

网络出版时间:2013-07-18 15:59
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130718.1559.001.html>

天山雪莲悬浮培养细胞总黄酮提取纯化工艺研究

付婉艺,李厚华,李 玲,王亚杰,张存旭

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】分析天山雪莲悬浮培养细胞生长过程中生物量和总黄酮含量的变化,优化总黄酮的提取纯化方法。**【方法】**采用 $L_9(3^4)$ 正交设计优化天山雪莲悬浮培养细胞中总黄酮的超声提取工艺,比较聚酰胺层析法、碱提酸沉法和聚酰胺酸碱法对总黄酮含量、纯度及回收率的影响。**【结果】**在 3~15 d,随着培养时间的增加,天山雪莲悬浮培养细胞的生物量和总黄酮含量明显增加,在培养 15 d 时均较高,分别为 21.9 g/L 和 66.5 mg/g,表明天山雪莲悬浮培养细胞最适收获时间为培养 15 d;总黄酮提取最佳工艺为:70 ℃ 超声条件下,采用体积分数 70% 的乙醇连续提取 3 次,可以得到 66.5 mg/g 总黄酮;总黄酮纯化的最佳方法为:聚酰胺层析法和碱提酸沉法联用,即聚酰胺酸碱法,获得的总黄酮纯度和回收率均较高,分别为 6.86 g/kg 和 47.6%。**【结论】**获得了天山雪莲悬浮培养细胞总黄酮提取和纯化的最佳方法,为天山雪莲药制品的工业化生产提供了参考。

【关键词】 天山雪莲;愈伤组织;液体培养;聚酰胺层析法;碱提酸沉法

【中图分类号】 Q949.95

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)08-0175-07

Extraction and purification of total flavonoids in suspension cultured cells of *Saussurea involucrata*

FU Wan-yi, LI Hou-hua, LI Ling, WANG Ya-jie, ZHANG Cun-xu

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study focused on the variations of biomass and flavonoids contents during cell growth of suspension cultured *Saussurea involucrata* cells, and the optimization of total flavonoids extraction and purification technology. **【Method】** $L_9(3^4)$ orthogonal design was used to optimize the ultrasonic extraction process of total flavonoids from the suspension cell, and three extraction methods, polyamide column chromatography, alkali extraction and acid precipitation, and combination of polyamide column chromatography and alkali extraction and acid precipitation, were compared. **【Result】** As the increase of culturing time, the biomass and total flavonoids contents of *S. involucrata* in suspension cultured cells were 21.9 g/L and 66.5 mg/g at the 15th day, respectively, indicating the best harvest time was the 15th day. The best extraction conditions of total flavonoids were: ethanol solutions (volume fraction 70%), and three times ultrasound treatment at 70 ℃ with a production rate of 66.5 mg/g total flavonoids. Combination of polyamide column chromatography and alkali extraction and acid precipitation was the best purification process with the highest purity and recovery of refined flavonoids of 6.86 g/kg and 47.6%, respectively. **【Conclusion】** This study obtained the best process to extraction and purification of total flavonoids from suspension cultured *S. involucrata* cells.

* [收稿日期] 2012-12-25

[基金项目] 国家林业局公益性行业科研专项(201204308);西北农林科技大学引进人才经费资助项目(Z111020901)

[作者简介] 付婉艺(1988—),女,广西南宁人,在读硕士,主要从事植物生物技术研究。E-mail:88082389y@163.com

[通信作者] 张存旭(1961—),男,陕西澄城人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事森林遗传及生物技术研究。

E-mail:cxzhang@nwsuaf.edu.cn

Key words: *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. ; calli; liquid cultures; polyamide column chromatography; alkali extraction and acid precipitation

天山雪莲(*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.) 为菊科风毛菊属多年生草本植物,分布于新疆、青海、甘肃等地,是我国传统名贵中药。药理研究表明,其活性成分具有抗菌、抗病毒、消炎镇痛、抗肿瘤、降血压和血脂、延缓衰老及抑制癌细胞增殖等重要功效^[1-4]。目前,人们主要利用野生天山雪莲生产药品及保养品,但由于其自然生长缓慢,加之过度采挖,现有资源濒临枯竭,生物多样性受到严重威胁。2001 年,国家明令禁止将野生雪莲用于滋补品和化妆品,只允许用于医药制剂。因此,寻找野生雪莲的替代品,满足市场需求成了一个亟待解决的课题,植物细胞培养技术为中草药有效成分的提取和生产提供了新的途径,已有成功商业化的案例^[5-7],而有关雪莲细胞悬浮培养仅有少量报道^[8-9]。

