

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0114-07

UPLC-QTOF/MS 法研究甜菊糖 结晶过程中化学成分的分布

额尔敦巴雅尔^{1,2 *}, 王欢欢^{1,2}, 焦利卫^{1,2}, 赵鹏宇^{1,2}, 杨文江^{1,2}

¹河北省天然色素工程技术研究中心; ²晨光生物科技集团股份有限公司, 邯郸 057250

摘要:本研究通过超高效液相-串联四级杆飞行时间质谱(Ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-QTOF/MS),对甜菊糖原糖和结晶糖的成分进行了分析鉴定:结果显示:甜菊糖原糖中共鉴定45种物质,甜菊糖苷类17种,氨基酸类21种,黄酮类6种,皂苷类1种;而结晶糖中共鉴定出9种物质,含甜菊糖苷类8种,氨基酸类1种,此研究明确了甜菊糖结晶过程中各物质去向及分布情况,为提高RA产品含量提供了理论依据。

关键词:甜菊糖;超高效液相-串联四级杆飞行时间质谱;结晶;化学成分

中图分类号:R284.1; Q946.91

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.016

Distribution of Each Component in Stevia of Crystallization Process by UPLC-QTOF/MS

Eerdunbayaer^{1,2 *}, WANG Huan-huan^{1,2}, JIAO Li-wei^{1,2}, ZHAO Peng-yu^{1,2}, YANG Wen-jiang^{1,2}

¹Hebei Industrial Technology Institute of Plant Natural Pigments; ²Chenguang Biotech Group Limited Corporation, Handan 057250, China

Abstract: In this study, the composition of stevia and crystallization of stevia has been studied by ultra high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF/MS). The results showed that 45 kinds of substances were identified in stevia, among which, there were 17 species of stevia glycoside, 21 amino acids, 6 kinds of flavonoids, and 1 kind of saponin. 9 kinds of substances were identified in the crystallization sugar, 8 species of stevia glycoside and 1 kinds of amino acids. The whereabouts and distribution of various substances in the process of crystallization of stevia were clarified. A theoretical basis for improving the content of RA products was provided.

Key words: stevioside; ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF/MS); crystallization; chemical composition

甜菊糖是一种适用于各种人群的新型甜味剂^[1],其主要成分中菜鲍迪苷A(Rebaudioside A, RA)具有甜度高,甜味纯正的特点,相比其他甜菊糖更容易被消费者接受^[2]。目前高RA产品已经成为甜菊糖精加工的高端产品。甜菊糖苷产品中RA含量比例不仅与原料有关,而且与加工工艺技术有关^[3]。目前工业生产高RA的方法是结晶法^[4]。许多学者对结晶工艺进行了研究,张扬等人^[5]对甜菊糖结晶工艺进行研究,确定了甜菊糖在甲醇中重结晶可以获得纯度>90%的RA产品。李培^[6]对甜菊糖结晶用溶剂、用量、温度、时间等因素进行研究,确定了一种结晶工艺,使甜菊甙/菜鲍迪苷A(Stevioside/Rebaudioside A, S/RA)由原料的0.957降至0.072 mg。但是关于甜菊糖结晶过程中的整体成分变化方面的研究报道较少,我们利用RA含量50.0%以上的甜菊糖原糖结晶生产RA含量95.0%以上的产品,以了解甜菊糖原糖和结晶糖产品中成分的差别。目前对甜菊糖成分的分析检测手段有近红外光谱法、毛细管电泳法、亲水作用色谱法、气相色谱质谱法等,也有使用液相色谱-质谱分析定性的研究,但多为低分辨率的,得到的质谱裂解信息有限,超高效液相-串联四级杆飞行时间质谱(Ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-QTOF/MS)分辨率和灵敏度均较高,在天然产物化学成分的定性分析中占有重要地位。本次采用UPLC-QTOF/MS的方法,对甜菊糖和结晶糖产品进行成分分

析,并对成分种类差异进行了对比。实验采用的 UPLC-QTOF/MS 检测方法可以较好地识别甜菊糖产品中的化学成分。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

