

涨瓶强力枇杷露中有害微生物的 筛选鉴定及其防治初步研究

汪学军^{1,2*}, 闵长莉^{1,2}, 韩彭垒^{1,2}, 钱润泽^{1,2}¹皖西学院生物与制药工程学院; ²皖西学院大别山植物内生菌资源研究中心, 六安 237012

摘要: 采用平板涂布法从出现涨瓶现象的强力枇杷露样品中分离纯化有害菌, 通过形态学、生理生化和分子生物学方法对其种属鉴定, 且对该菌株的防治方法进行了初步研究。实验结果表明, 从出现涨瓶现象的样品中筛选到一株有害菌 LS2, 种属鉴定结果表明, 菌株 LS2 与拜耳接合酵母 (*Zygosaccharomyces bailii*) 特征最为接近, 初步将其鉴定为拜耳接合酵母; 防治方法研究结果表明, 在 110 °C 加热处理 20 min 时, 可达到彻底杀灭要求。

关键词: 强力枇杷露; 有害微生物; 鉴定; 拜耳接合酵母

中图分类号: R932; Q939.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.018

Selection, Identification of a Spoilage Microorganism from Bottle Bulged Qiangli Pipa Syrup and Preliminary Study on Its Control

WANG Xue-jun^{1,2*}, MIN Chang-li^{1,2}, HAN Peng-lei^{1,2}, QIAN Run-ze^{1,2}¹College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University; ²Research Center for Endophytic Fungi Resources of Dabie Mountain, West Anhui University, Lu'an 237012, China

Abstract: In this study, spoilage microorganisms were isolated from bottle bulged Qiangli Pipa Syrup by spread plate method. The morphological, biochemical characteristics and molecular methods were analyzed to identify the taxonomic position of the strains. Moreover, their control methods were also studied in this test. The results showed that a spoilage strain (LS2) was obtained. According to taxonomic identification, the strain LS2 was identified as *Zygosaccharomyces bailii*. The sterilization requirements were achieved after heat treatment at 110 °C for 20 min.

Key words: Qiangli Pipa Syrup; spoilage microorganisms; identification; *Zygosaccharomyces bailii*

强力枇杷露是由枇杷叶、罂粟壳、百部、白前、桑白皮、桔梗、薄荷脑等制成的现代中药糖浆剂, 具有养阴敛肺, 止咳祛痰的功效^[1,2]。临床主要用于支气管炎咳嗽等。由于强力枇杷露多以中药植物为原料, 其成分主要包括蛋白质、糖类等, 这些营养物均有利于微生物的生长繁殖。虽然产品在生产及罐装的过程中严格按照药品标准规定和卫生标准规定, 但仍有少数产品残留了一些微生物, 个别产品放置一段时间后, 特别是夏季室温较高的情况下出现了发酵、产气生理现象。在密封瓶中产生的气体不能释放出来, 因而, 出现涨瓶甚至把瓶子涨破情况。

针对上述出现涨瓶现象的样品, 本实验从该样

品中筛选到一株能够引起涨瓶现象的菌株 LS2, 通过形态学、生理生化特征研究和分子生物学手段对其进行种属鉴定, 并对菌株 LS2 的防治方法进行了初步研究, 以期对涨瓶中产气菌的研究奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

安徽某制药厂生产的正常的强力枇杷露 (50 瓶) 和涨瓶的强力枇杷露 (3 瓶), 每瓶 120 mL, 均为塑料瓶灌装。

1.1.2 培养基

改良 PDA 培养基 (高糖): 去皮马铃薯 200 g, 蔗糖 400 g, 琼脂粉 20 g, 加入蒸馏水定容至 1 L, pH 自然。

1.2 方法

收稿日期: 2016-11-24

接受日期: 2017-02-14

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1708085MH226); 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目 (KJ2015A 172); 国家自然科学基金 (31100019)

* 通讯作者 Tel: 86-564-3305073; E-mail: xjwang0917@163.com

1.2.1 微生物的分离纯化

分别取 1 mL 涨瓶和正常的强力枇杷露至装有 9 mL 无菌水的试管中稀释为 10^{-1} , 同样, 从 10^{-1} 混匀的稀释液吸取 1 mL 至另一只装有 9 mL 无菌水的试管中稀释为 10^{-2} 。分别取 10^{-1} 、 10^{-2} 涨瓶和正常的强力枇杷露 0.2 mL 至改良 PDA 平板上, 以玻璃涂布器沿着不同的方向来回涂布, 使枇杷露的稀释液均匀地分布在培养基表面^[3], 置于 28 °C 恒温培养箱中倒置培养 72 h。对平板上的微生物根据菌落形成单位进行计数, 并将不同类群的菌落分别采用划线接种至 PDA 平板上进行分离纯化, 并记录和观察菌落的形态结构。对于纯菌落接种至相应的斜面上进行菌种的保藏, 防止被其它微生物所污染, 并对所分离到的微生物菌株进行编号。

