

- 较及相关性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (7): 46-51.
- [12] 于雷, 李晓坤, 杨云, 等. 墨旱莲多糖的过氧化氢脱色方法研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39 (9): 1832-1834.
- [13] 程旺开, 许月明, 张冬冬. 响应面优化黄秋葵叶多糖的提取工艺及其抗氧化活性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 38-42.
- [14] 熊磊, 陈慧, 胡文兵, 等. 黄金茶多糖超声提取工艺及体外抗氧化研究 [J]. 江西农业大学学报, 2017, 39 (4): 801-809.
- [15] 董红敏, 李素清, 牛小勇, 等. 正交实验优化川明参多糖超声提取工艺 [J]. 食品工业科技, 2014, 35 (8): 306-309, 322.
- [16] 林洵, 陈建福. 小藜多糖的提取工艺研究 [J]. 乐山师范学院学报, 2016, 31(8): 18-23.
- [17] 胡伟莲, 戴德慧. 红参药渣中多糖的提取及其醇沉性质分析 [J]. 食品研究与开发, 2015, 36(4): 58-61.

## 大孔树脂分离纯化陈皮黄酮工艺及其抑菌活性

王慧芳<sup>1</sup>, 苏淑云<sup>2</sup>, 邵圣娟<sup>1</sup>, 郑佳楠<sup>1</sup>

(1. 太原工业学院化学与化工系, 山西 太原 030008; 2. 朔城区第一中学化学教研组, 山西 朔州 036002)

**摘要:** 目的 研究大孔树脂纯化陈皮黄酮工艺, 并评价其抑菌活性。方法 考察 5 种大孔树脂 (HPD-100、HP-20、AB-8、X-5、NKA-II) 对黄酮的静态吸附、解吸作用, 绘制动力学曲线。以上样液 pH 值、体积流量、质量浓度, 洗脱液 (乙醇) 体积流量、体积分数为影响因素, 黄酮回收率为评价指标, 单因素试验优化分离纯化工艺。然后, 滤纸片法进行抑菌活性试验。结果 最佳条件为 HP-20 大孔树脂, 上样液 pH 值 3.5、体积流量 2 mL/min、质量浓度 0.682 3 mg/mL, 乙醇体积分数 60%、体积流量 2 mL/min, 黄酮回收率 64.95%, 纯化后其含有量较纯化前提高了 5.81 倍。0.5、1 mg/mL 黄酮对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有一定抑制作用, 其中纯化后该成分对大肠杆菌效果最显著, 金黄色葡萄球菌次之, 均优于茶多酚, 但对枯草芽孢杆菌作用相对较弱。结论 HP-20 型大孔树脂更适合分离纯化陈皮黄酮, 纯化后该成分抑菌活性明显提高。

**关键词:** 陈皮; 黄酮; 大孔树脂; 分离; 纯化; 抑菌活性; 单因素试验; 滤纸片法

**中图分类号:** R284.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2018)12-2667-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.12.011

## Flavonoids from *Citri reticulatae Pericarpium*, their isolation, purification with macroporous resin and antibacterial activity

WANG Hui-fang<sup>1</sup>, SU Shu-yun<sup>2</sup>, SHAO Sheng-juan<sup>1</sup>, ZHENG Jia-nan<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Taiyuan Institute of Technology, Taiyuan 030008, China; 2. Chemistry Teaching and Research Group, The First Middle School of Shuocheng District, Shuozhou 036002, China)

**KEY WORDS:** *Citri reticulatae Pericarpium*; flavonoids; macroporous resin; isolation; purification; antibacterial activity; single factor test; filter paper method

陈皮是一种常用的理气药, 具有健脾开胃、除燥化痰等功效<sup>[1]</sup>, 富含橙皮苷、川陈皮素、桔皮素<sup>[2]</sup>等黄酮类化合物, 故该类成分的提取分离一

