

大孔吸附树脂-聚酰胺联用纯化茅岩莓总黄酮工艺优化

金慧鸣, 郭红英, 谭兴和*, 刘梦浩, 王 锋, 蔡 文, 张 喻, 邓洁红

(湖南农业大学食品科技学院, 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 为纯化茅岩莓总黄酮, 先用HPD-100型大孔吸附树脂 (macroporous adsorption resin, MAR) 层析柱进行初步纯化, 再用聚酰胺 (polyamide, PA) 层析柱进行第2次纯化, 得到的HPD-100型MAR最适宜吸附工艺参数为上样液总黄酮质量浓度6 mg/mL、上样流速1 mL/min、上样液体积130 mL, 在此条件下吸附率为97.14%; 最适宜解吸工艺参数为洗脱液乙醇体积分数70%、洗脱流速1 mL/min、洗脱液体积40 mL, 在此条件下解吸率为94.10%。经HPD-100型MAR纯化后的总黄酮纯度从55.00%提高到了72.25%。PA的最适宜吸附工艺参数为上样液总黄酮质量浓度6 mg/mL、上样流速2 mL/min, 在此条件下吸附率为99.57%; 最适宜解吸工艺参数为洗脱液乙醇体积分数70%、洗脱流速1 mL/min、洗脱液体积55 mL, 在此条件下解吸率为76.50%。经PA纯化后总黄酮纯度从72.25%提高到了80.75%。该方法为茅岩莓黄酮的纯化提供了一种更高效的方法, 具有良好的应用前景。

关键词: 茅岩莓; 总黄酮; 大孔吸附树脂; 聚酰胺; 纯化

Purification of Total Flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* by Combined Use of Macroporous Adsorption Resin and Polyamide

JIN Huiming, GUO Hongying, TAN Xinghe*, LIU Menghao, WANG Feng, CAI Wen, ZHANG Yu, DENG Jiehong
(Key Laboratory for Food Science and Bio-Technology of Hunan Province, College of Food Science and Technology,
Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Sequential column chromatographies on HPD-100 macroporous adsorption resin (MAR) and polyamide (PA) were used to purify total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata*. The optimum adsorption parameters for HPD-100 MAR were determined as follows: sample concentration, 6 mg/mL; sample flow rate, 1 mL/min; and sample volume, 130 mL. Under these conditions, the percentage adsorption was 97.14%. The optimum desorption parameters were established as follows: eluent concentration, aqueous ethanol (70:30, V/V); eluent volume, 40 mL; and flow rate, 1 mL/min. Under these conditions, the percentage desorption was 94.10%. After the treatment with HPD-100 MAR, the purity of total flavonoids was increased from 55.00% to 72.25%. The optimum adsorption parameters for PA were determined as follows: sample concentration, 6 mg/mL; and flow rate, 2 mL/min. Under these conditions, the percentage adsorption was 99.57%. The optimum desorption parameters were determined as follows: 70% ethanol in water (V/V) as the eluent; eluent volume, 55 mL; and flow rate, 1 mL/min. Under these conditions, the percentage desorption was 76.50%. After the treatment with PA, the purity of total flavonoids was further increased to 80.75%. The method presented in this study can provided a promising approach for the efficiency purification of total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata*.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; total flavonoids; macroporous adsorption resin; polyamide; purification

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612003

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 12-0013-06

引文格式:

金慧鸣, 郭红英, 谭兴和, 等. 大孔吸附树脂-聚酰胺联用纯化茅岩莓总黄酮[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 13-18.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612003. <http://www.spkx.net.cn>

JIN Huiming, GUO Hongying, TAN Xinghe, et al. Purification of total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* by combined use of macroporous adsorption resin and polyamide[J]. Food Science, 2016, 37(12): 13-18. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612003. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2015-10-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371817); 湖南省自然科学基金项目 (2015JJ3076)

作者简介: 金慧鸣 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工技术. E-mail: 279697317@qq.com

*通信作者: 谭兴和 (1959—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工技术. E-mail: xinghetan@163.com

茅岩莓, 学名显齿蛇葡萄 (*Ampelopsis grossedentata*), 系葡萄科蛇葡萄属的一种野生藤本植物, 其干燥的叶片黄酮类化合物含量极高, 最高可达干质量的45%左右, 具有抗氧化、抑菌、降血糖、降血脂、保肝护肝的功效^[1-4]。其中, 总黄酮中含量最高的是二氢杨梅素, 最新研究证明其具有抑制乳腺癌细胞和前列腺癌细胞增殖的作用^[5-7]。随着人们对黄酮保健作用认识的加强, 茅岩莓黄酮的利用越来越得到重视。

