

大孔树脂纯化蓝莓叶多酚及其组成分析

冯 进^{1,2}, 李 敏³, 曾晓雄², 李春阳^{1,*}

(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 2.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095;
3.南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省粮油品质控制及深加工技术重点实验室, 江苏 南京 210003)

摘 要: 比较8种大孔树脂对蓝莓叶多酚的静态吸附与解吸效果, HPD400树脂吸附量为52.95mg/g, 解吸率为95.96%, 并且达到吸附平衡与解吸平衡的时间较短, 最适合蓝莓叶多酚的纯化。当上样质量浓度3mg/mL、pH2、上样流速2mL/min、上样体积140mL时, 树脂达到动态吸附饱和; 用80mL 40%的乙醇, 以1mL/min的流速进行洗脱, 可以洗脱完全, 解吸率为90.50%。经过HPD400树脂的纯化, 蓝莓叶多酚的纯度由原来的38.75%提高到69.38%。HPLC-DAD-MS的分析结果显示, 蓝莓叶多酚含有丰富的咖啡酰奎宁酸与槲皮素甙。

关键词: 蓝莓叶多酚; 大孔树脂; 纯化; HPLC-DAD-MS

Macroporous Resin Purification and Composition Analysis of Polyphenols from Blueberry Leaves

FENG Jin^{1,2}, LI Min³, ZENG Xiao-xiong², LI Chun-yang^{1,*}

(1. Institute of Farm Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;
2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
3. Key Laboratory of Grain and Oil Quality Control and Deep-Utilizing Technology of Jiangsu Province, College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210003, China)

Abstract: Adsorption and desorption of 8 types of macroporous resins towards polyphenols from blueberry leaves were investigated. The adsorption capacity and desorption rate of HPD400 resin was 52.95 mg/g and 95.96% respectively, and the time to reach equilibrium between adsorption and desorption was short, so it was the most suitable resin to purify blueberry leaves polyphenols. When 140 mL of 3 mg/mL samples with pH 2 was flowed through the HPD400 resin at a speed of 1 mL/min, the adsorption reached dynamic equilibrium. The adsorbed polyphenols could be completely eluted with 80 mL of 40% ethanol at 1 mL/min, resulting in a desorption rate of 90.50%. After being purified with HPD400 resin, the purity of polyphenols was increased from 38.75% to 69.38%. HPLC-DAD-MS analysis showed that the blueberry leaf polyphenols were rich in caffeoylquinic acids and quercetin glycosides.

Key words: blueberry leaves polyphenols; macroporous resin; purification; HPLC-DAD-MS

中图分类号: Q949.71

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)10-0086-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201310019

蓝莓又名笃斯越橘、蓝浆果等, 原产于北美^[1], 按照植物学分类, 属于杜鹃花科(Ericaceae)越橘亚科越橘属(*Vaccinium* spp.)多年生落叶或常绿灌木。蓝莓叶作为蓝莓产业的副产物, 具有药用价值, 其性温、味苦, 有解毒之功效^[2]。蓝莓叶中含有大量多酚物质^[3], 主要组分为绿原酸及其衍生物、咖啡酸、槲皮素甙以及低聚原花青素等^[4-5]。近年来, 蓝莓叶的生理功能在国际上受到广泛关注, Takesshita等^[6]研究证明蓝莓叶中聚合度为8和9的原花青素对丙肝病毒(HCV) RNA表达有很强的抑制作用, Squipen等^[7-8]研究发现蓝莓叶提取物对白血病敏感细胞

HL60及其两种抗药亚种具有抑制作用。Louis等^[9]研究发现, 蓝莓叶多酚可以增强C2C12细胞的葡萄糖转运能力和βTC-tet细胞的葡萄糖刺激胰岛素分泌(GSIS)能力, 并可以减少活化葡萄糖导致的PC12细胞凋亡, 因此具有抗糖尿病的功能。此外, 研究还发现蓝莓叶多酚提取物有降血脂^[10]、降血压^[11]的生理活性。

大孔树脂近年来被广泛用于多酚类物质分离与富集, 具有吸附快、解吸快、选择性强、吸附容量大、易于再生等优点^[12]。李超等^[13]用AB-8大孔树脂对大叶金黄草总黄酮进行了纯化, 纯化后黄酮纯度达到66.16%; 魏改芹等^[14]用HPD100大

收稿日期: 2012-03-16

基金项目: 2011年南京市科技发展计划国际联合研发项目(201101093)