直是科研工作者的研究重点之一<sup>[3-5]</sup>。黄酮的分离纯化方法主要有硅胶柱层析法、大孔树脂法、多溶剂萃取法等<sup>[6-8]</sup>, 其中大孔树脂法因具有性质稳

收稿日期: 2018-04-26

基金项目: 太原工业学院院级横向课题 (LH2017003)

作者简介: 王慧芳 (1977—), 女, 硕士, 讲师, 从事天然产物活性成分的提取、分离及活性研究。Tel: (0351) 3569476, E-mail: huifangw20012010@163.com

定、吸附快、选择性好、可再生等优点<sup>[9]</sup>，被广泛应用于冶金、催化、药物制备、天然产物分离纯化等方面<sup>[10-13]</sup>，在分离提纯黄酮类化合物中的应用已有很多报道<sup>[14-15]</sup>，也可用于陈皮中有效成分的分离<sup>[16-17]</sup>。本实验考察5种大孔树脂对陈皮黄酮的静态吸附、解吸作用，并对其进行抑菌活性试验，以期为该药材开发利用提供理论依据。

## 1 材料

陈皮（产地安徽省亳州市，购于太原万民药房，经山西中医药大学中医学院裴香萍副教授鉴定为正品）。芦丁对照品（上海金穗生物科技有限公司，含有量≥98%）；无水乙醇、氢氧化钠、氯化钠、硝酸铝、亚硝酸钠、浓盐酸等均为分析纯。HPD-100、HP-20、X-5、AB-8、NKA-II型大孔树脂（郑州华溢科技新材料股份有限公司）；大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌。FA2104型电子天平（上海舜宇恒平科学仪器有限公司）；XH-100A型微波催化合成/萃取仪（北京祥鹄科技发展有限公司）；722S型可见分光光度计（上海棱光技术有限公司）；数显恒温水浴锅（常州丹瑞实验仪器设备有限公司）；THZ-92A型恒温水浴振荡仪（河北浩诚国华科技开发有限公司）；高压蒸汽灭菌锅、恒温培养箱（上海东亚压力容器制造有限公司）。

## 2 方法

**2.1 线性关系考察**<sup>[18]</sup> 称取芦丁对照品0.0110g，60%乙醇定容到100mL量瓶中，制成0.1mg/mL溶液，分别精密量取0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00mL置于10mL量瓶中，加0.3mL5%NaNO<sub>2</sub>，摇匀，静置6min后加0.3mL10%Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>，混匀，静置6min，再加4mL4%NaOH，静置15min，60%乙醇定容，并设空白对照，在510nm波长处测定吸光度。以溶液质量浓度为横坐标(X)，吸光度为纵坐标(A)进行回归，得回归方程为A=8.5171X+0.0062(R<sup>2</sup>=0.9992)，在0~5.0μg/mL范围内线性关系良好。

**2.2 黄酮提取及含有量测定** 药材经干燥、粉碎、过筛（50目）后加入60%乙醇中，料液比1:21，静置30min，在62℃、619W下微波提取3min，抽滤，滤液用60%乙醇定容于50mL量瓶中，按“2.1”项下方法测定吸光度和黄酮含有量，按式(1)计算提取率。

$$\text{黄酮提取率} = \frac{\text{测得黄酮质量}}{\text{陈皮质量}} \times 100\% \quad (1)$$

## 2.3 黄酮纯化

**2.3.1 树脂预处理**<sup>[9]</sup> 对HPD-100、HP-20、X-5、AB-8、NKA-II型大孔树脂进行醇洗、碱洗、酸洗等操作后，于60℃下烘干备用，按式(2)~(5)计算相关参数。(c<sub>0</sub>为初始质量浓度，c<sub>1</sub>为吸附后质量浓度，m为树脂质量，c<sub>2</sub>为解吸后质量浓度，V<sub>1</sub>为提取液体积，V<sub>2</sub>为解吸液体积)。

