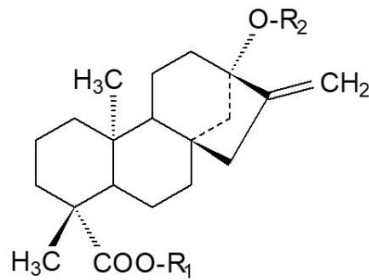


§11-1-012

甜菊糖苷

Steviol Glycosides



甜菊醇($R_1 = R_2 = H$)為甜菊糖苷之糖苷配基

1. 定義：本品來自甜菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)葉片，以甜菊醇(steviol)為骨幹，並與任意數量或組合之醣類[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)]形成以共價鍵與醣基結合之結構。
- (1) 熱水萃取法製得：本品以熱水萃取甜菊葉片，萃取液以樹脂吸附並濃縮其中甜菊糖苷。以乙醇溶劑清洗脫附，獲得甜菊糖苷粗產品。粗產品再以甲醇或乙醇水溶液重新結晶，亦可使用離子交換樹脂純化。終產品可經由噴霧乾燥獲得。
- (2) 酵素修飾法製得：本品以經基因轉殖之非產毒及非病原性微生物(*Pichia pastoris* 及 *Escherichia coli*)生產之酵素[葡萄糖基轉移酶(glucosyltransferase)及蔗糖合成酶(sucrose synthase)]處理由甜菊葉片萃取純化之甜菊糖苷，再經加熱使酵素失去活性並過濾去除，獲得酵素修飾之甜菊糖苷粗產品。粗產品經樹脂吸附/脫附或固/液相過濾等濃縮步驟，再經由脫色、結晶化及噴霧乾燥進行純化製得。
- 酵素生產使用之基因轉殖微生物：
- a. *Pichia pastoris* (基因來源包含 *Horedum vulgare* L、*Stevia rebaudiana* Bertoni、*Vigna radiate*)。
- b. *Escherichia coli* (基因來源包含 *Acidithiobacillus caldus*、*Arapidopsis thaliana*、*Solanum tuberosum*、*Stevia rebaudiana* Bertoni)。
2. 含量：本品所含甜菊糖苷之總含量應在95%以上(以乾重計)。
3. 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。
4. 鑑別：(1)溶解度：極微溶到易溶於水；微溶到易溶於乙醇水溶液(50:50, v/v)。
- (2) HPLC層析圖形：本品按照11.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值：本品之水溶液(1%)之pH值應為4.5~7.0。

5. 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。
6. 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)。
7. 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 µL，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。

8. 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。
9. 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。
10. 微生物規範：(1)總生菌數：
稱取本品50 g，置於已滅菌之磷酸鹽緩衝液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)酵母菌及黴菌：
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，其所含酵母菌及黴菌數應在200 CFU/g以下。
- (3)大腸桿菌：
稱取本品1 g，置於已滅菌之磷酸鹽緩衝液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。
11. 含量測定：利用高效液相層析法測定檢品中主要甜菊糖苷(包括rebaudioside A、rebaudioside B、rebaudioside C、rebaudioside D、rebaudioside E、rebaudioside F、rebaudioside M、rebaudioside N、rebaudioside O、dulcoside A、rubusoside、stevioside及steviolbioside)之總含量(%),若檢品中主要甜菊糖苷之總含量小於95%，則再利用液相層析質譜法鑑別檢品中次要甜菊糖苷及獲得對

應之分子量，再以次要甜菊糖苷標準品所得之標準曲線，或由各次要甜菊糖苷相對於rebaudioside A之分子量校正之UV波峰面積，求得檢品中次要甜菊糖苷之總含量。將主要及次要甜菊糖苷含量加總，即得檢品中甜菊糖苷之總含量。

(1)試劑：

- a. 移動相溶液A：0.01%甲酸或醋酸水溶液。[若僅使用UV偵測器，則亦可採用20 mM磷酸鈉緩衝液(pH 2.6)或0.01%三氟醋酸水溶液]。
- b. 移動相溶液B：乙腈。
- c. 稀釋液：[去離子水：乙腈(7:3, v/v)]溶液。

