

# 甜叶菊质量标准

郭翠容, 王梦月, 李晓波\*

(上海交通大学药学院, 上海 200240)

**[摘要]** 目的:建立甜叶菊的检查、定性鉴别及含量测定方法,为其质量控制提供科学依据。方法:按照中国药典委员会对中药质量标准的技术要求,对甜叶菊进行了性状、显微及薄层色谱鉴别,并对杂质、水分、总灰分、醇浸出物及指标成分(甜菊苷及莱鲍迪苷 A)含量进行测定。结果:性状、显微鉴别、薄层色谱鉴别及含量测定方法重复性好,专属性强;根据 24 批甜叶菊分析结果,拟定甜叶菊杂质不得过 4%,水分不得过 11%,总灰分不得过 9%,醇浸出物不得低于 41%,甜菊苷含量不得低于 2%,莱鲍迪苷 A 含量不得低于 3%。结论:建立的检查、定性鉴别及含量测定方法,能有效控制甜叶菊的质量。

**[关键词]** 甜叶菊; 杂质; 水分; 总灰分; 醇浸出物; 甜菊苷; 莱鲍迪苷 A

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0091-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140091

## Quality Criteria of Folium Steviae Rebaudiana

GUO Cui-rong, WANG Meng-yue, LI Xiao-bo\*

(Pharmacy College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for quality control of Folium Steviae Rebaudiana. **Method:** According to the method provided by Chinese pharmacopoeia methods, the external, microscopic morphological characteristics, thin layer chromatography (TLC) identification method, the content of impurity, moisture, ash, alcohol-soluble extract, Stevioside and Rabaudiside A were determined. **Result:** The external, microscopic characteristic and identification by TLC were obvious and specific. According to the examination results of 24 batches samples, the limits of impurity content, moisture content and ash content should be less than 4%, 11%, 9%, respectively; and the content of alcohol-soluble extract, stevioside and rabaudiside A should not be less than 41%, 2% and 3%, respectively. **Conclusion:** The identification and examination methods established can be used for the quality control of folium Steviae Rebaudiana.

**[Key words]** Folium Stevia Rebaudiana; impurity; moisture; ash; alcohol-soluble extract; Stevioside and Rabaudiside A were determined

甜叶菊别名甜菊、甜草、糖草、甜茶,原产于南美亚热带地区,巴拉圭和巴西交界的高山草地。目前,我国 27 个省区有引种,以安徽、黑龙江、甘肃为主产区。甜叶菊的叶具有高甜度、低热量、无副作用等优点,其甜度相当于蔗糖的 250~300 倍,可替代蔗糖和合成甜味剂,但其所含热量仅为蔗糖的 1/300。甜叶菊叶具有较好的抗菌<sup>[1]</sup>、抗氧化活性<sup>[2]</sup>,可有效预防和治疗糖尿病<sup>[3]</sup>,还能软化血管和降低血压,

对肥胖症<sup>[4]</sup>、动脉硬化、冠心病<sup>[5]</sup>有较好的防治效果。然而历版《中国药典》均未收载甜叶菊。本文以 2010 年版《中国药典》设计方案及技术要求为指导,从性状、显微、薄层鉴别、质量检查及指标成分(甜菊苷及莱鲍迪苷 A)含量测定等方面对甜叶菊进行系统研究,为甜叶菊干燥叶质量控制提供依据。

### 1 仪器与试剂

显微镜(OLYMPUS, Japan), 1200 系列高效液

**[收稿日期]** 20131217(015)

**[基金项目]** 国家药典委员会项目(TS21)

**[第一作者]** 郭翠容, 硕士, 从事生药学多个铺位研究, Tel: 021-34204805, E-mail: han\_bendan@126.com

**[通讯作者]** \* 李晓波, 博士, 教授, 从事生药学研究, Tel: 021-34204806, E-mail: xbli@sjtu.edu.cn

相色谱仪(美国 Aglient, 包括四元梯度泵, DAD 紫外检测器), HSGF245 硅胶板(厚度 0.15 ~ 0.2 mm, 烟台江友硅胶开发有限公司); 甜菊苷(Stevioside, ST)及莱鲍迪苷 A(Rebaudioside A, RA)对照品(自制, 经解析紫外光谱、红外光谱、质谱及核磁数据, 确定其化学结构, 纯度经高效液相色谱测定 > 98%), 甲醇、正丁醇、叔丁醇、乙酸、硫酸均为分析纯; 水为去离子水。