DK-98-2 型水浴锅:天津泰斯特公司;CF41 型结晶器:北京优莱博公司;JJ-1 型搅拌器:常州国华公司;R201L + W2-100 旋转蒸发仪:上海申生科技公司;SAgilentPoroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 2.7 μm), Acuity UPLC 与 G2 QTOF 联用系统:美国 Waters 公司。甲醇:色谱纯:天津市永大化学试剂公司。Rebaudioside A (RA)、Stevioside (STV)、Rebaudioside F (RF)、Rebaudioside C (RC)、Rubusoside、Dulcoside A (DA)、Rebaudioside B (RB)、steviolbioside 日本 WAKO 标准品。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

甜菊糖样品的制备,晨光生物 RA60 甜菊糖,批号:58543-16-1;原糖溶液在结晶器中 33 °C 保温,加入 5% 的 RA(97%) 晶种,保温搅拌 1 h,然后搅拌降温 4 h 由 33 °C 降至 25 °C,(1 °C/30 min);再搅拌 2 h 10 mins 降温至 12 °C(1 °C/10 mins),最后搅拌降温 5 mins 至 3 °C,保温搅拌 18 h。结晶完成后减压抽滤分别得到结晶糖和母液糖。此结晶过程中涉及搅拌的速率均为 150 rpm。

样品溶液的制备 称取结晶糖 20 mg,溶于 2 mL 50% 的甲醇/水溶液中,经 15000 rpm 离心,取上清液即得结晶糖样品溶液。

称取原糖 20 mg,溶于 2 mL 50% 的甲醇/水溶

液中,经 15000 rpm 离心,取上清液即得甘肃原糖样品溶液。

1.2.2 UPLC 色谱条件

UPLC-QTOF/MS 检测方法:

Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 × 150 mm, 2.7 μm);流动相:0 ~ 2 min(20% A), 2 ~ 20 min(20% ~ 35% A), 20 ~ 25 min(35% A), 25 ~ 35 min(35% ~ 50%), 35 ~ 45 min(50% ~ 100%), 45 ~ 48 min(100% A), 48 ~ 48.1 min(100% ~ 20%), 48 ~ 50 min(20% A);柱温:35 °C;体积流量:0.4 mL/min;进样量:10 μL。

1.2.3 质谱条件

电喷雾电离(ESI)离子源,正、负离子模式,质量扫描范围(*m/z*)100 ~ 2000,毛细管电压为 3 kV(负离子模式),样品锥电压 40 V,提取锥电压 4 V,源温 110 °C,脱溶剂气温 300 °C,脱溶剂气流速度 700 L/h。

1.2.4 甜菊糖检测方法

依照国家标准 GB 8270-2014 进行甜菊糖苷含量检测^[7]。

2 结果与分析

2.1 甘肃原糖中的成分分析结果

采用 UPLC-QTOF/MS 方法,对甜菊糖进行化学成分的定性分析,负离子模式下得到的峰谱图如图 1。根据检测的各物质成分的保留时间、质谱信息并结合 SciFinder 数据库及相关文献^[8-32]对其进行成分鉴定确认,共鉴定得到了 45 种物质,其中甜菊糖类 17 种,氨基酸类 21 种,黄酮类 6 种,皂苷类 1 种,详

