

# 甜茶素含量测定

吴祖祥 孟丽珊 徐位坤

(广西植物研究所)

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF SWEETENER FROM SWEET-TEA

Wu Zu-xiang, Meng Li-shan & Xu Wei-kun  
(Guangxi Institute of Botany)

甜茶 (*Rubus suavissimus* S. Lee) 含一种高甜度的甜茶素, 为斯替维醇 (Steviol) 和葡萄糖结合而成的二萜甙。

甜叶菊中斯替维甙的含量测定方法有: 气相色谱法<sup>[1, 2]</sup>、薄层—气谱联合测定法<sup>[3]</sup>、薄层层离—分光光度法<sup>[4]</sup>、薄层扫描测定法<sup>[5]</sup>等。甜茶中, 甙的含量测定尚无人进行过研究, 本文参照宫崎等人的薄层层离—分光光度法进行了研究。即首先把甙加酸水解为异甙元 (isosteviol), 再将异甙元和 2,4-二硝基苯肼作用制成腙, 经薄层分离后将色带洗脱, 在 $\lambda 362\text{nm}$ 处测定吸收值, 计算异甙元的 2,4-二硝基苯腙量, 最后根据甙与共异甙元 2,4-二硝基苯腙的克分子比换算成甙的含量。此法结果比较稳定, 全程加样回收率  $96.85 \pm 1.89\%$ 。现将实验方法及结果报导如下:

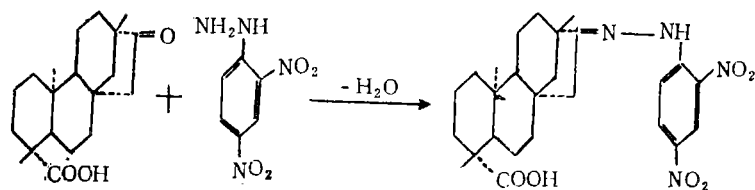
### 实验部分

#### (一) 仪器与试剂

UV-210A型紫外分光光度计; 50ml微量注射器; 95%乙醇(AR); 无水乙醇(AR); 丙酮(AR); 氯仿(AR)。

#### (二) 异斯替维醇2,4-二硝基苯腙标准品制备

原理:



(isosteviol) (2,4-二硝基苯肼)

(isosteviol的2,4-二硝基苯腙)

• 方宏、李仲瑀同志参加了此项工作

操作：称取异斯替维醇160mg 置于一个100ml 的圆底烧瓶中，加2 ml 甲醇使之溶解，再称取2,4-二硝基苯肼80mg 置于另一个100ml 的圆底烧瓶中，加入甲醇20ml 及85%磷酸 1ml，水浴上加热使之溶解。将上面二液混合，并在水浴上加热回流反应 1 小时。把反应物静置片刻即有黄色絮状沉淀析出，滤出沉淀物并在稀乙醇中重结晶 2 次得黄色针状结晶，熔点25.0~25.1℃，紫外光谱  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  362nm (log $\epsilon$ 4.783)。以此作为含量测定的标准品。

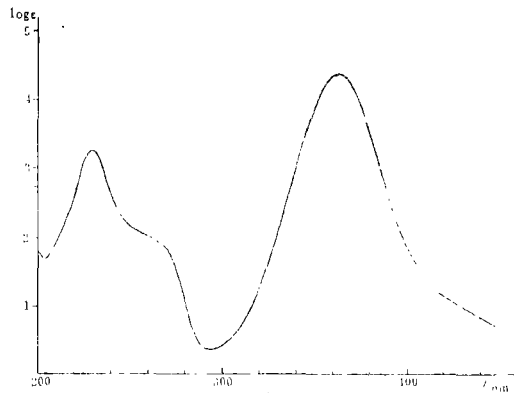


图1 异斯替维醇2,4-二硝基苯肼紫外吸收光谱

### (三) 标准曲线的制作

精密称取异斯替维醇的2,4-二硝基苯肼标准品 10mg 置于 100ml 量瓶中，并用无水乙醇溶解、稀释至刻度作为标准液。(每 1 ml 含标准品 0.1mg) 准确吸取标准液 0、2、3、4、5、6、7、8 ml 分别置于 8 个 50ml 的量瓶中，用无水乙醇稀释至刻度，在  $\lambda$ 362nm 处测定各自的吸收度值列于表 1 中。将表 1 的数据进行直线回归，得回归方程如下：

$$\hat{y} = a + bx = 0.00297 + 48.1x \dots\dots\dots (1)$$

$$\begin{aligned} \text{方程的相关系数 } r &= b \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n \sum y^2 - (\sum y)^2}} \\ &= 48.1 \sqrt{\frac{7 \times 0.00812 - 0.07^2}{7 \times 1.89873 - 3.3878^2}} = 0.9999 \\ & (r_{0.01,5} = 0.874 \quad r > r_{0.01,5}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{剩余标准差 } S &= \sqrt{(1 - r^2) \cdot \frac{\sum y^2 - (\sum y)^2 / n}{n - 2}} \\ &= \sqrt{(1 - 0.99999^2) \cdot \frac{1.89873 - (3.3878)^2 / 7}{7 - 2}} = 0.0012 \end{aligned}$$