1.2.2 涨瓶验证实验

将 1.2.1 斜面菌种分别接种至正常的强力枇杷露(未涨瓶), 旋紧瓶盖后置于 28 °C 恒温培养箱中培养 72 h, 观察有无涨瓶现象出现。如有涨瓶现象, 从新出现涨瓶的枇杷露中再次进行微生物的分离, 将分离得到的微生物接种至正常的强力枇杷露中再次进行培养, 观察涨瓶现象是否能重复再现, 并记录两次涨瓶的有害微生物特征是否一致。

1.2.3 涨瓶微生物的鉴定

由 1.2.2 中分离得到的能够引起涨瓶的微生物进行形态学、生理生化及分子生物学特征的鉴定。

形态学特征: 取引起涨瓶的微生物 LS2 划线接种改良 PDA 培养基上, 28 °C 恒温培养 72 h, 观察菌落形状、大小、边缘的光滑程度、菌落的颜色等特征, 并进行显微观察。

涨瓶有害微生物的生理生化特征: 即碳源同化试验、氮源同化试验、糖类发酵鉴定和酵母菌鉴定的其它试验参照文献《酵母菌的特征与鉴定手册》进行^[4]。

分子生物学鉴定: 采用 Ezup 柱式酵母菌基因组 DNA 抽提试剂盒 SK8257 提取酵母菌 LS2 基因组 DNA, 酵母菌鉴定通用引物 NLI (5'-GCATAT-CAATAAGCGGAGGAAAAG -3') 和 NL4 (5'-GGTC-CGTGTTTCAAGACGG -3') 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 修复延伸 10 min^[5]。切割经凝胶电泳 PCR 扩增产物目标条带, 测序工作由上海生工完成。

在 NCBI 数据库的 Bankit 上在线提交测序后酵母菌 LS2 序列和菌株测定方法、特征, 经审核无误

后, 获得由 Genbank 授权提供基因登录号。而后在 Blastn 数据库中进行比对, 选取同源性和匹配程度高的参比菌株及序列^[6]。利用 Clustal X 软件多重序列匹配排列分析和 Mega 6.06 软件方法构建系统发育树(N-J 法, Bootstrap 重复 1000 次检验各分支置信度, Kimura 2-parameter 模型), 确定菌株 LS2 种属关系^[7,8]。

1.2.4 涨瓶微生物的防治

将引起涨瓶的酵母菌 LS2 接种至 121 °C 灭菌处理后的强力枇杷露中, 经培养、稀释后制备成浓度 10^6 CFU/mL 菌悬液, 分别置于不同的温度下进行处理, 以达到筛选出对涨瓶有害微生物杀灭最合适的温度。具体操作方法是: 将装有有害微生物的强力枇杷露 5 mL 的试管置于高压蒸汽灭菌器内, 分别将温度设置为 105 °C、110 °C、115 °C 各加热灭菌 20 min。取经过不同的温度处理后的样品 0.2 mL 涂布于改良 PDA 平板上, 培养后观察有无微生物生长现象, 以达到判断在何种温度条件下处理对涨瓶有害微生物的具有控制杀灭作用。将不同温度处理的菌悬液接种至正常的强力枇杷露中, 28 °C 培养 72 h, 观察有无涨瓶现象出现。

2 结果与讨论

2.1 强力枇杷露中的微生物分离纯化

涨瓶和正常的强力枇杷露 0.2 mL 的 10^{-1} 、 10^{-2} 稀释液涂布于改良 PDA 平板后, 经过培养均有微生物生长的现象。其中, 涨瓶和正常的强力枇杷露 10^{-1} 稀释液样品在 PDA 平板上出现的菌落数较多, 无法进行计数。未涨瓶 10^{-2} 稀释液样品在 PDA 平板出现的菌落数为 21 个, 因此, 原样品微生物的数量为 1.05×10^4 CFU/mL; 而涨瓶 10^{-2} 稀释液样品在 PDA 平板上的菌落数为 47 个, 因此, 原样品微生物的数量为 2.35×10^4 CFU/mL。 10^{-2} 两种样品中的单个菌落分别采用划线接种分离法共得到形态不同的纯化菌株 6 株, 分别命名为 LS1 ~ LS6, LS1 ~ LS4 菌株来自于涨瓶的强力枇杷露, LS5 ~ LS6 菌株来自于正常的强力枇杷露。将 6 株菌分别接种至 PDA 斜面, 置于 4 °C 冰箱保藏。