作者简介: 冯进(1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向为活性物质提取。E-mail: jaas2010@163.com

*通信作者: 李春阳(1966—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为活性物质与功能食品。E-mail: lichunyang968@126.com

孔树脂对香青兰中木犀草素进行了纯化,木犀草素的含量由纯化前的0.15%增加到纯化后的2.7%。另外,HP20、DM130等大孔树脂对多酚的分离纯化效果也较好^[15-16]。

本研究选取了8种对多酚分离纯化效果较好的树脂,从中筛选出一种对蓝莓叶多酚具有良好吸附和解吸性能的树脂,考察此树脂对蓝莓叶多酚的静态、动态吸附与解吸性能及主要影响因素,建立蓝莓叶多酚的纯化方法,并用高效液相色谱-DAD检测及在线质谱(high performance liquid chromatography-DAD-mass spectrometry, HPLC-DAD-MS)分析方法对蓝莓叶多酚成分进行了初步分析,为蓝莓叶多酚的开发利用提供实验基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

“灿烂”蓝莓(bright well, 兔眼蓝莓, *Vaccinium ashei* Reade)蓝莓叶采自江苏省南京市溧水县,洗净后于-70℃条件下保藏。

大孔树脂D101、DM130、AB-8、HPD100、HPD400、HPD400A、HPD750、HPD826 沧州宝恩化工有限公司。8种树脂的具体参数见表1。

无水乙醇、无水碳酸钠等化学试剂 国药集团化学试剂有限公司;没食子酸、Folin-Ciocalteu试剂 美国Sigma公司。

表1 8种大孔树脂的结构功能参数
Table 1 Physical characteristics of eight macroporous resins

树脂型号	极性	外观	比表面积/(m ² /g)	平均孔径/Å
HPD400	非极性	乳白色不透明球状颗粒	500~550	75~80
HPD750	中极性	乳白色不透明球状颗粒	650~700	85~90
HPD100	非极性	乳白色不透明球状颗粒	650~700	85~90
HPD400A	中极性	乳白色不透明球状颗粒	500~550	85~90
D101	非极性	乳白色不透明球状颗粒	≥400	100~110
DM130	中极性	乳白色不透明球状颗粒	500~550	90~100
AB-8	弱极性	乳白色不透明球状颗粒	480~520	130~140
HPD826	氢键	乳白色不透明球状颗粒	500~600	90~100

1.2 仪器与设备

THZ-Q台式冷冻恒温振荡器 太仓市华美生化仪器厂;752S紫外-可见分光光度计 上海棱光技术有限公司;PHS-2C数显pH计 上海仪器仪表有限公司;FDU-1200冷冻干燥机 日本Eyela公司;1100高效液相色谱与质谱联用仪(带自动进样器)、Zorbax SB-C₁₈反相色谱柱(4.6mm×250mm, 5μm) 美国Agilent公司。

1.3 方法

1.3.1 蓝莓叶多酚提取液的制备

冷藏蓝莓叶液氮中磨碎,60%乙醇中室温振荡提取12h,5000×g离心30min,低温蒸干,冻干,使用时配成不同质量浓度的溶液。

1.3.2 多酚质量浓度与纯度的测定

1.3.2.1 多酚质量浓度的测定

采用Folin-Ciocalteu法^[17]。以没食子酸为标准品,得到标准曲线方程为: $Y=7.2110X+0.0152$, $R^2=0.9994$ 。

多酚质量浓度 C_0 /(mg/mL) = $C \times N$

式中: C 为根据标准曲线计算出待测液中多酚质量浓度/(mg/mL); N 为稀释倍数。

1.3.2.2 多酚纯度的测定

各取一定体积的提取液与洗脱液,减压蒸馏至无醇味,冻干,称量。

$$\text{总酚纯度 } P/\% = \frac{C_0 \times V}{m} \times 100$$

式中: C_0 为多酚质量浓度/(mg/mL); V 为溶液体积/mL; m 为冻干后质量/mg。

1.3.3 大孔树脂的预处理^[18]

树脂用95%的乙醇浸泡24h后装柱,并用95%的乙醇淋洗至无白色,5%盐酸溶液与2%氢氧化钠溶液分别浸泡并洗至中性。

1.3.4 大孔树脂静态吸附与解吸

1.3.4.1 大孔树脂对蓝莓叶多酚吸附量、吸附率和解吸率的测定^[19]

