.85	153.71	65.10	1.20	66.30
6	66.55	31.05	7.39	22.90	2.01	129.90	51.23	1.55	52.78
7	101.18	10.77	7.72	24.70	1.51	145.88	69.36	1.04	70.39
8	52.45	1.48	7.31	12.80	8.02	82.06	63.92	9.77	73.69
9	23.10	31.66	4.87	20.66	—	80.29	28.77	—	28.77
10	31.47	40.13	7.11	19.11	—	97.82	32.17	—	32.17
11	113.22	12.39	8.05	31.57	2.08	167.31	67.67	1.24	68.91
12	89.28	23.82	7.54	28.27	—	148.91	59.96	—	59.96

以 Amide 色谱柱为固定相解决了反向色谱柱上 RD 分离度差的问题。

不同种类甜菊糖苷甜味品质不同,甜叶菊中以 RA 甜味品质较好且含量较高^[23-24],但研究发现 100% 纯度的 RA 仍是甜中带有苦涩后味^[25];RD 在甜叶菊中含量虽然比较少,却具有比 RA 更佳的甜味品质^[26]。目前常采用酶法分子修饰^[27-28]、微生物转化^[26-29]等方式增加甜菊糖苷组合物中 RA、RD 含量,但存在产物活性不明、成本高等问题。不同品种甜叶菊中所含 RA、RD 含量比例具有差异,通过选择恰当品种的甜叶菊为原材料可以改善甜菊糖苷产品的味道,也可减少企业加工工序、提高生产效益。本研究比较分析了 12 个扦插培育的甜叶菊品系中 RA、RD 含量及其占比,结果提示以甜叶菊品系编号 2 为原材料可获得高产量 RD,以甜叶菊品系编号 1、8 为原材料生产的甜菊糖苷产品甜味品质较好,而甜叶菊品系编号 3、5、7、11 富含 RA 且甜菊糖苷产量高,该结果可为实际应用中选择适宜的甜叶菊品种提供参考依据。

4 结论

甜菊糖苷是一类极性比较强的化合物,本研究在 C18、HSS T3、Amide 3 种不同色谱柱中选择确定 Amide 和 HSS T3 为较优色谱柱,并以其为固定相建立 2 种不同的 HPLC 分析测定方法,结果表明,本研究所建立的 HPLC 方法可适用于甜叶菊中 RD、RA 甜菊糖苷的分析研究。12 个扦插培育的甜叶菊品系中所含

甜菊糖苷有所差异,编号 2 的甜叶菊品系中 RD 含量及占比高,编号 3、5、7、11 的甜叶菊品系中甜菊糖苷总含量较高(主要为 RA),编号 1、8 的甜叶菊品系中 RA+RD 占比比较高,本研究结果可为实际应用中选择适宜的甜叶菊品种进行产品开发利用提供借鉴和指导。

参考文献:

[1] 刘琼,潘芸芸,吴卫. 甜叶菊化学成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(6): 1085-1091

[2] 赵永平,蒯海明,张恩和,何庆祥,魏玉杰. 不同基因型甜叶菊光合生理特性与产量品质比较[J]. 核农学报, 2014, 28(5): 935-941

[3] Martins P M, Lanchote A D, Thorat B, Nfreitas L A P. Turbo-extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* using a fractional factorial design[J]. Revista Brasileira De Farmacognosia, 2017, 27(4): 510-518

[4] Adari B R, Alavala S, George S A, Meshram H M, Tiwari A K, Sarma A V S. Synthesis of rebaudioside-A by enzymatic transglycosylation of stevioside present in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. Food Chemistry, 2016, 200: 154-158

[5] Hellfritsch C, Brockhoff A, Stähler F, Meyerhof W, Hofmann T. Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(27): 6782-6793

[6] Pavlíček B, Těma P. The use of capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for sensitive determination of stevioside and rebaudioside A in foods and beverages [J]. Food Chemistry, 2017, 219: 193-198

[7] Pacifico S, Piccolella S, Nocera P, Tranquill O E, Poggetto F D, Catauro M. Steviol glycosides content in cultivated *Stevia rebaudiana*