表1 浓度与吸收度的变化关系\*

样品号	1	2	3	4	5	6	7
浓度 x(μg/ml)	4	6	8	10	12	14	16
吸收度 y	0.1962	0.2922	0.3860	0.4826	0.5820	0.6758	0.7730

\* 数据为 5 次重复试验的平均值

从统计结果看：相关系数几等于1，剩余标准差则几等于零，这说明所确立的回归方程是有意义的，精密度是高的，可用于含量测定工作。图2是根据该回归方程制作的标准曲线。含量测定时，(1)式可改写为：

$$x = \frac{y - 0.00297}{48.1} \dots\dots\dots (2)$$

x — 测得的浓度 (mg/ml)；  
y — 吸收度值。

(四) 样品测定

(1) 提取：精密称取通过60筛目的干燥甜茶叶粉500mg置于0.8×4cm的滤纸筒中，把滤纸筒放进一250ml的圆底烧瓶内，同时加入95%乙醇150ml，装上冷凝管，在水浴上加热回流提取3小时，再把滤纸筒用棉线上挂于冷凝管下继续洗提2小时。回收乙醇得提取物。(同样作一重复)

(2) 水解：将(1)所得提取物加进10%硫酸水溶液(W/W)150ml，在沸水浴上加热水解5小时，然后转溶于150ml氯仿中。回收氯仿得水解物。

(3) 脲化：在(2)所得水解物中加95%乙醇50ml，同时加入2,4-二硝基苯肼试剂1ml(试剂配制：将2g 2,4-二硝基苯肼加入到24ml 185%的磷酸中，加热溶解，再加95%乙醇15ml稀释，过滤备用)，然后在80℃水浴上回流脲化1小时，回收乙醇得脲化物。将脲化物用丙酮转移至25ml容量瓶中，并准确稀释到刻度。

(4) 薄层分离及测定：用微量注射器精密吸取样品的丙酮液50μl在5×20cm的硅胶G薄层板(10g硅胶G加蒸馏水30ml制板3块，于110℃活化1.5小时备用)上点成线状，用氯仿：甲醇(9：1)展开，异斯替维醇的2,4-二硝基苯脲本身显鲜黄色(见图3)。用吸样器吸取样品色带上的硅胶，并用5ml无水乙醇洗脱，同时在同一板上没有样品色带的地方吸取同量硅胶按上法处理作为参比，在λ362nm处测定吸收度，根据公式(3)计算含量。

$$\text{甜茶素含量}(\%) = \frac{\frac{y - 0.00297}{48.1} \times d}{\frac{W}{V_1} \times V_2} \div$$

$$0.619 \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

W——干叶粉称样量(mg)；V<sub>1</sub>——脲化物丙酮转溶体积(ml)；V<sub>2</sub>——薄层点样体积(ml)；y——吸收度值；d——薄层洗脱液稀释倍数；0.619——为异斯替维醇的2,4-二硝基苯脲与甜茶素的克分子比。

