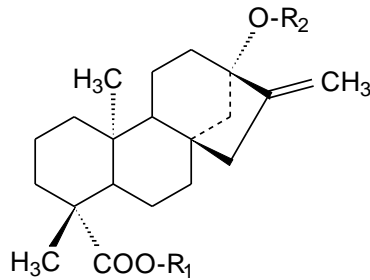


Steviol Glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni

本品來自 *Stevia rebaudiana* Bertoni 葉片，以甜菊醇(Steviol)為主鏈，並與任意數量糖[葡萄糖(glucose, Glc)、鼠李糖(rhamnose, Rha)、木糖(xylose, Xyl)、果糖(fructose, Fru)、阿拉伯糖(arabinose, Ara)、半乳糖(galactose, Gal)及去氧葡萄糖(deoxyglucose, deoxyGlc)]結合之共軛或化合結構，甜菊醇($R_1 = R_2 = H$)為甜菊糖苷之糖苷配基。

1. 含量：本品所含甜菊糖苷之總含量，包含所有以甜菊醇為主鏈之與其共軛、化合或固定之糖類(Glc、Rha、Fru、deoxyGlc、Gal、Ara及Xyl)，應在95%以上(乾重計)。
2. 外觀：本品為白至淡黃色粉末，無臭或輕微特殊氣味，甜度約為蔗糖之200~300倍。
3. 鑑別：(1)溶解度：易溶於酒精：水(50:50, v/v)溶液。
(2)HPLC層析圖形：本品按照10.含量測定，所得層析圖譜之主要甜菊糖苷波峰應與標準品相符。
(3)pH：本品之水溶液(1%)之pH值應為4.5~7.0。
4. 灰分：取本品1.0 g，於550°C熾灼至完全灰化，冷卻後稱重，其重量應在1%以下。
5. 乾燥減重：取本品2.0 g，於105°C乾燥2小時，其減失重量應在6%以下(附錄A-3)。
6. 殘留溶劑：利用頂空氣相層析法測定檢品中甲醇及乙醇之含量，其所含甲醇應在200 mg/kg以下，乙醇應在5000 mg/kg以下。
(1)內部標準溶液之配製：
取水50 mL，置於50 mL頂空分析瓶中密封，精確量取3-甲基-2-戊酮(3-methyl-2-pentanone) 15 μ L，通過隔墊注入，混合均勻，供作內部標準溶液。
(2)空白檢液之調製：
取空白檢品約0.2 g，精確稱定，置於頂空分析瓶中，加入水5 mL及內部標準溶液1 mL，於60°C加熱10分鐘，並劇烈振盪10秒，供作空白檢液。
(3)檢品溶液之調製：
取檢品約0.2 g，精確稱定，置於頂空分析瓶中，加入水5 mL及內部標準溶液1 mL，於60°C加熱10分鐘，並劇烈振盪10秒，供作檢品溶液。

(4)校準溶液之調製：

取空白檢品約0.2 g，精確稱定，置於頂空分析瓶中，加入水5 mL及內部標準溶液1 mL並稱重。精確量取已知量之標準品，通過隔墊注入，並精確稱定至0.01 mg以內(前後重量相減求得標準品之稱重量)，於60°C加熱10分鐘，並劇烈振盪10秒，供作校準檢液。

(5)測定法：

將檢品溶液、空白檢液及校準溶液之頂空分析瓶置於頂空進樣器上，依下列條件進行分析，就檢品溶液與校準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式分別求得檢品中甲醇或乙醇之含量(mg/kg)：

$$\text{檢品中甲醇或乙醇之含量(mg/kg)} = \frac{R_s \times W_{st} \times 1000}{(R_{st} - R_b) \times W_s}$$

R_s ：檢品溶液中甲醇或乙醇與內部標準品之相對波峰面積

R_{st} ：校準溶液中甲醇或乙醇與內部標準品之相對波峰面積

R_b ：空白檢液中甲醇或乙醇與內部標準品之相對波峰面積

W_{st} ：甲醇或乙醇標準品之稱重量(mg)

