

团 体 标 准

T/SATA 091—2025

食品中 13 种甜菊糖苷的测定 高效液相色谱法

Determination of 13 Steviol Glycosides in Foods by HPLC Method

2025 - 12 - 30 发布

2025 - 12 - 31 实施

深圳市分析测试协会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 方法原理 1

5 试剂和材料 1

6 仪器设备 2

7 分析步骤 2

8 测定 3

9 检出限和定量限 4

10 精密度 5

附录 A（资料性） 13 种甜菊糖苷的标准品名称、分子量、分子式、CAS 号、纯度信息表 6

附录 B（资料性） 13 种甜菊糖苷的标准溶液色谱图 7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由深圳市分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：华测检测认证集团股份有限公司、天津天狮学院。

本文件主要起草人：严杏、陈仁熙、蒙嘉鹏、夏进、丘彩花、张丽芬、罗雯、李俏、蒋妍、邓云金、郭晓雷、张秀芹。

本文件是首次发布。

食品中 13 种甜菊糖苷的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了食品中13种甜菊糖苷含量的高效液相色谱方法。

本文件适用于发酵乳、冰淇淋、雪糕、蔬菜制品、豆类制品、糕点、巧克力及其制品、糖果、杂粮粉及其制品、方便米面制品、调味糖浆、酱油、料酒及其制品、复合调味料、果蔬汁类及其饮料、蒸馏酒、果冻、茶制品、水果及其制品、膨化食品、坚果和籽类等食品中甜菊苷、瑞鲍迪苷A、瑞鲍迪苷B、瑞鲍迪苷C、瑞鲍迪苷D、瑞鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、瑞鲍迪苷E、瑞鲍迪苷M、瑞鲍迪苷N、瑞鲍迪苷O的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法原理

根据甜菊糖苷易溶于甲醇和乙腈的特点，蒸馏酒、果蔬汁类及其饮料、酱油等基质干扰小的样品经甲醇提取；其他复杂基质样品经乙腈提取，经亚铁氰化钾和乙酸锌溶液沉淀蛋白，硅胶固相萃取柱净化。各提取液氮吹至近干，30%乙腈水定容，配有二极管阵列检测器的高效液相色谱仪测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明，本实验使用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇(CH_3OH)：色谱纯。

5.1.2 乙腈($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$)：色谱纯。

5.1.3 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)。

5.1.4 磷酸(H_3PO_4)。

5.1.5 乙酸锌 $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ 。

5.1.6 亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 。

5.1.7 无水硫酸钠(Na_2SO_4)：于 650°C 灼烧 4 h，在干燥器中冷却至室温，储于密封瓶中备用。

5.2 试剂配制

5.2.1 磷酸钠缓冲液(pH 2.6)：称取 1.50 g 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)，用水定容至 1 L，用磷酸调节 pH 至 2.6。

5.2.2 30%乙腈水溶液：乙腈和水的体积比为 30:70。

5.2.3 亚铁氰化钾溶液(106 g/L)：称取 122 g 亚铁氰化钾，用水定容至 1 L。

5.2.4 乙酸锌溶液(219 g/L)：称取 262 g 乙酸锌，用水定容至 1 L。

5.3 标准品

甜菊糖苷标准品：甜菊苷、瑞鲍迪苷A、瑞鲍迪苷B、瑞鲍迪苷C、瑞鲍迪苷D、瑞鲍迪苷E、瑞鲍迪苷F、瑞鲍迪苷M、瑞鲍迪苷N、瑞鲍迪苷O、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷，标准品信息见附录A。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 储备液制备

根据标准品纯度，称取适量标准品，约 10 mg 于 10 mL 容量瓶中，用30%乙腈水定容，分别配置成 1000 mg/L 的甜菊苷储备液、瑞鲍迪苷A储备液、瑞鲍迪苷B储备液、瑞鲍迪苷C储备液、瑞鲍迪苷E储备液、杜克苷A储备液、甜茶苷储备液、瑞鲍迪苷M储备液、瑞鲍迪苷N储备液。依次称取标准品约 20 mg于 10 mL 容量瓶中，用30%乙腈水定容，分别配置成 2000 mg/L 的瑞鲍迪苷D储备液、甜菊双糖苷储备液、瑞鲍迪苷F储备液。称取标准品约 25 mg 于 5.0 mL 容量瓶中，用30%乙腈水定容，配置成 5000 mg/L 瑞鲍迪苷O储备液。摇匀备用，0℃~4℃ 避光保存12个月。

