

忽地笑中石蒜碱酶法提取及分离工艺研究

田春莲*, 王 鹏, 刘小攀

吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室, 张家界 427000

摘要:对复合酶法提取忽地笑石蒜碱的工艺进行优化,并用阳离子交换树脂分离石蒜碱。以纤维素酶与果胶酶的水溶液为提取溶剂,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察了酶解 pH、酶加入量、酶解时间和酶解温度等影响因素,以石蒜碱得率为指标,得最优提取工艺为:料液比 1:10, pH 4.5, 酶添加量 4%, 酶解温度 50 °C, 提取时间 2.0 h, 石蒜碱得率为 0.1750%。D-001 树脂纯化条件为:上样液 pH 为 2, 以 3 BV/h 流速上样, 以含 1.5 mol/L 氨水的 70% 乙醇洗脱, 流速为 3 BV/h, 初步分离后石蒜碱含量为 15.28%。研究结果可为石蒜碱工业化生产提供参考。

关键词:忽地笑;石蒜碱;酶法提取;阳离子交换树脂;分离

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.07.029

Study on Enzyme-assisted Extraction and Separation of Lycorine from *Lycoris aurea*

TIAN Chun-lian*, WANG Peng, LIU Xiao-pan

Key Laboratory of Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China

Abstract: The conditions for complex enzymatic extraction of lycorine from *Lycoris aurea* were optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal array design. Lycorine was further separated using cation exchange resin. Cellulase and pectinase solution was used as the extraction solvent. The effects of pH value of enzyme, amount of complex enzyme, dissociation time and enzymatic hydrolysis temperature on the extraction results were investigated. The optimal conditions were obtained as follows: ratio of solid to liquid was 1:10, pH value was 4.5, amount of complex enzymes was 4%, enzymatic hydrolysis temperature was 50 °C and reaction time was 2.0 h. Under these conditions, the extraction yield of lycorine was 0.1750%. In addition, D-001 cation exchange resin was selected for the separation of lycorine. The separation conditions were obtained as follows: adsorption flow rate was 3 BV/h with reagent of pH 2 and the desorption flow rate was 3 BV/h with 70% ethanol solution containing 1.5 mol/L ammonia. After separation, the content of lycorine was increased to 15.28%. The results can provide a reference for industrial production of lycorine.

Key words: *Lycoris aurea*; lycorine; complex-enzymatic extraction; cation exchange resin; separation

忽地笑(*Lycoris aurea* Herb.)属于石蒜科(Amaryllidaceae)石蒜属(*Lycoris*)多年生草本植物,又名铁色箭(本草纲目)、黄花石蒜,鳞茎卵形,外皮紫赤色薄膜,内为肉白色,形似蒜头,主要分布在湖北、湖南、广西、云南、广东、福建、四川等地^[1]。石蒜碱除临床用于小儿麻痹后遗症治疗的传统药物外,具有抗炎、抗病毒、抗疟疾、保护心血管等功效^[2,3],尤其对白血病、胃癌、肺癌、卵巢癌等多种癌细胞具有抑制和高效诱导凋亡的作用^[4,5]。国内外石蒜生物碱的提取主要有溶剂提取法、超声波提取法、微波提取

法等,但存在有机溶剂消耗大、成本高杂质多及得率低等缺点^[6-9];采用酶法提取植物活性成分具有操作效率高、条件温和、无污染的特点,目前广泛应用于总多酚^[10]、总生物碱^[11]、总黄酮^[12]、多糖^[13]等提取,而未见石蒜碱酶法提取的报道。生物碱的分离纯化主要有溶剂萃取法、色谱法、树脂吸附法、高速逆流色谱法等方法,离子交换树脂以其设备简单,操作方便,生产成本低、产品纯度高的特点,在生物碱等物质分离中取得广泛应用^[14,15],但离子交换树脂分离纯化石蒜碱的研究尚无报道。本研究以湖南忽地笑鳞茎为原料,探讨酶解法提取石蒜碱的新技术和新工艺,同时将阳离子交换树脂应用于石蒜碱的分离纯化,旨在获得提取率高、绿色环保和较高纯度的石蒜碱提取纯化工艺,为石蒜碱的工业化生产提