准确称取预处理好的大孔树脂3g,置于100mL具塞磨口三角瓶中,加入一定质量浓度的蓝莓叶多酚提取液50mL,置于摇床(25℃, 120r/min)振荡24h进行静态吸附后,取上清液测定总多酚含量,按照下面公式计算吸附量和吸附率:

$$Q=(C_0-C_t) \times V/m$$

$$A/\%=(C_0-C_t)/C_0 \times 100$$

式中: Q 为吸附量/(mg/g); C_0 为起始质量浓度/(mg/mL); C_t 为平衡质量浓度/(mg/mL); V 为吸附溶液体积/mL; m 为树脂质量/g; A 为吸附率/%。

将充分吸附后的树脂用蒸馏水洗净至树脂表面无提取溶液残留,滤纸吸干树脂表面的残留溶液,然后置于100mL具塞三角瓶中,加入50mL无水乙醇,置于摇床(25℃, 120r/min)振荡解吸12h,充分解吸后,取上清液测定多酚含量,按照下式计算解吸率。

$$D/\%=(V \times C)/(m \times Q) \times 100$$

式中: Q 为吸附量/(mg/g); C 为解吸后溶液中总多酚质量浓度/(mg/mL); V 为解吸液体积/mL; m 为树脂质量/g。

1.3.4.2 大孔树脂静态吸附与解吸动力学曲线的绘制

称取大孔树脂HPD400、HPD100、DM131各3.0g,装入具塞磨口三角瓶中,加入一定质量浓度的提取溶液50mL,置于摇床上振荡(25℃, 120r/min),静态吸附24h。期间每隔一定时间取0.1mL,适当稀释,测定多酚质量浓度吸附量,绘制吸附动力学曲线。

将充分吸附后的树脂用蒸馏水清洗至树脂表面无提取溶液残留,滤纸吸干树脂表面残留的溶液,然后置于具塞三角瓶中,加入50mL无水乙醇,置于摇床(25℃, 120r/min)振荡解吸12h,期间每隔一定时间取0.1mL,测定多酚解吸率,绘制静态解吸动力学曲线。

1.3.4.3 HPD400树脂Langmuir吸附等温曲线测定

准确称取预处理好的HPD400,分别加入不同质量浓度的蓝莓叶多酚提取液,置于摇床(25℃, 120r/min)振荡24h进行静态吸附后,取上清液测定多酚含量,计算吸附量。根据吸附平衡后吸附量与提取液中剩余的多酚质量浓度之间的关系,得到该树脂的Langmuir等温吸附曲线。Langmuir等温吸附公式:

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_m K_L} + \frac{C_e}{Q_m}$$

式中: Q_m 为理论最大吸附量(mg/g); Q_e 为吸附达平衡后的吸附量(mg/g); C_e 为吸附平衡后的多酚质量浓度(mg/mL); K_L 为吸附平衡常数。

1.3.4.4 静态吸附与解吸条件的优化

分别考察提取液多酚质量浓度与提取液pH值对树脂吸附的影响,考察乙醇体积分数对树脂解吸的影响。

1.3.5 HPD400树脂动态吸附与解吸

1.3.5.1 上样流速对吸附效果的影响

将预处理好的20g HPD400大孔树脂湿法装入玻璃层析柱(1.0cm×60cm)中。将蓝莓叶多酚提取液(3mg/mL, pH2)以不同流速上柱进行动态吸附,10mL/管分部收集流出液,测定泄漏点(流出液多酚质量浓度为进样质量浓度的1/10)时流出液体积,确定适宜上样流速。

1.3.5.2 洗脱流速对解吸效果的影响

将200mL优选质量浓度的蓝莓渣多酚提取液以优选上样流速上柱,静置1h后,用去离子水洗至流出液无色,用40%乙醇溶液以不同洗脱速度洗脱,分管收集洗脱液,通过测定每管多酚含量以及总多酚含量考察洗脱流速对树脂解吸效果的影响。

1.3.6 HPLC-DAD-MS试验方法

1.3.6.1 色谱条件

色谱柱: Zorbax SB-C₁₈反相色谱柱(4.6mm×250mm, 5μm)。

以含0.1% HAc的水为流动相A,含0.1% HAc的甲醇为流动相B,流速0.6mL/min,柱温为35℃,进样量为10μL,按照如下梯度洗脱: 0~5min, 5%~10% B; 10~25min, 10%~20% B; 25~35min, 20%~23% B; 35~45min, 23%~28% B; 45~60min, 28%~35% B; 60~75min, 35%~50% B; 75~80min, 50%~55% B; 80~85min, 55%~75% B; 85~90min, 75%~35% B; 90~95min, 35%~5% B。采用DAD检测器,检测波长为