天山雪莲的主要有效成分是总黄酮,总黄酮的提取技术多用超声波提取法,而分离纯化大多采用层析技术,也有的采取梯度 pH 萃取法、金属试剂络合沉淀法、双水相萃取分离法、碱提酸沉法和超临界流体萃取法等^[10-11]。其中,聚酰胺柱层析、大孔树脂吸附层析较为常用^[12-14],碱提酸沉法在实际生产中常被用于黄酮含量高的植物材料中总黄酮的提取和精制^[15]。中国药典规定,天山雪莲的药材标准是芦丁和绿原酸含量均不低于 1.5 mg/g^[16],因此采用反相高效液相色谱法(RPHPLC-DAD)测定这 2 种活性成分的含量,以确定天山雪莲悬浮培养细胞的药材品质。本试验以天山雪莲愈伤组织为材料,通过细胞培养试验及正交试验设计,确定天山雪莲细胞悬浮培养物的最佳收获时期,并探讨超声波辅助提取的最优条件以及纯化天山雪莲总黄酮的最佳方法,旨在为天山雪莲药制品的工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

天山雪莲愈伤组织由中国科学院植物研究所赵德修研究员惠赠。保存于 MS+3 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA (pH 5.8,琼脂 7 g/L,蔗糖 30 g/L)培养基中^[17],30 d 继代 1 次。取固体培养 15 d 左右分散性好的白色细胞,放入盛有 50 mL MS+3 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA (pH 5.8,蔗糖 30 g/L)液体培养基的 250 mL 三角瓶中,接种量为 3 g/L(干质量),在转速 100 r/min,温度(25±1)℃条

件下暗培养,每 20 d 继代 1 次。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 仪 器 QYC 200 空气恒温摇床,上海福玛实验设备有限公司生产;岛津-2455 紫外可见分光光度计,岛津公司生产;日立 L-2000 色谱仪(配备自动进样器 Hitachi L-2200 和二极管阵列检测器 Hitachi L-2455),日本日立有限公司生产。

1.2.2 试 剂 色谱级标准品芦丁、标准品绿原酸均购自 Sigma 公司,流动相色谱级甲醇、乙腈购自 Spectrum 公司,其余试剂均为分析纯。

1.3 天山雪莲悬浮培养细胞生长的测定

每 3 d 取 1 次培养物,共取 7 次,每次 3 个重复,经滤纸吸去水分,称量后置于烘箱中 40℃烘至恒质量,称量干质量,计算细胞生长率和总黄酮产量。

细胞生长率=(收获干质量-接种干质量)/接种干质量×100%。

总黄酮产量(mg/L)=总黄酮含量×(收获干质量-接种干质量)

1.4 天山雪莲悬浮培养细胞中总黄酮含量的检测

将芦丁标准品在 105℃烘箱中烘至恒质量,用乙醇溶解成质量浓度为 1 mg/mL 的标准液。分别取芦丁标准液 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 置入 10 mL 离心管中,加入 0.2 mL 50 g/L 的 NaNO₂,摇匀后静置 6 min;加入 0.2 mL 100 g/L Al(NO₃)₃,摇匀后静置 6 min;再加入 1 mL 40 g/L NaOH,摇匀后室温静置 15 min;加入体积分数 60% 乙醇溶液定容至 10 mL,于 450~540 nm 波长扫描,确定最大吸收波长(510 nm)^[18]。测定上述不同质量浓度标准品反应液在该波长下的吸光度,绘制标准曲线。

