

引用本文:赵向阳,余秀萍,吴玮,等.甜叶菊药材品质与质量提升研究[J].安徽医药,2023,27(10):1937-1940.
DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.10.007.



◇ 药物分析 ◇

甜叶菊药材品质与质量提升研究

赵向阳¹,余秀萍¹,吴玮¹,崔灿¹,孙婷婷¹,郭明飞²

作者单位:¹安徽省宿州市食品药品检验检测中心,安徽 宿州 234000;

²宿州市市场监督管理局,安徽 宿州 234000

摘要: **目的** 建立甜叶菊的质量标准研究方法。**方法** 在2020年10月至2021年12月,参照2020年版《中国药典(四部)》,对药材样品的显微特征、水分、总灰分、酸不溶性灰分、醇溶性浸出物进行检测;采用薄层色谱(TLC)法对药材样品进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定药材样品中甜菊苷和莱菔迪苷A的含量,色谱柱为Shim-pack GIST(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(35:65),流速为0.5 mL/min,检测波长为210 nm,柱温为40 ℃,进样量为10 μL。**结果** 药材样品粉末呈暗绿色或黄绿色,显微特征清晰。TLC图斑点清晰,且分离度好。甜菊苷和莱菔迪苷A分别在0.10~2.01 g/L($r=0.999\ 7$)和0.10~1.17 g/L($r=0.999\ 9$)范围内与峰面积积分值线性关系良好;精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.00%;平均加样回收率分别为98.5%和98.4%,RSD分别为0.30%和0.45%($n=6$)。10批药材样品的平均水分、总灰分、酸不溶性灰分含量分别为4.0%、7.2%和0.9%,醇溶性浸出物含量均大于50%;甜菊苷和莱菔迪苷A平均含量分别为11.4%和4.1%。**结论** 所建标准可用于甜叶菊的质量控制。

关键词: 甜菊属; 主成分分析; 薄层色谱; 高效液相色谱(HPLC); 甜菊苷; 莱菔迪苷A

Research on improvement of the qualities of *Stevia rebaudiana* (bertoni) hemsl.

ZHAO Xiangyang¹, YU Xiuping¹, WU Wei¹, CUI Can¹, SUN Tingting¹, GUO Mingfei²

Author Affiliation:¹Anhui Suzhou Food and Drug Inspection and Testing Center, Suzhou, Anhui 234000, China;

²Suzhou Administration for Market Regulation, Suzhou, Anhui 234000, China

Abstract: **Objective** To establish a method for the study of quality standards of *Stevia rebaudiana* (bertoni) hemsl. **Methods** Between October 2020 and 2021 December, the microscopic characteristics, moisture content, total ash, acid-insoluble ash, and alcohol-soluble extracts of the *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl. were determined according to the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition, Volume IV). Thin-layer chromatography (TLC) was used to qualitatively identify *Stevia rebaudiana* (bertoni) hemsl. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the content of stevioside and rebaudioside A in *Stevia rebaudiana* (bertoni) hemsl. The chromatographic column was Shim-pack GIST column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water(35:65, V/V), the flow rate was 0.5 mL/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The sample powder was dark green or chartreuse, with clear microscopic characteristics. The TLC spots were clear with good separation. The linear ranges of stevioside and rebaudioside A were 0.10-2.01 g/L ($r=0.999\ 7$) and 0.10-1.17 g/L ($r=0.999\ 9$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.00%. The average recoveries of stevioside and rebaudioside A were 98.5% and 98.4%, with RSDs of 0.30% and 0.45% ($n=6$), respectively. The average content of moisture, total ash and acid-insoluble ash of the ten batches of samples was 4.0%, 7.2% and 0.9%, respectively, and their alcohol-soluble extract contents were more than 50%. The average content of stevioside and rebaudioside A was 11.4% and 4.1%, respectively. **Conclusion** The established standard can be used for the quality control of decoction slices of *Stevia rebaudiana* (bertoni) hemsl.