320nm。

1.3.6.2 质谱条件

雾化气N₂ 30psi,干燥气N₂ 10psi,毛细管温度350℃,毛细管电压(负离子模式下)3.0kV。质量扫描范围: m/z 200~2000。

1.3.7 数据分析

使用SPSS 14.0软件,采用ANOVA法进行显著性检验。选取 $P<0.05$ 为显著水平。

2 结果与分析

2.1 8种大孔树脂对蓝莓叶多酚静态吸附及解吸特性

表2 8种大孔树脂静态吸附与解吸结果
Table 2 Results of static adsorption and desorption rates of eight macroporous resins

树脂型号	平衡质量浓度/(mg/mL)	吸附量/(mg/g)	吸附率/%	解吸液质量浓度/(mg/mL)	解吸率/%
HPD400	0.42±0.01 ^c	52.95±0.24 ^b	88.31±0.40 ^b	3.02±0.00 ^a	95.96±0.13 ^a
HPD750	0.45±0.02 ^d	52.41±0.41 ^b	87.44±0.70 ^b	2.72±0.09 ^d	86.54±2.73 ^d
HPD100	0.37±0.00 ^e	53.18±0.06 ^a	89.65±0.10 ^a	3.07±0.01 ^a	95.24±0.39 ^a
HPD400A	0.40±0.00 ^f	52.74±0.03 ^b	88.94±0.06 ^b	2.72±0.04 ^d	84.91±1.12 ^f
D101	0.54±0.01 ^b	50.01±0.13 ^c	85.04±0.22 ^c	2.61±0.05	85.27±1.52 ^e
DM130	0.47±0.01 ^c	51.68±0.13 ^{bc}	87.01±0.21 ^b	2.91±0.09 ^b	92.81±2.83 ^b
AB-8	0.40±0.00 ^f	52.70±0.06 ^b	88.96±0.11 ^b	2.77±0.07 ^c	86.36±2.15 ^d
HPD-826	0.59±0.05 ^a	49.42±0.89 ^d	83.54±1.50 ^d	2.71±0.05 ^d	89.64±1.79 ^e

注: 字母 a~f 表示差异显著性($P<0.05$); 同一列数据中字母相同表示无显著性差异。

在相同试验条件下,测得各树脂的静态吸附、静态解吸的结果如表2所示,吸附量较大的为非极性或者弱极性树脂,如HPD100、HPD400、AB-8,原因可能是蓝莓叶多酚组分属于弱极性的物质,与这类大孔树脂具有特异性吸附。而HPD100、HPD400、DM130对蓝莓叶多酚的解吸效果更好,这可能与具有较大的比表面积有关^[20],选择吸附量与解吸率均较好的HPD100、HPD400和DM130树脂绘制静态吸附与解吸动力学曲线。

2.2 HPD400、HPD100、DM130吸附与解吸蓝莓叶多酚动力学特性

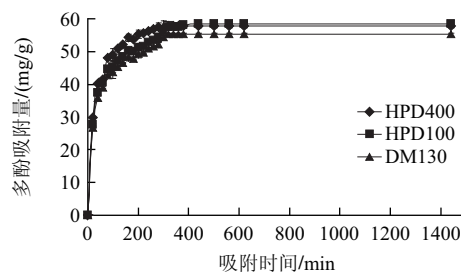


图1 HPD400、HPD100、DM130静态吸附动力学曲线

Fig.1 Kinetic curves of static adsorption of HPD400, HPD100 and DM130 macroporous resins

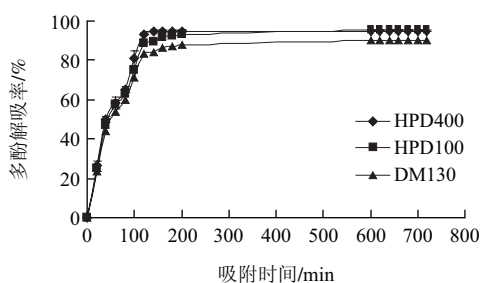


图2 HPD400、HPD100、DM130静态解吸动力学曲线

Fig.2 Kinetic curves of static desorption of HPD400, HPD100 and DM130 macroporous resins