2.2 涨瓶验证实验

分离纯化得到的微生物 LS1 ~ LS6 分别接种至正常的强力枇杷露(未涨瓶), 经过培养后, 接种 LS2 菌株的正常的强力枇杷露出现了涨瓶现象, 其它 5 株菌培养后没有出现这种现象。从 LS2 引起涨瓶枇

杷露中进行微生物的再次分离,得到了与 LS2 形态相同的菌落,将与 LS2 形态相同的菌落接种至正常的强力枇杷露中后,涨瓶的实验现象会再次出现,这说明了涨瓶原因是由菌株 LS2 引起的。

2.3 涨瓶有害微生物 LS2 的鉴定

2.3.1 涨瓶微生物 LS2 形态学特征

菌株 LS2 在 28 ℃ 培养时,24 h 后有菌落长出,

颜色呈微黄色,菌落直径较小、透明;48 h 后菌落的颜色不再透明渐变成乳白色,菌落直径变大,单个菌落直径约 2 mm 左右。菌落形状为半球形,中间隆起,边缘光滑,菌落与培养基接触疏松,易挑起(图 1 A)。涂片后进行显微观察,菌株 LS2 为纺锤形单细胞(放大倍数:10 × 40,图 1 B)。

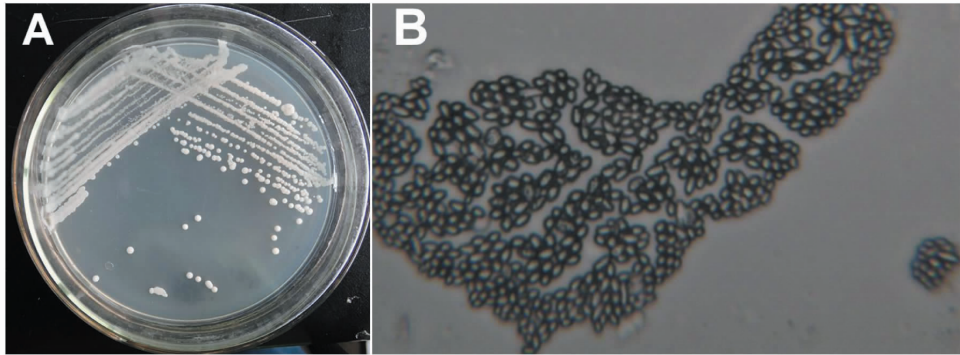


图 1 涨瓶微生物 LS2 的菌落特征

Fig. 1 Colony characteristics of strain LS2 in bottle bulged

A:LS 菌落;B:LS 显微特征

A:colony of LS2;B:microscopic character of LS2

2.3.2 涨瓶有害微生物的生理生化特征

碳源同化试验结果见表 1,氮源同化试验见表 2,糖类发酵鉴定试验结果见表 3,酵母菌鉴定的其

它试验见表 4。试验结果表明菌株 LS2 的生理生化特征与拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)特征最为接近。

表 1 碳源同化试验

Table 1 Carbon source assimilation test of strain LS2

试验项目 Test item	试验结果 Test results			试验项目 Test item	试验结果 Test results		
	1	2	3		1	2	3
D-半乳糖 D-Galactose	-	-	-	棉子糖 Raffinose	+	+	+
L-山梨糖 L-Sorbinose	+	+	+	松三糖 Melezitose	-	-	-
D-葡萄糖胺 D-Glucosamine	-	-	-	菊糖 Synanthrin	-	-	-
D-核糖 D-Ribose	-	-	-	淀粉 Starch	-	-	-
D-木糖 D-Xylose	-	-	-	甘油 Glycerinum	-	-	-
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	-	-	-	赤藓糖醇 Erythritol	-	-	-
D-阿拉伯糖 D-Arabinose	-	-	-	核糖醇 Ribitol	+	-	-
L-鼠李糖 L-Rhamnose	-	-	-	木糖醇 Newtol	-	-	-
蔗糖 Sucrose	+	+	+	D-山梨醇 D-Sorbitol	-	-	-
麦芽糖 Maltose	-	-	-	肌醇 Inositol	-	-	-
α-α-海藻糖 α-α-Trehalose	-	-	-	D-葡萄糖酸 D-Gluconic acid	-	-	-
甲基 α-D-吡喃葡萄糖苷 Methyl α-D-Pyran glucoside	-	-	-	D-葡萄糖醛酸 D-Glucuronic acid	-	-	-
纤维二糖 Cellobiose	-	-	-	DL-乳酸 DL-Lactic acid	-	-	-
水杨苷 Salicin	-	-	-	琥珀酸 Succinic acid	-	-	-