收稿日期:2014-10-09 接受日期:2015-03-17

基金项目:湖南省科技厅科技计划(2012TP4002-3);张家界市科技局计划(2014YB17)

* 通讯作者 Tel:86-744-8231386; E-mail: tianchunlian1970@163.com

供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

忽地笑于2012年3月采自湖南省怀化市沅陵县官庄,经吉首大学廖博儒研究员鉴定。石蒜碱标准品购自上海金穗生物科技有限公司,产品纯度>98%;纤维素酶购于(2×10^4 U/g)淮安市百麦绿色生物能源有限公司,半纤维素酶(1×10^4 U/g)和果胶酶(3×10^4 U/g)均购于上海如吉科技发展有限公司;732(001×7)、HD-8、HZ-008、D155、D001、D152型阳离子交换树脂购于郑州勤实科技有限公司;甲醇、乙腈(色谱纯)美国Tedia公司;其余试剂为分析纯。

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);FD5-3型真空冷冻干燥机(美国西盟公司);RE-5205 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);AEG-220 型万分之一天平(日本岛津)。

1.2 实验方法

1.2.1 酶种类的选择

以石蒜碱得率为检测指标,以忽地笑鳞茎粉末为提取物料,以pH 4.5的水为提取剂,在料液比(g:mL)为1:10条件下,分别加入3%的纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、纤维素酶与半纤维素酶复合酶、纤维素酶与果胶酶复合酶、半纤维素酶与果胶酶复合酶、纤维素酶与半纤维素酶及果胶酶复合酶,50℃浸提2.0 h,5000 rpm离心20 min,取上清液,定容至50 mL,过0.45 μm滤膜后HPLC检测。

1.2.2 单因素试验

以石蒜碱得率为检测指标,以忽地笑鳞茎粉末为提取物料,分别考察pH值1.5、3.0、4.5、5.0、6.0和7.5,纤维素酶与果胶酶混合酶加入量为忽地笑鳞茎粉末的0、1%、2%、3%、4%和5%,酶解时间0.5、1.0、1.5、2.0和2.5 h,酶解温度40、50、60、70和80℃,料液比(g:mL)1:5、1:10、1:15、1:20和1:25五因素对石蒜碱得率的影响。每个因素水平进行3次平行实验。

1.2.3 正交试验

在单因素试验基础上,对酶解pH值、纤维素酶与果胶酶混合酶加入量、酶解温度、酶解时间4因素,依据 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,优化组合,研究各因素对忽地笑鳞茎石蒜碱得率的影响,并对正交试验的最佳提取条件进行验证。

1.2.4 HPLC 分析条件

色谱柱:Kromasil 100-5C₁₈反相柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-磷酸缓冲液(17:83),柱温:35℃,流速1.0 mL/min,进样量20 μL,检测波长:290 nm。磷酸缓冲液的配制为2.72 g磷酸二氢钾溶于1000 mL水中加入1.4 mL三乙胺定溶至1 L,其pH值为7.02。

1.2.5 HPLC 方法学考察

1.2.5.1 石蒜碱标准曲线的绘制

称取25 mg石蒜碱标准品,定容,配成1.0 mg/mL的石蒜碱标准溶液,各取0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5 mL石蒜碱标准溶液定容于10 mL容量瓶中配成质量浓度为0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 mg/mL的标准溶液,用0.45 μm的微孔滤膜过滤后,按上述色谱条件测定,以标准品的含量为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,回归方程: $Y = 17200X + 34718$, $r = 0.9999$ 。

1.2.5.2 精密度的试验

精密吸取混合标准品溶液20 μL,按1.2.4项色谱条件连续进样6次,测定其峰面积,结果石蒜碱RSD = 1.32% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

