

## 甜叶菊渣中总黄酮的提取工艺优选

史高峰\*, 王红玉, 王国英, 宫建辉, 王振菊  
(兰州理工大学石油化工学院, 兰州 730050)

**[摘要]** **目的:** 优选甜叶菊渣中总黄酮提取工艺条件。**方法:** 以总黄酮得率为指标, 采用单因素试验考察乙醇体积分数、提取时间、料液比、提取温度及回流次数 5 个影响因素对甜叶菊渣中总黄酮得率的影响; 在单因素试验基础上, 选取乙醇体积分数、提取时间、料液比、提取温度为考察因素, 采用正交设计法优化甜叶菊渣中总黄酮的提取工艺条件。**结果:** 各因素对甜叶菊渣中总黄酮得率的影响顺序为料液比 > 提取时间 > 乙醇体积分数 > 提取温度。最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 80%, 提取时间 2.5 h, 料液比 1:20, 提取温度 80 ℃, 回流 3 次, 总黄酮得率 4.21%。**结论:** 该优选工艺简单易行、成本低廉、安全可靠, 有利于甜叶菊资源的合理利用。

**[关键词]** 甜叶菊; 总黄酮; 提取工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0062-03

## Optimization of Extraction Process for Total Flavonoids from Residues of *Stevia rebaudiana*

SHI Gao-feng\*, WANG Hong-yu, WANG Guo-ying, GONG Jian-hui, WANG Zhen-ju

(College of Petro-Chemical Technology, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology conditions of total flavonoids from residues of *Stevia rebaudiana*. **Method:** With yield of total flavonoids as index, effect of the concentration of ethanol, extraction time, solid-liquid ratio, extraction temperature and reflux extraction times on yield of total flavonoids from *S. rebaudiana* were studied by single-factor test; Basis on single factor test, the concentration of ethanol, extraction time, solid-liquid ratio, extraction temperature were chosen as factors, extraction technology of total flavonoids from residues of *S. rebaudiana* was optimized by orthogonal test. **Result:** Influence of various factors on yield of total flavonoids were in order of solid-liquid ratio > extraction time > the concentration of ethanol > extraction temperature. Optimum extraction technology was: reflux extracted 3 times with 20 times the amount of 80% ethanol at 80 ℃, extraction time of 2.5 h, yield of total flavonoids of 4.21%. **Conclusion:** This optimized technology was simple, reliable and safe with low cost, and it benefited to rational utilization of *S. rebaudiana* resources.

**[Key words]** *Stevia rebaudiana*; total flavonoids; extraction technology

甜叶菊原产于南美巴拉圭和巴西<sup>[1]</sup>, 性味甘、平, 含有甜菊糖苷、甾醇类和黄酮类成分<sup>[2]</sup>, 其中甜菊糖苷类含量较多, 且安全无毒、低热能、甜味优质, 已

在饮料、食品和医药卫生等领域获得广泛应用。黄酮类化合物具有抗肌瘤、抗氧化自由基、镇痛和保肝等药理活性<sup>[3-4]</sup>, 同时具有良好的降糖降压降脂的生物活性<sup>[5]</sup>。目前关于甜叶菊中甜菊糖苷的制备国内外均有报道, 但甜叶菊渣中黄酮类化合物的提取与测定还未见报道。黄酮类化合物的提取方法有超声波法<sup>[6]</sup>、溶剂提取法<sup>[7]</sup>、双水相萃取<sup>[8]</sup>、酶解法<sup>[9-10]</sup>、超临界流体萃取法<sup>[11]</sup>等。为充分地利用甜叶菊资源, 本文选用乙醇热回流法提取, 采用单

**[收稿日期]** 20120717(022)

**[通讯作者]** \* 史高峰, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事天然药物、天然物有机合成及生物化工等研究, Tel: 13109391608, E-mail: shigaofeng@lut.cn

因素试验和正交试验确定提取甜叶菊渣中总黄酮的工业路线,为其工业化提供理论依据。

## 1 材料

U-2001 型紫外可见分光光度计(日本 Hitachi), AL204 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱(扬州鸿都电子有限公司)。