W_s ：檢品之採取量(g)

頂空進樣條件^(註)：

樣品加熱溫度：60°C。

樣品加熱時間：10 min。

頂空進樣針溫度：70°C。

轉移溫度：80°C。

注入量：1.0 mL。

注入模式：分流。

氣相層析條件^(註)：

檢出器：火焰離子檢出器。

層析管：DB-wax毛細管(膜厚1 μm，內徑0.53 mm × 0.8 m)串聯DB-1毛細管(膜厚5 μm，內徑0.53 mm × 30 m)，或同級品。

層析管溫度：初溫：35°C，5 min；

升溫速率：5°C/min；

終溫：90°C，6 min。

注入器溫度：140°C。

檢出器溫度：300°C。

移動相氣體流速：氮氣，5 mL/min。

註：上述條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

7. 砷：取本品0.5 g，按照衛生福利部公告「重金屬檢驗方法總則」進行分析，其所含砷(As)應在1 mg/kg以下。
8. 鉛：取本品0.5 g，按照衛生福利部公告「重金屬檢驗方法總則」進行分析，

其所含鉛(Pb)應在1 mg/kg以下。

9. 微生物規範：(1)總生菌數：

稱取本品50 g，置於已滅菌之稀釋液450 mL中，用攪拌均質器攪拌混合均勻，供作10倍稀釋檢品溶液，按照衛生福利部公告「食品微生物之檢驗方法—生菌數之檢驗」培養並計算菌落數，其所含總生菌數應在1,000 CFU/g以下。

(2)酵母菌與黴菌：

稱取本品50 g，置於已滅菌之0.1%蛋白胨稀釋液450 mL中，用攪拌均質器攪拌混合均勻，供作10倍稀釋檢品溶液，按照衛生福利部公告「食品微生物之檢驗方法—黴菌及酵母菌數之檢驗」培養並計算菌落數，其所含酵母菌與黴菌數應在200 CFU/g以下。

(3)大腸桿菌：

稱取本品1 g，置於已滅菌之稀釋液9 mL中，用攪拌均質器攪拌混合均勻，供作10倍稀釋檢品溶液，按照衛生福利部公告「食品微生物之檢驗方法—大腸桿菌之檢驗」培養並鑑別判定之，應為陰性。

(4)沙門氏桿菌：

稱取本品25 g，置於已滅菌之乳糖培養液225 mL中，用攪拌均質器攪拌混合均勻，蓋上瓶蓋，於室溫下靜置60分鐘，調整pH為 6.8 ± 0.2 ，將瓶蓋鬆開約1/4圈，在 35°C 下培養 24 ± 2 小時，供作檢品溶液，按照衛生福利部公告「食品微生物之檢驗方法—沙門氏桿菌之檢驗」培養並鑑別判定之，應為陰性。

10. 含量測定：利用高效液相層析法測定檢品中主要甜菊糖苷(有標準品之甜菊糖苷)之總含量(%),若檢品中主要甜菊糖苷之總含量小於95%，則利用液相層析質譜法鑑別檢品中次要甜菊糖苷(無法取得標準品之甜菊糖苷)，再計算各次要甜菊糖苷相對於rebaudioside A之分子量校正波峰面積，求得檢品中次要甜菊糖苷之總含量，將兩者加總即得檢品中甜菊糖苷之總含量。

(1)乙腈：去離子水(3:7, v/v)溶液之調製：

取乙腈與去離子水以3：7 (v/v)比例混勻。

(2)標準溶液之配製：

取適量stevioside、rebaudioside A、rebaudioside B、rebaudioside C、rebaudioside D、rebaudioside E、rebaudioside F、rebaudioside M、rebaudioside N、rebaudioside O、dulcoside A、rubusoside及steviolbioside對照用標準品^(註)，精確稱定，分別以乙腈：去離子水(3:7, v/v)溶液配製成1.5 mg/mL，作為標準原液。精確量取適量各標準原液混合，以乙腈：去離子水(3:7, v/v)溶液稀釋至20-100 $\mu\text{g/mL}$ ，供作標準溶液。