5.4.2 混合标准中间溶液

依次取上述浓度的甜菊苷、瑞鲍迪苷A、瑞鲍迪苷B、瑞鲍迪苷C、瑞鲍迪苷D、瑞鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、瑞鲍迪苷E、瑞鲍迪苷M、瑞鲍迪苷N、瑞鲍迪苷O储备液 250 μL、250 μL、500 μL、500 μL、125 μL、500 μL、500 μL、500 μL、250 μL、250 μL、500 μL、500 μL、100 μL，于 5 mL 容量瓶中，用30%乙腈水溶液定容至刻度，配成甜菊苷、瑞鲍迪苷A、瑞鲍迪苷D为 50 mg/L，瑞鲍迪苷B、瑞鲍迪苷C、瑞鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、瑞鲍迪苷E、瑞鲍迪苷M、瑞鲍迪苷N、瑞鲍迪苷O为 100 mg/L 的混合标准中间溶液，0℃~4℃ 避光保存3个月。

5.4.3 混合标准工作曲线的配制

分别移取混合标准中间溶液 20 μL、60 μL、100 μL、200 μL、300 μL、400 μL，定容至 1 mL，配成甜菊苷、瑞鲍迪苷A、瑞鲍迪苷D工作液曲线浓度为 1.0 mg/L、3.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、15.0 mg/L、20.0 mg/L，瑞鲍迪苷B、瑞鲍迪苷C、瑞鲍迪苷 E、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、瑞鲍迪苷F、瑞鲍迪苷M、瑞鲍迪苷N、瑞鲍迪苷O工作液曲线浓度为 2.0 mg/L、6.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、30.0 mg/L、40.0 mg/L，现配现用。

5.5 材料

5.5.1 塑料离心管：50 mL。

5.5.2 硅胶固相萃取柱：500 mg，6 mL，或等效柱。

5.5.3 有机系 0.22 μm 滤膜。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪：配备 PDA 检测器。

6.2 匀浆机。

6.3 高速粉碎机。

6.4 分析天平：感量为 0.1 mg、0.01 mg。

6.5 pH 计：具有温度补偿功能，精度±0.1。

6.6 离心机：转速不低于 4000 r/min。

6.7 涡旋振荡器。

6.8 振荡水浴锅。

6.9 氮吹仪。

6.10 固相萃取装置。

7 分析步骤

7.1 试样制备

取多个预包装的饮料、液态奶等均匀样品直接混合；非均匀的液态、半固态样品经匀浆机匀浆；固体样品经粉碎机粉碎均匀；奶酪、黄油、巧克力等采用 50℃~60℃ 加热熔融，并趁热搅拌均匀。取其中 200 g 样品装入玻璃容器中，密封，液体样品 4℃ 保存，其他样品 -18℃ 保存。

7.2 试样提取

7.2.1 蒸馏酒、果蔬汁类及其饮料、酱油

称取 2.0 g (精确至 0.01 g) 样品于 50 mL 离心管中，准确移取加入 10 mL 甲醇，加入适量无水硫酸钠，涡旋振荡 2 min，放置 2 min，45℃ 超声提取 20 min，以 4000 r/min 离心 5 min，取出上清液，残留物用 10 mL 甲醇再次提取，上清液合并于 50 mL 具塞离心管中，氮吹至近干，用 30% 乙腈水溶液定容至 2 mL，经 0.22 μm 有机滤膜过滤，滤液待测。

7.2.2 发酵乳、冰淇淋、雪糕、蔬菜制品、豆类制品、糕点、巧克力及其制品、糖果、杂粮粉及其制品、方便米面制品、调味糖浆、料酒及其制品、复合调味料、果冻、茶制品、水果及其制品、膨化食品、坚果和籽类

称取混合均匀的样品 2.0 g (精确至 0.01 g)，置于 50 mL 具塞离心管中，加入 10 mL 乙腈，涡旋振荡 2 min，45℃ 水浴超声提取 20 min，以 4000 r/min 离心 5 min，取出上清液，残留物用 10 mL 乙腈再次提取，上清液合并于 50 mL 具塞离心管中，加入 106 g/L 亚铁氰化钾溶液和 219 g/L 乙酸锌溶液各 80 μL，涡旋振荡 2 min，以 4000 r/min 离心 5 min，移取上清液至洁净具塞离心管中。