从图1可以看出, HPD400在300min时达到吸附平衡, HPD100与DM130在400min左右达到吸附平衡, 达到平衡时DM130的吸附量明显低于其他两种树脂。从图2可以看出, HPD400树脂在140min左右达到解吸平衡, 另外两种在200min达到解吸平衡, HPD100与HPD400的解吸率差异不明显, DM130的多酚解吸率较低。由于HPD400达到吸附与解吸平衡的时间较快, 并且具有较高的吸附量和解吸率, 因此选择HPD400进行后续的纯化工作。

2.3 提取液多酚质量浓度对HDP400大孔树脂的影响

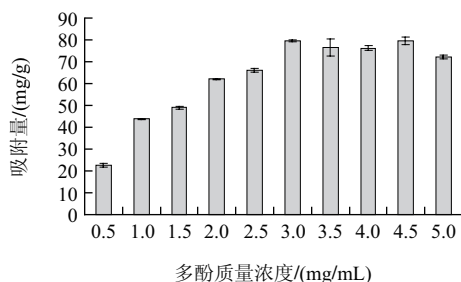


图3 蓝莓叶多酚质量浓度对吸附量的影响

Fig.3 Effect of the concentration of blueberry leaves polyphenols on adsorption quantity

由图3可以看出, 当多酚质量浓度在0.5~3mg/mL之间时, 树脂的吸附量随着多酚质量浓度的增加而迅速增加, 当多酚质量浓度为3~5mg/mL时, 吸附量无显著变化。提高上样量有利于提高树脂的利用率, 但是, 上样质量浓度过高, 上样液会出现絮凝和沉淀, 容易对树脂造成污染和阻塞, 降低其吸附能力^[21], 因此, 选择上样质量浓度为3mg/mL。

2.4 HPD400树脂的Langmuir吸附等温线

由图4可知, 在本实验研究范围内Langmuir等温线呈直线, $R^2=0.9868$, 基本符合Langmuir吸附理论, 根据斜率和截距计算得出HPD400树脂对蓝莓叶多酚的最大吸附量 Q_m 为75.19mg/g。由此可知HPD400大孔树脂对蓝莓叶多酚的吸附是单分子层的吸附^[22], 故应用较低质量浓度的蓝莓叶多酚溶液上样, 上样质量浓度过高不会增加吸附量, 反而会造成多酚的损失。

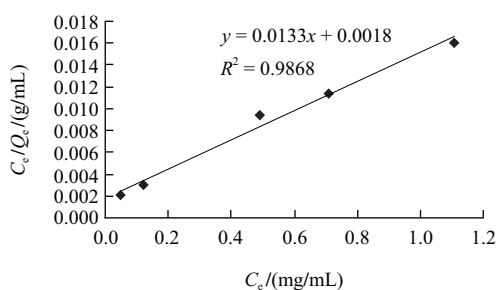


图4 Langmuir吸附等温曲线

Fig.4 Langmuir adsorption isotherm

2.5 提取液pH值对树脂吸附的影响

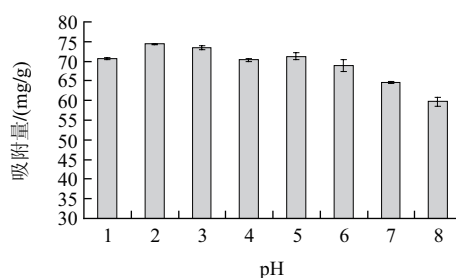


图5 pH值对静态吸附量的影响

Fig.5 Effect of pH on static adsorption quantity

如图5所示, 蓝莓叶多酚在酸性条件下的吸附效果较好, pH2时的吸附效果最好。不同pH值可以改变目标成分在溶液中的存在形式, 影响其溶解度, 并改变溶液极性, 影响目标成分与大孔树脂的分子间的作用力^[23], 蓝莓叶中多酚大多属于黄酮类物质, 并且含酚羟基较多, 呈弱酸性, 须在弱酸性条件下进行吸附。