- Bertoni: A new sweet expectation from the Campania Region (Italy) [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2017, 63: 111–120
- [8] 周文清. 高效液相色谱法检测运动饮料中甜菊糖苷[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(1): 170–173
- [9] 朱吟吟, 周凌. 高效液相色谱法测定甜叶菊中的 3 个甜菊醇糖苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(1): 184–189
- [10] Amery R, Jookan E, Duquenne B, Geuns J, Meesschaert B. Determination of steviol glycosides in various dairy matrices and soy drink[J]. Proceedings of Eustas Stevia Symposium, 2010, 4: 69–82
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 8270–2014 食品安全国家标准 食品添加剂 甜菊糖苷[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015
- [12] 彭应枝, 周芳, 董界, 何文艳, 刘韶. 反相高效液相法测定甜叶菊中莱菔迪苷 A 和甜菊糖苷的含量[J]. 中南药学, 2013, 11(9): 700–702
- [13] Chaturvedula V S P, Zamora J. Reversed-phase HPLC analysis of steviol glycosides isolated from *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. Food and Nutrition Sciences, 2014, 5(17): 1711–1716
- [14] Kovačević D B, Barba F J, Granato D, Galanakis C M, Herceg Z, Dragović-uzelac V, Putnik P. Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves [J]. Food Chemistry, 2018, 254: 150–157
- [15] Yu C M, Xu K, Shi Y. The spectrum model established for measuring the contents of Rebaudioside A and Stevioside quickly in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. Energy Procedia, 2011, 5(22): 855–861
- [16] 张伟, 王磊, 钱建瑞, 张永哲, 高伟. 高效液相氨基柱和 C18 柱测定甜菊糖含量方法对比[J]. 中国食品添加剂, 2013(4): 201–204
- [17] Rodenburg D L, Alves K, Perera W H, Ramsaroop T, Carvalho R, Mcchesney J D. Development of HPLC analytical techniques for diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni: Strategies to scale-up[J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2016, 27(8): 1–7
- [18] Molina-Calle M, Priego-Capote F, Luque De Castro M D. Characterization of Stevia leaves by LC–QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts[J]. Food Chemistry, 2017, 219: 329–338
- [19] Arandagonzález I, Moguelordóñez Y, Betancurancon D. Validation of HPLC–UV method for determination of minor glycosides contained in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves[J]. Biomedical Chromatography Bmc, 2015, 29(5): 733–738
- [20] Bergs D, Burghoff B, Joehneck M, Martin G, Schembecker G. Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves [J]. Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit, 2012, 7(2): 147–154
- [21] Bovanová L, Brandšteterová E, Baxa S. HPLC determination of stevioside in plant material and food samples [J]. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 1998, 207(5): 352–355
- [22] Woelwer-Rieck U, Lankes C, Wawrzun A, Wüst M. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana* [J]. European Food Research and Technology, 2010, 231(4): 581–588
- [23] Margaret A. Stevia, nature's zero-calorie sustainable sweetener: A new player in the fight against obesity[J]. Nutrition Today, 2015, 50(3): 129–134
- [24] Formigoni M, Milani P G, Avíncola A d S, Santos V J d, Benossi L, Dacome A S, Pilau E J, Costa S C d. Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia[J]. Food Chemistry, 2018, 241: 452–459
- [25] 王德骥. 再论甜菊糖苷的甜度、甜味和苦涩后味的成因机理[J]. 食品工业科技, 2010, 31(5): 417–420
- [26] Chen L L, Sun P, Zhou F F, Li Y, Chen K Q, Jia H H, Yan M, Gong D C, Ouyang P K. Synthesis of rebaudioside D, using glycosyltransferase UGTSL2 and in situ UDP-glucose regeneration [J]. Food Chemistry, 2018, 259: 286–291
- [27] 叶发银. 高纯度莱菔迪苷 A 的制备和甜菊苷的酶法改性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2013
- [28] 吕鑫华. 甜菊糖苷类甜味剂的分离纯化与生物转化 [D]. 北京: 北京化工大学, 2012
- [29] Gerwig G J, Poele E M T, Dijkhuizen L, Kamerling J P. *Stevia* glycosides: Chemical and enzymatic modifications of their carbohydrate moieties to improve the sweet-tasting quality [J]. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 2016, 73: 1–72

Optimization and Application of Content Determination Method of Rebaudioside D and Rebaudioside A in *Stevia rebaudiana* Bertoni

GUO Zhilong^{1,2} CHEN Ren^{1,2} MA Qian² SUN Fang² ZHANG Hong^{1,2} ZHANG Ziping^{1,2,*}

(¹Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Western, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; ²School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: In order to compare the content proportion of rebaudioside D (RD) and rebaudioside A (RA) in different varieties of *Stevia Rebaudiana* Bertoni, the optimized high performance liquid chromatography methods were established by selecting suitable stationary phase in C18, HSS T3 and Amide chromatographic column. The results showed that the selectivity of HSS T3 column to stevia glycosides was better, which could separate RA, ST, rebaudioside F (RF), rebaudioside C (RC), rubusoside (RBS), rebaudioside B (RB) and steviolbioside (SB) at the same time. The HPLC method employed was an isocratic mobile phase consisted of mixture of acetonitrile and sodium phosphate buffer (0.01%) with a ratio of 32.68 (v:v) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and with 10 µL injections, and the detection wavelength was set at 210 nm and the column temperature at 40°C. Amide column showed the best separation ability for RD, the HPLC method employed was an isocratic mobile phase consisted of a 76:24 (v:v) mixture of acetonitrile and water at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ and with 10 µL injections, the detection wavelength was set at 210 nm and the column temperature at 40°C. The HPLC results showed that the content proportion of RA and RD in 12 strains of *Stevia Rebaudiana* Bertoni was different. The content and proportion of RD in No. 2 were high, suggesting that this strain could be used as raw material to produce high content of RD. The content of stevia glycosides mainly RA in No 3, 5, 7 and 11 was higher, suggesting that these strains were rich in RA and high yield of steviol glycosides. The proportions of RA+RD in No. 1 and 8 were high, suggesting that steviol glycosides were of better sweetness quality in these raw materials. The HPLC methods established in this study could provide reference for the analysis of RD and RA in *Stevia Rebaudiana* Bertoni, and the results can provide reference and guidance for the selection of suitable *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties in practical applications.

Keywords: *Stevia rebaudiana* Bertoni, rebaudioside D, rebaudioside A, high performance liquid chromatography (HPLC)