近年来, 大孔吸附树脂 (macroporous adsorption resin, MAR) 被广泛用于化学和医药行业中, 尤其是植物粗提物中生物活性物质的提取纯化分离, 它具有操作成本低、溶剂耗费少、工作强度小、容易再生等优点^[8-11]。聚酰胺 (polyamide, PA) 是一种以酰胺键聚合形成的高分子化合物, 主要通过氢键之间相互作用的亲和力进行吸附^[12-13], 其对黄酮化合物有很强的吸附性能, 且分离和脱色效果好, 可以弥补MAR的一些不足。本研究试图通过MAR与PA联用, 确定纯化茅岩莓总黄酮的工艺参数, 旨在为茅岩莓总黄酮的纯化提供一种更高效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

干茅岩莓叶 (用中药粉碎机将其粉碎, 过120目筛, 装入密封袋备用) 张家界茅岩莓公司; 二氢杨梅素标准品 (色谱级, 纯度 $\geq 99\%$) 成都曼思特生物科技有限公司; HPD-100型MAR 郑州勤实科技有限公司; PA粉 (80~100目)、无水乙醇 (分析纯)、三氯化铝 (分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 氢氧化钠 (分析纯) 天津市风船化学试剂科技有限公司; 盐酸 (分析纯) 衡阳市凯倍化工试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

FW177中草药粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; KQ-250DE超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; RE-2000B旋转蒸发器、SHZ-D (III) 循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限公司; FD-1B真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; SKY-200B气浴摇床 上海苏坤实业有限公司; UV-2450紫外-可见分光光度计、ATX224电子分析天平 日本岛津公司; DENVER电子天平 北京赛多利斯仪器有限公司; 100、1000、5000 μL 移液枪 艾本德 (中国) 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 茅岩莓黄酮含量的测定

采用紫外分光光度法^[14]并做适当改进。精密称取1.8 mg二氢杨梅素标准品于10 mL容量瓶里, 用95%乙

醇溶液定容; 再从中准确吸取0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mL于25 mL容量瓶中, 分别加入3 mL质量分数5%的 AlCl_3 溶液, 用95%乙醇溶液定容到刻度, 摇匀, 配制成质量浓度分别为0、0.002 88、0.005 76、0.008 64、0.011 52、0.014 40、0.017 28 mg/mL的二氢杨梅素标准溶液, 在室温放置40 min, 于紫外分光光度计296 nm波长处测定吸光度。以二氢杨梅素质量浓度 C 为横坐标、吸光度 A 为纵坐标绘制茅岩莓总黄酮标准曲线, 并通过线性回归得到回归方程: $A=48.090\ 3C-0.000\ 8$, $R^2=0.999\ 8$ 。

1.3.2 MAR的预处理

按照文献[15]进行预处理, 处理完后置于蒸馏水中备用。

1.3.3 PA的预处理

按照文献[16]进行预处理, 处理完后置于蒸馏水中备用。

1.3.4 MAR上样液的制备

上样液制备流程: 茅岩莓粉 \rightarrow 加入乙醇溶液 \rightarrow 超声波辅助乙醇法提取 \rightarrow 过滤 \rightarrow 旋转蒸发成浸膏状 \rightarrow 冷冻干燥 \rightarrow 加蒸馏水配制成不同质量浓度总黄酮溶液 (超声波助溶) \rightarrow 备用。

提取条件为: 乙醇体积分数67%、超声波处理温度58 $^{\circ}\text{C}$ 、超声波处理时间28 min、液料比22.5:1 (mL/g)^[17]。

1.3.5 MAR动态吸附与解吸工艺参数的确定

取20 mL已处理好的MAR湿法装入层析柱 ($\Phi 18\text{ mm} \times 300\text{ mm}$) 中, 再将茅岩莓总黄酮溶液上柱, 待总黄酮溶液通过树脂柱后, 用大约4~5 BV (1 BV=20 mL) 蒸馏水冲洗树脂柱, 最后用乙醇溶液进行洗脱。通过测定吸附液和洗脱液中总黄酮质量浓度并计算吸附率和解吸率, 考察上样液总黄酮质量浓度、上样流速、上样液体积以及洗脱液体积分数、洗脱流速、洗脱液体积对MAR性能的影响, 确定最适宜工艺参数。