收集 24 批药材, 经上海交通大学药学院王梦月副教授鉴定为甜叶菊 *Stevia rebaudiana* Bertoni 的干燥叶。

## 2 方法和结果

**2.1 药材外观** 将药材或用水浸润后的药材置于光亮处, 观察。叶片多破碎或皱缩, 呈暗绿至棕绿色。完整的叶片呈倒卵形或长椭圆形, 长 3.0 ~ 6.5 cm, 宽 0.5 ~ 1.5 cm, 中上部边缘有锯齿, 一般 7 ~ 14 对, 先端钝, 基部楔形全缘, 三出羽状叶脉, 主脉明显, 在下表皮明显凸起, 两面均被柔毛; 具短叶柄; 叶片薄革质, 易碎; 气清香, 味极甜。见图 1。

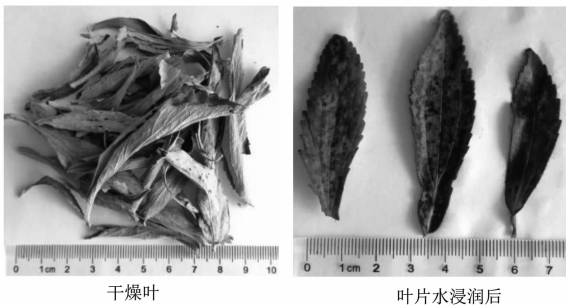
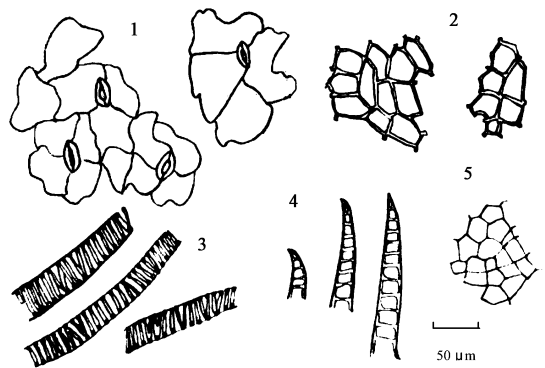


图 1 甜叶菊叶生药

### 2.2 显微鉴定

**2.2.1 粉末显微特征** 取适量粉末于载玻片上, 摊平, 加水合氯醛试液适量, 加热, 进行透化, 再加入稀甘油, 封片, 观察其特征。粉末呈暗绿色或黄绿色。表皮细胞较大, 形状不规则; 气孔较多, 多为不定式; 非腺毛较多, 单列式的多细胞线状毛, 由 5 ~ 12 个细胞组成, 35 ~ 100 μm, 稍弯曲; 多导管, 多为螺旋导管, 直径约为 15 ~ 45 μm, 长 30 ~ 125 μm, 也可见网状导管。见图 2。

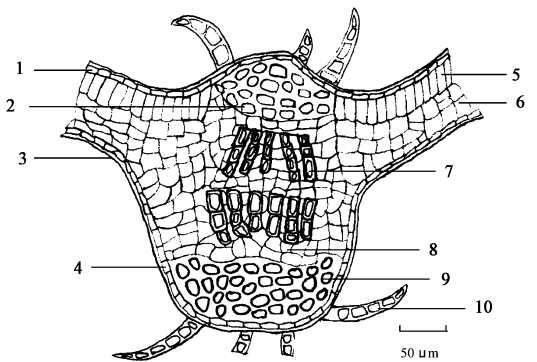
**2.2.2 叶片横切** 取完整叶片的中间部分, 过主脉横切片(厚 10 ~ 20 μm), 取切片于载玻片上, 加水合氯醛试液适量, 加热, 进行透化, 再加入稀甘油, 封片, 观察其特征。上下表皮均为 1 列横向延长的细胞, 叶缘处可见单列式的多细胞非腺毛, 稍弯曲, 有气孔分布; 栅栏组织 1 列, 呈长圆柱形, 与海绵组织分化明显, 海绵组织 3 ~ 5 列; 主脉向下突出, 一个维



1. 气孔; 2. 表皮细胞; 3. 导管; 4. 非腺毛; 5. 薄壁细胞

图 2 甜叶菊叶的粉末特征

管束, 外韧型, 主脉上下表皮内侧均有厚角组织, 使主脉也向腹面略突出。见图 3。



1. 上表皮细胞; 2. 厚角组织; 3. 蜡质; 4. 下表皮细胞; 5. 栅栏组织; 6. 海绵组织; 7. 木质部; 8. 韧皮部; 9. 厚角组织; 10. 非腺毛