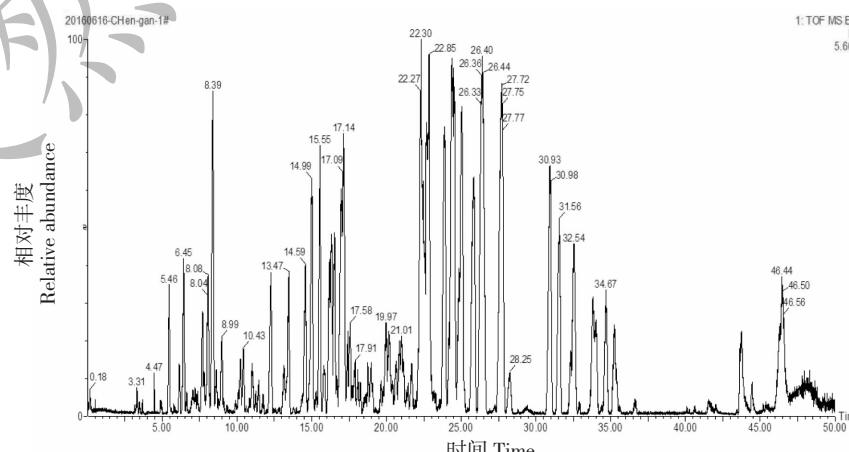


图 1 原糖总离子流图

Fig. 1 Spectrum of UPLC-MS of raw sugar

细结果见表1。

2.2 甘肃原糖中的成分分析结果

2.2.1 甜菊糖类化合物的鉴定

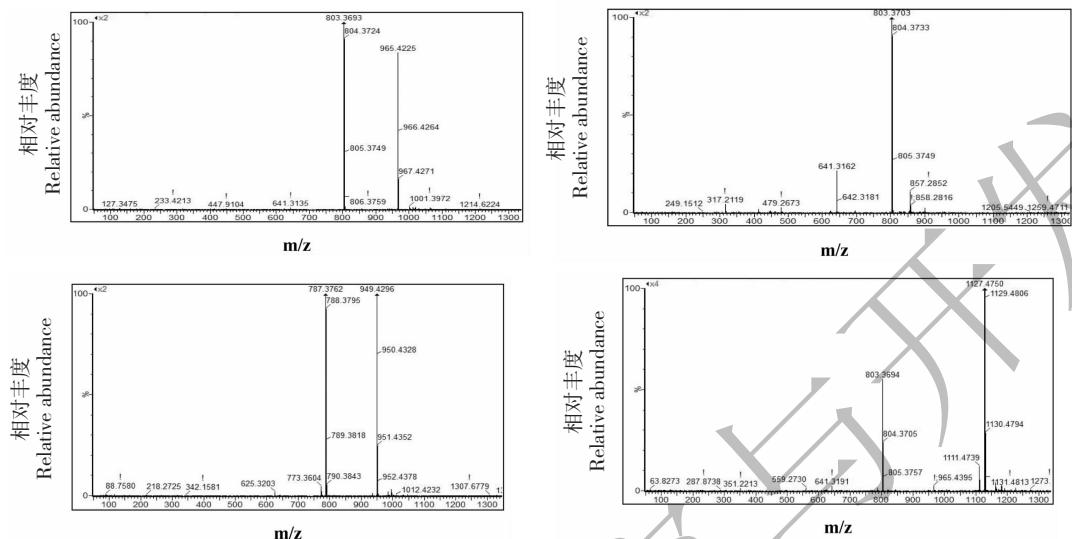


图2 负离子模式下甜菊糖苷 RA、RB、RC、RD 二级质谱图

Fig. 2 MS/MS spectra of RA, RB, RC, RD in negative ion mode

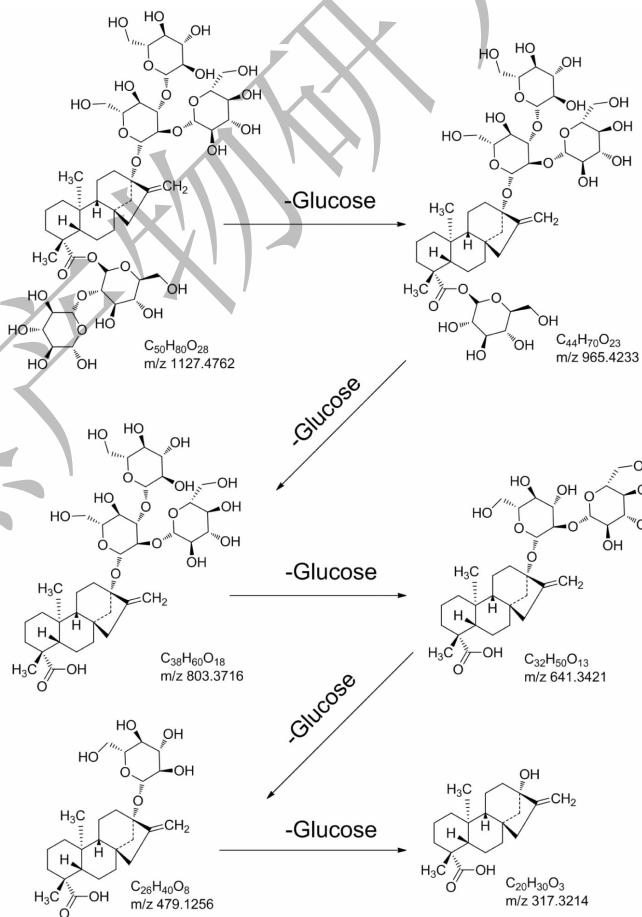


图3 甜菊糖苷类结构和可能的裂解途径

Fig. 3 Structure and possible chemical transformation pathway of stevias

结合 Scifinder 数据库、和甜菊糖苷可能的裂解途径分析定性,甜菊糖共鉴定出 17 种甜菊糖苷类物质

2.2.2 黄酮类化合物的鉴定

结合 Scifinder 数据库、和黄酮类可能的裂解途径分析定性,甜菊糖共鉴定出 6 种黄酮类物质。

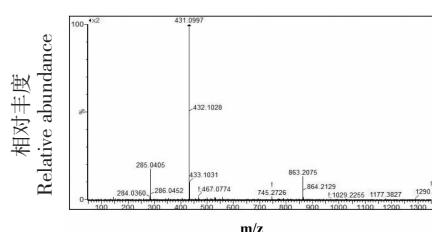


图 4 负离子模式下,黄酮类化合物二级质谱图

Fig. 4 MS/MS spectra of Flavonoids in negative ion mode

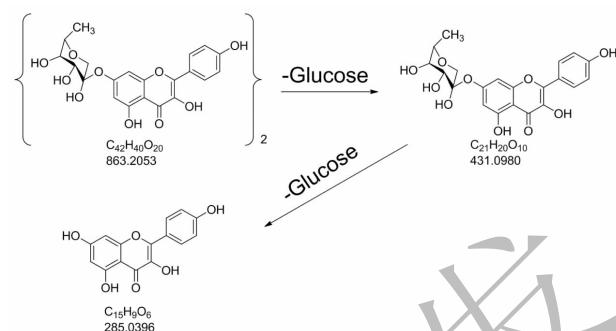


图 5 负离子模式下,黄酮糖苷类可能的裂解途径

Fig. 5 Structure and possible chemical transformation pathway of flavonoids

表 1 原糖中各物质信息

Table 1 Compounds information in raw sugar

序号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	$[M-H]^-$	分子式 Formula	分类 Classification
1	4.47	脯氨酸-脯氨酸-天冬氨酸-丝氨酸	413.1651	$C_{17}H_{26}N_4O_8$	氨基酸类
2	5.46	天冬酰胺-天冬氨酸-天冬酰胺-丝氨酸	447.1493	$C_{15}H_{24}N_6O_{10}$	氨基酸类
3	6.16	脯氨酸-谷氨酸-脯氨酸-丝氨酸	427.1807	$C_{18}H_{28}N_4O_8$	氨基酸类
4	6.45	山奈酚-7-鼠李糖苷	431.1933	$C_{21}H_{20}O_{10}$	黄酮类
5	7.7	苯丙氨酸-丝氨酸-丝氨酸-苏氨酸	439.1811	$C_{19}H_{28}N_4O_8$	氨基酸类
6	8.07	脯氨酸-苏氨酸-亮氨酸-脯氨酸	425.2402	$C_{20}H_{34}N_4O_6$	氨基酸类
7	8.38	Kanzonol H	423.2177	$C_{26}H_{32}O_5$	黄酮类