1.2.5.3 稳定性试验

精密吸取石蒜碱标准品溶液,按1.2.4项色谱条件每隔2 h进样20 μL,连续进样6次,结果石蒜碱RSD为2.38% ($n = 6$),表明石蒜碱在10 h内检测稳定性良好。

1.2.5.4 重复性试验

制取5份石蒜碱提取液,按1.2.4项色谱条件测定峰面积,结果石蒜碱RSD为1.74% ($n = 5$),说明该方法的重复性较高。

1.2.5.5 加标回收率试验

精密量取已知含量的石蒜碱溶液5份,分别加入一定量的石蒜碱标准品,用甲醇定容,按1.2.4项色谱条件测定峰面积,得到石蒜碱平均回收率为98.52%,RSD为2.92% ($n = 5$),因此,本方法具有较好的回收率。

1.2.6 石蒜碱得率的计算

$$Y = \frac{cV}{m_0} \times 100\%$$

式中: c 为石蒜碱的质量浓度(mg/mL); V 为提取液定容体积(mL); m_0 为忽地笑鳞茎粉末的质量(mg)。

1.2.7 阳离子交换树脂分离石蒜碱的工艺

阳离子树脂用去离子水浸泡过夜,至洗出液澄清。先后加入 5 BV 的 5% HCl 溶液、5 BV 的 5% NaOH 溶液及 5 BV 5% HCl 溶液各浸泡 12 h,用去离子水洗至 pH 6~7,得 H⁺ 阳离子交换树脂。根据静态吸附试验筛选最佳树脂型号,将筛选好的阳离子交换树脂湿法上柱,石蒜碱粗提物水溶液以一定流速上柱。以含 1.5 mol/L 氨水的 70% 乙醇溶液进行洗脱。每隔一定体积收集 1 次洗脱液,HPLC 测定洗脱液中石蒜碱的含量,考察上样液 pH、上样流速、洗脱剂类型、洗脱流速等参数。

1.2.8 阳离子交换树脂吸附率和洗脱率的计算

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

$$\text{洗脱率}(\%) = \frac{c_2 \times v_2}{(c_0 - c_1) \times v_1} \times 100\%$$

式中: c_0 —吸附前样液质量浓度(mg/mL), c_1 —吸附后滤液质量浓度(mg/mL), c_2 —洗脱液质量浓度(mg/mL), v_1 —萃取液体积(mL), v_2 —洗脱液体积(mL)。

2 结果与讨论

2.1 酶种类的选择

如表 1,纤维素酶和果胶酶的混合酶的提取效果最好,达到 0.1575%,其次是纤维素与半纤维素酶的复合酶,单一酶不能充分的提取忽地笑石蒜碱,可能是酶作用位点的不同以及石蒜碱在不同 pH 值环境中溶解性不同所致。因此,选取纤维素酶与果胶酶复配。

表 1 不同酶作用下的石蒜碱提取结果

Table 1 Extraction results of lycorine with different enzymes

酶种类 Enzyme	石蒜碱得率 Yield of lycorine(%)
纤维素酶 Cellulase	0.1474
半纤维素酶 Hemicellulase	0.1447
果胶酶 Pectinase	0.1480
纤维素酶与半纤维素酶复合酶 Mixed cellulose and hemicellulase	0.1530
纤维素酶与果胶酶复合酶 Mixed cellulose and pectinase	0.1575
半纤维素酶与果胶酶复合酶 Mixed hemicellulase and pectinase	0.1500
纤维素酶与半纤维素酶及果胶酶复合酶 Mixed cellulose,hemicellulose and pectinase	0.1521
未添加酶 No enzyme added	0.0902