细胞中总黄酮含量的测定:称取 0.1 g 烘干至恒质量的天山雪莲细胞 0.1 g,加入体积分数 70% 乙醇溶液 5 mL,室温下提取 48 h,期间振荡 4~6 次,使提取液充分浸透样品,于 70℃超声提取 1 h,每隔 20 min 向样品中加 1 次 5 mL 乙醇提取液,共计 3 次。12 000 r/min 离心 10 min,吸取上层提取液于带有刻度的离心管中,加入体积分数 60% 乙醇至 20 mL。吸取 0.2 mL 提取液,加入 0.2 mL 50 g/L NaNO₂,混匀后放置 6 min,加入 0.2 mL 100 g/L Al(NO₃)₃,混匀后放置 6 min,加入 1.0 mL 40 g/L NaOH,混匀后静置 15 min,用体积分数 60%乙

醇定容至 10.0 mL,于 510 nm 处测定吸光度;根据标准曲线计算细胞中总黄酮含量,每个样品重复 3 次。

1.5 天山雪莲悬浮培养细胞中芦丁和绿原酸含量的测定

采用 HPLC-DAD 法测定芦丁和绿原酸含量,在日立 L-2000 色谱仪上样检测,色谱柱型号:Lachrom-C18,4.6 mm×250 mm,5 μm(Hitachi,Japan) 色谱柱。流动相参数:A.0.4 mL/L 的甲酸水溶液,B.色谱级乙腈,采用梯度洗脱。洗脱程序为:0—40 min,A 95%~0%,B 5%~100%;40—60 min,A 0%,B 100%。柱温 40 ℃,进样量为 10 μL,流速 0.5 mL/min,测定波长选择 280 nm^[19]。将标准品按稀释倍数配制成质量浓度为 0.000 2,0.002,0.3,0.45 和 2 mg/mL,过滤后上机分析,进样量为 10 μL,记录各色谱图的峰面积,制作标准曲线,得到峰面积与标准品质量浓度间的回归方程。

表 1 天山雪莲总黄酮提取 L₉(3⁴) 正交试验设计的因素与水平

水平 Level	因素 Factor		
	超声温度/℃ Temperature	提取次数 Times	乙醇体积分数/% Ethanol concentration
	A	B	C
1	25	1	30
2	40	2	50
3	70	3	70

1.6.2 分离纯化 将 1.6.1 中优选出的方法提取得到的粗提取液在减压旋转蒸发仪上(50 ℃)浓缩至 1/10 体积,然后分别用以下 3 种方法进行分离纯化。

1)聚酰胺柱层析法。上聚酰胺吸附柱(10 cm×50 cm,上样量 30 mL)。洗脱顺序:水洗→体积分数 30%乙醇→体积分数 50%乙醇→体积分数 70%乙醇→体积分数 95%乙醇→柱子再生。判断洗脱液中黄酮类物质含量的高低,合并含有黄酮类物质的洗脱液,于旋转蒸发仪上(50 ℃)减压浓缩至 10 mL。

2)碱提酸沉法。加入 4~6 滴 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值为 10,摇匀,然后滴加 1 mol/L HCl 至 pH 为 2~3,静置 20 min,10 000 r/min 离心 20 min,得到褐色沉淀。收集上清液(继续浓缩,重复上述沉淀步骤),用滤纸吸干残留液体,加入 20 mL 体积分数 70%乙醇并调节 pH 为 10~11,使沉淀完全溶解,滴加 HCl 至 pH 为 1~2,静置 20 min,重复离心,收集沉淀。用蒸馏水重复洗涤沉淀 3 次,去除水溶性杂质和盐类。

1.6 天山雪莲悬浮培养细胞中总黄酮的提取及纯化

1.6.1 提 取 采用 L₉(3⁴) 正交设计对雪莲细胞总黄酮提取温度、提取次数和提取液(乙醇)体积分数进行筛选和优化(表 1)^[20],正交试验的重复采取完全随机设计,每处理重复 3 次。准确称取烘干至恒质量的培养 15 d 的雪莲细胞 1.0 g,按表 1 设计分别加入体积分数 30%,50%和 70%的乙醇,室温下浸泡 48 h,其间振荡 4~6 次,使其充分浸透。提取次数的试验方案为:5 mL 乙醇提取液每隔 20 min 加 1 次,共计 3 次;5 mL 乙醇提取液每隔 30 min 加 1 次,共计 2 次;10 mL 乙醇提取液一次性加入,提取 1 h。将样品在 25,40 和 70 ℃下超声提取 1 h,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上层提取液于带有刻度的试管中,加入体积分数 70 %乙醇至 20 mL,进行总黄酮含量的测定。