Key words: *Stevia*; Principal component analysis; Thin-layer chromatography(TLC); High-performance liquid chromatography (HPLC); Stevioside; Rabaudiside A

甜叶菊[*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.]又名甜菊叶、甜茶、甜菊草是菊科、甜叶菊属多年生草本植物^[1]。原产地是南美洲巴拉圭东北部与巴西接壤的阿曼拜山脉,我国于20世纪70年代从日本引入栽培^[2]。目前我国北京、河北、陕西、江苏、福建、湖南、云南等27个地区均有引种^[3]。甜叶菊叶中含有

多种活性成分,包括糖苷类^[4-5]、绿原酸类^[6]、多酚类^[7]、黄酮类等。其中甜菊糖苷具有低热量、高甜度的特性^[8],作为天然甜味剂被广泛地应用于食品、饮料和医药等行业^[9]。现代医学研究表明,甜叶菊具有抗氧化^[10]、抗菌、治疗糖尿病、控制血糖、降低血压、抗肿瘤^[11]、抗癌、抗腹泻、提高免疫力^[12],促进新

陈代谢、保护心脏^[13]等药理作用。有研究^[13]表明,甜叶菊提取物能够通过改变高脂饮食诱导肠道菌群,从而达到抑制血脂血糖升高的作用。相关研究^[14]显示,甜叶菊水提物可对白化大鼠糖尿病的抗糖尿病作用。同时,甜叶菊糖苷对控制肥胖症、调节胃酸、恢复神经疲劳有很好的功效,对心脏病有显著疗效^[15],最重要的是它可消除蔗糖的副作用。

目前,由于中草药的质量受限于地理环境以及温度气候等问题,导致目前的中草药质量难以控制。而《中国药典》尚未收载甜叶菊,各地方中药材标准和炮制规范^[16-19]中也仅对甜叶菊的性状、显微和薄层鉴别作了定性要求,并未对指标成分做定量测定,缺少对甜叶菊的质量控制依据。2020年10月至2021年12月,本研究以2020年版《中国药典》的方法和要求为指导,对收集到的10批甜叶菊药材的性状、鉴别、检查、浸出物、含量测定进行系统研究,为全面控制该药材的质量提供了有效依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Leica DM1000 显微镜;瑞士卡玛 CA-MAG Visualizer 2 薄层成像系统;德国宾德 FP240 型精密干燥箱;合肥科晶 KSL-1200X-M 高温箱式炉;1260VWD 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);梅特勒 AB-135S 电子天平(0.01 mg);赛多利斯 BSA 124S 电子天平(0.1 mg);湖北鼎泰高 DTA-27 超声波清洗器。

1.2 试药 甜菊苷对照品(批号 111515-201803,鉴别用)及甜叶菊对照药材(批号 121238-200603,鉴别用)均来源于中国食品药品检定研究院,甜菊苷对照品(批号 MUST-20070310,纯度 99.06%)及莱菔迪昔 A 对照品(批号 RFS-T00602008024,纯度 99.67%)均购买于成都曼思特生物科技有限公司。甜叶菊样品 10 批,其中安徽省中药材标准起草领导小组提供 6 批,宿州市埇桥区群富甜叶菊合作社采集 2 批,亳州康美药材市场购买 2 批。实验中所用试剂乙腈为色谱纯(美国天地有限公司),水为娃哈哈纯净水,其余分析纯。

2 方法与结果

2.1 性状及鉴别^[20]

2.1.1 甜叶菊形态表征 本品多破碎或皱缩,草绿色,完整叶片展平后呈倒卵形至宽披针形,长 4.5~9.5 cm,宽 1.5~3.5 cm;先端钝,基部楔形;中上部边缘有粗锯齿,下部全缘;三出脉,中央主脉明显,两面均有柔毛;具短叶柄,叶片常下延至叶柄基部;叶革质,质脆易碎。气微,味极甜。粉末呈暗绿色或黄绿色。表皮细胞较大,形状不规则。单列式的多细胞线状非腺毛由 5~12 个细胞组成,50~150 μm ,

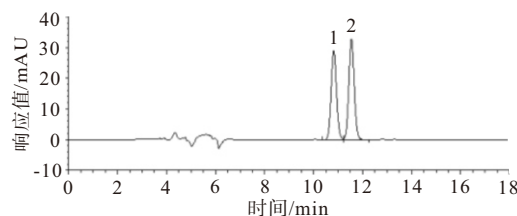
稍弯曲。导管多为螺旋导管,直径为 15~45 μm ,也可见网纹导管。见图 1。

2.1.2 TLC 鉴别 取本品粉末 0.5 g,精密称定,加甲醇 10 mL,超声处理 30 min,滤过,为供试品溶液。另取甜叶菊对照药材 0.5 g,同法制得对照药材溶液。再取甜菊苷对照品,加甲醇制成每 1 毫升各含 2 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2020 年版四部通则 0502)试验,吸取供试品溶液和对照药材溶液各 5 μL ,对照品溶液 10 μL ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(7.5:4:0.5)为展开剂,于湿度低于 70% 环境下展开,取出,晾干,喷以 50% 硫酸乙醇溶液,在 110 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。见图 2。