(2)平衡：

粉末狀之檢品應於實驗室平衡至少12小時再進行分析。若為未開封且已知水分含量之參考標準品，則可視情況不進行平衡。

取檢品約1~2 g，於開口容器中平鋪成厚度不超過6 mm之薄層，偶爾攪拌以確保均勻吸濕，再依6.「乾燥減重」測定檢品及標準品之乾燥減重。

(3)標準溶液之配製：

取適量rebaudioside A、rebaudioside B、rebaudioside C、rebaudioside D、rebaudioside E、rebaudioside F、rebaudioside M、rebaudioside N、rebaudioside O、dulcoside A、rubusoside、stevioside及steviolbioside對照用標準品，精確稱定，分別以稀釋液配製成1.5 mg/mL，作為標準原液。精確量取適量各標準原液混合，以稀釋液稀釋至5~500 µg/mL，供作標準溶液。若對照用標準品僅rebaudioside A一種，則精確量取適量rebaudioside A標準原液，以稀釋液稀釋至5~500 µg/mL，供作標準溶液。

(4)檢品溶液之調製：

取已平衡之本品約40~50 mg，精確稱定，置於100 mL容量瓶中，加入稀釋液80 mL，超音波振盪溶解，待冷卻至室溫後，以稀釋液定容，供作檢品溶液。

(5)測定法：

- a. 精確量取檢品溶液及標準溶液各5 µL，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析(必要時須將檢品溶液適量稀釋，使各目標成分之濃度均落在標準曲線範圍內)。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)，並依下列計算式求出各主要甜菊糖苷之含量，再加總求得檢品中主要甜菊糖苷之總含量：

- (a)由各主要甜菊糖苷之標準曲線求得各主要甜菊糖苷之含量

$$\text{檢品中各主要甜菊糖苷之含量(\%)} = C_{SG}/C_{\text{sample}} \times 100$$

C_{SG} ：由標準曲線求得之各主要甜菊糖苷平均濃度(µg/mL)

C_{sample} ：檢品溶液之濃度($\mu\text{g/mL}$)

(b) 由 rebaudioside A 標準曲線及相對感應因子(relative response factor, RRF)求得各主要甜菊糖苷之含量

$$\text{檢品中各主要甜菊糖苷之含量(\%)} = C_X \times F \times 100 / C_{\text{sample}}$$

C_X ：由 rebaudioside A 標準曲線求得之各主要甜菊糖苷平均濃度($\mu\text{g/mL}$)

F：各主要甜菊糖苷於波長210 nm下，相對於rebaudioside A之 RRF，如附表一

C_{sample} ：檢品溶液之濃度($\mu\text{g/mL}$)

高效液相層析條件^(註)：

光二極體陣列檢出器或紫外光/可見光檢出器：定量波長210 nm。

層析管：Agilent Poroshell 120 SB-C18，2.7 μm ，內徑4.6 mm \times 15 cm，或同級品。

層析管溫度：45°C。

自動進樣器溫度：10-20°C。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 \rightarrow 8.0	75 \rightarrow 75	25 \rightarrow 25
8.0 \rightarrow 13.0	75 \rightarrow 68	25 \rightarrow 32
13.0 \rightarrow 16.0	68 \rightarrow 68	32 \rightarrow 32
16.0 \rightarrow 19.0	68 \rightarrow 60	32 \rightarrow 40
19.0 \rightarrow 23.0	60 \rightarrow 60	40 \rightarrow 40
23.0 \rightarrow 23.5	60 \rightarrow 40	40 \rightarrow 60
23.5 \rightarrow 25.0	40 \rightarrow 40	60 \rightarrow 60
25.0 \rightarrow 25.5	40 \rightarrow 75	60 \rightarrow 25
25.5 \rightarrow 35.0	75 \rightarrow 75	25 \rightarrow 25

