

# 超声波辅助提取蓝莓总黄酮的工艺优化

曹建华\*,李光辉,张敏(青岛市第三人民医院,山东青岛 266041)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4426-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.35

**摘要** 目的:优化超声波辅助提取蓝莓总黄酮的工艺。方法:基于单因素试验,以总黄酮得率为指标,以乙醇体积分数、料液比和超声功率为考察因素设计正交试验,对超声波辅助提取蓝莓总黄酮的工艺参数进行优化并进行验证试验;同时与传统的醇回流法(回流提取2次,每次2h)比较。结果:最优提取工艺为在料液比1:25时用70%乙醇提取,超声功率250W(超声40min)。验证试验中蓝莓总黄酮得率为3.98%(RSD=0.41%,n=3),而醇回流法提取总黄酮得率为2.25%。结论:超声波辅助提取蓝莓总黄酮在提取时间和效果上明显优于醇回流法,且更适用于大规模工业化生产。

**关键词** 蓝莓;总黄酮;得率;提取工艺;优化;超声波辅助提取;正交试验

**Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction Technology of Total Flavonoids from *Vaccinium uliginosum***  
CAO Jian-hua, LI Guang-hui, ZHANG Min(Qingdao Third People's Hospital, Shandong Qingdao 266041, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize ultrasonic-assisted extraction technology of total flavonoids from *Vaccinium uliginosum*. METHODS: Based on single factor test, the ultrasonic-assisted extraction technology of total flavonoids from *V. uliginosum* was optimized by orthogonal test, using the yield of total flavonoids as index, with ethanol volume fraction, solid-liquid ratio and ultrasonic power as factors. The optimized technology was validated and compared with traditional ethanol reflux method (reflux extracting for 2 times, 2 h each time). RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as the solid-liquid ration of 1:25, 70% ethanol, ultrasonic power of 250 W (40 min for ultrasonic time). In validation test, the yield of total flavonoids from *V. uliginosum* was 3.98% (RSD=0.41%, n=3), and the yield of total flavonoids was 2.25% by ethanol reflux method. CONCLUSIONS: The ultrasonic-assisted extraction is obviously superior to ethanol reflux method on extraction time and effects, and it is suitable for industrialized production.

**KEYWORDS** *Vaccinium uliginosum*; Total flavonoids; Yield; Extraction technology; Optimization; Ultrasonic-assisted extraction; Orthogonal test

时间的延长,每日释放量减少;且在20d后,体系的每日释放量随着时间的增长而缓慢减小,溶出速率趋于稳定,近似为零级速率释药。由此可见,该缓释系统在体外模拟环境下可维持缓释时间达30d。

### 3 讨论

本试验中所采用的植入材料为多孔金属钽支架材料,其生物相容性好、弹性模量接近松质骨,具有非降解特性,物理化学性能稳定。这种材料是通过化学蒸汽沉积法在均匀的网状碳骨架表面喷涂了一层惰性金属钽制作而成的,其平均孔径为430 μm,孔隙率为75%~80%,孔隙间相互连通,是一个比较新颖的金属材料。

由验证试验结果可见,所制Dox植入式缓控释系统30d平均累积释放度为84.14%,低于缓控释制剂要求的药物完全累积释放度90%。究其原因,笔者认为多孔金属钽支架材料的自身问题。

在本试验中,影响制备Dox植入式缓控释系统的因素除了成膜材料的浓度外,笔者认为还包括自组装反应的时间与温度。本次研究中统一反应时间为1h、反应温度为室温,后续试验中笔者将对其作进一步优化。

本试验研制的Dox植入式缓控释系统体外释放符合拟订

\* 副主任药师。研究方向:药事管理、临床药学。电话:0532-89076588。E-mail:qdsyyjk@126.com

的释药速度要求。由正交设计可见,透明质酸作为大分子黏弹性物质<sup>[7]</sup>,其对释药速度影响最大。由释放度结果可见,制备的Dox缓控释系统具有缓释作用,释放度重现性良好,但该系统在动物体内释放、吸收等情况还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 王明,杨小平,苏宇雄,等.定量缓释基因重组碱性成纤维细胞生长因子/聚乳酸-聚羟基乙酸植入片的制备及体外释药研究[J].中华口腔医学研究杂志,2008,2(2):19.
- [2] 李勃,肖引,刘凯,等.阿霉素磁靶向药物制剂研究进展[J].中国药业,2014,23(10):96.
- [3] 屠锡德.药剂学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:949-951.
- [4] 樊秋平,梁嘉碧,杨海云,等.热疗用阿霉素温敏纳米粒的制备及工艺优化[J].中国药房,2011,22(17):1580.
- [5] 祝侠丽,贾永艳,黄海英,等.正交设计法优化布洛芬缓释骨架片的处方工艺[J].中国药房,2014,25(9):830.
- [6] 鲍玉成,张文龙,王勇,等.长效缓释双药物人工骨的制备及释放特性[J].中国组织工程研究,2012,16(38):7126.
- [7] 陈建澎,王婧茜,易喻,等.透明质酸及其衍生物研究进展[J].中国生物工程杂志,2015,35(2):111.