2.2 纤维素酶与果胶酶混合酶提取石蒜碱单因素试验结果

2.2.1 酶解 pH 值的影响

由图 1(a)可知,pH 值对石蒜碱提取率影响较大,随着 pH 值的升高,石蒜碱提取率先升高,在 pH 值为 4.5 时提取效果最好,然后随 pH 值的提高而下降。因为 pH 值不仅能够影响酶的构象,也影响底物的解离状态,进而影响酶活力^[16],导致石蒜碱提取率较低。故酶解 pH 选择 4.5。

2.2.2 复合酶加入量的影响

图 1(b)结果表明,酶用量在 0~3% 范围内,石

蒜碱得率与酶用量呈正相关,而当酶用量超过 3% 时底物浓度不能对酶达到饱和,使酶的作用受到抑制,导致石蒜碱得率有所下降,所以酶用量 3% 时提取效果最好,是因为纤维素酶降解了植物细胞壁纤维素,使活性成分较易从细胞内释出,从而提高石蒜碱提取率。

2.2.3 酶解时间的影响

如图 1(c)可知,石蒜碱得率随酶解时间延长而提高,1.5 h 时石蒜碱得率最高,继续延长提取率略有降低。石蒜碱提取率在反应前期随底物浓度与酶活性加快而上升;但随酶解时间延长,反应产物

的积累抑制了酶活力^[17]。故酶解时间控制在 1.5 h 为宜。

2.2.4 酶解温度的影响

从图 1(d)可知,酶解温度在 20~50 ℃范围内,石蒜碱提取得率与酶解温度呈正相关,且 50 ℃时最大,温度超过 50 ℃导致蛋白质变性,酶活力降低,石蒜碱提取率减少。

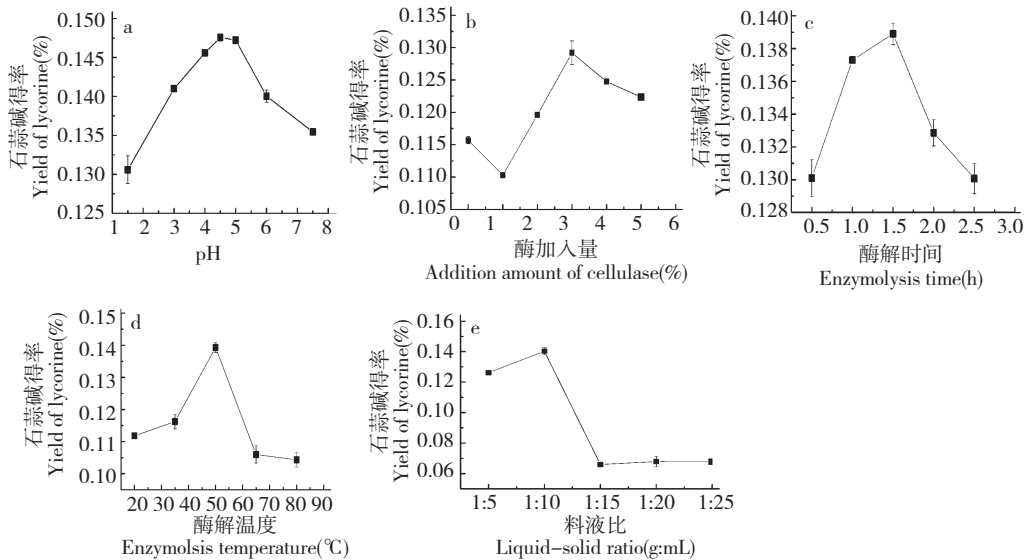


图 1 pH (a)、酶加入量 (b)、酶解时间 (c)、酶解温度 (d) 及料液比 (e) 对石蒜碱提取得率的影响

Fig. 1 Effects of pH (a), cellulose amount (b), enzymolysis time (c), enzymolysis temperature (d), liquid-solid ratio (e) on extraction yield of lycorine

2.3 正交试验结果与分析

通过表 2 直观分析可知石蒜碱提取最佳工艺组合为 $A_2B_3C_3D_2$, 即酶解温度 50 ℃、酶解时间 2.0 h、加酶量 4%、提取剂为 pH 为 4.5 的水溶液,影响石

