SN

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

网址www.cnfw315.com
电话4000982315
刮涂层 查真伪

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

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≥98%。

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

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

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

4.7 标准物质：甜菊双糖甙(CAS 号 41093-60-1)纯度≥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 μL，加入 500 μL 乙腈振荡混匀，15 000 r/min 离心 5 min，过 0.22 μm 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×4.6 mm(内径)，5 μm，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 μL。

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×4.6 mm(内径)，5 μm，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 μL。

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:

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

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(μg/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 μg/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

甜叶菊叶经沸水煮泡，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≥98%。

10.5 标准物质：瑞鲍迪甙A(CAS号58543-16-1)纯度≥98%。

10.6 标准物质：瑞鲍迪甙C(CAS号63550-99-2)纯度≥98%。

10.7 标准物质：杜克甙A(CAS号64432-06-0)纯度≥98%。

10.8 标准物质：甜菊双糖甙(CAS号41093-60-1)纯度≥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 ℃～4 ℃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：

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

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。

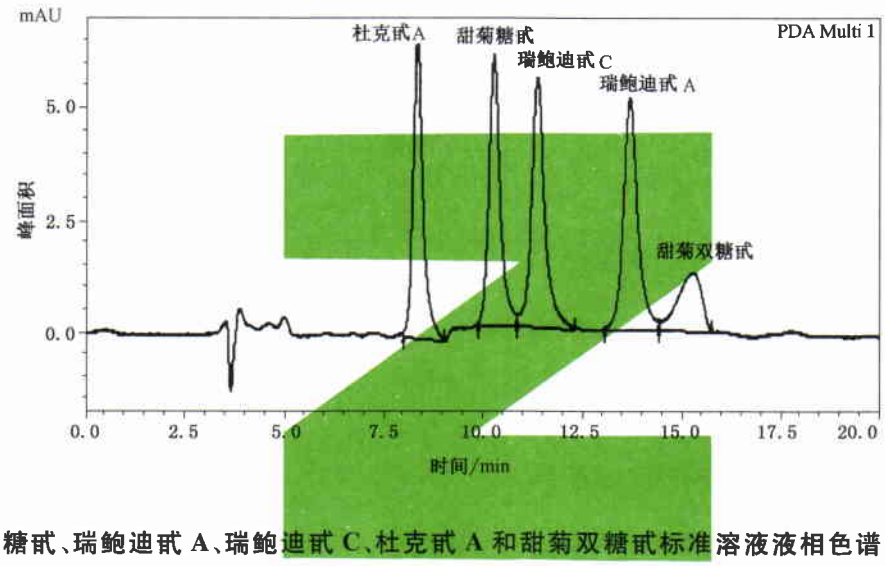


图 A.1 甜菊糖甙、瑞鲍迪甙 A、瑞鲍迪甙 C、杜克甙 A 和甜菊双糖甙标准溶液液相色谱图（10 μg/mL）

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） 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。