註：若有其他商品化標準品亦可納入。

(3)檢品溶液之調製：

取本品約50 mg，精確稱定，置於50 mL容量瓶中，加入乙腈：去離

子水(3:7, v/v)溶液20 mL，超音波振盪溶解後，以乙腈：去離子水(3:7, v/v)溶液定容，供作檢品溶液。

(4)測定法：

- a. 精確量取檢品溶液及標準溶液各10 µL，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析。計算各標準品相對於rebaudioside A之相對滯留時間(典型之相對滯留時間如附表)，並就檢品溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜與標準溶液比較鑑別之。檢品溶液需重複注入(至少2重複)，由標準曲線求得各主要甜菊糖苷之平均濃度(µg/mL)，並依下列計算式求得檢品中主要甜菊糖苷之總含量：

$$\text{檢品中主要甜菊糖苷之總含量(\%)} = \frac{\sum C_M \times 50}{W \times 10 (100-M)}$$

C_M ：檢品溶液中各主要甜菊糖苷之平均濃度(µg/mL)

50：檢品最後定容之體積(mL)

W：檢品之採取量(mg)

M：乾燥減重(%)

高效液相層析條件^(註)：

光二極體陣列檢出器：定量波長210 nm。

層析管：Phenomenex Luna 5µ C18(2)，100A，5 µm，內徑4.6 mm × 15 cm，或同級品。

層析管溫度：50°C。

自動進樣器溫度：2-8°C。

移動相溶液：A液(去離子水)與B液(乙腈)以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 40.0	85 → 70	15 → 30
40.0 → 60.0	70 → 55	30 → 45
60.0 → 70.0	55 → 55	45 → 45
70.0 → 70.1	55 → 85	45 → 15
70.1 → 80.0	85 → 85	15 → 15

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：10 µL。

註：上述條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

- b. 若檢品中主要甜菊糖苷之總含量小於95%，則另依下列條件進行液相層析質譜(LC-MS)分析，鑑別檢品中次要甜菊糖苷(無標準品之甜菊糖苷)之存在(甜菊糖苷之典型分子量離子如附表)，依下列計算式求得檢品溶液中各次要甜菊糖苷相對於rebaudioside A之分子量校正波峰面積，並利用rebaudioside A之

標準曲線推算各次要甜菊糖苷之平均濃度($\mu\text{g/mL}$)，再依下列計算式求得檢品中各次要甜菊糖苷之總含量：

檢品溶液中各次要甜菊糖苷之分子量校正波峰面積

$$= \frac{M_x \times \text{MPA}}{M_{\text{RebA}}}$$

M_x ：各次要甜菊糖苷之分子量

M_{RebA} ：rebaudioside A之分子量(967 amu)

MPA：檢品溶液中各次要甜菊糖苷之平均波峰面積

$$\text{檢品中各次要甜菊糖苷之總含量(\%)} = \frac{\sum C_m \times 50}{W \times 10 (100-M)}$$

C_m ：檢品溶液中各次要甜菊糖苷之平均濃度($\mu\text{g/mL}$)

50：檢品最後定容之體積(mL)

W：檢品之採取量(mg)

M：乾燥減重(%)

液相層析質譜分析測定條件^(註)：

離子化模式：ESI。

毛細管電壓(Capillary voltage)：4 kV。

進樣錐電壓(Cone voltage)：35 V (low)；60 V (high)。

萃取電壓(Extractor voltage)：5 V。

射頻透鏡電壓(RF lens voltage)：1 V。

離子源溫度(Source temperature)：90°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：350°C。

溶媒揮散流速(Desolvation flow rate)：400 L/hr。

偵測離子：分子量離子如附表所示。

註：上述條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

c. 檢品中甜菊糖苷之總含量(%) = A + B

A：檢品中主要甜菊糖苷之總含量(%)