3)聚酰胺酸碱法。即联合使用聚酰胺柱层析法和碱提酸沉法。上聚酰胺吸附柱(10 cm×50 cm,上样量 30 mL)。洗脱顺序:水洗→含 1 g/L NaOH 的无水乙醇溶液→柱子再生。判断洗脱液中黄酮类物质含量的高低,合并含有黄酮类物质的洗脱液。将洗脱液用 1 mol/L HCl 调 pH 至 7,于旋转蒸发仪上(50 ℃)减压浓缩至 10 mL。

将上述处理所得产物于干燥器中干燥至恒质量,进行总黄酮含量的测定。

纯化回收率=(晶体中总黄酮含量/浸出液中总黄酮含量)×100%。

1.7 数据分析与处理

采用 Excel 和 SPSS 13.0 软件对数据进行分析处理,采用 LSD 测验进行差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 天山雪莲悬浮培养细胞生长和总黄酮的合成动态及有效成分含量

2.1.1 悬浮培养细胞生长和总黄酮的合成动态 由图 1 和图 2 可知,在天山雪莲悬浮培养细胞培养

过程中,从接种到培养 3 d,生物量和生长率变化不大,为细胞生长延迟期,3~15 d 二者明显增加,培养 15 d 时生物量和生长率均较高,分别为 21.9 g/L 和 630%,15 d 以后细胞生长缓慢,进入静止期;总黄酮含量和产量前 3 d 增长缓慢,3~15 d 迅速增加,

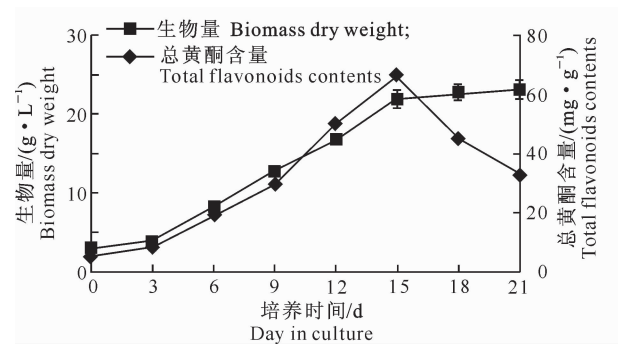


图 1 天山雪莲悬浮培养细胞生物量和总黄酮含量的动态变化

Fig. 1 Dynamic variation of dry weight and total flavonoids content in *S. involucrate* suspension cells

2.1.2 芦丁和绿原酸含量 根据色谱图中峰面积和标准品质量浓度,得到了芦丁标准品质量浓度与其峰面积积分的标准曲线回归方程: $C=8\times 10^{-7}A-0.0326$ (C 表示芦丁质量浓度,mg/mL; A 表示峰面积积分), $r^2=0.9992$,测定范围为 0.0002~2 mg/mL;绿原酸标准品质量浓度与其峰面积积分的回归方程为 $C=2\times 10^{-7}A+0.0017$ (A 表示峰面积积分; C 表示绿原酸质量浓度,mg/mL), $r^2=0.9997$,测定范围为 0.0002~2 mg/mL。将天山雪莲悬浮培养细胞样品的峰面积代入回归方程,可

表 2 天山雪莲悬浮培养细胞总黄酮提取的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal for the extraction of total flavonoids from *S. involucrate* suspension cells

试验序号 No.	超声温度 Temperature A	提取次数 Times B	乙醇体积分数 Ethanol concentration C	总黄酮含量/(mg·g ⁻¹) Contents of total flavonoids				
				重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	总量 Total	平均值 Average
1	1	1	1	34.53	30.24	32.53	97.30	32.43
2	1	2	2	43.74	39.76	41.95	125.45	41.82
3	1	3	3	43.89	46.05	44.46	134.40	44.80
4	2	1	2	43.60	42.86	41.14	127.60	42.53
5	2	2	3	44.27	53.22	50.45	147.94	49.31
6	2	3	1	46.94	47.68	44.56	139.18	46.39
7	3	1	3	57.81	48.02	47.63	153.46	51.15
8	3	2	1	50.67	55.50	53.26	159.43	53.14
9	3	3	2	66.50	54.19	61.95	182.64	60.88
K ₁	357.15	378.36	395.91					
K ₂	414.12	432.82	435.69					
K ₃	495.53	456.22	435.80					
极差 Range	138.4	77.9	40					
最优水平 Optimal level	A ₃	B ₃	C ₃					