2.6 乙醇体积分数对解吸的影响

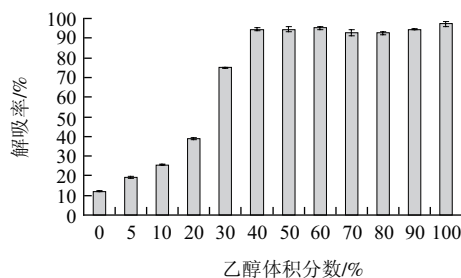


图6 乙醇体积分数对静态解吸率的影响

Fig.6 Effect of ethanol concentration on static desorption rate

从图6可以看出, 乙醇体积分数在0%~40%之间时, 解吸率随着乙醇体积分数的升高增加较快, 继续提高乙醇体积分数, 解吸率变化不大, 从节约资源的角度考虑, 选择40%乙醇溶液解吸。

2.7 上样流速对吸附效果的影响

从图7可以看出, 上样流速为1、2、3、4、5mL/min时, 泄露点(流出液质量浓度为上样液质量浓度1/10时)分别

出现在160、140、110、100、80mL附近。流速为1mL/min时泄露点出现较晚，但因为流速太慢而导致生产周期过长。综合考虑，选择上样流速为2mL/min。

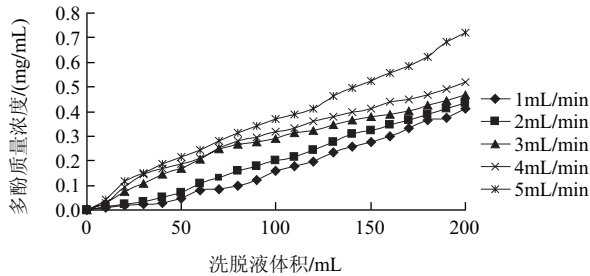


图7 上样流速对动态吸附的影响
Fig.7 Effect of loading flow rate on kinetic adsorption

2.8 洗脱流速对洗脱效果的影响

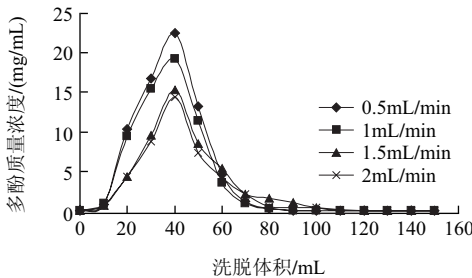


图8 HPD400树脂吸附蓝莓叶多酚洗脱曲线
Fig.8 Desorption curve of blueberry leaves polyphenols from HPD400

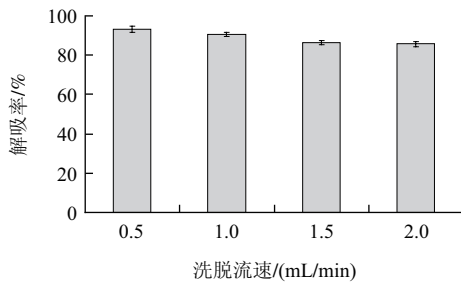


图9 洗脱流速对解吸率的影响
Fig.9 Effect of desorption flow speed on desorption rate of blueberry leaves polyphenols

从图8可以看出，以0.5、1mL/min进行洗脱得到的峰形均较窄，无明显的拖尾现象，以1.5、2mL/min进行洗脱得到的峰形较宽，且有着明显的拖尾现象。从图9可以看出，洗脱速率越快解吸率越低，这是由于在洗脱体积一定的情况下，洗脱速率过大，会导致洗脱剂未充分溶解树脂中的多酚而过柱^[24]，洗脱流速为0.5mL/min时，洗脱率最高，但是生产周期过长，而洗脱速率提高到1mL/min时，解吸率下降不明显，而生产周期可以缩短，所以本试验选择洗脱速率为1mL/min。从图8可以看出，当洗脱体积为80mL时，蓝莓叶多酚基本可以洗脱完全。

2.9 蓝莓叶多酚纯度的计算

蓝莓叶多酚经过HPD400树脂纯化后，多酚纯度从38.75%提高到69.38%，说明HPD400大孔树脂对蓝莓叶多酚的纯化效果较好，可以大幅度提高提取物的多酚含量。