(收稿日期:2015-04-09 修回日期:2015-08-10)

(编辑:邹丽娟)

蓝莓 (*Vaccinium uliginosum*) 系杜鹃花科 (*Ericaceae*) 越橘属 (*Vaccinium*) 液果组灌木, 因果实呈蓝色而得名, 有三大商业栽培类型: 高丛蓝莓、兔眼蓝莓、矮丛蓝莓<sup>[1]</sup>。蓝莓原产于美国, 在我国主要分布在长白山及大、小兴安岭一带, 有近 20 年的引种栽培历史<sup>[2]</sup>。蓝莓果肉细腻, 因独特的风味和较高的营养保健功效备受人们关注, 被誉为“水果皇后”, 是联合国粮农组织推荐的五大健康水果之一<sup>[3]</sup>。蓝莓中富含花青素、黄酮醇等多种黄酮类成分, 其中花青素在目前已知的水果与蔬菜中含量最高, 具有增强免疫力、延缓衰老等功效, 其作用机制可能与清除体内自由基、抗氧化有关<sup>[4-5]</sup>。

超声波的机械振动和空化作用可加速植物有效成分的扩散和释放, 利于活性成分的提取。因此, 超声辅助提取技术是一种高效、简单、环保的活性成分提取方法<sup>[6]</sup>, 并已广泛用于多种天然植物中有效成分的提取。但目前未见有对蓝莓果实中黄酮类化合物超声提取的研究。鉴于黄酮类化合物是蓝莓中一类重要的药用活性成分, 笔者采用超声波辅助法提取蓝莓中总黄酮, 并基于单因素试验结果, 采用正交试验设计优化提取工艺, 为蓝莓的开发应用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

KQ-300DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司, 频率: 40 kHz); FA2204B 型电子分析天平 (上海精科天美贸易有限公司); 722S 型可见分光光度计 (上海美析仪器有限公司); DZF-6030A 型真空干燥箱 (上海一恒科技有限公司); SF-130 型高速中药粉碎机 (长沙中南制药机械厂)。

### 1.2 药材、药品与试剂

芦丁对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 100080-200707, 纯度: 92.5%); 蓝莓 (2014 年 6 月 20 日采摘自青岛市黄岛区, 经 60 °C 烘干粉碎过 40 目筛, 密封, 置于阴暗处保存备用); 试验所用试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 总黄酮含量测定方法学考察

参照 2010 年版《中国药典》<sup>[7]</sup> 及文献<sup>[8]</sup>, 将芦丁对照品干燥至恒质量后精密称取 0.024 7 g, 加入适量 70% 乙醇中微热溶解, 转移至 100 ml 量瓶中, 并定容至刻度, 得质量浓度为 0.247 mg/ml 的对照品溶液。精密吸取此溶液 0、3.0、6.0、9.0、12.0、15.0 ml 至 50 ml 量瓶中, 各加入 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 1.5 ml, 摇匀, 放置 6 min 后加入 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 1.5 ml, 混匀后静置 6 min, 然后再加入 4% NaOH 溶液 20 ml, 用 70% 乙醇定容, 混匀静置 10 min。在其最大吸收波长 510 nm 处测定各溶液的吸光度 (A), 与质量浓度 (c) 回归得到标准方程为  $A = 10.653c - 0.0249$  ( $r = 0.9997$ ), 芦丁检测质量浓度线性范围为 0.016 8 ~ 0.058 1 mg/ml。

准确吸取蓝莓总黄酮提取液 2.0 ml, 重复测定 6 次, 结果, 吸光度的 RSD = 0.77% ( $n = 6$ ), 表明方法精密度高; 准确吸取蓝莓总黄酮提取液 2.0 ml, 间隔 30 min 测定 1 次, 共重复 6 次, 结果, 吸光度的 RSD = 0.88% ( $n = 6$ ), 表明该方法精密度高及 3 h 内溶液稳定性较好。取已知总黄酮质量浓度的蓝莓总黄酮提取液 2.0 ml 共 6 份, 准确加入质量浓度为 0.247 mg/ml 的芦丁对照品溶液 1.0 ml, 依法测定总黄酮含量, 计算得平均回收率为