进一步对正交试验设计获得的数据进行方差分

析,结果表明,C 因素对天山雪莲黄酮提取效率的影

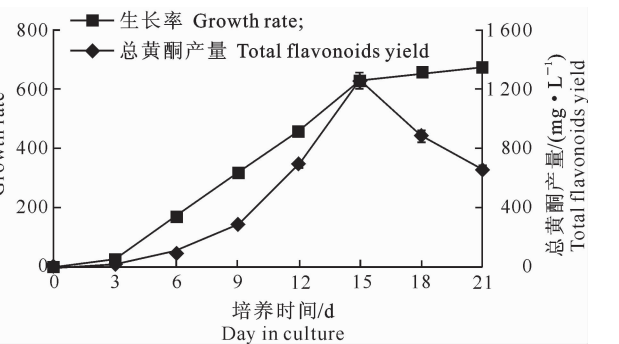


图 2 天山雪莲悬浮培养细胞生长率和总黄酮产量的动态变化

Fig. 2 Dynamic variation of growth rate and total flavonoids yield in *S. involucrate* suspension cells

得样品中芦丁和绿原酸的质量浓度,根据质量浓度计算出芦丁和绿原酸的含量分别为 1.7 和 1.6 mg/g,达到中国药典^[20]规定的标准(芦丁和绿原酸含量均不低于 1.5 mg/g)。

2.2 天山雪莲悬浮培养细胞中总黄酮最佳提取工艺和纯化方法的确定

2.2.1 提取工艺对总黄酮含量的影响 根据对各因素极差和均值的直观分析,确定各因素对天山雪莲总黄酮提取效率影响的主次关系为 A>B>C(表 2)。

析,结果表明,C 因素对天山雪莲黄酮提取效率的影

响达到显著水平($P<0.05$),而 A 和 B 因素的影响能够达到极显著水平($P<0.01$)。

直观分析及方差分析结果表明,A₃B₃C₃ 为雪莲黄酮提取工艺的最佳方案,即于 70 ℃ 超声条件下,采用体积分数 70%乙醇连续提取 3 次。

2.2.2 粗提取液中的总黄酮含量分析 采用比色法测定最优提取条件下得到的天山雪莲悬浮培养细胞粗提取液中总黄酮含量,芦丁标准品质量浓度与其吸光度的直线方程为: $C=0.532\ 4A-0.007$ (C 为总黄酮质量浓度,mg/mL; A 为吸光度),相关系数 $r=0.999\ 9$,测定波长 510 nm。天山雪莲中总黄酮含量(mg/g)= $10\times C\times V_1/(M\times 0.2)$,其中 C 为测定样品液中总黄酮质量浓度(mg/mL); M 为样品干质量(g); V_1 为样品最后定容体积(mL);0.2 为测定时加入提取液的体积(mL);10 为测定时提取液定容体积(mL)。以芦丁的含量进行换算,可知粗提液中总黄酮含量为 66.5 mg/g。

表 3 3 种纯化方法对天山雪莲悬浮培养细胞分离纯化后所得晶体中总黄酮含量、纯度及回收率的影响

Table 3 Effects of three purity methods on the contents,purities and recovery of total flavonoids in the crystal extracted and purified from *S. involucrate* suspension cells.