8	8.62	脯氨酸-苏氨酸-亮氨酸-脯氨酸	425.2380	$C_{20}H_{34}N_4O_6$	氨基酸类
9	8.98	Licoricidin	423.2177	$C_{26}H_{32}O_5$	黄酮类
10	10.23	谷氨酰胺-组氨酸-谷氨酰胺-组氨酸	547.2384	$C_{22}H_{32}N_{10}O_7$	氨基酸类
11	10.43	脯氨酸-脯氨酸-苏氨酸-谷氨酸	441.1953	$C_{19}H_{30}N_4O_8$	氨基酸类
12	11.01	蛋氨酸-赖氨酸-色氨酸-丝氨酸	549.2524	$C_{25}H_{38}N_6O_6S$	氨基酸类
13	12.26	蛋氨酸-蛋氨酸-丝氨酸-组氨酸	503.1774	$C_{19}H_{32}N_6O_6S_2$	氨基酸类
14	13.16	谷氨酰胺-丝氨酸-甘氨酸-赖氨酸	417.2114	$C_{16}H_{30}N_6O_7$	氨基酸类
15	13.47	甘氨酸-赖氨酸-丝氨酸-赖氨酸	417.2484	$C_{17}H_{34}N_6O_6$	氨基酸类
16	14.57	丝氨酸-甘氨酸-赖氨酸-赖氨酸	417.2468	$C_{17}H_{34}N_6O_6$	氨基酸类
17	15	异莱鲍迪苷 A	965.4223	$C_{44}H_{70}O_{23}$	甜菊糖类
18	15.54	菜鲍迪苷 O (RO)	1435.5857	$C_{67}H_{104}O_{33}$	甜菊糖类
19	15.82	缬氨酸-丝氨酸-谷氨酸-异亮氨酸-天冬酰胺	559.2781	$C_{23}H_{40}N_6O_{10}$	氨基酸类
20	16.2	菜鲍迪苷 D (RD)	1127.4762	$C_{50}H_{80}O_{28}$	甜菊糖类
21	16.32	络氨酸-缬氨酸-络氨酸-赖氨酸-缬氨酸	705.3347	$C_{34}H_{50}N_6O_8$	氨基酸类
22	16.53	赖氨酸-丝氨酸-甘氨酸-赖氨酸	417.2498	$C_{17}H_{34}N_6O_6$	氨基酸类
23	16.98	Quercetin3-sophoroside-7-(6''-(E)-caffeylglucoside)	949.4285	$C_{42}H_{46}O_{25}$	黄酮类
24	17.4	菜鲍迪苷 J (RJ)	1111.4810	$C_{31}H_{34}O_{17}$	甜菊糖类
25	17.58	六羟基黄酮-3,7-双糖苷	641.3177	$C_{27}H_{30}O_{18}$	黄酮类
26	17.89	甘草皂苷 D3	1011.4240	$C_{50}H_{76}O_{21}$	皂苷类
27	18.25	菜鲍迪苷 E (RE)	965.4235	$C_{44}H_{70}O_{23}$	甜菊糖类
28	18.76	亮氨酸-谷氨酸-络氨酸-丙氨酸	493.2281	$C_{23}H_{34}N_4O_8$	氨基酸类

续表1(Continued Tab. 1)

序号 No.	保留时间 t_R min	化合物 Compond	[M-H] ⁻	分子式 Formula	分类 Classification