移動相流速：0.5 mL/min。

注入量：5 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%，則於上述LC-UV系統串聯一台質譜儀，依下列條件進行質譜分析，以鑑別檢品中次要甜菊糖苷[次要甜菊糖苷之分子量離子如附表二，若無對照用標準品時則需搭配一或多個碎片離子(如附表三)一同確認]，再由標準曲線求得檢品中各次要甜菊糖苷之含量；若無對照用標準品，則由各次要甜菊糖苷相對於rebaudioside A之分子量校正之UV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含量，再加總求得檢品中次要甜菊糖苷之總含量：

檢品中各次要甜菊糖苷之含量(%) = $C_X \times M_X \times 100 / (M_A \times C_{\text{sample}})$

C_X ：由rebaudioside A標準曲線求得之各次要甜菊糖苷平均濃度(μg/mL)

M_X ：由質譜分析獲得之各次要甜菊糖苷分子量

M_A ：rebaudioside A之分子量(967.01)

C_{sample} ：檢品溶液之濃度(μg/mL)

質譜分析測定條件^(註)：

離子化模式：ESI⁻。

進樣錐電壓(Cone voltage)：35 V ($m/z \leq 900$ amu)；

80 V ($m/z > 900$ amu)。

解析度：1 amu。

掃描模式：全掃描或選擇離子偵測(SIM)。

①全掃描： m/z 50~2000。

②選擇離子偵測：分子量離子如附表二。

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(%) = $(A + B) / (100 - M)$

A：檢品中主要甜菊糖苷之總含量(%)

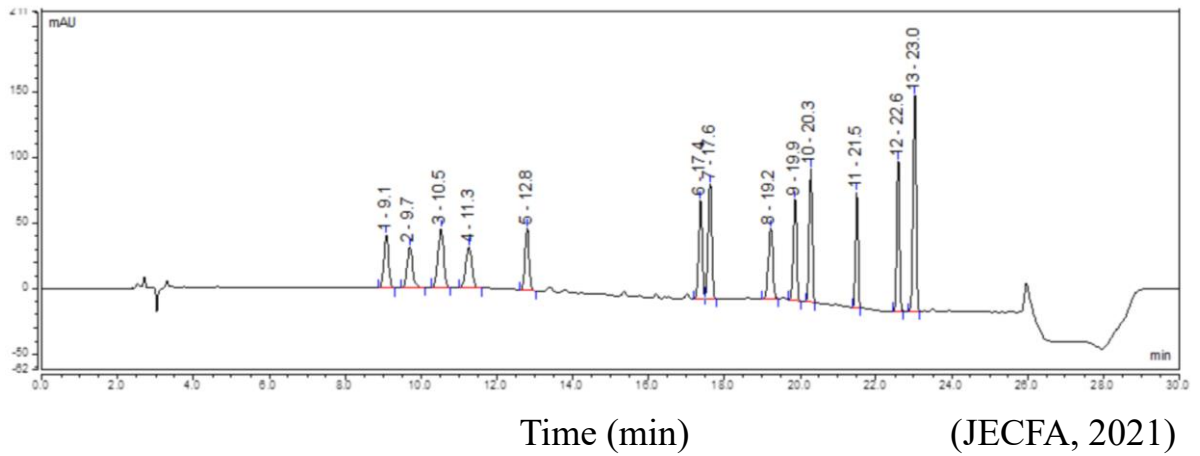
B：檢品中次要甜菊糖苷之總含量(%)

M：乾燥減重(%)