1.3.6 PA动态吸附与解吸工艺参数的确定

取经MAR最适宜工艺参数吸附和洗脱处理的总黄酮溶液, 测得洗脱液中总黄酮的质量, 通过旋转蒸发仪去除有机溶剂, 再加入水溶液配制成不同总黄酮质量浓度的溶液作为上样液, 备用。量取20 mL已处理好的PA湿法装入层析柱 ($\Phi 18\text{ mm} \times 300\text{ mm}$) 中, 将上样液通过PA柱进行吸附, 考察上样液总黄酮质量浓度和上样流速对PA性能的影响, 再用4~5 BV蒸馏水冲洗, 然后分别用体积分数为30%、50%、70%、90%的乙醇溶液以1 mL/min进行洗脱, 每流出5 mL流出液收集并测定总黄酮质量浓度, 并以洗脱液体积为横坐标、流出液中总黄酮质量浓度为纵坐标绘制动态洗脱曲线, 从而确定最适宜的洗脱液体积和乙醇体积分数。最后考察不同洗脱流速对PA性能的影响。

1.3.7 吸附率和解吸率的计算

通过测定上样液、吸附液和洗脱液中总黄酮的质量浓度来计算吸附率和解吸率, 如式(1)、(2)所示:

$$\text{吸附率}/\% = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{解吸率}/\% = \frac{C_2 V_2}{(C_0 - C_1) V_1} \times 100 \quad (2)$$

式中: C_0 为上样液总黄酮质量浓度/(mg/mL); C_1 为吸附液总黄酮质量浓度/(mg/mL); C_2 为洗脱液总黄酮质量浓度/(mg/mL); V_1 为上样液体积/mL; V_2 为洗脱液体积/mL。

1.3.8 总黄酮纯度的测定

分别将MAR和PA的洗脱液置于旋转蒸发仪中浓缩成浸膏状, 再冷冻干燥成粉末。准确称取适量总黄酮粉, 用95%乙醇溶液溶解, 用1.3.1节方法测定溶液中总黄酮质量浓度, 从而计算样品中黄酮纯度, 如式(3)所示:

$$\text{纯度}/\% = \frac{CV}{m} \times 100 \quad (3)$$

式中: C 为溶液中总黄酮质量浓度/(mg/mL); V 为溶解总黄酮粉所用的乙醇溶液体积/mL; m 为称取的总黄酮粉质量/g。

2 结果与分析

2.1 MAR动态吸附与解吸工艺参数的确定

2.1.1 上样液总黄酮质量浓度对吸附效果的影响

分别取50 mL总黄酮质量浓度为2、4、6、8 mg/mL的上样液, 以上样流速1 mL/min通过已处理好的MAR, 收集吸附后的流出液, 测定其总黄酮质量浓度并计算吸附率。

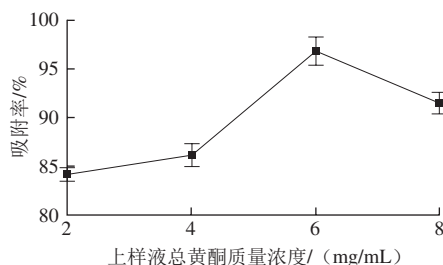


图1 上样液总黄酮质量浓度对吸附效果的影响

Fig. 1 Effect of total flavonoids concentration in sample on the adsorption efficiency

由图1可知, 上样液总黄酮质量浓度较小时吸附率也较低, 2~6 mg/mL范围内, 吸附率随着质量浓度的增加而增加, 上样液总黄酮质量浓度为6 mg/mL时, 吸附率达到最大, 继而又随着质量浓度的增加而降低。这是由于上样液总黄酮质量浓度越高, 单位表面积内的总黄酮与

MAR接触量越多, 吸附量也就越大^[18]。但如果上样质量浓度太大, 可能不仅使总黄酮在树脂中扩散能力下降, 而且与总黄酮竞争吸附的杂质质量也随之增大^[19], MAR更容易达到饱和, 使得总黄酮得不到充分吸附, 易造成能源浪费。所以, 最适宜的上样液总黄酮质量浓度为6 mg/mL。