2.2 水分、总灰分、浸出物检查 按《中国药典》2020 年版四部通则对 10 批药材样品进行水分、总灰分、浸出物测定。结果 10 批药材样品的水分在 8.5%~10.6%,总灰分在 5.5%~9.0%,酸不溶性灰分在 0.5%~1.6%,醇溶性溶出物在 44.5%~54.9%。

2.3 含量测定

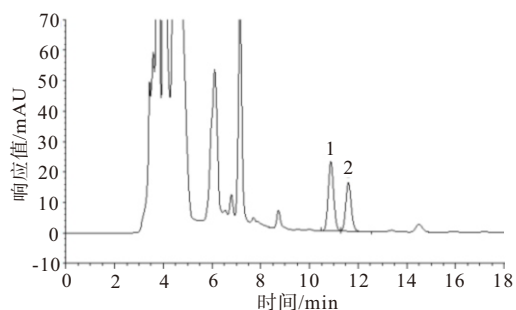
2.3.1 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱:岛津 Shim-pack GIST(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(35:65);设置总流速为:0.5 mL/min。进样量:10 μL ;检测波长:210 nm;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;结果显示,此色谱条件下,供试品色谱图中杂质峰对主峰无干扰,甜菊苷和莱菔迪昔 A 的分离度大于 1.5,峰对称因子在 0.90~1.10,理论塔板数以甜菊苷计>5 000,对照品溶液重复进样 5 次的相对标准偏差不过 1.5%。色谱图见图 3,4。



注:1—莱菔迪昔 A 峰;2—甜菊苷峰。

图 3 混合对照品溶液色谱图

2.3.2 溶液的制备 混合对照品溶液制备:精密取莱菔迪昔 A 对照品 40.23 mg 置 20 mL 量瓶中,加 50% 乙醇溶解,超声 60 min,制成浓度为 2.011 5 g/L 的对照品储备液。精密称取甜菊苷对照品 27.92 mg 置 20 mL 量瓶中,制成浓度为 1.396 g/L 的对照品储备液。精密量取莱菔迪昔 A 对照品和甜菊苷对照品储备液适量,加 50% 乙醇制成每 1 mL 含莱菔迪昔 A 1.0 mg 和甜菊苷 0.5 mg 的混合溶液,即得混合对照品溶液。



注:1—莱菔迪昔 A 峰;2—甜菊苷峰。

图4 甜叶菊供试品溶液色谱图

供试品溶液的制备:取本品粉末 0.5 g,精密称定,置平底烧瓶中,加入 50% 乙醇 50 mL,称定重量,加热回流 60 min,冷却至室温,称重,用提取溶剂补足缺失重量,摇匀,滤过取滤液,即得供试品溶液。

2.3.3 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱:岛津 Shim-pack GIST (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水 (35:65);设置总流速为:0.5 mL/min。进样量:10 μL;检测波长:210 nm;柱温:40 °C;结果显示,此色谱条件下,供试品色谱图中杂质峰对主峰无干扰,甜菊苷和莱菔迪昔 A 的分离度大于 1.5,峰对称因子在 0.90~1.10,理论塔板数以甜菊苷计>5 000,对照品溶液重复进样 5 次的相对标准偏差不过 1.5%。色谱图见图 3,4。

2.3.4 线性关系考察 取“2.3.2”项下莱菔迪昔 A 和甜菊苷标准品储备液,以 50% 乙醇为溶剂分别成稀释成莱菔迪昔 A 和甜菊苷标准品系列对照品溶液。取系列对照品溶液,分别按“2.3.3”项下色谱条件测定,记录色谱图峰面积,以对照品质量浓度(X , g/L)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线并进行线性回归。结果莱菔迪昔 A 和甜菊苷分别在 0.10~2.01 ($r=0.999\ 7$)、0.10~1.171 ($r=0.999\ 9$) g/L 范围内呈良好线性,线性回归方程分别为 $Y=1\ 129.9 X+14.836$ 和 $Y=1\ 311.4 X-4.544\ 7$ 。

2.3.5 精密度考察 取“2.3.2”项下混合对照品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件重复进样 5 次,分别测得莱菔迪昔 A 峰面积为 1 146.42、1 145.61、1 145.12、1 153.60、1 147.90、1 147.21, RSD 为 0.27% ($n=6$)。甜菊苷峰面积为 508.02、507.81、508.20、509.02、507.82、507.88, RSD 为 0.09% ($n=6$), RSD 小于 2%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 准确称取同一甜叶菊样品 6 份,按“2.3.2”项下的方法制备供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件检测,所得峰面积代入“2.3.5”线性方程分别求算两成分含量,结果显示,6 份甜叶菊样本中莱菔迪昔 A 的含量分别为 8.17%、8.27%、8.24%、8.30%、8.27%、8.31%, RSD 为 0.58% ($n=6$)。