29	18.97	菜鲍迪苷 G (RG)	803.3686	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	甜菊糖类
30	19.64	丝氨酸-脯氨酸-缬氨酸-缬氨酸	399.2371	C ₁₈ H ₃₂ N ₄ O ₆	氨基酸类
31	19.98	赖氨酸-丙氨酸-赖氨酸-甘氨酸	401.2514	C ₁₇ H ₃₄ N ₆ O ₅	氨基酸类
32	20.64	异甜菊双糖苷	965.4207	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	甜菊糖类
33	21.01	菜鲍迪苷 L	1127.4763	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	甜菊糖类
34	21.68	菜鲍迪苷 A	965.4233	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	甜菊糖类
35	22.29	甜菊苷 (STV)	803.3716	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	甜菊糖类
36	22.85	菜鲍迪苷 F (RF)	935.4138	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	甜菊糖类
37	23.87	菜鲍迪苷 C (RC)	949.4279	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	甜菊糖类
38	24.38	棉花素-7-葡萄糖基-(1->3)-鼠李糖苷	625.3229	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	黄酮类
39	25.03	甜茶苷 (RUB)	641.3179	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	甜菊糖类
40	25.82	杜克苷 A (DA)	787.3803	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	甜菊糖类
41	26.39	3-O-(Glc)-6-O-(Glc)-(25R)-5alpha-spirostan-3beta,6alpha,23S-triol	641.3183	C ₄₀ H ₆₈ O ₁₅	甜菊糖类
42	27.72	菜鲍迪苷 B	803.3710	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	甜菊糖类
43	30.94	甜菊双糖苷 (SX)	641.3176	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	甜菊糖类
44	31.56	精氨酸-脯氨酸-亮氨酸	383.2423	C ₁₇ H ₃₂ N ₆ O ₄	氨基酸类
45	32.32	缬氨酸-缬氨酸-苯丙氨酸-酪氨酸	525.2669	C ₂₈ H ₃₈ N ₄ O ₆	氨基酸类