2.2.5 料液比的影响

图 1(e)可知,石蒜碱提取得率随料液比的增大而增加,料液比 1:10 时得率最高。料液比小虽有利于酶和底物的相互作用,但此时体系黏度大且石蒜碱不能充分浸润,影响传质过程;增大料液比可降低溶液黏度,加快传质过程,但也降低了酶与底物接触的几率,因此,当料液比达到一定值后继续增加提取剂用量,石蒜碱提取率变化并不明显。

蒜碱得率的各因素主次顺序为酶解温度 > 酶用量 > 酶解时间 > 酶解 pH。由表 3 方差分析,酶解温度对石蒜碱得率的影响显著 ($P < 0.05$),其他因素无明显影响。

表 2 酶法提取石蒜碱正交试验结果及极差分析

Table 2 Orthogonal test design and corresponding range analysis results

试验号 No.	A 酶解温度 Enzymolysis temperature (°C)	B 酶解时间 Enzymolysis time (h)	C 酶加入量 Amount of cellulose (%)	D 酶解 pH 值 Enzymolysis pH value	石蒜碱得率 Yield of lycorine ($\times 10^{-3}\%$)
1	35	1.0	2	4.0	136.7
2	35	1.5	3	4.5	144.1
3	35	2.0	4	5.0	148.6
4	50	1.0	3	5.0	156.0
5	50	1.5	4	4.0	154.8
6	50	2.0	2	4.5	151.8
7	65	1.0	4	4.5	131.2
8	65	1.5	2	5.0	110.1
9	65	2.0	3	4.0	123.7

k_1	143.133	141.300	132.867	138.400
k_2	154.200	136.333	141.267	142.367
k_3	121.667	141.367	144.867	138.233
R	32.533	5.034	12.000	4.134

表3 酶法提取石蒜碱方差分析

Table 3 Results of variance analysis

方差来源 Source of variation	离差平方 Deviation square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
A	1641.707	2	820.8535	49.980	<0.05
B	50.007	2	25.0035	1.522	>0.1
C	227.520	2	113.76	6.927	>0.1
误差(D) Error	32.847	2	16.4235	1.000	
总和 Sum	1952.081				

注: $F_{0.10}(2,2) = 9.00$; $F_{0.05}(2,2) = 19.00$; $F_{0.01}(2,2) = 99.00$

2.4 最佳提取工艺的验证性试验结果

选择正交试验优选结果对酶解工艺进行3次平行试验,结果石蒜碱平均得率为0.1750%。高于各次正交试验结果,从而验证了此工艺条件为最优工艺。

2.5 阳离子交换树脂分离石蒜碱的结果与分析

2.5.1 阳离子交换树脂的筛选

由表4可知,本实验所选用的阳离子交换树脂

表4 6种阳离子交换树脂的静态吸附与解吸数据

Table 4 Static adsorption-desorption properties of 6 cation exchange resin

树脂型号 Resin model	732(001×7)	HD-8	HZ-008	D155	D001	D152
吸附率 Adsorption rate (%)	92.78	77.84	23.93	47.55	86.18	23.74
解吸率 Desorption rate (%)	91.26	92.42	66.67	33.09	98.26	74.84

2.5.2 D001树脂对石蒜碱吸附效果的影响

2.5.2.1 上样液pH值对吸附效果的影响

溶液pH值决定了上样液中游离生物碱与生物碱盐浓度的大小,从而影响阳离子树脂的交换效果。由图2可看出石蒜碱在上样液pH为2时,吸附效果最好。

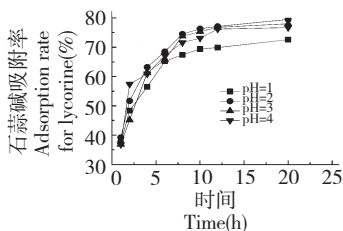


图2 上样液pH对石蒜碱的影响

Fig. 2 Effect of pH value of loading solutions on adsorption rate of lycorine

包括强酸性[732(001×7)、D001、HD-8、HZ-008]、弱酸性(D155、D152)2种。由静态吸附试验可知732(001×7)、D001和HD-8树脂的吸附率均较高,而D001树脂的解吸率最高,达98.24%。综合考虑吸附量和解吸率的影响,选择D001树脂进行试验。