甜叶菊(甘肃酒泉,经兰州大学药学院马志忠教授鉴定为菊科植物甜叶菊 *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl 的叶), 芦丁对照品(纯度 92.5%, 中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707), 蒸馏水(实验室自制),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 芦丁标准曲线的绘制**<sup>[12]</sup> 准确称取 100 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 5 mg, 甲醇超声溶解于 25 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀,即得 0.2 g·L<sup>-1</sup> 的芦丁对照品溶液。以甲醇为空白对照,于波长 200 ~ 400 nm 进行紫外吸收扫描,结果样品溶液和对照品溶液在 358 nm 处有最大吸收。准确吸取芦丁对照品溶液 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容到刻度,以空白试剂作参比,于 358 nm 波长处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得线性回归方程  $Y = 19.4X - 0.0053$  ( $R^2 = 0.9998$ )。结果表明芦丁质量浓度在 0.008 ~ 0.040 g·L<sup>-1</sup> 与 A 呈良好线性关系。

**2.2 总黄酮得率的测定** 称取 10 g 甜叶菊渣,加乙醇提取,真空减压浓缩,干燥,即得粗黄酮浸膏。取 2 ~ 3 mg 粗黄酮浸膏,置于 25 mL 量瓶中,甲醇超声溶解并定容至刻度,测定 A,计算总黄酮得率。

$$X = (m_1/m_2) \times 100\%; Y = (CVX/m_3) \times 100\%$$

式中  $m_1$  为黄酮浸膏的质量; $m_2$  为原料质量/20; $C$  为样品中黄酮质量浓度; $V$  为样品体积/25; $m_3$  为测定得率时称取的粗黄酮浸膏质量; $X$  为浸膏得率; $Y$  为总黄酮得率。

## 2.3 单因素试验

**2.3.1 乙醇体积分数考察** 固定料液比 1:15,提取时间 2 h,提取温度 70 °C,提取 2 次的条件下,考察乙醇体积分数(50%, 60%, 70%, 80%, 95%)对甜叶菊渣中总黄酮得率的影响。结果总黄酮得率依次为 0.9%, 1.7%, 2.1%, 3.7%, 3.5%,说明随着乙醇体积分数的增加,总黄酮得率呈上升趋势。

**2.3.2 料液比考察** 固定乙醇体积分数 80%,提取时间 2 h,提取温度 70 °C,提取 2 次的条件下,考察料液比(1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30)对甜叶菊

渣中总黄酮得率的影响。结果总黄酮得率分别为 1.7%, 3.1%, 3.5%, 3.5%, 3.5%,说明随料液比的增大,总黄酮得率不断增加。当料液比 > 1:20 时,黄酮得率基本不再增加,表明总黄酮已基本提取完全。

**2.3.3 提取时间考察** 固定乙醇体积分数 80%,料液比 1:20,提取温度 70 °C,提取 2 次的条件下,考察提取时间(1, 1.5, 2, 2.5, 3 h)对甜叶菊渣中黄酮得率的影响。结果总黄酮得率分别为 2.6%, 3.9%, 4.2%, 4.0%, 4.0%,说明提取时间 < 2 h 时,黄酮得率随时间的延长而显著增大;当提取时间 > 2 h 时,总黄酮得率略微下降,说明随提取时间的延长,一些黄酮类化合物可能会分解。

**2.3.4 提取温度考察** 固定乙醇体积分数 80%,料液比 1:20,提取时间 2 h,提取 2 次的条件下,考察提取温度(50, 60, 70, 80, 90 °C)对甜叶菊渣中黄酮得率的影响。结果总黄酮得率分别为 2.8%, 4.0%, 4.2%, 3.9%, 3.5%,说明在(50 ~ 70) °C 时,甜叶菊渣中总黄酮得率随温度的升高显著增加,但当温度 > 70 °C 时,黄酮得率呈下降趋势,推测温度太高一部分稳定性不好的黄酮类化合物会分解。

**2.3.5 提取次数考察** 固定乙醇体积分数 80%,料液比 1:20,提取时间 2 h,提取温度 70 °C 的条件下,考察提取次数(1, 2, 3, 4, 5 次)对甜叶菊渣中黄酮得率的影响。结果总黄酮得率分别 3.2%, 0.7%, 0.2%, 0.05%, 0.02%,说明提取 3 次总黄酮基本提取完全。

**2.4 正交试验优选**<sup>[13-14]</sup> 在单因素试验基础上,以总黄酮得率为指标,选取乙醇体积分数、提取时间、料液比、提取温度为考察因素,采用正交试验优化甜叶菊渣中总黄酮的提取工艺条件。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 甜叶菊渣中总黄酮的提取工艺优选