2.3 结晶糖中成分分析结果

甜菊糖原糖经过结晶得到结晶糖,其 UPLC-QT-OF/MS 图谱如图 2.2,共鉴定分析出 8 种甜菊糖苷类物质和 1 种氨基酸物质,详细信息见表 2.2。

通过甜菊糖原糖和结晶糖中成分种类的对比,我们发现,结晶后总物质种类由 49 种减少到了 9 种,其中甜菊糖类物质由原糖中的 17 种减少到了 8 种,菜鲍迪苷 O、E、G 和 J 等甜菊糖类物质也通过结晶过程被过滤到了母液糖中;原糖中 21 种氨基酸只

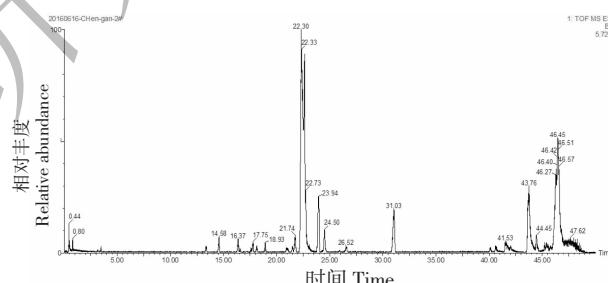


图 6 结晶糖液-质图谱

Fig. 6 Spectrum of UPLC-MS of crystalline sugar

表 2 结晶糖物质信息表
Table 2 Compounds information in crystalline sugar

序号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compond	[M-H] ⁻	分子式 Formula	分类 Classification
1	14.58	甘氨酸-赖氨酸-丝氨酸-赖氨酸	417.2484	C ₁₇ H ₃₄ N ₆ O ₆	氨基酸类
2	16.37	菜鲍迪苷 D	1127.4762	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	甜菊糖类
3	21.74	菜鲍迪苷 L	1127.4763	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	甜菊糖类
4	22.30	菜鲍迪苷 A	965.4233	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	甜菊糖类
5	22.73	甜菊苷	803.3716	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	甜菊糖类
6	23.94	菜鲍迪苷 F	935.4138	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	甜菊糖类
7	24.50	菜鲍迪苷 C	949.4279	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	甜菊糖类
8	26.52	杜克苷 A	787.3803	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	甜菊糖类
9	31.03	菜鲍迪苷 B	803.3710	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	甜菊糖类

有一种留在结晶糖中,其他氨基酸与黄酮类等非甜菊糖类物质均被过滤到了母液糖中,经过结晶,甜菊糖纯化效果显著。

2.4 原糖和结晶糖中成分进行含量对比

对甜菊糖原糖和结晶糖中个物质含量进行对比,对比结果见表3。

表3 原糖与结晶糖成分含量对比

Table 3 Comparison of the Content of Raw Sugar and Crystalline Sugar

产品名称 Name	RD 含量 RD content (%)	RA 含量 RA content (%)	STV 含量 STV content (%)	RF 含量 RF content (%)	RC 含量 RC content (%)	DA 含量 DA content (%)	RUB 含量 RUB content (%)	RB 含量 RB content (%)	SX 含量 SX content (%)	其它 Others
甜菊糖原糖 Raw sugar	2.164	46.212	25.887	1.445	8.127	0.801	0.456	0.369	0.207	14.332
结晶糖 Crystalline sugar	0.507	95.896	0.256	0.447	0.158	0	0	0.039	0	2.697
含量变化 The content change	0.234	2.075	0.010	0.309	0.019	0	0	0.106	0	0.188

注:含量变化定义为结晶糖中含量/甜菊糖中含量。

Note: The content change is defined as the content of crystal sugar / stevioside content.