图 3 甜叶菊叶片主脉横切片显微特征

### 2.3 薄层色谱鉴别

**2.3.1 供试液制备** 取甜叶菊粉末(过 3 号筛)约 0.5 g, 精密称定, 精密加入甲醇 25 mL, 超声处理(功率 750 W, 频率 55 KHz) 30 min, 放冷, 摇匀, 过滤, 备用。选择了 3 种体系的展开剂进行薄层色谱鉴别, 分别为①氯仿-甲醇-水(7:4:1); ②正丁醇-乙酸-水(5:1:1); ③叔丁醇-乙酸-水(5:1:1)。结果 3 种展开体系均有较好的展开效果, 斑点清晰, 且 Rf 值适度。在①展开体系中  $Rf_{ST} = 0.56$ ,  $Rf_{RA} = 0.52$ ; ②展开体系中  $Rf_{ST} = 0.42$ ,  $Rf_{RA} = 0.39$ ; ③展开体系中  $Rf_{ST} = 0.51$ ,  $Rf_{RA} = 0.47$ 。

**2.3.2 对照品溶液配制** 分别称取甜菊苷及莱鲍迪苷 A 对照品适量, 用甲醇溶解, 配制成质量浓度为  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液, 备用。

**2.3.3 点样** 将样品溶液及各对照品溶液分别点样, 点样点距硅胶板下边缘 1 cm, 点样量 5 μL, 点样斑点直径控制 < 3 mm。

**2.3.4 展开** 将展开剂倒入双槽层析缸(10 cm ×

10 cm)的一侧,再将已点样的硅胶板放入另一侧,密封,预饱和 15 min,将展开剂缓缓倒入硅胶板一侧,室温条件下展开,待展距达到 8 cm 时,取出,自然晾干。

**2.3.5 显色** 用喉头喷雾器将 50% 硫酸-乙醇溶液均匀的喷至硅胶板上,置于 110 ℃ 的烘箱内加热 8 ~ 10 min,使其显色,测定 Rf 值。

**2.4 杂质测定** 参照《中国药典》2010 年版一部附录 II A 药材和饮片取样法进行取样后,再参考附录 IX A 杂质检查法进行测定<sup>[8]</sup>。

**2.5 水分测定** 参照《中国药典》2010 年版一部附录 IX H 水分测定法第一法(烘干法),对甜叶菊药材中水分进行测定<sup>[8]</sup>。

**2.6 总灰分测定** 参照《中国药典》2010 年版一部附录 IX K 灰分测定法(总灰分测定法),对甜叶菊药材总灰分进行测定<sup>[8]</sup>。

**2.7 醇浸出物测定** 参照《中国药典》2010 年版一部附录 X A 浸出物测定法(醇溶性浸出物测定法),对甜叶菊药材醇浸出物(70% 乙醇)进行测定<sup>[8]</sup>。

**2.8 甜菊苷及莱鲍迪苷 A 含量测定**

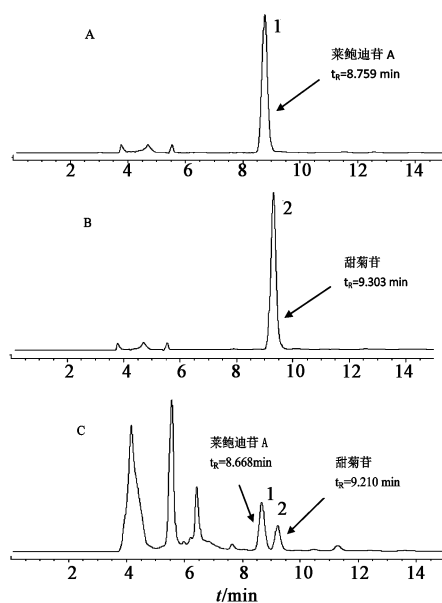
**2.8.1 色谱条件** Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(33:67),流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃,检测波长 210 nm。