$$\text{吸附量} = \frac{c_0 - c_1}{m} \times V_1 \quad (2)$$

$$\text{吸附率} = \frac{c_0 - c_1}{c_0} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{脱附量} = \frac{c_2 \times V_2}{m} \quad (4)$$

$$\text{脱附率} = \frac{c_2}{c_0 - c_1} \times 100\% \quad (5)$$

**2.3.2 树脂筛选** 称取处理好的HPD-100、HP-20、X-5、AB-8、NKA-II型大孔树脂各1.0g（湿重），置于5个100mL具塞锥形瓶中，加入药材粗提液25mL，置于恒温振荡仪（25.0℃、120r/min）中12h，取1mL上层液于10mL量瓶中定容，测定黄酮质量浓度，计算吸附率。再将上述已吸附饱和的树脂过滤、抽滤，去离子水洗至无色，加25mL60%乙醇同法操作。每组平行3次，取平均值。

**2.3.3 静态吸附、解吸考察** 取树脂1.0g（湿重）进行吸附、解吸，每隔一段时间测定上清液中黄酮质量浓度，计算吸附率、解吸率，绘制动力学曲线。

**2.3.4 上样液pH值考察** 取5份已处理好的HP-20型大孔树脂各20.0g（湿重）装柱，超纯水平衡后加入pH值2.5、3、3.5、4、4.5、5的黄酮粗提液（0.4mg/mL）各25mL，体积流量4mL/min，测定流出液中黄酮质量浓度，计算吸附率。

**2.3.5 上样液体积流量考察** 按“2.3.4”项下方法装柱4个，使树脂达到平衡后向加入最优pH值的粗提液各25mL，选择上样液体积流量1、2、3、4mL/min，测定流出液中黄酮质量浓度，计算吸附率。

**2.3.6 上样液质量浓度考察** 操作方法同上，上样液pH值和体积流量取最优值，选择上样液质量浓度0.2130、0.4365、0.6823、0.8591mg/mL，测定流出液中黄酮质量浓度，计算吸附率。

**2.3.7 洗脱液质量浓度考察** 取6份饱和吸附的

树脂, 25 mL 乙醇洗脱, 选择乙醇体积分数 30%、40%、50%、60%、70%、80%, 体积流量 3 mL/min, 测定洗脱液中黄酮质量浓度, 计算解吸率。

**2.3.8 洗脱液体积流量考察** 按上样最佳条件 (HP-20型大孔树脂 20 g, 上样液 pH 值 3.5, 质量浓度 0.4 mg/mL, 体积流量 2 mL/min) 制得 4 份已达吸附平衡的树脂, 去离子水洗去杂质后, 加入 25 mL 60% 乙醇洗脱, 体积流量 1、2、3、4 mL/min, 测定洗脱液中黄酮质量浓度, 计算解吸率。

**2.3.9 验证试验** 按照上述条件进行 3 次验证试验, 按式 (6) 计算黄酮回收率。

$$\text{回收率} = \frac{\text{回收黄酮质量}}{\text{陈皮中黄酮质量}} \times 100\% \quad (6)$$

**2.3.10 纯度测定<sup>[19]</sup>** 将纯化后的黄酮与粗提物均配成 1 mg/mL 溶液, 按“2.1”项下方法测定吸光度, 按式 (7) 计算纯度。

$$\text{纯度} = \frac{\text{纯化后黄酮质量}}{\text{纯化前黄酮质量}} \times 100\% \quad (7)$$

**2.4 抑菌活性试验<sup>[20]</sup>** 移取被测菌种 (枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌) 原液各 1 mL,

注入 50 mL 土豆琼脂培养基中, 30 ℃恒温下培养 12 h, 冷藏备用。分别考察陈皮粗提液、纯化后黄酮、对照药茶多酚的抑菌活性, 并设置空白对照, 培养 72 h 后用游标卡尺十字交叉按式 (8) 计算抑菌圈直径, 取平均值, 每组平行 3 次, 取平均值。

