

甜叶菊中 Stevioside 的测定

韦永成

(广西亚热带作物研究所)

摘要 在硅胶 G 薄层板上用氯仿：甲醇：水(38：12：2)分离出 Stevioside，用蒽酮—硫酸试剂显色，然后用上海72型一分光光度计在620nm 波长比色，测出甜叶菊中 Stevioside 的含量。本法回收率为 96.50±0.539%。

前言

甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 是菊科多年生草本植物。原产南美巴拉圭、巴西等热带地区。其叶中含有比蔗糖甜100—300倍的甜味物质—甜菊甙 (Stevioside)，是四环二萜类化合物。近年来，我国许多地方引种栽培。据报道，甜叶菊中 Stevioside 的含量测定方法有：气相色谱法、薄层—气相色谱联合测定法，薄层扫描测定法、薄层层离分光光度法。本文介绍改良测定方法：即将干燥甜叶菊叶粉用甲醇提取，经 TLG 板分离，把相应的 Stevioside 斑点刮出提取，用蒽酮试剂来显色测定吸光度。其显色过程的化学反应式如下：

实验部分

一、仪器及试剂 72型一分光光度计(上海分析仪器厂)微量进样器(10—20ul)层析板(17×4.5cm)乙醇(95%)、氯仿、甲醇、浓硫酸(均 A·R)蒽酮(C·P)甜菊甙(Stevioside)纯品

二、标准曲线的制作

1. 精确称取甜菊甙(Stevioside)纯品100mg，用双蒸水溶解移入100ml的容量瓶中，并用双蒸水稀释定容至刻度，密闭低温保存。此液为每毫升含1毫克的标准溶液。

2. 精确吸取上述标准溶液0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50和2.0ml，分别移入50ml的容量瓶中，用双蒸水稀释定容至刻度。上述分别得到浓度为0.500、0.010、0.015、0.020、0.025、0.030和0.040mg/ml的标准溶液。

3. 吸取上述标准溶液各2ml，分别移入10ml的具塞刻度试管中，同时吸2ml双蒸水于另一试管中作空白。然后把试管置冰浴中，每支试管准确加入0.2%的蒽酮—硫酸试剂4ml，将试管塞紧剧烈摇匀，放回冰浴中冷却后取出放入沸水浴中准确加热10分钟取出迅速放入冷水中冷却至室温后用10mm的比色皿，在620nm 波长测定各自的光密度。所得结果列于表1：

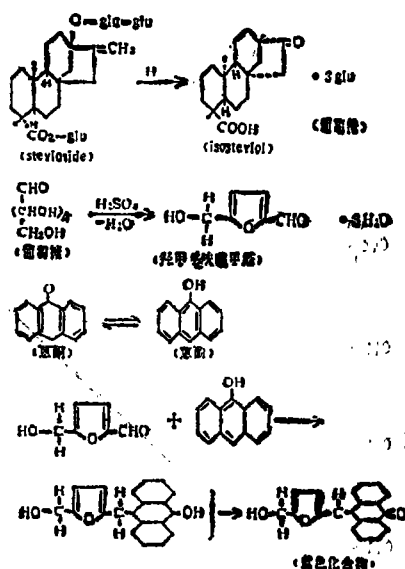


表1 浓度与吸光度的变化关系表

编 号	1	2	3	4	5	6	7
浓度 mg/ml (x)	0.005	0.010	0.015	0.020	0.025	0.030	0.040
吸 光 度 (y)	0.05	0.10	0.155	0.215	0.260	0.310	0.410

计算结果得回归方程为:

$$y = 0.0002786 + 10.286885x,$$

$$\text{剩余标准差 } S = \sqrt{(1 - r^2) \frac{\sum y^2 - (\sum y)^2/n}{n - 2}} = 0.0001685.$$

这表明, 所确定的回归方程有意义, 精密度高, 适用于含量测定。据所确定的回归方程, 绘制标准曲线图如图1。

三、样品测定

1. 提取: 精确称取通过60目筛孔的干燥甜叶菊叶粉200—500mg, 置于滤纸筒放到提取器中, 加入甲醇50ml, 装上冷凝管在水浴上加热回流6小时, 回收甲醇得提取物。将残余甲醇蒸干后, 用95%的乙醇溶解洗入50ml的容量瓶中, 并用95%的乙醇定溶至刻度。

2. 薄层分离: 用微量进样器精确吸取样品的乙醇溶液10—30ul, 在5×17cm的硅胶G薄层板(10g硅胶G加水30ml制板4块, 风干后于105℃活化1小时置干燥器备用)成点点样, 点两个点, 同时点-stevioside纯品定位。待溶剂干后, 用CHCl₃: MeOH: H₂O(38: 12: 2)展开, 时间约70分钟, 取出挥发展开剂后用碘蒸汽显色定位(见图2)。待碘挥发后, 将Stevioside斑点准确刮出移入直径为6mm, 长10cm玻璃滴管中(尖端用小许脱脂棉塞住以防硅胶漏掉), 用4ml的双蒸水洗脱于5ml的容量瓶中并定容至刻度。洗脱时, 同时取样做空白。