**2.8.2 对照品溶液制备** 分别取甜菊苷及莱鲍迪苷 A 对照品适量,精密称定,加入甲醇,制成质量浓度为 2.0 g·L<sup>-1</sup> 的溶液,即得。

**2.8.3 供试品溶液制备** 称取药材粉末(过 3 号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定其质量,超声处理 30 min(功率 750 W,频率 55 KHz),冷却,再次称定其质量,用甲醇补足质量,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.8.4 系统适用性** 建立的 HPLC 含量测定方法系统适用性良好,甜菊苷及莱鲍迪苷 A 分别与前后峰的分离度均达 1.5 以上,理论塔板数均在 10 000 以上,溶剂峰在甜菊苷及莱鲍迪苷 A 峰位置均无干扰。见图 4。

**2.8.5 线性关系考察** 分别取 2.0 g·L<sup>-1</sup> 的甜菊苷及莱鲍迪苷 A 对照品溶液,作为对照品贮备液。将对照品贮备液稀释成 0.1,0.2,0.4,0.8,1.6 g·L<sup>-1</sup>,精密吸取上述稀释液及贮备液各 5 μL,以峰面积 Y 对质量浓度 X(g·L<sup>-1</sup>)求得甜菊苷及莱鲍迪苷 A 线性方程分别为  $Y = 2197.2X - 2.9667 (r = 0.9996)$ ;  $Y = 1768.1X - 1.6289 (r = 0.9999)$ 。两者线性范围均为



A, B. 对照品; C. 样品; 1. 甜菊苷; 2. 莱鲍迪苷 A

图 4 甜叶菊叶 HPLC

0.1 ~ 2.0 g·L<sup>-1</sup>,与峰面积有良好的线性关系。

**2.8.6 检测限与定量限** 采用信噪比法,以空白溶剂进样后,测定噪声,进已知浓度的对照品溶液,根据其对应的峰高值,将对照品溶液稀释至约 3,10 倍信噪比高度的浓度,即为检测限与定量限。甜菊苷检测限为 0.000 8 g·L<sup>-1</sup>,定量限为 0.003 g·L<sup>-1</sup>;莱鲍迪苷 A 检测限为 0.002 g·L<sup>-1</sup>,定量限为 0.006 5 g·L<sup>-1</sup>,表明该方法灵敏度高。

**2.8.7 精密度试验** 取甜菊苷及莱鲍迪苷 A 对照品溶液,按上述色谱条件,分别连续进样 6 次(进样量 5 μL),结果甜菊苷峰面积的 RSD 0.23%,莱鲍迪苷 A 峰面积的 RSD 0.17%,表明方法精密度良好。

**2.8.8 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于 1,2,4,6,8,10,12 h 进样(进样量 5 μL),结果甜菊苷 RSD 0.91%,莱鲍迪苷 A RSD 0.84%,表明样品在 12 h 内稳定性良好。

**2.8.9 重复性试验** 取 21 号样品粉末(过 3 号筛),按上述供试品溶液制备方法,分别制备 6 份供试液,进样 5 μL,计算甜菊苷及莱鲍迪苷 A 含量,结果甜菊苷 RSD 0.97%,莱鲍迪苷 A RSD 2.1%,表明该方法重复性良好。

**2.8.10 加样回收率试验** 精确吸取甜菊苷对照品溶液 9 mL(1.0 g·L<sup>-1</sup>),莱鲍迪苷 A 对照品溶液 17.5 mL(1.0 g·L<sup>-1</sup>),6 份,置锥形瓶中,水浴上蒸干,取 21 号样品粉末(过 3 号筛)6 份,每份约 0.25

g,精密称定,至锥形瓶中,按供试品溶液制备项下方法,制备供试品溶液,进样 5 μL,计算回收率。结果甜菊苷平均回收率为 95.48%,RSD 为 0.68%,莱鲍迪苷 A 平均回收率为 99.53%,RSD 为 1.09%,表明该方法准确度良好。

**2.8.11 样品测定** 取各批次甜叶菊样品,按供试品溶液制备项下方法制备,按上述色谱条件进样,计算甜菊苷及莱鲍迪苷 A 含量。24 批甜叶菊叶来源、杂质、水分、总灰分、醇浸出物及指标成分含量测定结果见表 1。根据测定结果,24 批药材质量差异较大,杂质为 1.01% ~ 5.11%,水分为 6.19% ~ 12.70%,总灰分为 6.05% ~ 10.82%,醇浸出物为 39.7% ~ 61.2%,甜菊苷含量为 1.54% ~ 5.98%,莱鲍迪苷 A 含量为 2.16% ~ 14.35%。