$$\text{抑菌圈直径} = \text{抑菌圈外径} - \text{滤纸片直径} \quad (8)$$

**2.5 统计学分析** 采用 SAS 9.2 软件进行处理, 数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示。

### 3 结果

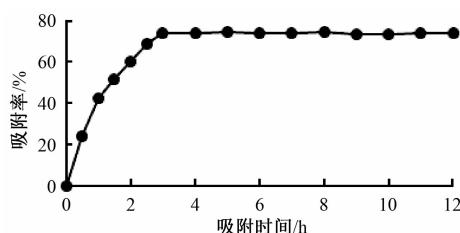
#### 3.1 黄酮纯化

**3.1.1 树脂筛选** 表 1 显示, 非极性大孔树脂 (X-5、HP-20) 对黄酮的吸附率可达 70% 以上, 弱极性大孔树脂 (AB-8、HPD-100) 在 60% 以上, 而极性大孔树脂 (NKA-II) 则只有 51.78%, 表明该成分属于弱极性分子。另外, 树脂比表面积越大越有利于吸附, 在比表面积相同的情况下 HP-20 吸附率高于 X-5, 表明黄酮分子量较小<sup>[7]</sup>, 平均孔径相对较小的 HP-20 更有利于该成分分子进入其内部。综合吸附、解吸结果, 选择 HP-20 型大孔树脂分离提纯黄酮。

**表 1 大孔树脂筛选结果**  
**Tab. 1 Results of macroporous resin screening**

类型	极性	比表面积/ $(\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1})$	平均孔径/nm	吸附率/%	解吸率/%
X-5	非极性	500~600	29.0~30.0	70.65	92.14
AB-8	弱极性	480~520	13.0~14.0	68.50	91.74
NKA-II	极性	160~200	14.5~15.5	51.78	57.13
HPD-100	弱极性	400~500	8.5~9.0	67.16	91.47
HP-20	非极性	500~600	12.0~16.0	74.64	88.61

**3.1.2 静态吸附、解吸考察** 图 1 显示, HP-20 型大孔树脂对黄酮的吸附率在 0~3 h 内迅速增大, 之后达到吸附饱和, 曲线趋于平缓, 树脂达到吸附平衡所需时间为 3~4 h。因此, 选择吸附时间为 3 h, 最大吸附率可达 74.88%。

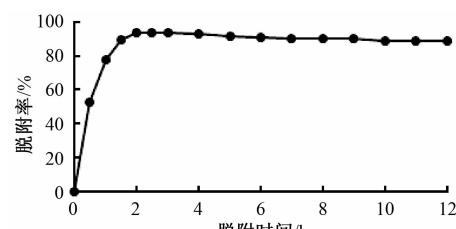


**图 1 HP-20 型大孔树脂静态吸附曲线**

**Fig. 1 Static adsorption curve for HP-20 macroporous resin**

图 2 显示, HP-20 型大孔树脂对黄酮的解吸在 2~3 h 内迅速完成, 之后解吸率略有降低, 表明

3 h 后存在反吸附现象。考虑到吸附效率, 选择解吸时间 2 h, 解吸率可达 93.44%。



**图 2 HP-20 型大孔树脂静态解吸曲线**

**Fig. 2 Static desorption curve for HP-20 macroporous resin**

**3.1.3 上样液 pH 值考察** 图 3 显示, 随着 pH 值增大, HP-20 型大孔树脂对黄酮的吸附率也随之提高, 在 3.5 时达到最大 (78.41%), 表明该条件有利于黄酮分子解离及与树脂形成分子间氢键。但酸性太强 ( $\text{pH} < 3.5$ ) 会导致黄酮水解<sup>[21]</sup>, 从而