甜菊苷的含量分别为 5.30%、5.32%、5.33%、5.36%、5.34%、5.38%, RSD 为 0.45% ($n=6$), RSD 小于 2%,表明该方法重复性良好。

2.3.7 稳定性考察 取 0.5 g 甜叶菊样本,精密称定,按“2.3.2”项下方法制备的甜叶菊供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件,分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 测定,记录色谱图峰面积。结果,莱菔迪昔 A 峰面积 RSD 为 0.69%,甜菊苷峰面积 RSD 为 0.30%, RSD 小于 2%,表明在该方法下制备的甜叶菊中莱菔迪昔 A 和甜菊苷具有较好的稳定性。

2.3.8 回收率试验 精密称取甜叶菊 T1 样品 0.25 g,平行 6 份,按表 6 分别加入莱菔迪昔 A 和甜菊苷对照品适量,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件检测,计算回收率。见表 1。结果显示,莱菔迪昔 A 的平均回收率为 98.5%, RSD 为 0.30%;甜菊苷的平均回收率为 98.1%, RSD 为 0.45%, RSD 小于 2%,表明回收率良好。

表1 甜叶菊回收率试验($n=6$)

成分	取样量/ g	样品含 量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收 率/%	平均 值/%	RSD /%
莱菔迪 昔 A	0.251 0	18.720 5	20.654 0	39.125 1	98.79	98.5	0.30
	0.250 8	18.705 6	20.307 3	38.657 5	98.25		
	0.252 0	18.795 1	20.535 1	39.095 0	98.85		
	0.253 3	18.892 0	20.238 0	38.801 3	98.38		
	0.253 4	18.899 5	20.346 9	38.870 4	98.15		
	0.252 5	18.832 4	20.703 5	39.258 8	98.66		
甜菊苷	0.251 0	12.167 1	11.093 4	23.032 9	97.95	98.1	0.45
	0.250 8	12.157 4	10.983 7	23.001 1	98.73		
	0.252 0	12.215 5	11.083 4	23.014 4	97.43		
	0.253 3	12.278 5	12.080 1	24.091 4	97.79		
	0.253 4	12.283 4	12.060 2	24.129 6	98.23		
	0.252 5	12.239 8	12.010 4	24.038 1	98.23		

2.3.9 样品含量测定 取收集的 10 批样品,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,取“2.3.2”项下混合对照品溶液和上述供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件测定,按外标法计算求得莱菔迪昔 A 和甜菊苷含量,含量结果见表 2。

3 讨论

3.1 薄层鉴别条件的优化 参照《安徽省中药饮片炮制规范》2019 年版^[19]中甜叶菊薄层色谱鉴别方法,以甜菊苷对照品和甜叶菊对照药材为对照,先后考察了不同厂家和型号薄层板、样品提取方法、点样量、显色剂、展开剂比例等条件,最终选取德国 Merck 硅胶 G 薄层板,以三氯甲烷-甲醇-水 (7.5:4.0:0.5) 为展开剂,显色剂为 50% 硫酸乙醇溶液,与原方法相比,各成分分离度更加好,且斑点清晰, R_f 值适中。

表2 10批甜叶菊样品的含量

样品	莱菔迪昔 A 含量/%	甜菊苷 含量/%	二成分的 总量/%
T1	8.2	6.0	14.2
T2	12.0	4.5	16.5
T3	10.1	4.6	14.7
T4	5.7	7.4	13.1
T5	12.0	4.4	16.4
T6	11.4	5.2	16.6
T7	14.7	1.8	16.5
T8	12.0	2.2	14.2
T9	14.1	2.7	16.8
T10	14.3	2.6	16.9
中位数/ $M(P_{25}, P_{75})$	12.0(10.4, 13.6)	4.5(2.6, 5.1)	16.5(14.3, 16.6)

3.2 含量测定条件的优化

3.2.1 色谱条件优化 据文献报道^[21-23],目前测定甜菊苷和莱菔迪昔 A 的含量,主要有两种填料色谱柱: C_{18} 柱和氨基柱。相比于 C_{18} 分离柱,氨基柱分离效果更好,但重现性和峰形不好,故选择 C_{18} 柱测定。实验通过对色谱柱温度、流速、进样体积、流动相种类、流动相比比例的优化,达到了最佳的分离度和峰形,确定了色谱条件。与文献方法相比,在该条件下,峰形最优、分离度均能稳定达到 1.6 以上。