表 1 24 批甜叶菊叶来源、杂质、水分、总灰分、醇浸出物及指标成分含量(n=3) %

No	收集地	杂质	水分	总灰分	醇浸出物	甜菊苷	莱鲍迪苷 A
1	河北石家庄市	3.11	7.31	8.58	48.11	2.47	11.50
2	江苏南京市	3.02	7.37	7.35	54.72	2.80	14.35
3	云南昆明市	4.51	6.38	8.69	42.81	5.98	2.64
4	黑龙江牡丹江市	2.09	6.35	6.83	59.01	5.01	6.73
5	湖南衡阳市	1.13	11.32	10.46	49.65	3.75	2.16
6	辽宁沈阳市	1.09	6.56	9.36	44.96	4.96	3.40
7	江西南昌市	3.49	6.36	6.42	61.21	5.17	6.40
8	福建泉州市	1.99	6.59	6.81	55.64	4.78	6.41
9	四川成都市	1.48	8.37	8.11	48.32	2.65	12.29
10	山东临沂市	5.11	7.34	6.05	44.64	4.92	2.43
11	湖北武汉市	4.38	6.79	7.16	55.78	4.53	6.52
12	山东青岛市	4.09	8.02	9.07	50.13	4.27	8.11
13	浙江杭州市	3.70	6.53	6.64	54.94	4.04	6.48
14	安徽马鞍山市	4.95	6.19	6.62	57.90	5.27	6.01
15	广东广州市	1.01	11.07	6.26	50.64	4.38	9.06
16	广西玉林市	1.99	8.16	10.82	39.72	1.53	8.41
17	福建福州市	2.32	11.01	6.46	57.61	5.39	7.11
18	江苏苏州市	4.68	7.12	7.81	47.67	4.75	5.54
19	河北保定市	3.88	10.28	7.24	58.13	5.05	6.47
20	上海	2.99	10.17	8.42	47.11	2.39	10.97
21	安徽亳州市	2.88	9.74	7.83	51.84	3.94	8.00
22	安徽宿州市	3.41	11.51	6.98	51.68	4.29	6.89
23	安徽阜阳市	2.92	12.70	10.13	47.93	1.83	12.53
24	安徽明光市	3.04	10.41	9.73	48.53	2.88	9.24

### 3 讨论

本文从甜叶菊的生药性状以及显微特征包括粉末装片和叶片的横切面进行系统的观察和鉴别,建立了薄层色谱鉴别甜叶菊的方法及 HPLC 测定甜菊苷及莱鲍迪苷 A 含量的方法。

在薄层色谱鉴别实验中,选择的 3 种展开体系,均能有效分离鉴定甜菊苷及莱鲍迪苷 A,且斑点清晰,Rf 值适度。但正丁醇-乙酸-水及叔丁醇-乙酸-水体系展开速度缓慢,故选择三氯甲烷-甲醇-水作为展开剂。

根据文中实验结果建议甜叶菊药材杂质上限为 4%,甜叶菊药材水分上限为 11%,甜叶菊药材的总灰分上限为 9%,甜叶菊药材的浸出物下限为 41%,甜叶菊中甜菊苷含量不得低于 2%,莱鲍迪苷 A 含量不得低于 3%。

### [参考文献]

- [1] Sumit Ghosh, Enketeswara Sududhi, Sanghamitra Nayak. Antimicrobial assay of Stevia rebaudiana Bertoni leaf extracts against 10 pathogens[J]. Int J Integrative Bio, 2008,2(1):27.
- [2] Il-Suk Kim, Ok-Hwan Lee, Mira Yang, et al. The antioxidant activity and the bioactive compound content of Stevia rebaudiana water extracts [J]. LWT-Food Sci Technol,2011,44(5):1328.
- [3] 曹芳,冯文静,陈明,等. 甜菊糖苷降血糖作用研究[J]. 中国药物与临床,2009,9(2):127.
- [4] Ozbayer Cansu, Kurt Hulyam, Kalender Suna, et al. Effects of Stevia rebaudiana ( Bertoni ) extract and N-nitro-L-arginine on renal function and ultrastructure of kidney cells in experimental type 2 Diabetes [J]. J Med Food,2011,14(10):1215.
- [5] 张双捷,许德义. 异甜菊醇抗豚鼠离体心脏缺氧复灌损伤作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2004, 18(6):427.
- [6] 林美珍. 甜叶菊的生药鉴定[J]. 井冈山学院学报:自然科学,2006,27(8):51.
- [7] 杨春树. 药用植物学[M]. 上海:上海科技出版社,1997:219.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:514.

[责任编辑 顾雪竹]