依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化 Silica 硅胶净化柱，将全部上清液转移至净化柱，用 5 mL 甲醇洗脱，收集洗脱液，氮吹仪吹干，用 30% 乙腈水溶液定容至 2 mL，经 0.22 μm 有机滤膜过滤，滤液待测。

8 测定

8.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，或等效色谱柱；
- b) 流动相：30% 乙腈水溶液 - 磷酸钠缓冲溶液；
- c) 柱温：40℃；
- d) 进样量：20 μL；
- e) 流速：0.8 mL/min；
- f) 检测波长：210 nm；
- g) 梯度洗脱，见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	磷酸钠缓冲溶液/%	乙腈/%
0	80	20
8	75	25
12	65	35
30	65	35
30.1	80	20
40	80	20

8.2 标准曲线制作

检查仪器的各项性能指标，使仪器灵敏度、分辨率等各项指标到达仪器的测试要求。

待基线稳定后,将13种甜菊糖苷系列溶液按质量浓度由低到高分别注入高效液相色谱仪中进行测定,以标准系列溶液中目标化合物的浓度为横坐标,以色谱峰面积为纵坐标,制作标准曲线。13种甜菊糖苷标准溶液的色谱图参见附录B。

8.3 样品的测定

8.3.1 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

8.3.2 空白试验

除不加试样外,空白试验应与样品平行测定,并且采用相同的分析步骤分析。

8.3.3 定性测定

依次将空白溶液和试样溶液注入高效液相色谱仪中,得到色谱图。进行试样测定时,试样检出色谱峰的保留时间与标准物质相一致。

8.3.4 定量测定

采用峰面积外标法定量,根据标准曲线得到试样溶液中13种甜菊糖苷的浓度。

8.4 结果计算和表述

8.4.1 试样中 13 种甜菊糖苷的含量

试样中13种甜菊糖苷的质量分数以X表示,单位以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(1)计算。

$$\chi = \frac{(C_s - C_0) \times V}{m} \quad (1)$$

式中:

χ ——样品中相应的甜菊糖苷的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

C_s ——标准曲线中得到的试样中相应甜菊糖苷的浓度,单位为毫克每升(mg/L);

C_0 ——标准曲线中得到的空白中相应甜菊糖苷的浓度,单位为毫克每升(mg/L);

V ——样品提取体积,单位为毫升(mL);

m ——样品质量的数值,单位为克(g)。

8.4.2 试样中 13 种甜菊糖苷总量,以甜菊醇当量计算

试样中13种甜菊糖苷含量(以甜菊醇当量计)以Y表示,单位以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(2)、(3)计算。

$$Y = \sum X_i \quad (2)$$

$$X_i = k_i \times X \quad (3)$$

式中:

Y ——样品中甜菊糖苷含量以甜菊醇当量计的总量,单位为毫克每千克(mg/kg);

X_i ——样品中相应的甜菊糖苷转化成甜菊醇当量计的总量,单位为毫克每千克(mg/kg);

X ——样品中相应的甜菊糖苷的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

k_i ——甜菊糖苷转化成甜菊醇的换算系数:甜菊苷, 0.395; 瑞鲍迪苷 A, 0.329; 瑞鲍迪苷 B, 0.395; 瑞鲍迪苷 C, 0.334; 瑞鲍迪苷 D, 0.282; 瑞鲍迪苷 F, 0.340; 杜克苷 A, 0.404; 甜茶苷, 0.496; 甜菊双糖苷, 0.496; 瑞鲍迪苷 E, 0.329; 瑞鲍迪苷 M, 0.246; 瑞鲍迪苷 N, 0.249; 瑞鲍迪苷 O, 0.221。

计算结果保留 3 位有效数字。

9 检出限和定量限

称样量为 2.0 g 提取液体积为 2 mL 时，甜菊苷、瑞鲍迪苷A、瑞鲍迪苷D方法检出限为 1.0 mg/kg，定量限为 3.0 mg/kg。瑞鲍迪苷B、瑞鲍迪苷C、瑞鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、瑞鲍迪苷E、瑞鲍迪苷M、瑞鲍迪苷N、瑞鲍迪苷O方法检出限为 2.0 mg/kg，定量限为 6.0 mg/kg。