2.5.2.2 上样速率对吸附效果的影响

上样速率会影响树脂对目标物质的吸附效果,以上样液体积为横坐标,流出液与上样液浓度之比作图。从图3可知,当上样流速为3 BV/h时D-001阳离子树脂对石蒜碱的吸附量最大。因此,选择3 BV/h为上样速率。

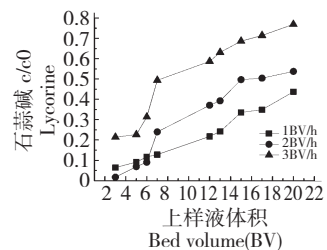


图3 上样速率对石蒜碱的影响

Fig. 3 Effect of sample loading rate on adsorption rate of lycorine

2.5.2.3 动态吸附曲线

将 20 mL D-001 型阳离子交换树脂湿法上柱, 吸附石蒜碱, 由图 4 可知, 当上样 30 mL 时石蒜碱达到泄露点, 当上样 1690 mL 时石蒜碱达到饱和。

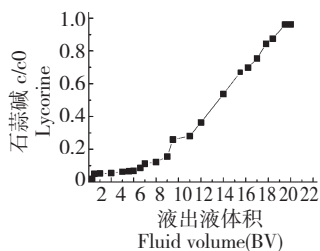


图 4 动态吸附曲线

Fig. 4 Dynamic adsorption curve

2.5.3 D001 树脂吸附石蒜碱后洗脱效果的影响

2.5.3.1 洗脱剂的选择

结果见图 5, 由图可知当氨水浓度为 1.5 mol/L, 乙醇体积分数为 70 % 时洗脱效果最好。因此, 使用含 1.5 mol/L 氨水的 70 % 乙醇溶液为洗脱剂。

2.5.3.2 洗脱速率的影响

结果见图 6, 从图中可知, 当洗脱速率为 3 BV/h 时洗脱剂对阳离子树脂中石蒜碱的洗脱量均最大。考虑吸附率和工作效率, 选用 3 BV/h 作为洗脱速率。

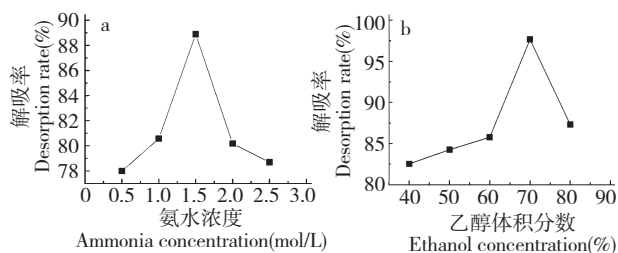


图 5 洗脱剂氨水浓度 (a) 及乙醇体积分数 (b) 对石蒜碱解吸率的影响

Fig. 5 Effect of ammonia concentration (a) and ethanol concentration (b) for desorption rate of lycorine

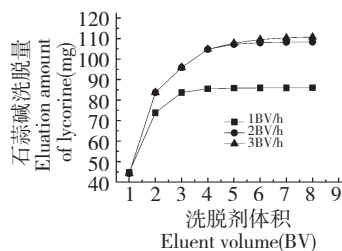


图 6 洗脱流速对石蒜碱解吸率的影响结果

Fig. 6 Effect of resolving rate on desorption rate of lycorine

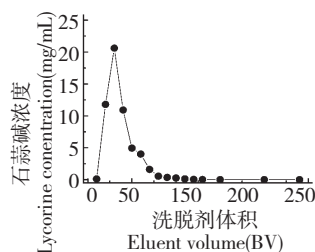


图 7 动态解吸曲线

Fig. 7 Dynamic desorption curve

2.5.4 D001 树脂洗脱曲线

D-001 阳离子树脂对石蒜碱的动态洗脱曲线如图 7。洗脱至 5 BV 时, 石蒜碱基本洗脱完全, 合并 0 ~ 100 mL 洗脱液, 旋转蒸发器蒸发后真空冷冻干燥, 经 HPLC 检测, 石蒜碱的纯度为 15.28%。