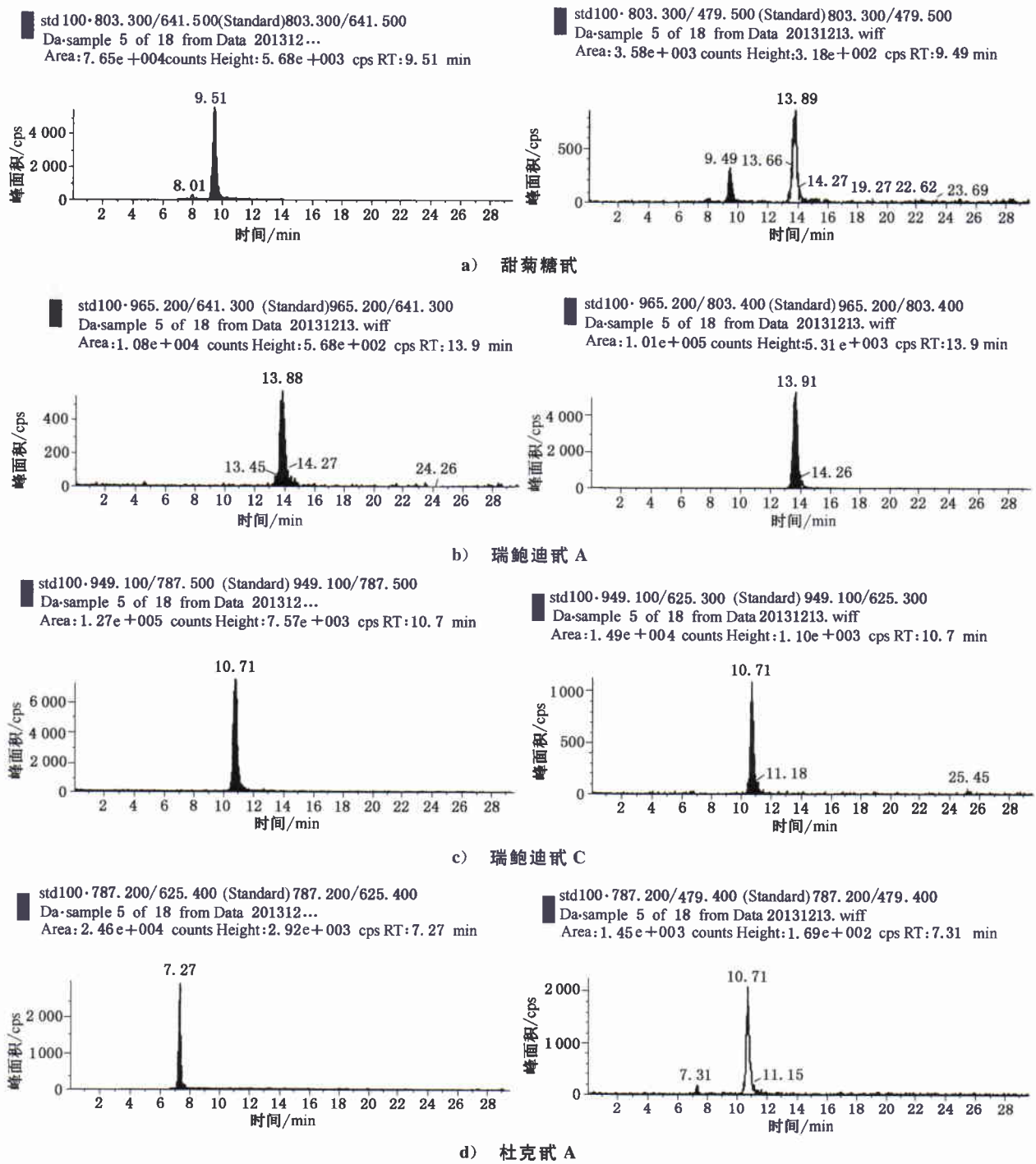
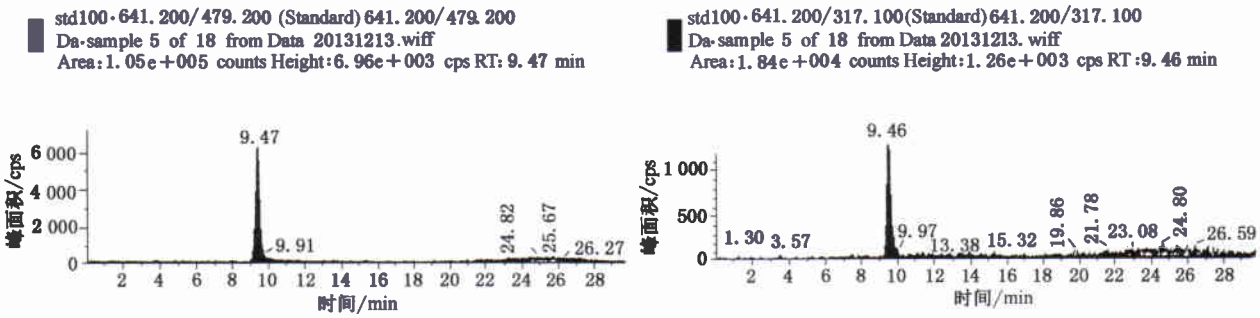


图 C.1 五种甜菊糖甙标准溶液的多反应监测（MRM）色谱图（浓度为 0.1 μg/mL）


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
峰面积/cps
6 000
4 000
2 000
0
9.47
9.91
24.82
25.67
26.27
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
时间/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
峰面积/cps
1 000
500
0
9.46
1.30
3.57
9.97
13.38
15.32
19.86
21.78
23.08
24.80
26.59
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
时间/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