导致吸附率下降；酸性太弱（ $\text{pH} > 3.5$ ）则会抑制黄酮分子离解，从而不利于其吸附，故选择上样液 $\text{pH}$ 值为3.5。

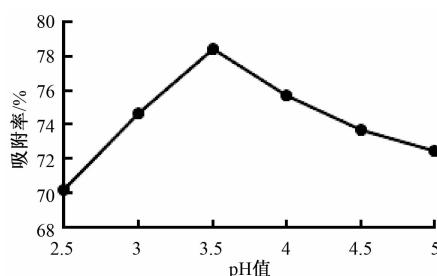


图3 上样液 $\text{pH}$ 值对黄酮吸附率的影响

Fig. 3 Effect of sample pH value on the adsorption rate of flavonoids

3.1.4 上样液体积流量考察 图4显示，随着上样液体积流量增大，HP-20型大孔树脂对黄酮的吸附逐渐减小，在 $1\sim2\text{ mL}/\text{min}$ 时吸附率下降明显，而在 $2\sim4\text{ mL}/\text{min}$ 时则趋缓。考虑到实际生产效率，选择上样液体积流量为 $2\text{ mL}/\text{min}$ 。

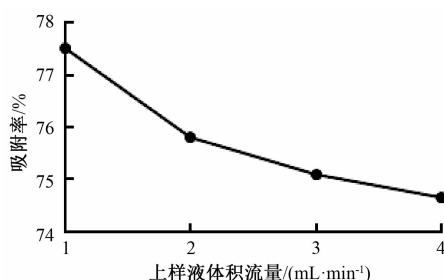


图4 上样液体积流量对黄酮吸附率的影响

Fig. 4 Effect of sample volume flow rate on the adsorption rate of flavonoids

3.1.5 上样液质量浓度 图5显示，HP-20型大孔树脂对黄酮的吸附率随上样液质量浓度增大而提高，但在 $0.682\text{ 3 mg/mL}$ 出现絮凝或沉淀，从而发生树脂柱堵塞，导致洗脱困难，同时也会造成样品浪费。因此，选择上样液质量浓度为 $0.682\text{ 3 mg/mL}$ 。

3.1.6 洗脱液(乙醇)体积分数考察 图6显示，当乙醇体积分数在 $30\%\sim60\%$ 之间时，黄酮解吸率随着洗脱液质量浓度增大而逐渐提高，在 $60\%$ 时达到最大(91.09%)，其原因是黄酮类化合物与大孔树脂之间存在范德华力，当两者极性接近时解吸率达到最大<sup>[22]</sup>。由于HP-20型大孔树脂为非极性树脂，而黄酮为弱极性分子，故乙醇体积分数增大有利于该成分洗脱，但其超过 $60\%$ 时醇溶性杂质随之增多，导致解吸率下降，故选择乙醇

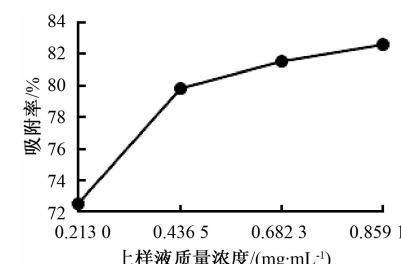


图5 上样液质量浓度对黄酮吸附率的影响

Fig. 5 Effect of sample concentration on the adsorption rate of flavonoids

体积分数为 $60\%$ 。

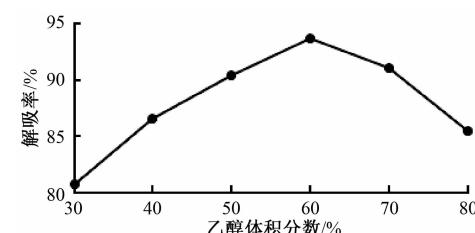


图6 乙醇体积分数对黄酮解吸率的影响

Fig. 6 Effect of ethanol concentration on the desorption rate of flavonoids

3.1.7 洗脱液(乙醇)体积流量考察 图7显示，乙醇体积流量越大，解吸率越低，其原因是洗脱液还未得及洗脱树脂上吸附的黄酮分子就已流了出去，但体积流量太小会大大延长洗脱时间，从而降低洗脱效率。另外，黄酮解吸率在体积流量 $1\sim2\text{ mL}/\text{min}$ 时下降趋势明显，而在 $3\sim4\text{ mL}/\text{min}$ 时下降趋缓，考虑到 $2\text{ mL}/\text{min}$ 过小，故选择乙醇体积流量为 $3\text{ mL}/\text{min}$ 。

