

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

甜菊葉中甜菊苷之分析

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：90-FH-08
執行期間：90年1月1日至90年11月30日

計畫主持人：洪端良
共同主持人：
計畫參與人員：張金銅，胡靜美，廖郁宇，林育琪

執行單位：食品衛生系

中華民國 91年 2月 18日

摘要:

本研究從甜菊葉中萃取出甜菊苷，以液體層析儀定量分析其含量。嘗試以近紅外線光譜技術建立其檢量線方程式，快速定量分析甜菊葉中甜菊苷含量。結果顯示，檢量線組之 30 個樣品，甜菊苷含量範圍 0.05-12.27mg/100g，以近紅外線波長所建立之檢量線方程式，迴歸決定係數(R²)為 0.99；檢量線之標準機差(SEC)為 0.46。另以 30 個樣品測試檢量線方程式之可信度，經可信度測試結果顯示，估測值之標準機差為 0.48。因此，近紅外線光譜技術可應用於甜菊葉中甜菊苷含量之快速分析及工廠之品質管制。

關鍵字：近紅外線光譜技術、甜菊葉、甜菊苷

前言:

甜菊苷是從甜葉菊(*Stevia rebaudiana*)之葉子中萃取出來的一種糖。甜葉菊原產於巴拉圭與巴西間之山脈，早在 400 多年前就被巴拉圭居民用來製作甜茶。60 年代末期，由於國際普遍對人工甜味劑之安全性持懷疑的態度，因此，受到許多國家的重視，特別是日本廣泛的應用甜菊糖。中國大陸為甜菊葉最大出口國，此外，歐洲及美洲的國家對目前甜菊葉的興趣也在增加，前景看好。台灣雖有種植但仍未量產而工業化。

近幾年來這些天然甜味劑已廣泛的應用於食品、飲料及藥品工業上。甜菊苷需求的增加則導致甜葉菊中甜菊苷品管的重要。液體層析儀是直接分析甜菊苷的方法，這方法準確性高，但樣品前處理複雜、耗費時間長及成本高。因此尋求快速分析法方能應付天然甜味劑之製造工業。

在日益重視品質之市場狀態下確實掌握製程之品質，為各種製造業必備之條件，最理想者能夠在不破壞樣品條件下檢測，實際上以目前最新的分析技術而言，仍未能滿足此項要求，而近紅外線分光術(near infrared spectroscopy)是目前非破壞性分析法中較為可行之一種分析技術。近紅外線分光術在歐美國家約1970年代，日本約在1980年代才正式被廣泛應用，近年來已普遍的使用於食品工業界。近紅外線之波長範圍為700~2500nm，在紅外線光譜區域內所發生之吸光現象主要是存在於分子中氫原子結合基之基本伸縮振動(strength vibration)之倍振動(overtone)或結合振動(combination)所造成之吸收。在定量分析上，由於食品是由多種成分混合而成，以近紅外線掃瞄可得到複雜之光譜，除欲測定之成分外，對於其他成分也有吸收，因此，必須以多波長之迴歸方程式配合傳統分析之數據，分別求得各分量之方程式，一般以2~6個波長求得成分之檢量線方程式。未知成份含量樣品只要以近紅外線掃瞄所得到之光譜，既以此檢量線方程式預測其成份含量。近紅外線分光儀雖具非破壞性、快速、省時、省力、成本低及無化學污染等多項優點，但最大的缺點是建立具高可信度之檢量線方程式及群化模式，欲建立高可信度之檢量線方程式則必須收集一批樣品成份含量及性質範圍大，並具有代表性之樣品，且配合高精密度及準確度之分析方法，才可建立具高可信度之檢量線方程式及群化模式。

本研究之目的是嘗試應用近紅外線分光術於甜菊葉中甜菊苷之分析，以期作為工廠甜菊葉中甜菊苷產品品質管制之用。

材料與方法

(一)、樣品:

試驗樣品60個由該公司所提供，該公司採自中南部地區。甜菊葉經45°C熱風乾燥後，隨即研磨成0.1mm粉末，隨機取樣分成兩批，30個作為檢量線組，30個作檢量線方程式之可信度測試組。

(二)、液體層析儀分析甜菊樣品之前處理：

甜菊葉粉末以熱水萃取，再以NaOH調整到pH9，以Millipore membran過濾。液相層析法是使用Lichrosorb RP-18 (5 μ m)為分離管柱，移動相是methanol/NaOH (65:35)溶液，流速為 1.5ml/min，偵測器以210nm測定樣品之吸光值。

(三)、近紅外線分光儀之掃瞄

近紅外線分光儀係採用 NIRSystem 6500 型(向亞洲蔬菜研究發展中心借用)，波長範圍從400~2500nm(包括可見光)，測定反射光譜。以複因子迴歸統計分析法(multiple regression analysis)建立成份之檢量線方程式作為預估之用。可信度之測試(validation)另外一批樣品之估測，以相關分析評估其可信度。

結果與討論

成份之檢量線方程式必須選擇最適波長嘗試以樣品原始光譜、光譜一次微分及二次微分三種數學處理，並以複因子迴歸決定係數及最低的標準機差來決定最佳的波長組合由表一所示，最適的檢量線方程式需 5 個波長而分別使用於三種數學處理，這三種數學處理中，以一次微分(R^2 0.91, SECO.46)及二次微分(R^2 0.90, SECO.49)之統計值優於原始光譜(R^2 0.89, SECO.64)，而以一次微分之統計值最佳(R^2 0.91, SECO.46)。檢量線方程式測試結果如表二所示 r 為 0.90，SEV 為 0.48。此結果顯示以一次微分所建立之檢量線方程式具有較佳之線性關係，檢量線方程式估測可靠程度也較高(表二)。

以二次微分所建立之檢量線方程式(如表三所示)，其準確度及精密度均較僅用原始光譜、光譜二次微分高。由於近紅外線光譜技術具樣品前處理簡單、無化學污染、操作成本低、分析速度快等優點。因此，此技術可應用於甜菊葉中甜菊 工廠之品質管制。

參考文獻

1. Tateo-F, Escobar-Sanchez-ML, Bononi-E. Stevioside content of Stevia rebaudiana(Bertoni) grown in East Paraguay. Italian Journal of Food Science. 11(3):265-269.
2. Bovanova-L, Brandsteterova-E, Baxa-S. HPLC determination of stevioside in plant material and food samples. Food Research and Technology. 1998. 207(5):352-355.
3. Tateo-F, Mariotti-M, Bononi-M, Lubian-E, Martello-S, Cornara-L. Stevioside content and morphological variability in a population of Stevia rebaudiana(Bertoni) Bertoni from Paraguay. Italian Journal of Food Science. 1998. 10(3):261-267.
4. Nishiyama-P, Alvarez-M, Vieira-LGE. Quantitative analysis of stevioside in the leaves of Stevia rebaudiana by near infrared reflectance spectroscopy. 1992. Journal of the Science of Food and Agriculture. 59(3):277-281.
5. Lawrence-JF, Charbonneau-CF. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 1998. 71(5):934-937.

Table 1. Statistical results of calibration and validation of Stevia leaves with three different mathematical treatments by near infrared spectroscopy

	R ²	Standard deviation	Wavelengths				
Original spectrum	0.89	0.64	1340	2130	2140	2260	2380
First derivative	0.91	0.46	1360	1650	1800	2280	2460
Second derivative	0.90	0.49	2050	2260	2280	2400	2400

Table 2. Calibration and validation statistical data for NIRS analysis of steviosides content in Stevia leaves

	R ²	SEC	r	SEP
Calibration set	0.91	4.7		
Validation set			0.90	6.5

Table 3. Calibration equation of the first derivative for NIRS determination of stevioside

Wavelength(nm)	Coefficients
-	9.8
1360	625.3
1650	-215.8
1800	842.1
2280	-751.6
2460	-120.1