方法 Method	晶体中总黄酮含量/g Contents of total flavonoids in the crystal	晶体中总黄酮纯度/ (g·kg ⁻¹) Purities of total flavonoids in the crystal	浸出液中总黄酮含量/g Contents of total flavonoids in the liquid	纯化回收率/% Recovery of purification
聚酰胺柱层析法 Polyamide column chromatography	0.44±0.02 b	6.20±1.58 a	1.49±0.09 b	29.5±0.20 a
碱提酸沉法 Alkali extraction and acid precipitation	0.35±0.01 a	6.98±4.88 c	1.19±0.05 a	29.5±0.17 a
聚酰胺酸碱法 Combination of polyamide column chromatography and alkali extraction and acid precipitation	0.69±0.03 c	6.86±17.0 b	1.45±0.07 b	47.6±0.06 b

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。
Note:Lowercase letters indicate significantly difference at $P<0.05$.

3 结论与讨论

本研究结果显示,在天山雪莲细胞悬浮培养过程中,从接种至培养第 3 天为生长延迟期,第 3~15 天为对数生长期,第 15 天生物量和总黄酮含量均较高,分别为 21.9 g/L 和 66.5 mg/g,因此提取天山雪莲悬浮培养细胞总黄酮的最佳收获时间为培养 15 d 时。培养 1~3 d 为天山雪莲细胞的生长延迟期,此时细胞分裂指数低,可能是由于细胞为适应新环境而调整代谢,致使细胞分裂延迟,刘永刚等^[21]、吕东平等^[22]在水母雪莲细胞悬浮培养过程中也观察到延迟期现象。

本研究中,天山雪莲悬浮培养细胞总黄酮提取

2.2.3 纯化方法对总黄酮含量、纯度及回收率的影响 通过比色法计算碱提酸沉法、聚酰胺柱层析法和聚酰胺酸碱法 3 种分离纯化方法获得的晶体中总黄酮的含量及纯度,结果(表 3)表明,聚酰胺酸碱法所得晶体中总黄酮含量最高,为 0.69 g,显著大于另 2 种方法($P<0.05$);3 种方法所得晶体中总黄酮的纯度均超过了 6.00 g/kg,采用碱提酸沉法和聚酰胺酸碱法获得的晶体中黄酮纯度较高,分别可达到 6.98 g/kg 和 6.86 g/kg,与聚酰胺柱层析法(6.20 g/kg)差异达显著水平($P<0.05$);碱提酸沉法和聚酰胺柱层析法的纯化回收率较低,均为 29.5%,而采用聚酰胺酸碱法最终获得的总黄酮回收率为 47.6%,显著大于前 2 种方法($P<0.05$)。

上述结果表明,从晶体中总黄酮含量、纯度和回收率综合考虑,聚酰胺酸碱法明显优于其他 2 种方法。

的最佳工艺为:在 70 ℃ 超声条件下,用体积分数 70%的乙醇连续提取 3 次,可得到 66.5 mg/g 总黄酮。聚酰胺柱层析和碱提酸沉法联用是分离中药材总黄酮的常用方法,有较高的工业生产应用价值。本研究中,用聚酰胺柱层析法所得雪莲总黄酮纯度和回收率分别为 6.20 g/kg 和 29.5%,碱提酸沉法为 6.98 g/kg 和 29.5%。这 2 种方法联合使用所得天山雪莲总黄酮纯度和回收率分别为 6.86 g/kg 和 47.6%。与聚酰胺柱层析法相比,聚酰胺酸碱法获得的总黄酮纯度和回收率均明显提高;与碱提酸沉法相比,聚酰胺酸碱法获得的总黄酮纯度相差不大,但其回收率却提高了 1.6 倍。

由天山雪莲细胞悬浮培养所得细胞中芦丁和绿

原酸的含量均能达到且超过中国药典要求的生药标准,克服了野生植株生长慢、生长条件苛刻、发芽率低、资源稀少等缺点。本研究对天山雪莲悬浮培养细胞的总黄酮分离提纯工艺进行了探索,得到了回收率和纯度较高的总黄酮产物,为天山雪莲药制品的工业化生产提供了技术支持。

[参考文献]

[1] Hebeda C B,Bolonheis S M,Nakasato A,et al. Effects of chlo-rogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011,135(2):261-269.

[2] Lin J P,Yang J S,Lin J J,et al. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model *in vivo* [J]. Environmental Toxicology,2012,27(8):480-484.

[3] Tsimplouli C,Demetzos C,Hadzopoulou-Cladaras M,et al. *In vitro* activity of dietary flavonol congeners against human cancer cell lines [J]. European Journal of Nutrition,2012,51(2):181-190.