參考文獻：

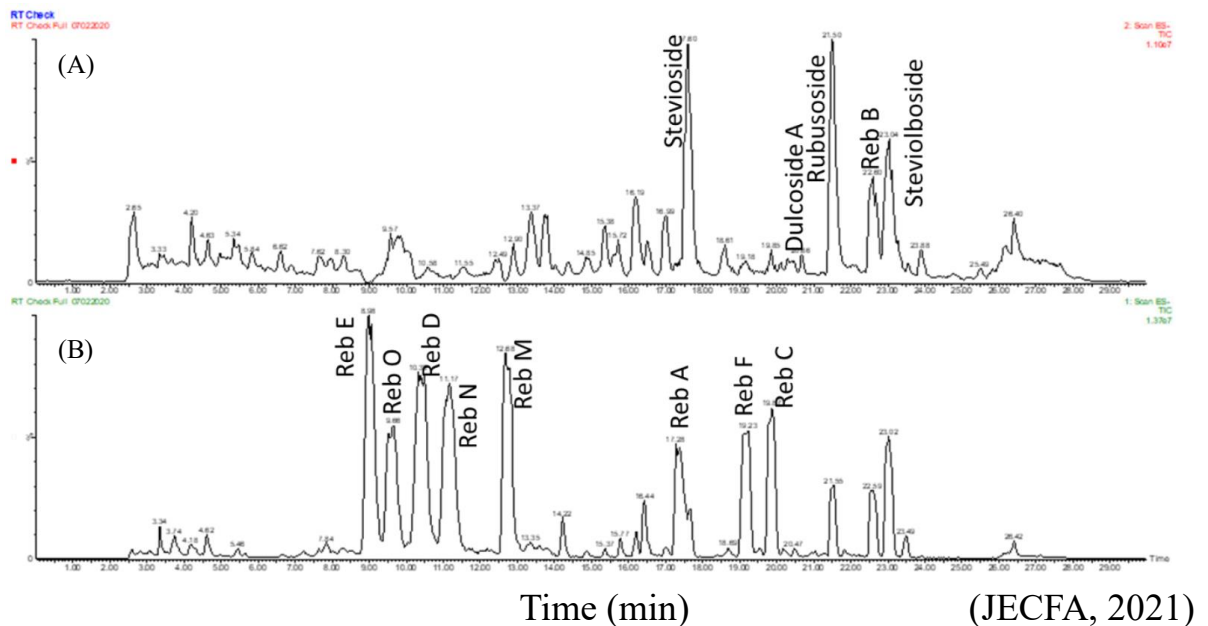
1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2021. Monograph 26. (Framework for) Steviol Glycosides. Compendium of Food Additive Specifications. [https://www.fao.org/3/cb8031en/cb8031en.pdf]
2. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2022. Monograph. Steviol Glycosides. Food Chemical Codex 13. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD, USA.