2.1.2 上样流速对吸附效果的影响

取50 mL总黄酮质量浓度为6 mg/mL的上样液分别以上样流速0.5、1.0、1.5、2.0 mL/min通过已处理好的MAR柱, 收集吸附后的流出液, 测定其总黄酮质量浓度并计算吸附率。

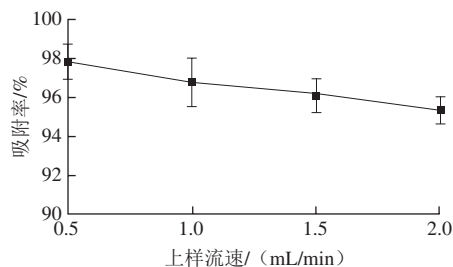


图2 上样流速对吸附效果的影响

Fig. 2 Effect of sample flow rate on the adsorption efficiency

由图2可知, 吸附率随着上样流速的增加而逐渐下降, 但下降趋势较缓慢。因为上样液流速过快, 目标物来不及被树脂充分吸附就会开始泄漏; 而上样流速过慢, 目标物与树脂接触越充分, 从而提高MAR的吸附量, 但会降低吸附效率^[19-20], 因此在不影响吸附效率的情况下选择合适的上样流速非常重要。综合考虑吸附效果与工作效率两个因素, 选择1 mL/min为最适宜的上样流速。

2.1.3 上样液体积对吸附效果的影响

取150 mL总黄酮质量浓度为6 mg/mL的上样液分别以上样流速1 mL/min通过已处理好的MAR柱, 以5 mL为一个体积单位收集流出液, 测定其总黄酮质量浓度, 并以上样液体积为横坐标、流出液总黄酮质量浓度为纵坐标绘制动态吸附曲线, 考察上样液体积对吸附效果的影响。

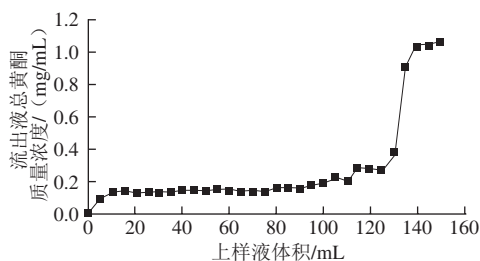


图3 动态吸附曲线

Fig. 3 Dynamic adsorption curve

从图3可以看出, 上样液体积0~125 mL时, 流出液总黄酮质量浓度很低, 且基本处于稳定平缓的趋势; 当上样液体积继续增加到130 mL时, 质量浓度开始明显上

升;当上样液体积达到135 mL时,流出液总黄酮质量浓度为0.911 mg/mL,已经超过上样液总黄酮质量浓度的1/10,故视130 mL为泄漏点^[16]。因此,确定上样液体积为130 mL,经计算吸附率达97.14%。

2.1.4 洗脱液体积分数对解吸效果的影响

取130 mL总黄酮质量浓度为6 mg/mL的上样液以上样流速1 mL/min通过已处理好的MAR柱,再用4~5 BV蒸馏水以1 mL/min的流速冲洗MAR柱使流出液为无色透明。分别用50 mL体积分数为30%、50%、70%、90%的乙醇溶液作为洗脱液在1 mL/min的流速条件下进行洗脱,收集洗脱液,测定其总黄酮质量浓度并计算解吸率。

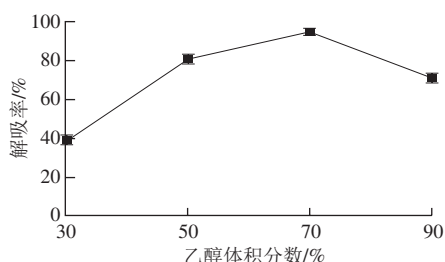


图4 洗脱液体积分数对解吸效果的影响

Fig. 4 Effect of eluent concentration on the desorption efficiency

考虑茅岩莓黄酮基本用于食品及医药领域,因此选择相对安全性较高的乙醇作为洗脱液。由图4可知,乙醇体积分数30%~70%,解吸率随着乙醇体积分数的增大而增大;乙醇体积分数为70%时,解吸率最高;之后再增加乙醇体积分数,解吸率又随之降低。这是因为乙醇体积分数不同,极性大小也不同,而黄酮与MAR之间存在着一定的范德华力,两物质的极性越相近则范德华力越大^[21]。可能由于70%乙醇溶液与茅岩莓黄酮的极性更为接近,因此最容易被洗脱下来,故选择70%为最适宜的洗脱液乙醇体积分数。