98.75% (RSD = 1.46%,  $n = 6$ ), 表明该方法的准确度较高。

### 2.2 蓝莓总黄酮提取及得率测定方法

精密称取蓝莓粉末 5.00 g, 置于 250 ml 锥形瓶中, 按每组试验设定液料比及提取时间超声波辅助提取。将得到的蓝莓提取液离心、抽滤, 收集滤液。为充分提取其中的总黄酮成分, 重复操作 2 次, 合并滤液后静置, 取上清液, 用 70% 乙醇溶液定容至 100 ml 量瓶中, 按“2.1”项下方法测定总黄酮含量, 通过标准曲线计算提取液质量浓度, 并计算总黄酮得率: 总黄酮得率 (%) = 蓝莓提取液质量浓度 × 体积 × 稀释倍数 / 蓝莓干粉质量 (g) × 100%。每组试验平行操作 3 次, 取平均值。

### 2.3 单因素试验及结果

根据文献<sup>[8]</sup>, 影响超声波辅助提取的主要因素有乙醇体积分数、料液比和超声功率。因此, 固定超声时间为 40 min 的试验条件下, 分别对这 3 种影响因素进行单因素考察, 考察各因素及水平对蓝莓总黄酮得率的影响。

2.3.1 乙醇体积分数对蓝莓总黄酮得率的影响 准确称取蓝莓粉末 5.00 g, 以不同乙醇体积分数 (40%、50%、60%、70%、80%)、料液比 1:20、超声功率 250 W 进行提取, 测定总黄酮含量并计算得率, 结果见图 1A。

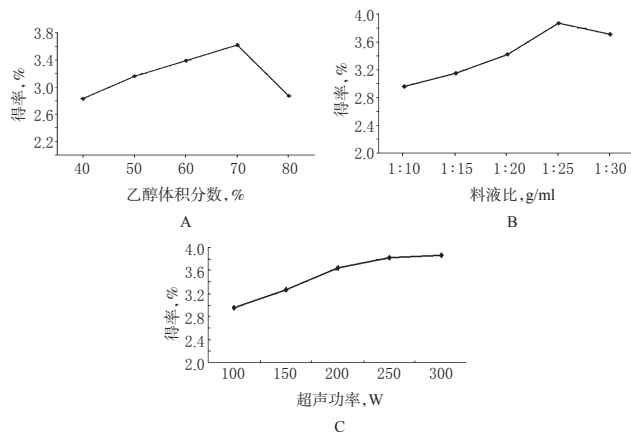


图 1 各因素对总黄酮提取得率的影响

A. 乙醇体积分数; B. 料液比; C. 超声功率

### Fig 1 Effect of each factor on the yield of total flavonoids

A. ethanol volume fraction; B. solid-liquid ratio; C. ultrasonic power

由图 1A 可知, 随着乙醇体积分数的升高, 总黄酮得率逐渐增加并在 70% 时达最大, 之后得率降低。推测可能原因为蓝莓中黄酮类化合物极性比较小, 在低体积分数乙醇水溶液中溶解度比较小, 所以随着体积分数增大而溶出量逐渐增加, 到 70% 时达到最大值; 超过 70% 后, 高体积分数的乙醇使蓝莓细胞内的蛋白变性凝固, 黄酮成分不易溶出而致溶出量减少。因此选择乙醇体积分数为 50%、60%、70% 进行正交试验。

2.3.2 料液比对蓝莓总黄酮得率的影响 准确称取蓝莓粉末 5.00 g, 以不同料液比 (1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)、乙醇体积分数 70%、超声功率 250 W 进行提取, 测定总黄酮含量并计算得率, 结果见图 1B。

由图 1B 可知, 料液比越大, 总黄酮得率越大, 并在料液比为 1:25 时达到最大值, 说明由于溶剂量的增加, 药材浸润程度更好, 渗透性更好, 从而增加了黄酮类活性成分的溶出和扩散。而在料液比高于 1:25 时, 可能由于杂质溶出过多导致总

黄酮得率下降。因此选择料液比为1:20、1:25、1:30进行正交试验。

2.3.3 超声功率对蓝莓总黄酮得率的影响 准确称取蓝莓粉末5.00 g,在不同超声功率(100、150、200、250、300 W)、乙醇体积分数70%、料液比1:20条件下进行提取,测定总黄酮含量并计算得率,结果见图1C。

由图1C可知,超声功率越大,总黄酮得率越高,原因可能是随着超声功率的增加,超声波振动越剧烈,提取溶剂就能更容易且快速地渗透到蓝莓果实中,提取出更多的有效成分。而超过250 W时黄酮得率增加缓慢,可能是提取杂质的不断渗出和部分有效成分被破坏所致。因此选择超声功率为200、250、300 W进行正交试验。

## 2.4 正交试验设计与结果

选择乙醇体积分数、料液比和超声功率3个因素,每个因素设定3个水平,采用 $L_9(3^4)$ 设计正交试验考察超声波辅助提取方法对蓝莓总黄酮得率的影响。因素与水平见表1;正交试验设计与结果见表2;方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(乙醇体积分数),%	B(料液比),g/ml	C(超声功率),W
1	50	1:20	200
2	60	1:25	250
3	70	1:30	300