3 结论

石蒜碱酶法提取的最优工艺条件为: 按料液比 (g: mL) 1: 10 加入 pH 为 4.5 的水作为提取溶剂, 再加入 4% 的纤维素酶和果胶酶的复合酶, 在 50 °C 水浴提取 2.0 h, 提取 3 次石蒜碱得率为 0.1750%。石蒜碱得率影响的各因素为酶解温度 > 酶用量 > 酶解时间 > 酶解 pH, 酶解温度对石蒜碱得率的影响显著。通过对石蒜碱的分离纯化研究, 确定了最佳阳离子交换树脂分离条件: 以 D-001 型阳离子交换树脂进行石蒜碱分离, 以 3 BV/h 上样至饱和, 以含 1.5 mol/L 氨水的 70% 乙醇溶液 3 BV/h 进行洗脱, 洗脱液干燥物中石蒜碱的含量为 15.28%。

酶解法提取石蒜碱较超声波辅助提取石蒜碱^[8]得率由 0.1560% 提高到 0.1750%, 增加了 12.1%。提取溶剂采用酸性水溶液, 节约了提取成本, 对环境无污染, 酶法只在传统水提工艺上增加酶解过程, 工艺简单、操作方便, 具有一定的应用价值, 可以考虑用于工业化生产。

参考文献

- 1 Flora of China Commission (中国植物志编纂委员会). *Flora of China* (中国植物志). Beijing: Science Press, 1985. Vol I, 20.
- 2 Ieven M, Vlietinck AJ, Vanden DA, et al. Plant antiviral agents. III. Isolation of alkaloids from *Clivia miniata* Regel (Amaryllidaceae). *J Nat Prod*, 1982, 45: 564-573.
- 3 Qin KM (秦昆明), Li X (李笑), Xu Z (徐昭), et al. A survey of the studies on pharmacological effects of lycorine and its derivatives. *J Beijing Union Univ, Nat Sci* (北京联合大学