2.1.5 洗脱流速对解吸效果的影响

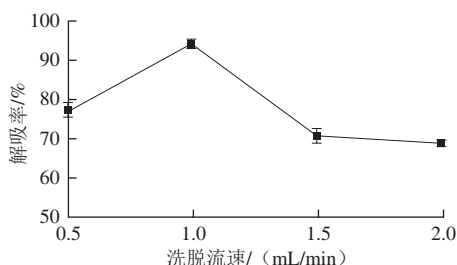


图5 洗脱流速对解吸效果的影响

Fig. 5 Effect of elution velocity on the desorption efficiency

取130 mL总黄酮质量浓度为6 mg/mL的上样液,以上样流速1 mL/min通过已处理好的MAR柱,再用4~5 BV蒸馏水以1 mL/min的流速冲洗MAR柱使流出液为无色透

明。用50 mL 70%乙醇溶液作为洗脱剂分别在0.5、1.0、1.5、2.0 mL/min的流速条件下进行洗脱,收集洗脱液,测定其总黄酮质量浓度并计算解吸率。

由图5可知,当洗脱流速为0.5~1 mL/min时,解吸率随着洗脱流速的增加而逐渐增加;流速为1 mL/min时,解吸率达到最高;之后解吸率又随着流速进一步增加而逐渐降低,这可能是因为流速过快缩短了MAR表面活性部位与总黄酮相互作用的时间^[22]。因此,洗脱流速以1 mL/min为宜。

2.1.6 洗脱液体积对解吸效果的影响

取130 mL总黄酮质量浓度为6 mg/mL的上样液,以上样流速1 mL/min通过已处理好的MAR柱,再用4~5 BV蒸馏水以1 mL/min的流速冲洗MAR柱使流出液为无色透明。用50 mL 70%乙醇溶液作为洗脱剂在1 mL/min的流速条件下进行洗脱,以5 mL为一个体积单位收集流出液,测定其总黄酮质量浓度,并以洗脱液体积为横坐标、流出液总黄酮质量浓度为纵坐标绘制动态洗脱曲线,考察洗脱液体积对解吸效果的影响。

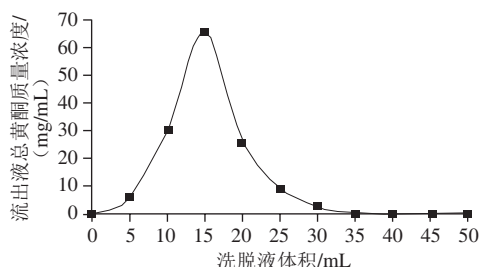


图6 动态洗脱曲线

Fig. 6 Dynamic desorption curve

由图6可知,当洗脱液体积为5 mL时,流出液中总黄酮质量浓度相对较小,随后急剧上升,洗脱液体积为15 mL时,总黄酮质量浓度达到最大值,为65.465 mg/mL;当洗脱液体积达到45 mL时,总黄酮质量浓度只有0.052 mg/mL。因此,选择40 mL为最适宜的洗脱液体积,此时,解吸率为94.10%。从该洗脱曲线可以看出,40 mL的洗脱液可以把茅岩莓总黄酮基本洗脱完全,且峰形较对称,无拖尾。

2.2 PA动态吸附与解吸工艺参数的确定

2.2.1 上样液总黄酮质量浓度对吸附效果的影响

分别将已去除有机溶剂的MAR解吸液(总黄酮含量为702 mg)加入一定量水溶液配制成总黄酮质量浓度为3、4、5、6 mg/mL的溶液,以上样流速1 mL/min通过已处理好的PA柱,收集吸附后的流出液,测定其总黄酮质量浓度并计算吸附率。

由图7可知,上样液总黄酮质量浓度在3、4、5、6 mg/mL时,吸附率分别为99.57%、99.71%、99.59%、99.87%,差别非常小,均在99%以上。说明在此范围

内,总黄酮质量浓度对吸附效果影响非常小,且吸附效果非常好。因上样液总黄酮质量已固定,考虑到上样液总黄酮质量浓度越高,上样液体积越小,吸附时间则越短,所以选择6 mg/mL为最适宜的上样液总黄酮质量浓度,此时,上样液体积为117 mL。