3.2.2 提取方法的优化 先后考察不同提取溶剂和提取方式对甜叶菊中甜菊苷和莱菔迪昔 A 含量的影响,分别使用水、甲醇、50% 甲醇、乙腈:水(30:70)、无水乙醇、50% 乙醇作为溶剂,按“2.3”项下方法制备供试品溶液。结果以水、50% 甲醇和 50% 乙醇作为溶出介质时效果最佳,无水乙醇溶出最低。相比其他溶剂,杂峰少,峰形好,但在实验中发现用水提取难过滤,易生成絮状物,故将水排除。相比甲醇和乙腈,乙醇没有毒性,故选择了 50% 乙醇作为提取溶剂。以 50% 乙醇为提取溶剂,分别考察加热回流和超声两种提取方式,结果表明回流比超声提取充分,故本研究最终选定回流为提取方式。

4 结论

本研究分析了甜叶菊的性状和显微鉴别,建立了 TLC 鉴别方法及用 HPLC 测定甜菊苷和莱菔迪昔 A 含量的方法,初步完成了甜叶菊的质量标准研究工作。结果表明,本方法操作简便,准确度高,重复性、稳定性好,为甜叶菊药材质量评价和监督提供了参考依据。

(本文图 1,2 见插图 10-2)

参考文献

[1] 李卓. 甜叶菊根多糖对非酒精性脂肪肝大鼠的治疗作用[D]. 芜湖: 皖南医学院, 2020.

[2] 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.

[3] 郭志龙. 不同品系甜叶菊中甜菊糖苷和绿原酸类物质含量测定与分析[D]. 银川: 宁夏大学, 2019.

[4] 罗庆云, 印敏. 甜菊糖苷类化合物的质谱行为分析及定量策略初探[J]. 中国糖料, 2022, 44(2): 28-36.

[5] 吴洁, 熊清平, 石莹莹, 等. 凹凸棒黏土对甜叶菊水提液吸附絮凝作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(1): 24-28.

[6] 贾铮, 徐思远, 杨建中, 等. 高效液相色谱法同步测定甜叶菊提取物中 7 种绿原酸[J]. 中国饲料, 2022(3): 89-94.

[7] MYINT KZ, WU K, XIA Y, et al. Polyphenols from stevia rebaudiana (bertoni) leaves and their functional properties[J]. J Food Sci, 2020, 85(2): 240-248.

[8] 杨金花. 甜叶菊化学成分、含量及其甜度的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2012.

[9] 付悦然, 郑彧, 王明阳, 等. 北五味子联用甜叶菊代茶饮研究与开发[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(5): 46-48.

[10] 赵磊, 张会敏, 徐美利, 等. 甜叶菊废渣提取物及其主要成分异绿原酸的抗炎作用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(5): 117-124.

[11] IATRIDIS N, KOUGIOUMTZI A, VLATAKI K, et al. Anti-cancer properties of stevia rebaudiana; more than a sweetener[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2022, 27(4): 1362.

[12] 卓春柳, 王方方, 钟翠红, 等. 甜叶菊绿原酸增强大肠杆菌感染蛋雏鸡免疫力研究[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(8): 2200-2212.

[13] 耿晶, 张秩, 李玮. 绿原酸预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(6): 682-685.

[14] AHMAD U, AHMAD RS. Anti diabetic property of aqueous extract of stevia rebaudiana bertoni leaves in streptozotocin-induced diabetes in albino rats[J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1): 179.

[15] TESTAI L, STROBYKINA I, SEMENOV VV, et al. Mitochondriotropic and cardioprotective effects of triphenylphosphonium-conjugated derivatives of the diterpenoid isosteviol[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10): 2060.

[16] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范: 2015 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016.

[17] 汪文涛, 李文莉. 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药饮片炮制规范[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2010.

[18] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药材标准: 第一册[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2017.

[19] 安徽省药品监督管理局. 安徽省中药饮片炮制规范[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2019.

[20] 汤青, 臧恒昌. 中药石斛鉴别方法的研究进展与展望[J]. 安徽医药, 2013, 17(8): 1411-1413.

[21] 彭应枝, 周芳, 董界, 等. 反相高效液相色谱法测定甜叶菊中莱菔迪昔 A 和甜菊糖苷的含量[J]. 中南药学, 2013, 11(9): 700-702.

[22] 程玉柱, 夏运喜, 秦玉华, 等. 甜叶菊中甜菊苷与瑞鲍迪昔 A 含量测定方法研究[J]. 现代农业科技, 2017(19): 250, 253.

[23] 孙蕊, 贾鹏禹, 冯胜杰, 等. 高效液相色谱法测定甜叶菊叶片中甜菊糖苷含量[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(2): 131-136.

(收稿日期: 2022-11-04, 修回日期: 2023-02-07)