參考層析圖譜

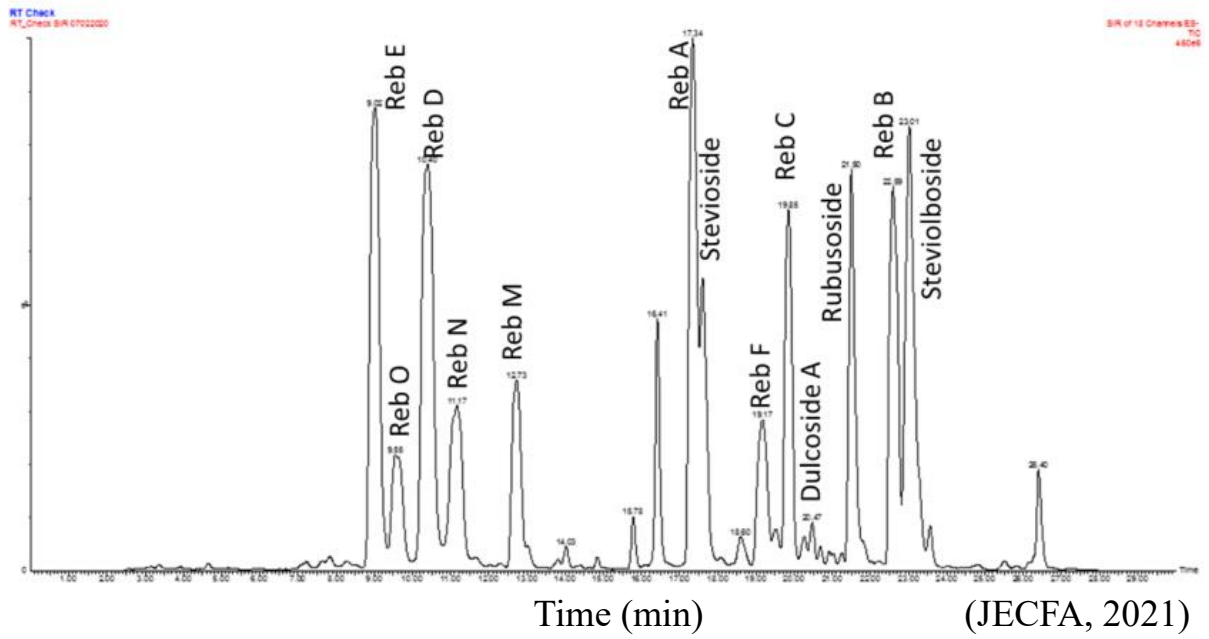


圖一、主要甜菊糖苷標準品之HPLC-UV圖譜

各甜菊糖苷之波峰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、甜菊糖苷樣品於 m/z 50~900 amu (A)及 m/z 901~2000 amu (B)之全掃描圖譜



圖三、甜菊糖苷樣品之SIM圖譜

附表一、各主要甜菊糖苷於波長210 nm下，相對於rebaudioside A之相對感應因子(relative response factor, RRF)

化合物	相對滯留時間 (RRT)	相對感應因子 (RRF)
Rebaudioside E	0.49	0.98
Rebaudioside O	0.53	1.56
Rebaudioside D	0.56	1.16
Rebaudioside N	0.57	1.25
Rebaudioside M	0.72	1.36
Rebaudioside A	1	1
Stevioside	1.02	0.8
Rebaudioside F	1.1	0.97
Rebaudioside C	1.13	1.03
Dulcoside A	1.15	0.83
Rubusoside	1.22	0.65
Rebaudioside B	1.28	0.82
Steviolbioside	1.3	0.76

*所有RRF實測值皆係使用10 mm的UV/PDA流通槽進行分析而得，以製造商提供之對照標準品純度(包括水分及溶劑之校正)計算RRF。建議採用此方法或更改任何操作條件時，對主要糖苷之RRF進行個別確認。

(FCC, 2022)

附表二、次要甜菊糖苷之分子量離子*

化合物	分子量離子[M-H] ⁻
Steviol或其異構物	317
Steviol+1葡萄糖苷	479
Dulcoside A1	625
Steviolbioside異構物或rubusoside異構物	641
Stevioside F或其異構物	774
Dulcoside A異構物	787
Rebaudioside B異構物或sevioside異構物	803
Rebaudioside F異構物	935
Rebaudioside C異構物	949
Rebaudioside A異構物	965
Steviol+4葡萄糖+1阿拉伯糖或其異構物	1097
Steviol+4葡萄糖+1鼠李糖或其異構物	1111
Rebaudioside D異構物	1127
Steviol+5葡萄糖+木糖或其異構物	1259
Rebaudioside N異構物	1273
Rebaudioside M異構物	1289
Rebaudioside O異構物	1435

*本表未包含所有可能之甜菊糖苷，可評估額外之分子量離子 (JECFA, 2021)

附表三、次要甜菊糖苷之碎片離子

化合物	碎片離子[M-H] ⁻
Steviol	317
Steviol+1葡萄糖苷	479
Steviol+2 glucoside-oxygen [M-16]	625
Steviol+2葡萄糖苷	641
Steviol+2葡萄糖苷+1鼠李糖苷	787
Steviol+3葡萄糖苷	803
(Deoxy)-Steviol+4葡萄糖苷	949
Steviol+4葡萄糖苷	965

*本表未包含所有可能之碎片離子，可評估額外之碎片離子 (JECFA, 2021)