试验项目 Test item	试验结果 Test results			试验项目 Test item	试验结果 Test results		
	1	2	3		1	2	3
熊果苷 Arbutin	-	-	-	柠檬酸 Citric acid	-	-	-
蜜二糖 Melibiose	-	-	-	甲醇 Methyl alcohol	-	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-	乙醇 Ethyl alcohol	+	+	+

注: + 阳性, - 阴性。

Note: + Positive, - Negative.

表 2 氮源同化试验

Table 2 Nitrogen source assimilation test of strain LS2

试验项目 Test item	试验结果 Test results			试验项目 Test item	试验结果 Test results		
	1	2	3		1	2	3
硝酸钾 Potassium nitrate	-	-	-	亚硝酸钠 Nitrite	-	-	-
乙胺 Ethylamine	+	+	+	L-赖氨酸 L-Lysine	+	+	+
尸胺 Cadaverine	+	+	+	肌酸 Creatine	-	-	-
肌酸酐 Creatinine	-	-	-				

注: + 发酵, - 不发酵。

Note: + with fermentation; - without fermentation.

表 3 糖类发酵试验

Table 3 Carbohydrate fermentation test of strain LS2

试验项目 Test item	试验结果 Test results			试验项目 Test item	试验结果 Test results		
	1	2	3		1	2	3
葡萄糖 glucose	+	+	+	乳糖 Lactose	-	-	-
D-半乳糖 D-Galactose	-	-	-	纤维二糖 Cellobiose	-	-	-
麦芽糖 maltose	-	-	-	松三糖 Melezitose	-	-	-
甲基 α -D-吡喃葡萄糖苷 Methyl α -D-Pyran glucoside	-	-	-	棉子糖 Raffinose	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+	菊糖 Synanthrin	-	-	-
α - α -海藻糖 α - α -Trehalose	-	-	-	淀粉 Starch	-	-	-
蜜二糖 Melibiose	-	-	-				

注: + 发酵, - 不发酵。

Note: + with fermentation; - without fermentation.

表 4 酵母菌其它生化特征

Table 4 Other biochemical characteristics of strain LS2

试验项目 Test item	试验结果 Test results			试验项目 Test item	试验结果 Test results		
	1	2	3		1	2	3
0.1% 放线菌酮生长 0.1% Growth of actinomycetes	-	-	-	42 $^{\circ}$ C 生长 Grow at 42 $^{\circ}$ C	+	+	+
无维生素生长 No vitamin for growth	-	-	-	淀粉形成 Starch formation	-	-	-
重氮基蓝 B (DBB) Diazo base blue B	-	-	-	尿素水解 Urea hydrolysis	-	-	-
37 $^{\circ}$ C 生长 Grow at 37 $^{\circ}$ C	+	+	+	醋酸产生试验 Acetic acid production test	+	+	+

注: + 生长, - 不生长。

Note: + grow, - not grow.

2.3.3 分子生物学鉴定

LS2 菌株 26S rDNA D1/D2 区域序列经纯化、测序后得到长度为 606 bp, 将该区域序列提交到 Gen-

Bank 的 Bankit 后, 得到的基因登录号为 KU253717。菌株 LS2 26S rDNA D1/D2 区域序列在 GenBank 同源性搜索, Blastn 结果表明, 其序列与数据库中模式

菌株拜耳接合酵母 (*Z. bailii*) 同源性最高,相似性达到 99%。在 GenBank 数据库分别选取与菌株 LS2 序列相似性高的菌株 26S rDNA D1/D2 序列进行比较,Clustal X 软件进行 alignment 后,经 MEGA6.06 软件构建出其系统发育树(见图 2)^[9]。在系统发育树中菌株 LS2 与 *Z. bailii* (KF908879) 聚类到一起的几率最高,遗传距离最近。结合形态特征,将菌株 LS2 鉴定为 *Z. bailii*。