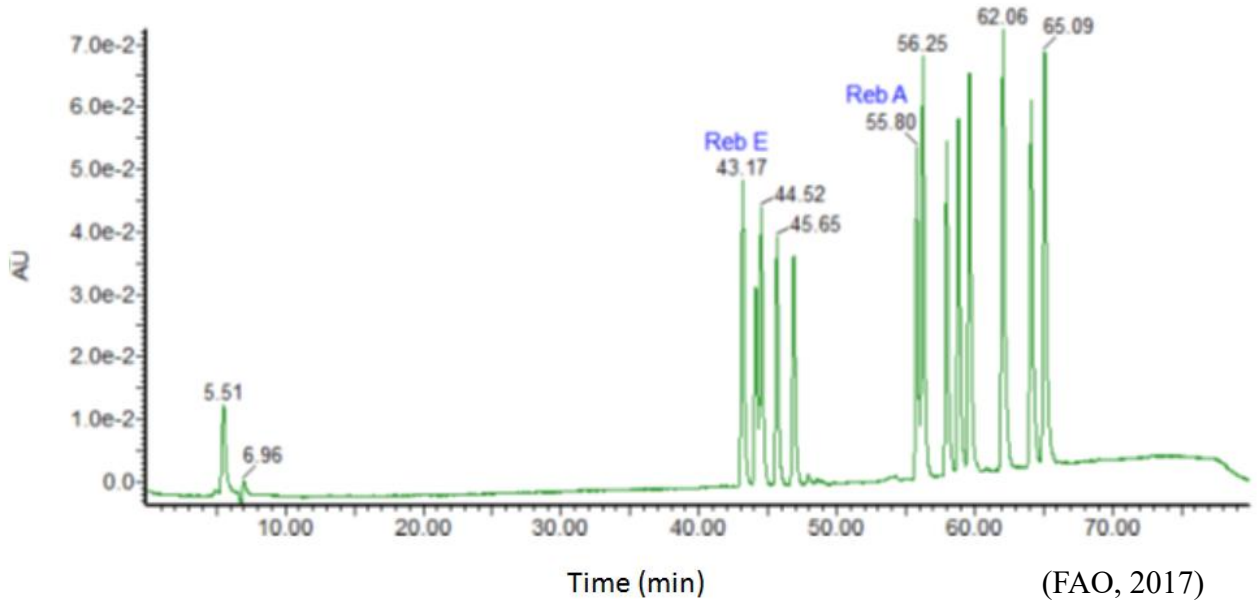
B：檢品中次要甜菊糖苷之總含量(%)

參考文獻：

FAO. 2017. Steviol Glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni monograph 20. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

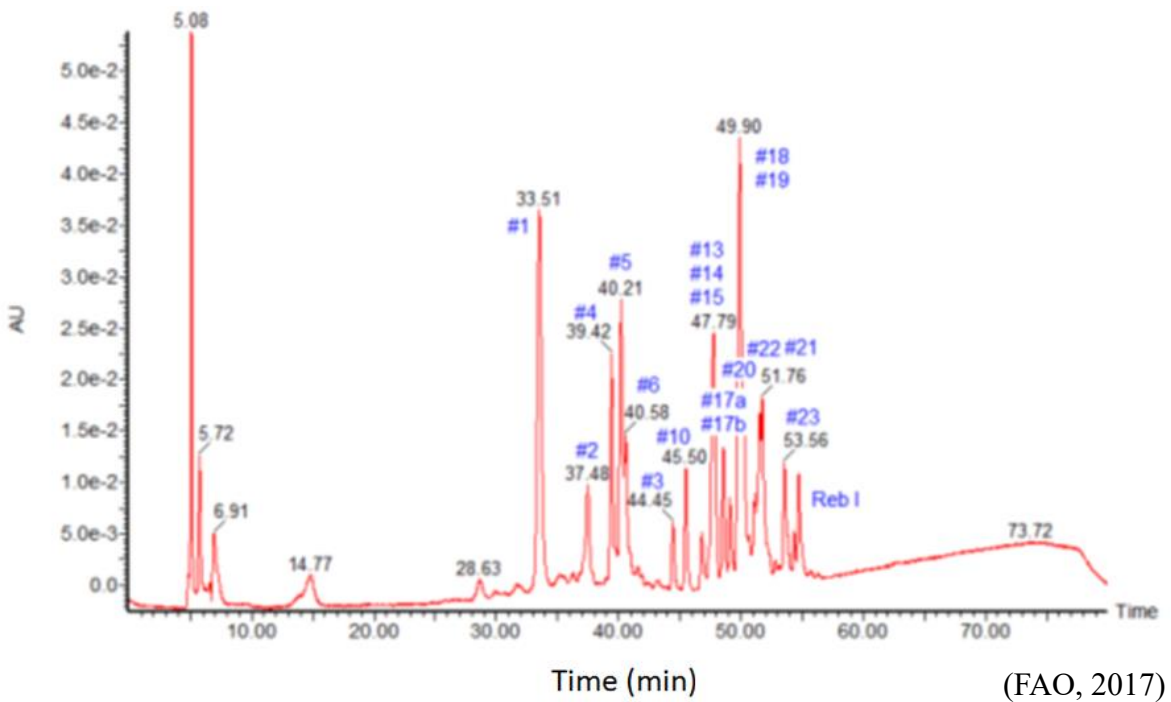
[<http://www.fao.org/3/BU297en/bu297en.pdf>]