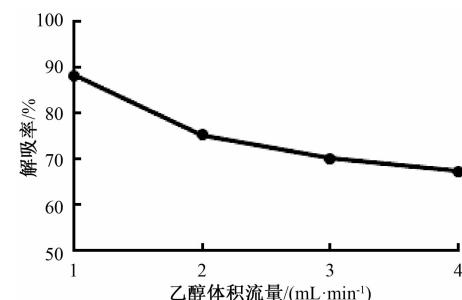


图7 乙醇体积流量对黄酮解吸率的影响

Fig. 7 Effect of ethanol volume flow rate on the desorption rate of flavonoids

3.2 验证试验 按最优工艺(HP-20型大孔树脂，上样液 $\text{pH}$ 值3.5、体积流量 $2\text{ mL}/\text{min}$ 、质量浓度 $0.682\text{ 3 mg/mL}$ ，乙醇体积分数 $60\%$ 、体积流量 $3\text{ mL}/\text{min}$ )进行验证试验，平行3次，测得黄酮平均回收率为 $64.95\%$ ，表明工艺稳定可靠。

3.3 纯度测定 纯化前黄酮纯度仅为 $(12.59 \pm 0.15)\%$ ，经HP-20型大孔树脂纯化后达到 $(73.17 \pm 0.28)\%$ ，提高了5.81倍，表明该树脂对黄酮的纯化效果良好。另外，AB-8型大孔树脂也是一种分离提纯黄酮类化合物效果良好的树脂<sup>[23-24]</sup>。

3.4 抑菌活性 表2显示，0.5、1 mg/mL黄酮对

枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有一定抑制作用，且纯化后抑菌活性明显提高。其中，黄酮纯化后对大肠杆菌的抑制作用最强，抑菌圈直径比茶多酚大了约1 mm，且对金黄色葡萄球杆菌的抑菌效果也强于茶多酚，但对枯草芽孢杆菌作用相对较弱。

表2 抑菌活性试验结果( $\bar{x} \pm s$ )Tab. 2 Results of antibacterial activity tests ( $\bar{x} \pm s$ )

菌种	黄酮/(mg·mL <sup>-1</sup> )	抑菌圈直径/mm			空白对照
		黄酮(纯化前)	黄酮(纯化后)	茶多酚	
枯草芽孢杆菌	0.25	—	—	—	—
	0.5	0.21 ± 0.12	1.92 ± 0.13	2.66 ± 0.16	—
	1	1.73 ± 0.17	3.23 ± 0.35	3.87 ± 0.18	—
大肠杆菌	0.25	—	—	—	—
	0.5	1.33 ± 0.13	3.20 ± 0.24	2.09 ± 0.39	—
	1	2.05 ± 0.20	4.52 ± 0.53	3.72 ± 0.47	—
金黄色葡萄球菌	0.25	—	—	—	—
	0.5	0.32 ± 0.03	1.04 ± 0.09	0.82 ± 0.12	—
	1	0.51 ± 0.11	1.66 ± 0.13	1.23 ± 0.15	—

注:—表示无法测出抑菌圈直径(即无抑菌活性)