[4] Stanojevic L,Stankovic M,Nikolic V,et al. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts [J]. Sensors,2009,9(7):5702-5714.

[5] Kolewe M E,Gaurav V,Roberts S C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology [J]. Mol Pharm,2008,5(2):243-256.

[6] 高明波,李兴泰,阮成江,等. 紫杉醇及紫杉烷的细胞工程生产 [J]. 中国农学通报,2010(13):53-57.
Gao M B,Li X T,Ruan C J,et al. Production of taxol and taxanes by cell engineering [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2010(13):53-57. (in Chinese)

[7] Bringi V,Kadkade P G,Prince C L,et al. Enhanced production of taxol and taxanes by cell cultures of *Taxus species*: US , 7264951 [P]. 2007-09-04.

[8] 邢建民,赵德修,李茂寅,等. 水母雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮类活性成分合成 [J]. 植物学报,1998(9):59-64.
Xing J M,Zhao D X,Li M Y,et al. Cell growth and flavonoids production in suspension culture of *Saussurea medusa* [J]. Acta Botanica Sinica,1998(9):59-64. (in Chinese)

[9] 武利勤,郭颗星,肖培根. 新疆雪莲细胞悬浮系的建立和黄酮类活性成分的产生 [J]. 中国中药杂志,2005,30(13):965-968.
Wu L Q,Guo S X,Xiao P G,et al. Cell suspension culture and flavonoids production in *Saussurea involucrate* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica,2005,30(13):965-968. (in Chinese)

[10] 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(26):8083-8086.
Guo X F,Yue Y D. Research advances in extraction, isolation, purification and content determination methods of flavonoids [J]. Journal of Anhui Agriculture Science,2007(26):8083-8086. (in Chinese)

[11] 张 岩,曹国杰,张 燕,等. 黄酮类化合物的提取以及检测方

法的研究进展 [J]. 食品研究与开发,2008(1):154-158.
Zhang Y,Cao G J,Zhang Y,et al. Research on the extraction and identification of flavonoids [J]. Food Research and Development,2008(1):154-158. (in Chinese)

[12] 吴新荣,刘志刚,颜仁梁,等. 聚酰胺颗粒分离纯化土茯苓总黄酮研究 [J]. 中药材,2009,32(10):1606-1609.
Wu X R,Liu Z G,Yan R L,et al. Separation and purification of total flavonoids in *Smilax glabra* by polyamide resins [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials,2009,32(10):1606-1609. (in Chinese)

[13] 王春民,刘 刚,费 艳,等. 大孔吸附树脂法纯化黄芩总黄酮工艺的研究 [J]. 中草药,2010(1):58-60.
Wang C M,Liu G,Fei Y,et al. Study on the technology of purification of total flavonoids in *Scutellaria baicalensis* with macroporous adsorbing resins [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2010(1):58-60. (in Chinese)

[14] 黄金龙,殷之武,何新华,等. 银杏叶总黄酮纯化工艺研究 [J]. 中草药,2012(5):922-925.
Huang J L,Yin Z W,He X H,et al. Research on purification technology of total flavonoids in leaves of *Ginkgo biloba* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2012(5):922-925. (in Chinese)

[15] 杨新河,吕帮玉,毛清黎. 槐花中芦丁的碱提酸沉法研究 [J]. 食品工业科技,2007(4):183-185.
Yang X H,Lü B Y,Mao Q L. Study on the alkali extraction and acid precipitation of rutin in *Sophora japonica* [J]. Science and Technology of Food Industry,2007(4):183-185. (in Chinese)

[16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:三部 [S]. 北京: 化学工业出版社,2010.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia: Vol. 3 [S]. Beijing:Chinese Medical Science and Technology Press,2010. (in Chinese)

[17] 仇 健. 药用资源植物天山雪莲的苯丙素生物合成途径解析和基因工程调控 [D]. 北京:中国科学院植物研究所,2011.
Qiu J. Metabolic analysis and engineering of phenylpropanoid biosynthesis in *Saussurea involucrate* [D]. Beijing: Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences,2011. (in Chinese)

[18] 李 娟,张鲁刚,张 昱. 橙色大白菜球叶总黄酮提取与测定方法的研究 [J]. 园艺学报,2007,34(4):923-928.
Li J,Zhang L G,Zhang Y. A study on extraction and determination of total flavonoids in orange colour Chinese cabbages [J]. Acta Horticultureae Sinica,2007,34(4):923-928. (in Chinese)

[19] Li H H,Flachowsky H,Fischer T C,et al. Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.) [J]. Planta,2007,226:1243-1254.