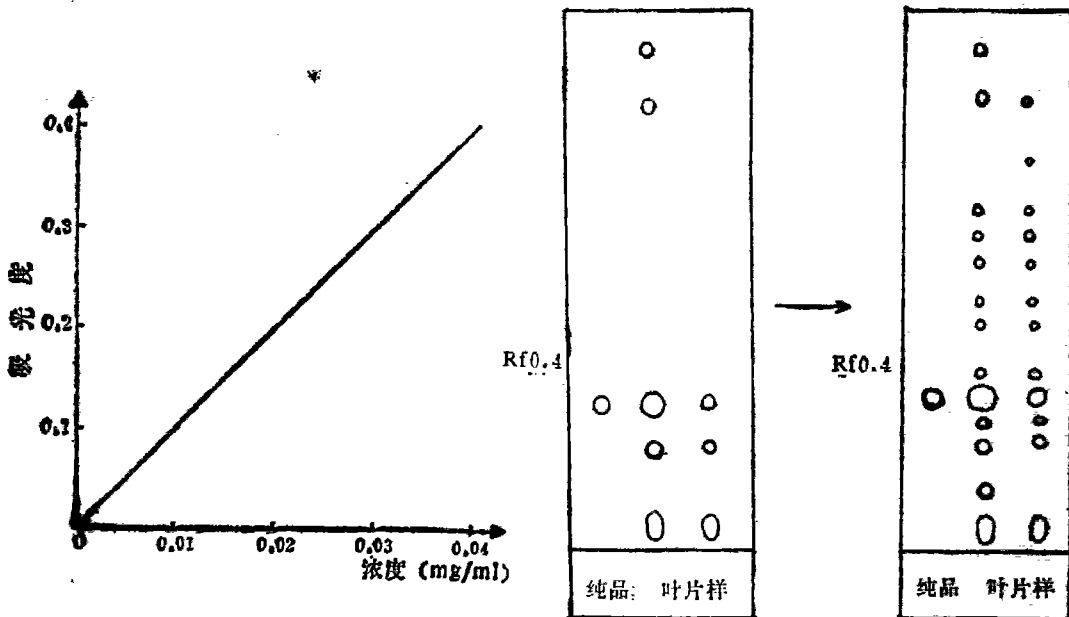


图1 标准曲线图

图2 板层显色

3. 测定: 吸取上述洗脱液 2 ml 于 10ml 的具塞试管中, 将试管置于冰浴加入 0.2% 的萘酚—硫酸试剂 4 ml, 按制作标准曲线操作步骤, 最后在 620nm 波长测定吸光度, 据下列公式计算含量:

$$\text{Stevioside 含量 \%} = \frac{V_2 \cdot V_2 \cdot N}{W \cdot 10^6} \times 100$$

式中: W — 称样量(mg); V_1 — 提取后定容体积(ml); V_2 — 薄层点样体积与薄层洗脱稀释倍数, 即稀释倍数/点样量; N — 测得样品的浓度(mg/ml)。

四、加样回收试验 在已知 Stevioside 含量的甜叶菊叶粉中加入 Stevioside 纯品 50mg, 依法进行提取, 分离和测定, 从测得的 Stevioside 总量中减去原样品含量, 以此计算出加样的回收率, 测定结果见表 2。

表 2 Stevioside 加 样 回 收 率

编 号	原 样 品 量 (mg)		纯品加入量 (mg)	测得总量 (mg)	加样回收量 (mg)	加样回收率 (%)
	干 叶 粉	含甜菊甙				
1	2500	241.56	50	290.01	48.03	96.06
2	2500	241.56	50	290.01	48.03	96.06
3	2500	241.56	50	290.34	48.36	96.72
4	2500	241.56	50	290.34	48.03	96.06
5	2500	241.56	50	290.67	48.69	97.38
6	2500	241.56	50	290.34	48.36	96.72
总 和					289.5	579.00
平 均 值					48.25	96.50
标 准 差					0.265	0.539

五、甜叶菊叶工业提取产品的定量 此法测定产品可直接称取样品溶解于乙醇中稀释定容后进行板层分离测定。具体步骤: 称取甜叶菊叶工业提取产品 0.2—0.4000g, 用 95% 乙醇溶解移入 10ml 的容量瓶中, 并加乙醇定容至刻度, 用微量进样器吸取待测液 20—40ul, 点板分离, 按上述操作测定。

实验结果与讨论

1. 本文采用薄层层离—分光光度法测定甜叶菊叶中 Stevioside, 所需的均为常规仪器, 操作较简单, 实验过程如能控制好实验条件, 结果还是比较好的, 全过程加样回收率在 96.5 ± 0.539%。

2. 本分析方法对叶片提取液未经任何除杂处理而即行板层分离, 层离过后叶片样点甜菊甙所在的位置略夹杂些黄色色带, 该色素是否影响下一步的显色, 有待进一步研究。

本文承蒙广西农学院龙葵教授审阅, 特致谢意!

参 考 文 献

- [1] Harry B. Wood, JR., R. Allertom, Harry W. Diehl, and Hewitt G. Fletcher, JR. 1955: Stevioside I. The Structure of The Glucose Moieties. *Journal of Organic Chemistry*. U. S. 20: 875—873.
- [2] E. Mosetting, U. Beglinger, F. Dolder, H. Lichti, P. Quitt and J. A. Waters. 1963: The Absolute Configuration of Steviol and Isosteviol. *Journal of The American Chemical Society*., U. S. A. 85: 2305—2309.
- [3] 中国医学科学院药物研究所编著, 1972: 中草药有效成分的研究(第一分册), 165、205—206、336页。人民卫生出版社。

DETERMINATION OF STEVIOSIDE IN STEVIA REBAUDIANA BERTONI

Wei Yong-Cheng

(Guangxi Institute of Subtropical Crops)

Abstract Stevioside can be separated on Silica gel G with chloroform—methanol—water (38: 12: 2). The areas of the spots were detected with antheron—sulfuric acid. The content of Stevioside in the leaves was determined by colorimetric method with a 72 spectrophotometer $\lambda = 620\text{nm}$. The recovery percentage of the method was $96.5 \pm 0.539\%$.