#### 4 讨论

大孔树脂是利用其多孔结构及与有机高分子形成氢键和范德华力作用，从而对不同大分子进行选择性吸附来达到分离提纯有效成分目的的吸附材料。本实验选择非极性树脂(X-5、HP-20)、弱极性树脂(AB-8、HPD-100)、极性树脂(NKA-II)作为对象，考察其对陈皮黄酮粗提液静态吸附、解吸作用，发现非极性的HP-20型大孔树脂更适合其分离纯化。通过单因素试验，确定最优工艺为上样液pH值3.5、体积流量2 mL/min、质量浓度0.682 3 mg/mL，洗脱液(乙醇)体积分数60%、体积流量2 mL/min，黄酮回收率64.95%，纯化后其含有量较纯化前提高了5.81倍，表明该大孔树脂更适合分离纯化陈皮黄酮。前期报道，迷迭香叶总黄酮经AB-8型大孔树脂分离纯化后，其纯度比纯化前提高了3.37倍<sup>[25]</sup>；梓树根皮总黄酮经NKA-II型大孔树脂分离纯化后，其纯度高达 $(77.43 \pm 0.23)\%$ <sup>[26]</sup>，而本实验发现非极性树脂HP-20也有类似作用，具有一定新颖性。

然后，通过滤纸片法对陈皮黄酮抑菌活性进行测试，发现该成分质量浓度在0.5、1 mg/mL时对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有一定抑制作用，其中纯化后对大肠杆菌和金黄色葡萄球杆菌的抑菌作用均优于茶多酚，尤其对前者效果更显著。鉴于此，今后可进一步研究陈皮黄酮对真

菌的抑菌性能其构效关系、作用机制等，以便更好地为天然食品保鲜剂的研发提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 高婷婷, 杨绍祥, 刘玉平, 等. 陈皮挥发性成分的提取与分析[J]. 食品科学, 2014, 35(16): 114-119.
- [2] Dong P, Qiu P J, Zhu Y, et al. Simultaneous determination of four 5-hydroxy polymethoxyflavones by reversed-phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(5): 642-647.
- [3] Green C O, Wheatley A O, McGrowder D A, et al. Citrus peel polymethoxylated flavones extract modulates liver and heart function parameters in diet induced hypercholesterolemic rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 51: 306-309.
- [4] 陈少华, 张秀玲, 王晓君, 等. 响应面优化双酶法提取川陈皮素工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(24): 259-263, 271.
- [5] Pratiwi F, Tinata J K, Prakasa A W, et al. Citric acid compounds of tangerines peel extract (*Citrus reticulata*) as potential materials teeth whitening[J]. *J Phys Conf Ser*, 2017, 824(1): 1-5.
- [6] 罗世坤, 王家欢, 徐兰英, 等. 陈皮中川陈皮素的提取分离及改性[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 20-23.
- [7] 耿 婷, 王娟强, 席兴军, 等. 大孔树脂-高速逆流色谱分离纯化薇甘菊中的黄酮类化合物(英文)[J]. 色谱, 2017, 35(3): 302-307.
- [8] 宋玉鹏, 刘凯洋, 陈海芳, 等. 多溶剂萃取法分离制备陈皮中的川陈皮素和橘皮素[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(8): 952-956.
- [9] 刘景玲, 张治海, 李 鑫, 等. 大孔树脂法分离纯化大血