- 学报, 自科版), 2009, 23:6-10.
- 4 Dasari R, Banuls LMY, Masi M, *et al.* C1, C2-ether derivatives of the Amaryllidaceae alkaloid lycorine retention of activity of highly lipophilic analogues against cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24:923-927.
 - 5 Yu M(于淼), Yu Y(于洋), Liu LT(刘林涛). Study on apoptosis of human leukemia cell line K562 induced by lycorine. *J Harbin Univ Commerce, Nat Sci*(哈尔滨商业大学学报, 自科版), 2014, 30:157-160.
 - 6 Li X(李霞), Xiong YF(熊远福), Jiang LH(蒋利华), *et al.* Extraction of galanthamine and lycorine from *Lycoris Herb.* with one-step method. *Chem Ind Eng Prog*(化工进展), 2008, 27:904-907.
 - 7 Fan HJ(范华均), Luan W(栾伟), Li GK(李攻科). Determination of alkaloids in *Lycoris* with microwave-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography. *J Instru Anal*(分析测试学报), 2006, 25(13):27-30.
 - 8 Wang P(王鹏), Tian CL(田春莲), Liu XP(刘小攀). Ultrasonic extraction of lycorine and galanthamine from Red Spider Lily Bulb (*Lycoris radiata*). *Food Sci*(食品科学), 2013, 34(20):45-49.
 - 9 Du PY(杜甫佑), Xiao XH(肖小华), Li GK(李攻科). Microwave-assisted extraction of alkaloids in *Lycoris radiata* using ionic liquids solution. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2007, 35:1570-1574.
 - 10 Wang DP(汪殿蓓), Li JH(李建华). Optimization of composite enzymatic extraction of polyphenols from the fruit of *Abelmoschus moschatus*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26:909-914.
 - 11 Li J(李军), Hao CQ(郝彩琴), Chen HY(陈海燕), *et al.* Study on the enzymatic extraction process of alkaloids from *Sophora alopecuroides* L. *J Northwest Pharm*(西北药学杂志), 2014, 29:347-350.
 - 12 Xu YX(徐玉霞), Wang HB(王华斌). Effects of extracting technology of total flavonoids in *Malus micromalus* Makino by enzymatic treatment and its flavonoid crude extract on proliferation of HeLa cells *in vitro*. *J Chin Agric Univ*(中国农业大学学报), 2013, 18:119-127.
 - 13 Li Z(李钟), Luo YL(罗艳玲), Liu TS(刘塔斯). Optimization of enzymatic extraction of crude polysaccharide from *Rhizoma Polygonati Odorati* by response surface methodology. *J Guangzhou TCM Univ*(广州中医药大学学报), 2013, 30:218-222.
 - 14 Zhang JY(张加余). The research on the technology in purifying total alkaloids in *Herba Leonuri* and *Sophora Angusticlia* by acidic ion resins. Jinan: Shandong University Traditional Chinese Medicine(山东中医药大学), PhD. 2008.
 - 15 Wang X(王信), Dai L(代龙), Sun ZQ(孙志强), *et al.* Separation and purification technology for total alkaloids from *Uncariae Ramulus cum Uncis* with cation exchange resin. *Chin Tradit Herb Drug*(中草药), 2011, 42:1973-1976.
 - 16 Chen XL(陈晓琳), Zhang YB(张岩柏), Deng ZX(邓振雪), *et al.* Extraction of total alkaloids from *Solanum lyratum* by cellulose degradation. *J Northwest Pharm*(西北药学杂志), 2012, 27:291-293.
 - 17 Ma CJ(麻成金), Huang W(黄伟), Huang Q(黄群), *et al.* Optimization of multi-enzyme hydrolysis for *Sloanea hemsleyana* seed protein extraction. *Food Sci*(食品科学), 2012, 33(20):27-32.

(上接第 1247 页)

- 2 Wat CK, Johns T, Towers G. Phototoxic and antibiotic activities of plants of the Asteraceae used in folk medicine. *J Ethnopharm*, 1980, 2:279-290.
- 3 Xu SB(许实波), Zhao JH(赵金华). Blumea flavonols of protective effect of experimental liver injury in rats. *Acta Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 1998, 14:99-100.
- 4 Saewan N, Koysoomboon N, Chantrapromma K. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC. *J Med Plan Res*, 2011, 5:1018-1025.
- 5 Haswgawa H, Yamada Y, Komiyama K, *et al.* Dihydroflavonol BB-1, an extract of natural plant *Blumea balsamifera*, abrogates TRAIL resistance in leukemia cells. *Blood*, 2006, 107:679-688.
- 6 Zheng D(郑丹), Zhang XQ(张晓琦), Wang Y(王英), *et al.* Chemical constituents of the aerial parts of *Blumea riparia*. *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2007, 5:421-424.
- 7 Huang L, Lin C, Li A, *et al.* Pro-coagulant activity of phenolic acids isolated from *Blumea riparia*. *Nat Prod Commun*, 2010, 5:1263-1266.
- 8 Pang Y(庞玉新), Huang M(黄梅), Yu FL(于福来), *et al.* Comparative analysis on the contents of main chemical compositions in *Blumea balsamifera* (L.) DC. from Hainan and Guizhou province. *Acade J Guangdong Coll Pharm*(广东药学院学报), 2014, 30:448-452.
- 9 Riceevans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med*, 1996, 20:933-956.