參考層析圖譜



圖一、主要甜菊糖苷標準品之HPLC圖譜

各甜菊糖苷依滯留時間由左至右依次為rebaudioside E、rebaudioside O、rebaudioside D、rebaudioside N、rebaudioside M、rebaudioside A、stevioside、rebaudioside F、rebaudioside C、dulcoside A、rubusoside、rebaudioside B及steviolbioside



圖二、次要甜菊糖苷之HPLC圖譜

附表、各甜菊糖苷之滯留時間、相對滯留時間、分子量及偵測離子

化合物名稱	滯留時間 (RT)	相對滯留時間 (RRT)	分子量 (M)	偵測離子
Related steviol glycoside #1	32.6	0.58	458	517 or 427
Related steviol glycoside #2	33.6	0.60	982	981
Related steviol glycoside #3	34.3	0.61	676	427 or 735
Related steviol glycoside #4	38.1	0.68	1129	675 or 1127
Related steviol glycoside #5	40.8	0.73	982	981
Rebaudioside V	43.0	0.77	1261	1259
Rebaudioside T	42.0	0.75	1099	1127
Rebaudioside E	43.7	0.78	967	965
Rebaudioside O	44.6	0.79	1436	1435
Rebaudioside D	45.1	0.80	1129	1127
Rebaudioside K	45.8	0.81	1112	1111
Rebaudioside N	46.1	0.82	1274	1273
Rebaudioside M	47.5	0.84	1291	1289
Rebaudioside S	48.3	0.86	951	949
Rebaudioside J	48.4	0.86	1112	1111
Rebaudioside W	49.1	0.87	1098	1097
Rebaudioside U2	49.1	0.87	1099	1097
Rebaudioside W2	49.7	0.88	1098	1097
Rebaudioside W3	50.3	0.89	1098	1097
Rebaudioside U	50.7	0.90	1098	1097
Rebaudioside O2	50.6	0.90	1436	965
Rebaudioside Y	50.8	0.90	1260	1259
Rebaudioside I	50.7	0.90	1129	1127
Rebaudioside V2	52.2	0.93	1261	1259
Rebaudioside K2	51.7	0.93	1112	1111
Rebaudioside H	53.7	0.96	1112	1111
Rebaudioside A	56.2	1.00	967	965
Stevioside	56.6	1.01	805	803
Rebaudioside F	58.3	1.04	937	935
Rebaudioside C	59.2	1.05	951	949
Dulcoside A	60.0	1.07	789	787
Rubusoside	62.4	1.11	643	641
Rebaudioside B	64.5	1.15	805	803
Steviolbioside	65.5	1.17	643	641

註：上表之滯留時間及相對滯留時間會因使用之儀器及測定條件不同而有所差異