2.10 HPLC-DAD-MS分析蓝莓叶多酚成分

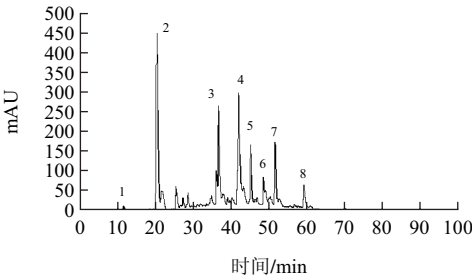
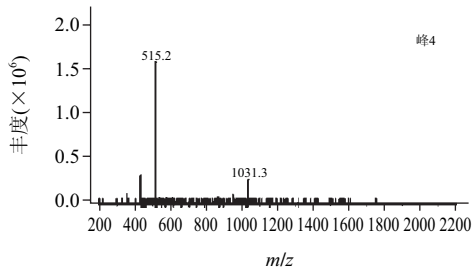
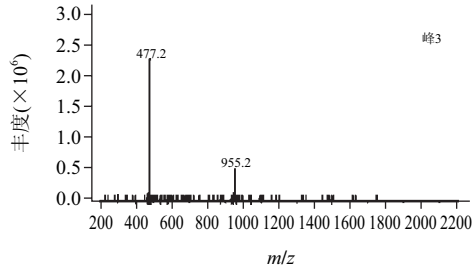
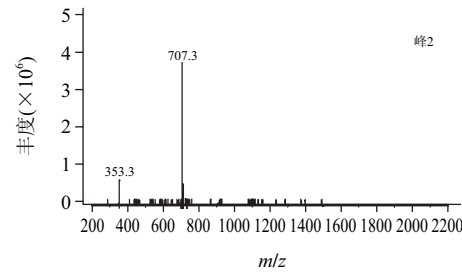
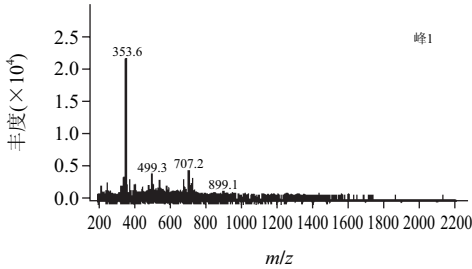


图10 蓝莓叶多酚HPLC分析结果
Fig.10 The result of HPLC analysis of blueberry leaves polyphenols



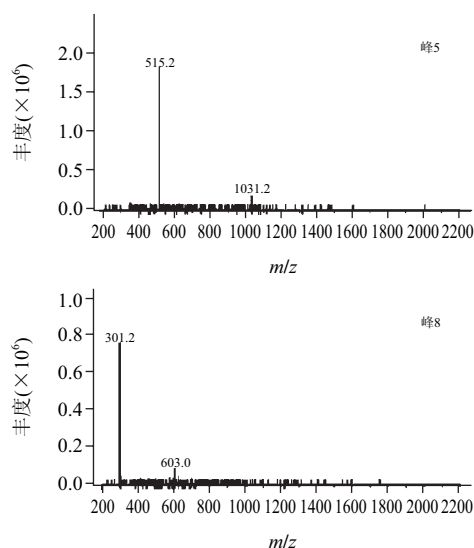


图11 峰1、2、3、4、5、8质谱图

Fig.11 MS spectra of peaks 1, 2, 3, 4, 5 and 8

根据质谱图, 峰1、2为绿原酸(chlorogenic acid)^[5], 它们的出峰保留时间不同, 应该属于两种同分异构体。另外, 根据相对分子量与出峰保留时间, 结合相关文献的报道^[4-5,9,25], 推测峰3、4、5、8分别为槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸(quercetin-3-*O*-glucuronide)、3,5-二-反式-咖啡酰奎宁酸(3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid)、3,4-二-反式-咖啡酰奎宁酸(3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid)、槲皮素(quercetin)。

3 结论

HPD400树脂的静态吸附量为52.95mg/g, 解吸率95.96%, 并且达到吸附与解吸平衡的时间较短, 最适合蓝莓叶多酚的纯化。

当上样质量浓度为3mg/mL、pH 2、上样流速为2mL/min时, HPD400树脂对蓝莓叶多酚的吸附量较大, 为140mL。用80mL 40%乙醇以1mL/min的流速进行洗脱时, 解吸效果较好, 解吸率为90.50%, 且峰形对称性较好, 无明显的拖尾现象。经过HPD400树脂的纯化, 蓝莓叶多酚的纯度由原来的38.75%提高到69.38%。

结合文献报道与HPLC-DAD-MS的分析结果, 推测蓝莓叶中可能含有绿原酸(chlorogenic acid)的两种同分异构体、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸(quercetin-3-*O*-glucuronide)、3,5-二-反式-咖啡酰奎宁酸(3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid)、3,4-二-反式-咖啡酰奎宁酸(3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid)、槲皮素(quercetin)。

参考文献:

[1] MARVIN P, JAMES F. Highbush blueberry production guide[M]. New York: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1992: 4-7.