正交试验因素水平				
水平	A 提取时间/h	B 料液比 /g·mL <sup>-1</sup>	C 提取温度 /°C	D 乙醇体积分数/%
1	1.5	1:17	60	70
2	2	1:20	70	80
3	2.5	1:23	80	90

由表 2 结果可知,影响甜叶菊渣中总黄酮得率的因素从大到小依次为料液比 > 提取时间 > 乙醇体积分数 > 提取温度;根据极差数据确定最佳提取工艺条件为  $A_3B_2C_3D_2$ ,即料液比 1:20,提取时间 2.5

表 2 甜叶菊渣中总黄酮的提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	总黄酮得率 /%
1	1.5	1:17	60	70	2.60
2	1.5	1:20	70	80	4.16
3	1.5	1:23	80	90	3.16
4	2	1:17	70	90	2.42
5	2	1:20	80	70	3.69
6	2	1:23	60	80	2.94
7	2.5	1:17	80	80	3.86
8	2.5	1:20	60	90	3.64
9	2.5	1:23	70	70	4.06
$K_1$	3.31	2.96	3.06	3.45	
$K_2$	3.02	3.83	3.55	3.65	
$K_3$	3.85	3.39	3.57	3.07	
R	0.84	0.87	0.51	0.58	

h,乙醇体积分数 80% ,提取温度 80 ℃。

**2.5 验证试验** 分别称取甜叶菊渣 20,40,60 g,按优选的工艺条件提取甜叶菊渣中总黄酮,提取 3 次,计算总黄酮得率分别为 4.21% ,4.17% ,4.26%。说明优选的提取工艺具有较好的重复性,且稳定可行。

### 3 讨论

单因素试验考察乙醇体积分数时,当乙醇体积分数为 80% 时,总黄酮得率最高,但乙醇体积分数 >80% 时,黄酮得率反而略微下降,说明随乙醇体积分数的增加,醇溶性杂质不断增加,故选取乙醇体积分数 80%。

本工艺提取甜叶菊渣中总黄酮,简单易行,成本低廉,安全可靠,有利于甜叶菊资源的合理利用。

### [参考文献]

[ 1 ] Hanson J R, Deoliveira B H. Stevioside and related

sweet diterpenoid glycosides[J]. Nat Prod Rep,1993,10 (3): 301.

[ 2 ] 石任兵. 甜叶菊有效部位及其活性和应用,中国:200710163453.6[P]. 2008-04-09.

[ 3 ] Lee Y, Howard L R, Villalon B. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*cap sicum annum*) cultivars[J]. J Food Sci, 1995, 60(3): 476.

[ 4 ] Onyeneho S N, Hettiarachchy N S. Effect of navy bean hull extract ontheoxidative stability of soy and sunflower oils[J]. J Agric Food Chem,1991, 39 (10): 1701.

[ 5 ] 石任兵. 一种同时制备甜叶菊总甜菊苷和甜叶菊总黄酮的方法,中国:200710111313.4[P]. 2007-06-18.

[ 6 ] 蔡晶,王薇,黄陈陈,等. 二次通用旋转组合设计优化山核桃蒲黄酮的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):50.

[ 7 ] 裴丹,赵明,欧阳臻,等. 龙柴方中黄芩、垂盆草总黄酮的提取纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):59.

[ 8 ] 郭雪峰,岳永德. 黄酮类化合物的提取、分离纯化和含量测定方法的研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35 (26):8083.

[ 9 ] 朱红梅,赵猛,王文晖. 酶法提取沙棘叶中黄酮的研究[J]. 农业与技术,2008,12 (6):34.

[ 10 ] 许云峰,张臻,周建芹. 酶辅助提取槐米中总黄酮的研究[J]. 中草药,2008,39 (11):1639.

[ 11 ] 钱亚琴,刘汉清,庄炜. SFE-CO<sub>2</sub> 萃取技术在中药提取分离中的应用[J]. 南京中医药大学学报,2004,20 (4):254.

[ 12 ] 石永平,汪海. 正交设计优选贯叶连翘中总黄酮提取工艺[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(3): 323.

[ 13 ] 钟明媚,陈飞虎,袁丽萍,等. 正交设计法优选鬼针草中总黄酮的提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2006,17(12): 13.

[ 14 ] 柳景,王昌利,崔锐,等. 复方鹿衔草总黄酮的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):29.

[责任编辑 仝燕]