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	得率,%
1	1	1	1	3.23
2	1	2	2	3.47
3	1	3	3	3.56
4	2	1	2	3.70
5	2	2	3	3.74
6	2	3	1	3.81
7	3	1	3	3.72
8	3	2	1	3.89
9	3	3	2	3.88
$K_1$	3.420	3.550	3.637	
$K_2$	3.750	3.750	3.720	
$K_3$	3.830	3.712	3.717	
R	0.410	0.200	0.083	

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis results of variance

因素	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.281 8	2	0.140 9	207.852 5	0.004 8
B	0.033 4	2	0.016 7	24.606 6	0.039 1
C	0.003	2	0.001 5	2.180 3	0.314 4
误差	0.001 4	2	0.000 7		
总和	0.319 4				

注: $F_{0.01}(2,2)=99.00, F_{0.05}(2,2)=19.00$

Note: $F_{0.01}(2,2)=99.00, F_{0.05}(2,2)=19.00$

由表2和表3可知,以总黄酮得率为评价指标的最优提取工艺为 $A_3B_2C_2$ ,即乙醇体积分数70%、料液比1:25、超声功率250 W;各因素影响程度大小依次为 $A>B>C$ ,其中A对蓝莓

总黄酮得率影响极显著( $P<0.01$ ),B对蓝莓总黄酮得率影响显著( $P<0.05$ ),表明本试验选择的考察因素比较准确。

## 2.5 验证试验

精密称取蓝莓粉末5.00 g,平行操作5份,按上述选择的最优工艺进行提取,测得总黄酮得率为3.98% ( $RSD=0.41%$ ,  $n=5$ ),表明该优选工艺稳定可行、重现性好。

## 2.6 与传统的醇回流法比较<sup>[9]</sup>

精密称取蓝莓粉末5.00 g,平行操作5份。提取条件为乙醇体积分数70%、料液比1:25、回流提取2次、每次2 h。提取液浓缩后转移至100 ml量瓶中,并用70%乙醇定容至刻度。计算该方法下蓝莓总黄酮得率为2.25%。因此,超声波辅助法与醇回流法相比提取效率更高。

## 3 讨论

超声波辅助提取技术不但能加快植物中有效成分的溶出速度,缩短提取时间,而且还可以增加有效成分的溶解度,提高提取效率。本研究通过单因素考察及正交试验设计,得蓝莓总黄酮最优提取工艺为:乙醇体积分数70%、料液比1:25、超声功率250 W。在此条件下,总黄酮得率为3.98%。该工艺操作简单,结果准确、稳定、可靠。因此,本试验可为蓝莓的综合开发利用提供试验依据,同时也扩展了超声波辅助提取技术的应用范围。

由于本试验研究的仅是黄酮大类的提取和得率分析,尚未对其具体成分进行分离及分析研究;下一步将采用色谱技术对黄酮大类进行分离和成分分析,提高各成分纯度,并确定其结构,为合成黄酮类替代品提供依据<sup>[10]</sup>。

## 参考文献

- [1] 赵海,岳绍雄,陈泽斌,等.从文献分析看我国蓝莓研究进展[J].昆明学院学报,2014,36(6):33.
- [2] 史海芝,刘惠民.国内外蓝莓研究现状[J].江苏林业科技,2009,36(4):48.
- [3] 李洪鲜.黔东南州蓝莓产业现状及发展建议[J].湖北林业科技,2015,22(1):64.
- [4] 韩鹏祥,张蓓,冯叙桥,等.蓝莓的营养保健功能及其开发利用[J].食品工业科技,2015,36(6):370.
- [5] 刘玮,钱慧碧,辛秀兰,等.蓝莓果渣中总黄酮的提取纯化及抗氧化性能的研究[J].食品科技,2011,36(2):216.
- [6] 李倩云,张双灵,周国燕.超声波辅助提取五倍子中单宁的工艺优化[J].食品与机械,2015,31(1):171.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:333.
- [8] 陈雅维,张延萍,周冬菊,等.响应面法优化葛根总黄酮的超声辅助提取工艺[J].食品科学,2012,33(14):41.
- [9] 孔繁晟,贲永光,孙爱群,等.超声法与连续回流法提取黄芪总黄酮的工艺对比研究[J].中国药房,2010,21(19):1752.
- [10] 李颖畅,孙建华,孟宪军.蓝莓叶总黄酮提取物的定性分析和抗油脂氧化[J].食品科学,2010,31(13):96.

(收稿日期:2015-04-14 修回日期:2015-07-21)

(编辑:刘 萍)