通过甜菊糖原糖与结晶糖中的成分含量对比,结晶糖中 RA 的含量达 95.9%,与原糖中 RA 相比富集了 2.07 倍,远高于其他糖苷的富集程度,说明甜菊糖结晶过程可有效提高 RA 的含量。

3 结论

UPLC-QTOF 检测方法能很好地实现混合样品的分离并完成检测,对植物提取中化学成分的鉴定具有重要意义。以此方法对甘肃甜菊糖原糖和结晶糖进行鉴定分析后,我们得知结晶过程去除了原糖中 20 种氨基酸类杂质和全部黄酮类和其他杂质,结晶糖中 RA 含量明显提升,达到 95.8%,物质种类也减少至 9 种,其中 8 种为甜菊糖类物质。经过实验研究确定,该过程对 RA 的富集很重要,大部分杂质通过结晶留在母液糖中,提高了 RA 的纯度,研究还确定了高 RA 中的杂质成分主要为氨基酸类物质和其他甜菊糖苷类物质,为提高 RA 产品的含量提供了理论依据。

参考文献

- Wan HD(万会达), Li D(李丹), Xia YM(夏咏梅). Progress in functions of steviol glycosides[J]. Food Sci(食品科学), 2015, 36:264-269.
- Ding HM(丁红梅), Tian H(田洪), Lian YH(连运河), et al. Study on crystallization process with RA purification from stevia[J]. China Food Adds(中国食品添加剂), 2013, 6: 77-81.
- Sun ZF(孙传范), Li JW(李进伟). Research Progress on Steviosides[J]. Food Sci(食品科学), 2010, 31:338-340.

- Xu J(徐健), Li WL(李维林). The research progress of pharmacological effect and processing technology of stevia sugar[J]. Food and Ferment Ind(食品与发酵工业), 2013, 10:207-214.
- Zhang Y(张杨), Chen TH(陈天红), Shi ZQ(史作清) et al. Studies on The Separation of Rebaudioside A By Recrystallization[J]. Ion Exchan & Adsor(离子交换与吸附), 1998, 6:515-520.
- Li P(李培), Yang RJ(杨瑞金), Hua X(华霄), et al. Separation of statisides by resolution[J]. Food & Mac(食品与机械), 2010, 1:160-163.
- Zhang J(张健), Liu JX(俞桂新), Zhang SN(章苏宁), et al. Research progress on steviosides[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory(光谱实验室), 2011, 5:2692-2696.
- Jun JH(军姜华), Shi RB(石任兵). HPLC determination of four phenolic components in effective fraction of Stevia rebaudiana Bertoni[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 4:536-539.
- Chaturvedula VSP, Zamora J. Reversed-phase HPLC analysis of steviol glycosides isolated from Stevia rebaudiana Bertoni [J]. Food & Nutrition Sci, 2014, 5:1711-1716.
- Chaturvedula VS, Prakash I. A new diterpene glycoside from Stevia rebaudiana. [J]. Molecules, 2011, 16:2937-2943.
- Yang Q. Analysis of the chemical constituents of Stevia rebaudiana and its sweetness[J]. J Beijing Univ Chem Tech, 2012, 2:283-297.
- Teo CC, Tan SN, Yong JW, et al. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of Stevia rebaudiana Bertoni [J]. J Sep Sci, 2015, 32:613-622.
- Sanches SM, Francisco MG, Higashi B, et al. Chemical char-