10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

附 录 A

(资料性)

13 种甜菊糖苷的标准品名称、分子量、分子式、CAS 号、纯度信息表

13种甜菊糖苷的标准品名称、分子量、分子式、CAS号、纯度信息见表A.1。

表 A.1 13 种甜菊糖苷的标准品名称、分子量、分子式、CAS 号、纯度信息表

中文名称	英文名称	分子式	分子量	CAS 号	纯度%
甜菊苷	Stevioside	$C_{38}H_{60}O_{18}$	804.38	57817-89-7	98.6
瑞鲍迪苷 A	Rebaudioside A	$C_{44}H_{70}O_{23}$	966.43	58543-16-1	98.0
瑞鲍迪苷 B	Rebaudioside B	$C_{38}H_{60}O_{18}$	804.38	58543-17-2	99.7
瑞鲍迪苷 C	Rebaudioside C	$C_{44}H_{70}O_{22}$	950.44	63550-99-2	99.3
瑞鲍迪苷 D	Rebaudioside D	$C_{50}H_{80}O_{28}$	1128.48	63279-13-0	98.7
瑞鲍迪苷 F	Rebaudioside F	$C_{43}H_{68}O_{22}$	936.42	438045-89-7	99.9
杜克苷 A	Dulcoside A	$C_{38}H_{60}O_{17}$	788.38	64432-06-0	99.6
甜茶苷	Rubusoside	$C_{32}H_{50}O_{13}$	642.33	64849-39-4	99.5
甜菊双糖苷	Steviolbioside	$C_{32}H_{50}O_{13}$	642.33	41093-60-1	98.3
瑞鲍迪苷 E	Rebaudioside E	$C_{44}H_{70}O_{23}$	967.01	63279-14-1	99.0
瑞鲍迪苷 M	Rebaudioside M	$C_{56}H_{90}O_{33}$	1291.29	1220616-44-3	94.2
瑞鲍迪苷 N	Rebaudioside N	$C_{56}H_{90}O_{32}$	1275.29	1220616-46-5	97.4
瑞鲍迪苷 O	Rebaudioside O	$C_{62}H_{100}O_{37}$	1437.44	1220616-48-7	97.9
甜菊醇	Steviol	$C_{20}H_{30}O_3$	318.45	471-80-7	/

附 录 B
(资料性)

13 种甜菊糖苷的标准溶液色谱图

13种甜菊糖苷的标准溶液色谱图见图B.1。

数据文件名:甜菊糖苷-13新.lcd
样品名:甜菊糖苷-13新.lcd

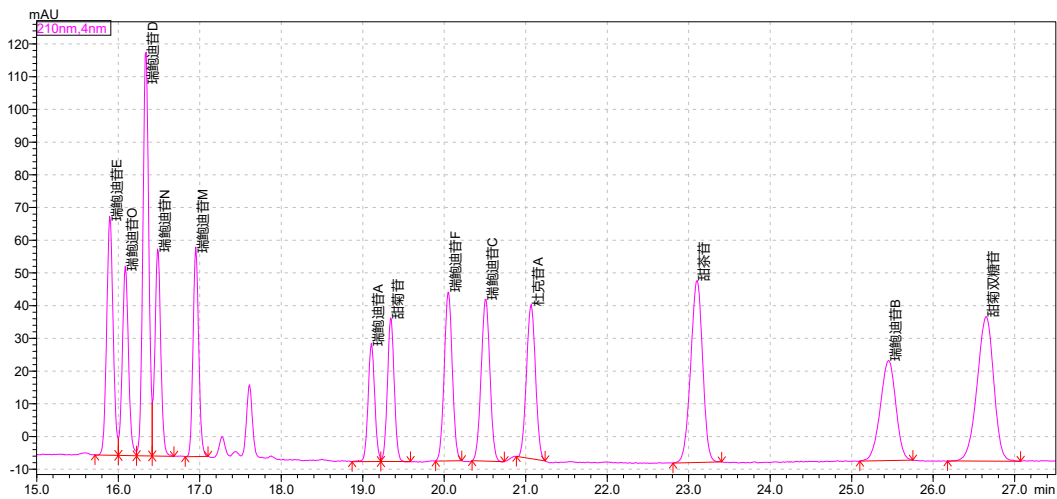


图 B.1 13 种甜菊糖苷的标准溶液色谱图