- [藤中原花青素[J]. 食品工业科技, 2017, 38(1): 112-115, 120.]
- [10] 李少华. 硫酸盐稀溶液中多金属综合回收[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [11] 张帆, 信云霞, 贾学五. 大孔树脂对过氧化氢热稳定性的影响[J]. 无机盐工业, 2017, 49(8): 73-76.
- [12] 谷宝霞, 金鸣, 李金荣. 大孔树脂-凝胶柱层析法大规模制备纯品羟基红花黄色素A[J]. 心肺血管病杂志, 2008, 27(6): 363-365.
- [13] 陈坤, 李琪, 胡茜, 等. 大孔树脂D-101纯化黑骨藤复方药物有效部位工艺研究[J]. 离子交换与吸附, 2017, 33(4): 322-330.
- [14] 粟敏, 汤婷, 唐玮蔚, 等. 大孔树脂富集纯化黄蜀葵花总黄酮的工艺研究[J]. 中药材, 2017, 40(6): 1402-1405.
- [15] 舒祝明, 蒋剑平, 王建平, 等. 大孔树脂纯化胡柚皮总黄酮的工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 649-653.
- [16] 齐兵, 何志勇, 秦肪, 等. 陈皮中橙皮苷的提取与纯化工艺研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(24): 343-346.
- [17] 刘韶, 阳秀娟. 大孔树脂分离纯化陈皮中多甲氧基黄酮类化合物[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(10): 1562-1567.
- [18] 崔蕊静, 刘秀凤, 常学东. 安梨皮渣中总黄酮微波辅助提取工艺优化[J]. 中国酿造, 2014, 33(12): 85-88.
- [19] 朱孔岳, 冯琦, 盘赛昆, 等. 响应面分析法优化超临界CO<sub>2</sub>萃取陈皮精油工艺的研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(13): 56-58, 68.
- [20] 董爱君, 刘华臣, 刘冰, 等. 肉桂酸薄荷酯的合成及抑菌活性研究[J]. 食品科技, 2017, 42(5): 253-256.
- [21] 舒祝明, 蒋剑平, 王建平, 等. 大孔树脂纯化胡柚皮总黄酮的工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 649-653.
- [22] 王沙沙, 刘洋, 牛真真, 等. 大孔吸附树脂分离纯化猪毛菜总黄酮及其抗氧化活性[J]. 精细化工, 2018, 35(1): 58-64.
- [23] 张星, 董欣, 刘振春, 等. 大孔树脂纯化黑豆异黄酮的工艺优化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(1): 136-145, 154.
- [24] 项想, 孙成静, 宿树兰, 等. 丹参茎叶酚酮有效部位的提取纯化工艺研究[J]. 中草药, 2018, 49(1): 120-127.
- [25] 任丽平, 李先佳, 金少举. 大孔树脂分离纯化迷迭香叶总黄酮及抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2017, 42(4): 69-73.
- [26] 邵金华, 何福林, 陈霞, 等. 桤树根皮总黄酮分离纯化及其抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 140-144, 220.

## 白及 SSR-PCR 扩增体系的优化

徐德林, 陈红波, 马激, 周婷, 石忠令, 李林, 钱刚\*  
(遵义医学院, 贵州遵义 563003)

**摘要:** 目的 优化白及 SSR-PCR 扩增体系。方法 响应面法对 10 μL 扩增体系中的模板 DNA 质量浓度、引物浓度、2 × PCR mix 用量进行配比寻优, 再取 5 对 EST-SSR 引物和 4 份种质, 分别在 10、25 μL 扩增体系中对上述方案进行扩增验证。结果 10 μL 白及 SSR-PCR 中模板 DNA 质量浓度、引物浓度、2 × PCR mix 用量最优配比分别为 1.60 ng/μL、12 μmol/L、6.98 μL。在 5 对引物分别于 4 份种质的扩增中, 以最优配比构建的 2 种体系均能扩增出稳定清晰的条带。

**结论** 本实验可对白及 SSR 分子标记的研究奠定坚实基础。

**关键词:** 白及; SSR-PCR 扩增体系; 响应面法

**中图分类号:** Q75      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2018)12-2672-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.12.012

## Optimization of SSR-PCR amplification system of *Bletillae Rhizoma*

XU De-lin, CHEN Hong-bo, MA Ji, ZHOU Ting, SHI Zhong-ling, LI Lin, QIAN Gang\*  
(Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China)

收稿日期: 2018-03-28

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31560079, 31560087); 贵州省科学技术基金项目(黔科合 LH 字[2014]7549); 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(黔科合 ZY 字[2013]3002); 遵义市 2014 年度“15851”人才工程项目(201424); 遵义医学院精英人才工程项目(2016)

**作者简介:** 徐德林(1981—), 男, 副教授, 研究方向为中药材遗传育种。Tel: (0851) 28609592, E-mail: xudelin2000@163.com

\*通信作者: 钱刚(1969—), 男, 博士, 教授, 从事植物细胞与分子遗传学工作。E-mail: pengjiaqiong@163.com