[20] 高振鹏,袁宏安,岳田利,等. 超声波辅助提取双孢菇多糖的研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2012(7):215-220.

Gao Z P, Yuan Y H, Yue T L, et al. Study on the polysaccharides extraction of *Agaricus bisporus* using ultrasonic [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2012(7): 215-220. (in Chinese)

[21] 刘永刚, 高敏, 崔建云, 等. 水母雪莲细胞悬浮培养合成黄酮及抗氧化活性 [J]. 西北植物学报, 2005(7): 1421-1427.

Liu Y G, Gao M, Cui J Y, et al. Flavonoid biosynthesis and antioxidant activities in the suspension culture of *Saussure medusa* cells [J]. Acta Bot Boreal Occident Sinica, 2005(7): 1421-1427.

[22] 吕东平, 赵德修, 黄艳, 等. 前体对水母雪莲悬浮培养细胞黄酮合成的影响 [J]. 云南植物研究, 2001(4): 497-503.

Lü D P, Zhao D X, Huang Y, et al. The effect of precursor feeding on flavonoids biosynthesis in cell suspension cultures of *Saussurea medusa* [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2001(4): 497-503. (in Chinese)

(上接第 174 页)

[11] 郑文俊. 六种菊属植物的耐热性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2002.

Zheng W J. Studies on the heat resistance of six *Dendranthema* Mums [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2002. (in Chinese)

[12] 徐东生. 我国草莓脱毒研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2002(3): 43-46.

Xu D S. Advances of researches on virus elimination of strawberry in China [J]. Hubei Agricultural Science, 2002(3): 43-46. (in Chinese)

[13] Mori K, Hosokawa D, Watanabe M. Studies on multiplication and distribution of viruses in plants by use of fluorescent antibody technique: I. Multiplication and distribution of viruses in shoot apices [J]. Annphytopath Soc Japan, 1982, 48: 433-443.

[14] 罗福利. 植物脱病毒技术 [J]. 农技服务, 2012, 29(4): 427-428.

Luo F L. Technology of virus elimination for plant [J]. Agricultural Technology Service, 2012, 29(4): 427-428. (in Chinese)

[15] 刘学瑞, 张碧峰. 抗植物病毒剂的研究和应用 [J]. 植物保护, 1994(3/4): 8-11.

Liu X R, Zhang B F. The research and application on antiviral agents in plants [J]. Plant Protection, 1994(3/4): 8-11. (in Chinese)

[16] 江山. 病毒唑在植物保护中的应用 [J]. 植物保护, 1991(6): 35-36.

Jiang S. The application of virazole in plant protection [J]. Plant Protection, 1991(6): 35-36. (in Chinese)

[17] 丁文雅. 植物组织培养脱毒技术与检测方法 [J]. 农业科技通讯, 2009(3): 75-77.

Ding W Y. Virus elimination technique and virus-detection of plant tissue culture [J]. Agriculture Science and Technology Communication, 2009(3): 75-77. (in Chinese)

[18] 刘娜. 植物病毒及脱毒研究之进展 [J]. 北京农业, 2012(21): 80-81.

Liu N. Plant virus and detoxication research progress [J]. Beijing Agriculture, 2012(21): 80-81. (in Chinese)

[19] 洪健, 李德葆, 周雪平. 植物病毒分类图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.

Hong J, Li D B, Zhou X P. Plant virus classification pattern [M]. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)

[20] 裘维蕃. 植物病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 1985.

Qiu W F. Plant virology [M]. Beijing: Science Press, 1985. (in Chinese)

[21] 王金刚, 张兴. 园林植物组织培养技术 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008.

Wang J G, Zhang X. Garden plant tissue culture technology [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2008. (in Chinese)