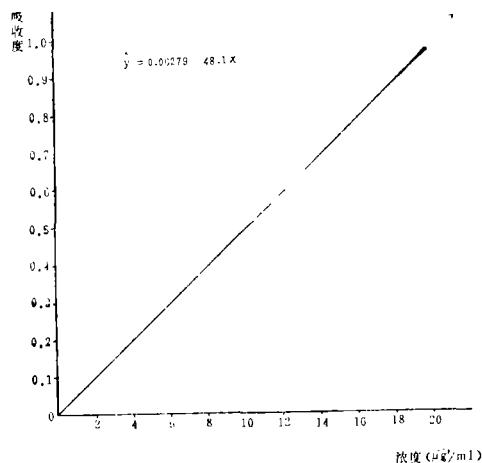


图2 标准曲线

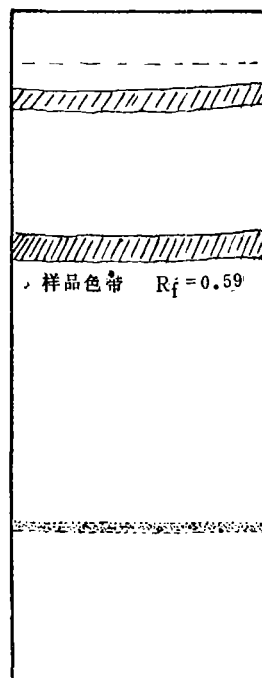


图3 异斯替维醇4,2-二硝基苯脲薄层层析谱

展开剂：CHCl<sub>3</sub>：MeOH/9：1

### (五) 加样回收试验

在已知甜茶素含量的一定量甜茶叶粉中加入甜茶素纯品 10mg，依法进行提取、分离、测定，从测得的甜茶素总量中减去原样品含量以计算加样回收率。结果见表 2。

表 2 甜茶素加样回收率

样品编号	原样品量(mg)		纯品加入量 (mg)	总测得量 (mg)	加样回收率 (mg)	加样回收率 (%)
	干叶粉	甜茶素				
1	500	40.39	10	50.30	9.91	99.1
2	500	40.39	10	50.10	9.71	97.1
3	500	40.39	10	49.90	9.51	95.1
4	500	40.39	10	50.30	9.91	99.1
5	500	40.39	10	49.95	9.56	95.6
6	500	40.39	10	49.90	9.51	95.1
总和	—	—	—	—	58.11	581.1
平均值	—	—	—	—	9.685	96.85
标准差	—	—	—	—	0.189	1.89

### (六) 应用

(1) 甜茶叶各生长期的甜茶素含量变化(表 3)。叶子不同生长发育阶段中甜茶素的含量有着明显的变化，嫩叶的含量最高，成叶次之，落叶最低。

表 3 甜茶叶不同生长期甜茶素含量

生长期	嫩叶	成叶	黄叶	落叶
含量(%)	7.91	6.04	5.54	4.68

(2) 甜茶叶中甜茶素含量与季节的关系(表 4)。5月底较低，6月底开始上升，7、8两月达到最高点，9月底以后开始下降，12月底降到最低值。

表 4 甜茶素含量与季节的关系 1981年

采样时间	含量(%)	采样时间	含量(%)
5月29日	4.41	9月29日	5.22
6月29日	6.04	10月29日	5.19
7月29日	6.43	11月29日	4.64
8月29日	6.28	12月29日	3.86

(3) 产地对甜茶叶中甜茶素含量的影响(表 5)。桂南的岑溪(北纬22°47')和桂中的金秀(北纬24°08')所产甜茶叶甜茶素的含量相似，而较北的桂林雁山(北纬25°07')所产甜茶叶(栽培)则含量稍低。

(下转 215 页)

致谢：核磁共振谱、质谱是中国科学院上海药物研究所测定。  
红外光谱、紫外光谱是广西植物研究所测定，均表示感谢。

### 参 考 文 献

- 〔1〕 邱运平等, 1982: 广西植物 1 ( 1 ) 47—49.
- 〔2〕 R. Crohare et al., 1974: Phytochem, (13): 1957.
- 〔3〕 朱大元等, 1981: 中草药 (12): 1—2.
- 〔4〕 Zhu Da-yuan et al., 1982: Heterocycles 17: 345.

(上接208页)

表5 产地对甜茶素含量的影响

产 地	含 量(%)	备 注
岑 溪 县	7.75	野生, 1981, 8, 12, 采样。
金 秀 县	样 I 8.07 样 II 7.79	野生, 1981, 8, 16, 采样。 样 I 的刺很少。
桂 林 雁 山	6.35	栽培, 1981, 8, 29, 采样。

### 结 果 与 讨 论

1. 本文采用薄层层离—分光光度法测定甜茶中甜茶素的含量, 方法流程虽较长, 但只要控制好实验条件, 结果还是比较稳定的。

2. 甜茶叶子的生长期对甜茶素的含量有较大影响, 嫩叶含量较高, 但嫩叶的叶片小而薄, 产量低, 故以采收成叶为好; 季节对含量的影响也较大, 就含量而言, 则以6月底到9月初采收为宜; 雁山栽培的含量较之岑溪、金秀二地野生的含量稍低, 是否由于地区差异所引起, 有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 〔1〕 三桥 博等, 1975: Stevia rebaudiana Bertoni の栽培研究 Stevioside の定量について, 药学杂志(日), 95(1), 127—130
- 〔2〕 坂本征则等, 1975: Stevioside の定量法の研究, 药学杂志(日), 95(12), 1507—1510
- 〔3〕 三桥 博等, 1975: Stevia rebaudiana Bertoni の栽培研究 Stevioside の定量について, (第2报), 药学杂志(日), 95(12), 1501—1503
- 〔4〕 宫崎幸男等, 1974: ステビア (Stevia rebaudiana Bertoni) の栽培について関する研究, 热带农业, 第17卷第3号, 158—161
- 〔5〕 卞咏梅, 1981: 新甜味植物——甜叶菊的研究, 植物生理学通讯, 3, 15—17