[2] 张玉香, 曲慧鸽, 杨润亚, 等. 响应面法优化蓝莓叶黄酮的微波提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 33-37.

[3] EHLENFELDT M K, PRIOR R L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and polyphenolics and anthocyanidins concentrations in fruit and leaf tissue of highbush blueberry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(5): 2222-2227.

[4] MATSUO T, FUJITA Y, OHNISHI S, et al. Chemical constitution of the leaves of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) and characterisation of polymeric proanthocyanidins containing phenylpropanoid units and A-type linkages[J]. Food Chemistry, 2010, 121(4): 1073-1079.

[5] HARRIS C S, BURT A J, SALEEM A, et al. A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*[J]. Phytochemical Analysis, 2007, 18(2): 161-169.

[6] TAKESHITA M, ISHIDA Y, AKAMATSU E, et al. Proanthocyanidin from Blueberry leaves suppress expression of Hepatitis C virus RNA [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(32): 21165-21176.

[7] SKUPIEN K, KOSTRZEWA-NOWAK D, OSZMIANSKI J, et al. *In vitro* antileukemic activity of extracts from chokeberry (*Aronia melanocarpa* [Michx] Elliott) and mulberry (*Morus alba* L.) leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells[J]. Phytotherapy Research, 2008, 22(5): 689-694.

[8] SKUPIEN K, OSZMIANSKI J, KOSTRZEWA-NOWAK D, et al. *In vitro* antileukemic activity of extracts from berry plants leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells[J]. Cancer letters, 2006, 236(2): 289-291.

[9] MARTINEAU L C, COUTURE A, SPOOR D, et al. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait[J]. Phytomedicine, 2006, 13(9/10): 612-623.

[10] NAGAO K, HIGA K, SHIROUCHI B, et al. Effects of *Vaccinium ashei* Reade leaves on lipid metabolism in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72(6): 1619-1622.

[11] SAKAIDA H, NAGAO K, HIGA K, et al. Effect of *Vaccinium ashei* Reade leaves on Angiotensin converting enzyme activity *in vitro* and on systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats *in vitro*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(9): 2335-2337.

[12] 徐青, 陆莹莹, 辛健美, 等. 大孔树脂吸附分离海芦笋中黄酮类化合物工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 115-119.

[13] 李超, 王乃馨, 郑义, 等. AB-8大孔树脂分离纯化大叶金盏草总黄酮[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 31-35.

[14] 魏改芹, 邢建国, 何承辉, 等. HPD100大孔树脂分离纯化香草兰中木犀草素的研究[J]. 中成药, 2008, 30(11): 1608-1611.

[15] 魏元峰, 刘新国, 韩建伟, 等. HP20树脂纯化黄芩总黄酮的研究[J]. 湖北中医杂志, 2007, 29(2): 50-51.

[16] 巫冠中, 苏欣, 等. DM130树脂富集葎草中总黄酮的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(36): 17970-17973.

[17] SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTOS R M, et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by mean of Folin-Ciocalteu reagent[J]. Meth Enzymol, 1999, 299(8): 152-178.

[18] 唐丽丽, 刘邻渭, 孙丽芳, 等. 大孔树脂对石榴皮中多酚物质的吸附研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(5): 48-51.

[19] 刘新明, 潘道东, 吕丽爽, 等. 大孔树脂筛分马兰中活性组分及体外抗脂质过氧化测定[J]. 食品科学, 2011, 32(22): 89-94.

[20] 于林芳, 王超, 王玉明, 等. 大孔树脂纯化草皮氏海参总皂苷工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 1-4.

[21] 刁晶晶, 曹龙奎. 大孔树脂吸附分离纯化软枣猕猴桃总黄酮[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 145-149.

[22] 孟宪军, 朱力杰, 李斌, 等. 大孔树脂纯化北五味子藤茎中总三萜的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 339-342.

[23] 毕洁, 杨庆利, 于丽娜. 大孔树脂纯化碱提花生壳总黄酮[J]. 食品科学, 2011, 36(2): 197-202.

[24] 黎海滨, 杨越华. 大孔树脂吸附纯化罗汉果皂苷的动力学研究[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 124-128.

[25] OSZMIANSKI J, WOJDYLO A, GORZELANY J, et al. Identification and characterization of low molecular weight polyphenols in berry leaf extracts by HPLC-DAD and LC-ESI/MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(24): 12830-12837.