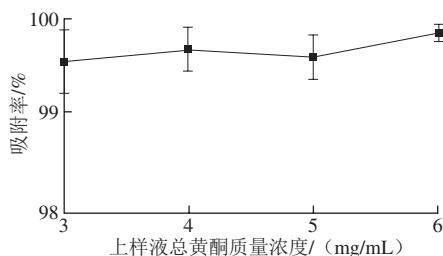


图7 上样液总黄酮质量浓度对吸附效果的影响

Fig. 7 Effect of total flavonoids concentration in sample on the adsorption efficiency

2.2.2 上样流速对吸附效果的影响

将已去除有机溶剂的MAR解吸液(总黄酮含量为702 mg),配制成总黄酮质量浓度为6 mg/mL的溶液,分别以上样流速0.5、1.0、1.5、2.0 mL/min通过已处理好的PA柱,收集吸附后的流出液,测定其总黄酮质量浓度并计算吸附率。

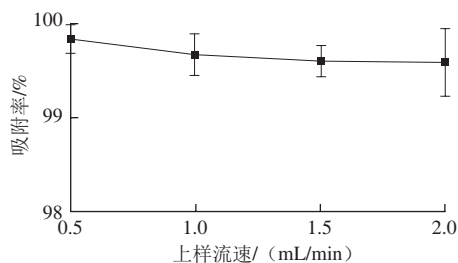


图8 上样流速对吸附效果的影响

Fig. 8 Effect of sample flow rate on the adsorption efficiency

由图8可知,上样流速在0.5~2 mL/min之间时,吸附率分别为99.83%、99.65%、99.58%、99.57%,仍然都在99%以上。因此,为提高效率,选择2 mL/min为最适宜上样流速。

2.2.3 不同洗脱液体积分数的动态洗脱曲线

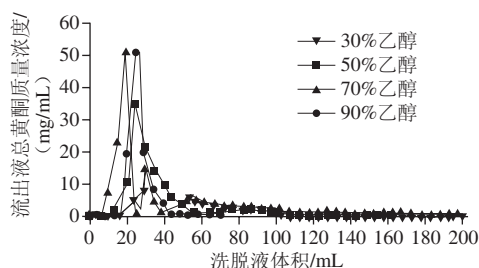


图9 洗脱液体积分数对解吸效果的影响

Fig. 9 Effect of eluant concentration on the desorption efficiency

将吸附好的PA用4~5 BV蒸馏水冲洗,再分别用体积分数为30%、50%、70%、90%的乙醇溶液以1 mL/min流速进行洗脱,每流出5 mL流出液收集并测定总黄酮质量浓度,并以洗脱液体积为横坐标,总黄酮质量浓度为纵坐标绘制动态洗脱曲线,考察洗脱液体积分数和洗脱液体积对解吸效果的影响。

由图9可知,体积分数为30%的乙醇溶液洗脱下来总黄酮较少,且峰形不集中,拖尾非常严重,这种拖尾现象导致了洗脱时间的延长和洗脱液体积的增大,当洗脱液体积达到200 mL时,流出液总黄酮质量浓度仍有0.260 mg/mL,此时解吸率只有55.9%。这可能是因为30%的乙醇溶液洗脱能力较弱,而一些黄酮化合物与PA形成较多氢键,结合力大,使得不易被洗脱^[23]。50%乙醇溶液动态洗脱曲线峰形相对集中,稍有拖尾,55 mL的洗脱液能基本把黄酮洗脱下来,解吸率为72.88%。用70%乙醇溶液洗脱,洗脱液为20 mL时,流出液总黄酮质量浓度达到最高值,出峰较早,洗脱液为30 mL时,又出现一个峰值。这可能是由于PA的柱层析作用,根据吸附物质与PA结合力不同所以会被分开洗脱下来,不同的峰代表不同物质^[24]。此时,洗脱液体积为55 mL,解吸率为77.77%,可能是70%的乙醇溶液能最大程度地降低PA和总黄酮的氢键作用。90%乙醇溶液动态洗脱曲线峰形较对称集中,较70%乙醇溶液洗脱曲线出峰晚,且需65 mL乙醇溶液才能基本洗脱完全,此时解吸率为74.23%。因此,选择55 mL、70%为最适宜的洗脱液体积和洗脱液体积分数。