- acterization and prebiotic activity of fructo-oligosaccharides from Stevia rebaudiana (Bertoni) roots and *in vitro* adventitious root cultures [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 152: 718.
- 14 Choi YH, Kim I, Yoon KD, et al. Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from Stevia rebaudiana leaves [J]. *Chromatographia*, 2002, 55: 617-620.
- 15 Roop Narayan Verma, Amla Batra. Isolation and analytic characterization of rebaudioside A and GC-MS analysis of methanolic leaves extract of Stevia rebaudiana Bert [J]. *Annals of Phytomedicine*, 2013, 2: 108-114.
- 16 Ahmed MS, Dobberstein RH. Stevia rebaudiana. III. high-performance liquid chromatographic separation and quantitation of rebaudiosides B, D, and E, dulcoside A, and steviolbioside [J]. *J Chromatogr A*, 1982, 245: 373-376.
- 17 Indra P, Prakash CVS, Avetik M. Structural characterization of the degradation products of a minor natural sweet diterpene glycoside rebaudioside M under acidic conditions [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 1014-1025.
- 18 Prakash I, Ma G, Bunders C, et al. A new diterpene glycoside: 15 α -hydroxy-rebaudioside M isolated from stevia rebaudiana [J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10: 1159-1156.
- 19 Ohta M, Sasa S, Inoue A, et al. Characterization of novel steviol glycosides from leaves of stevia rebaudiana morita [J]. *J Biol Chem*, 2010, 57: 199-209.
- 20 Chaturvedula VS, Upreti M, Prakash I. Diterpene glycosides from stevia rebaudiana [J]. *Molecules*, 2011, 16: 3552-3562.
- 21 Chaturvedula VSP, Chen S, Yu O, et al. NMR spectral analysis and hydrolysis studies of rebaudioside N, a minor steviol glycoside of bertoni [J]. *Food & Nutr Sci*, 2013, 4: 1004-1008.
- 22 Brian D, Athula B, Alvin N, et al. New non-glycosidic diterpenes from the leaves of stevia rebaudiana [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66: 1395-1398.
- 23 Tada A, Ishizuki K, Iwamura J, et al. Improvement of the assay method for steviol glycosides in the JECFA specifications [J]. *American J Anal Chem*, 2013, 4: 190-196.
- 24 Meneni S, Chaturvedula VSP. Continuation of reversed-phase HPLC analysis studies of steviol glycosides isolated from *Stevia rebaudiana* Bertoni [J]. *J Food Res*, 2015, 4(2): 87-91.
- 25 Englert M, Kaiser C, Schwack W, et al. Isolation of five steviol glycosides from a stevia rebaudiana, form ulation by gradient elution countercurrent chromatography [J]. *Chromatographia*, 2016, 79: 275-284.
- 26 Fu X, Yin Z, Chen J, et al. Production of chlorogenic acid and its derivatives in hairy root cultures of stevia rebaudiana [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 63: 262-268.
- 27 Sharma S, Walia S, Singh B, et al. Comprehensive review on agro technologies of low-calorie natural sweetener stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni); a boon to diabetic patients [J]. *J Agri & Food Chem*, 2015, 96: 1867.
- 28 Rajbhandari A, Roberts MF. The flavonoids of stevia rebaudiana [J]. *J Nat Prod*, 2004, 46: 194-195.
- 29 Brandle JE, Telmer PG. Steviol glycoside biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68: 1855.
- 30 Karaköse H, Müller A, Kuhnert N. Profiling and quantification of phenolics in stevia rebaudiana leaves [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 9188-9198.
- 31 Lopes S M, Rada V, Oliveira AJ. Isolation and characterization of inulin with a high degree of polymerization from roots of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni. [J]. *Carbohydr Res*, 2015, 411(2): 15-21.
- 32 Bililign T, Moore JC, Tan S, et al. Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatography method for routine identification and purity assessment of high-purity steviol glycoside sweeteners [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62: 1384-1389.

(上接第 230 页)

- 12 Ma YH(马玉和), Wang QK(王庆奎), Guo YJ(郭永军), et al. The comparison of inhibition effect between *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila* in five Chinese herbals [J]. *Feed Ind*(饲料工业), 2014, 35(16): 51-54.
- 13 Tao JF, Yan RW, Zhao LL, et al. Separation and purification of two taxanes and one xylosyl-containing taxane from *Taxus wallichiana-na* Zucc.: A comparison between high-speed countercurrent chromatography and reversed-phase flash chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40: 1273-1282.
- 14 Piekarski H. Calorimetry—an important tool in solution chemistry [J]. *Thermochim Acta*, 2003, 420(1-2): 13-18.
- 15 Li ZQ(李忠琴), Jin H(靳恒), Lin M(林茂), et al. Separation and purification of antibacterial fractions from *Rhus chinensis* Mill. by High-speed Counter-current Chromatography and analysis of their anti-vibrio activity [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27: 822-826.
- 16 Qu XS(屈啸声). Thermokinetic study on antibacterial activity of *Vitex Negundo* [D]. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学), 2009.