2.2.4 洗脱流速对解吸效果的影响

将吸附好的PA用4~5 BV蒸馏水冲洗,再用55 mL 70%乙醇溶液分别在0.5、1.0、1.5、2.0 mL/min的流速条件下进行洗脱,收集洗脱液,测定其总黄酮质量浓度并计算解吸率。

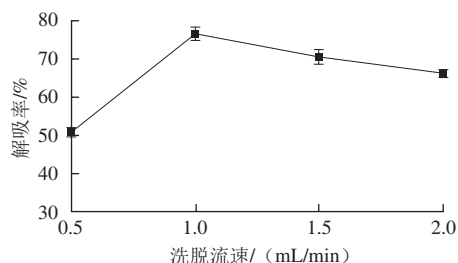


图10 洗脱流速对解吸效果的影响

Fig. 10 Effect of eluent flow rate on the desorption efficiency

由图10可知,解吸率在洗脱流速为0.5 mL/min时很低,之后随着流速的加快解吸率迅速上升;流速为1 mL/min时,解吸率达到最大;流速从1~2 mL/min时,解吸率又随着流速的加快而降低。因此,选择1 mL/min为最适宜的洗脱流速,此时,解吸率为76.50%。

2.3 总黄酮纯度的测定结果

分别准确称取20 mg纯化前、经MAR纯化后、经PA纯化后的黄酮粉,精密加入5 mL 95%乙醇溶液进行溶解。测定溶液中总黄酮含量分别为2.20、2.89、3.23 mg/mL。再通过1.3.8节的公式计算出纯度分别为55.00%、72.25%、80.75%。可见经MAR纯化后纯度提高了17.25%,纯化效果较好。经PA化后的总黄酮虽然纯度只提高了8.5%,但黄酮颜色由黄土赭色变成了象牙白,说明PA脱色效果较好。茅岩莓总黄酮用MAR与PA联用法,纯度提高了25.75%,说明此方法有一定的可行性。

3 结 论

本研究确定了MAR对茅岩莓总黄酮进行初步纯化的最适宜工艺参数为:上样液总黄酮质量浓度6 mg/mL、上样液流速1 mL/min、上样液体积130 mL;洗脱液乙醇体积分数70%、洗脱流速1 mL/min、洗脱液体积40 mL。在此条件下,茅岩莓总黄酮纯度从55.00%提高到了72.25%。确定了PA对茅岩莓总黄酮第2次纯化的最适宜工艺参数为:上样液总黄酮质量浓度6 mg/mL、上样液流速2 mL/min;洗脱液乙醇体积分数70%、洗脱流速1 mL/min、洗脱液体积55 mL。在此条件下,总黄酮纯度提高到了80.75%。用MAR与PA联用法纯化茅岩莓总黄酮,纯度提高了25.75%,而MAR法^[25]纯化茅岩莓总黄酮纯度只提高了14.65%。因此MAR-PA联用法达到了较好的纯化目的,并使PA弥补了MAR在纯化工艺上的不足,具有良好的应用前景,为实际生产提供了有效依据。

参考文献:

- [1] YE Liyun, WANG Hengjian, DUNCAN S E, et al. Antioxidant activities of vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) extract and its major component dihydromyricetin in soybean oil and cooked ground beef[J]. Food Chemistry, 2015, 172: 416-422. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.09.090.
- [2] 何桂霞,何群,裴刚,等.瑶族藤茶中总黄酮类成分的含量测定[J].中医药导报,1999(12): 30-31.
- [3] 罗祖友,付晓芳,吴谋成.藤茶的研究进展[J].食品科学,2005,26(8): 513-517. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2005.08.133.
- [4] 肖晓莹,陈继承,庞杰.藤茶的功能性及黄酮类化合物提取研究进展[J].热带作物学报,2012(8): 1522-1527. DOI:10.3969/j.issn.1000-2561.2012.08.036.
- [5] ZHOU Yong, SHU Furong, LIANG Xinyu, et al. Ampelopsin induces cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells through ROS generation and endoplasmic reticulum stress pathway[J]. PloS One, 2014, 9(2): e89021. DOI:10.1371/journal.pone.0089021.
- [6] NI Feng, GONG Yi, LI Linglin, et al. Flavonoid ampelopsin inhibits the growth and metastasis of prostate cancer *in vitro* and in mice[J]. PloS One, 2012, 7(6): 1398-1408. DOI:10.1371/journal.pone.0038802.
- [7] 许利嘉,马培,肖伟,等.别样茶-藤茶的古今应用历史初步调查[J].中国现代中药,2012,14(4): 62-66. DOI:10.3969/j.issn.1673-4890.2012.04.019.
- [6] GAO Jianhua, LIU Benguo, NING Zhengxiang, et al. Characterization and antioxidant activity of flavonoid-rich extracts from leaves of *Ampelopsis grossedentata*[J]. Journal of Food Biochemistry, 2009, 33(6): 808-820. DOI:10.1111/j.1745-4514.2009.00253.x.
- [8] JIA Guangtao, LU Xiuyang. Enrichment and purification of madecassoside and asiaticoside from centella asiatica extracts with macroporous resins[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1193(1/2): 136-141. DOI:10.1016/j.chroma.2008.04.024.
- [9] MA Chaoyang, TAO Guangjun, TANG Jian, et al. Preparative separation and purification of rosavin in rhodiola rosea by macroporous adsorption resins[J]. Separation and Purification Technology, 2009, 69(1): 22-28. DOI:10.1016/j.seppur.2009.06.002.
- [10] DONG Yi, ZHAO Mouming, SUN Dongxiao, et al. Absorption and desorption behaviour of the flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* L. leaf on macroporous adsorption resins[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 538-545. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.07.109.
- [11] FU Boqiang, LIU Jie, LI Huan, et al. The application of macroporous resins in the separation of licorice flavonoids and glycyrrhizic acid[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1089(1/2): 18-24. DOI:10.1016/j.chroma.2005.06.051.
- [12] 冯彬彬.莲房原花青素提纯分离工艺条件及优化研究[D].郑州:郑州大学,2014.
- [13] ZHANG Jing, HAYAT K, ZHANG Xiaoming, et al. Separation and purification of flavonoid from ginkgo extract by polyamide resin[J]. Separation Science and Technology, 2010, 45(16): 2413-2419. DOI:10.1080/01496395.2010.487844.
- [14] 何桂霞,裴刚,周天达.显齿蛇葡萄中总黄酮和二氢杨梅素的含量测定[J].中国中药杂志,2000,25(7): 423-425. DOI:10.3321/j.issn:1001-5302.2000.07.013.
- [15] 张家瑞.大孔树脂纯化覆盆子黄酮的研究[J].现代食品科技,2013,29(4): 817-821.
- [16] RUAN Xiao, ZHAN Limei, GAO Xingxing, et al. Separation and purification of flavonoid from taxus remainder extracts free of taxoids using polystyrene and polyamide resin[J]. Journal of Separation Science, 2013, 36(12): 1925-1934. DOI:10.1002/jssc.201201189.
- [17] 金慧鸣,谭兴和,蔡文,等.响应面法优化藤茶总黄酮的提取工艺[J].食品安全质量检测学报,2015,6(5): 1575-1582.
- [18] 吴海霞,吴彩娥,李婷婷,等.大孔树脂纯化银杏叶黄酮的研究[J].现代食品科技,2013,29(12): 2964-2969.
- [19] 王若兰,田志琴,孔祥刚,等.大孔吸附树脂纯化小米酚类化合物的工艺条件研究[J].中国粮油学报,2011,26(10): 35-39.
- [20] 曾超珍,刘志祥,韩磊.大孔树脂法纯化柑橘皮中的橙皮甙及其油脂抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2012,12(3): 119-124. DOI:10.3969/j.issn.1009-7848.2012.03.017.
- [21] 骆党委,叶静,黄雅燕,等. AB-8大孔吸附树脂精制芦柑皮总黄酮及黄酮类化合物的分离[J].食品科学,2014,35(6): 30-35. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201406006.
- [22] WAN Pengfei, SHENG Zunlai, HAN Qiang, et al. Enrichment and purification of total flavonoids from flos populi extracts with macroporous resins and evaluation of antioxidant activities *in vitro*[J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2013, 945/946(2): 68-74. DOI:10.1016/j.jchromb.2013.11.033.
- [23] 张静.银杏黄酮纯化及生物活性的研究[D].无锡:江南大学,2010.
- [24] 何锦凤,陈天鹏,刘海杰,等.大孔树脂对汉麻籽壳抗氧化多酚的吸附纯化作用[J].中国食品学报,2013,13(6): 77-87.
- [25] 易海燕,何桂霞,欧阳文,等.大孔吸附树脂分离纯化藤茶总黄酮的研究[J].中草药,2011,42(1): 74-77.