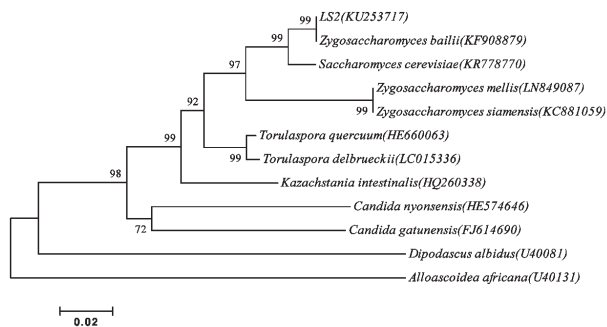


图 2 基于 26S rDNA D1/D2 区域序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree drawn from neighbor-joining analysis based on the 26S rDNA D1/D2 domain sequence alignment

2.4 涨瓶有害微生物 LS2 的防治

取 10^6 CFU/mL 的引起涨瓶的酵母菌悬液 5 mL,分别经不同的温度处理后,涂布于 PDA 平板上,培养后观察有无微生物生长现象。研究的结果表明,在 105 °C 加热处理 20min 后,在 PDA 平板上仍有部分菌落长出,表明 105 °C 条件下不能对强力枇杷露中的菌株 LS2 进行有效的杀灭;而 110 °C、115 °C 处理后的强力枇杷露液在 PDA 平板上无菌落生长的现象;同时,发现 110 °C、115 °C 处理后的菌悬液接种至正常的强力枇杷露中也未出现涨瓶现象,而 105 °C 处理后的样品出现涨瓶现象,这些实验结果表明在 110 °C、115 °C 处理后的强力枇杷露中有害微生物被杀死,达到灭菌的要求,建议企业在熬制过程中提高温度至 110 °C,达到彻底消灭的要求。

3 讨论与结论

本实验在涨瓶样品产气菌的研究中,为了使实验结果更为严谨,分别以出现涨瓶现象的样品和正常的强力枇杷露为研究对象,并通过改良 PDA 培养基进行微生物的分离纯化,以期能最大限度模拟强力枇杷露中的高糖高渗环境,满足其中的微生物生长营养和环境的需求。采用该方法,共获得微生物

6 株,其中 4 株来自于涨瓶的样品,2 株来自于正常的强力枇杷露。

为了验证上述分离得到的菌株是否为涨瓶微生物,我们参照科赫法则的要求,将 6 株菌株分别接种至正常的强力枇杷露样品中培养,观察是否会有涨瓶现象出现,对出现涨瓶现象的样品进行微生物的分离纯化后,再次接种至正常强力枇杷露中,以观察是否会有涨瓶现象再现,结果表明菌株 LS2 是引起强力枇杷露涨瓶的原因,该菌经种属鉴定后为拜耳接合酵母 (*Z. bailii*)。酵母菌是一类单细胞真菌,属于兼性厌氧菌,在自然界广泛存在,有些种属能够引起食品的腐败,被称为腐败酵母^[10,11]。欧阳友生和樊君分别对酱油涨袋、涨瓶中产气菌的检测研究表明,酵母菌和细菌产气菌是引起其涨袋、涨瓶的原因^[12,13],樊洁等从蜂蜜样品中分离得到耐高渗透压酵母菌^[14],李栋也从葡萄酒中筛选到有害菌拜耳接合酵母^[15],这表明酵母菌的确有可能引起食品腐败变质,但从药品中筛选到有害酵母菌的报道还很鲜见,本文首次报道了一株能够引起强力枇杷露产生涨瓶现象的菌株 LS2。

强力枇杷露作为中成药,其主要成分为糖类和枇杷叶,枇杷叶上可能附有一些微生物,这就可能包括拜耳接合酵母,这些微生物会随着枇杷叶带入到药品中去。在生产中是采用沸水熬制 2 h 的方法来进行提取和杀死绝大多数的微生物。在实际操作过程中,杀灭微生物的方法有很多,不过温度是首选,一来是因为高温可使枇杷露中的微生物细胞内的蛋白质和酶类发生变性而失活,从而起到杀死微生物的目的;二来是因为不向枇杷露中加入任何其它成分,相对来说绿色环保。既然 100 °C 熬制 2 h 也不能彻底杀灭微生物,因此,笔者的研究温度是从 105 °C 开始,加之考虑到营养成分会显著影响灭菌效果,高营养成分中微生物对温度的耐受性会增强,故又把菌株 LS2 加入到强力枇杷露中。实验室研究结果表明当温度提高至 110 °C 加热 20 min 时,可达到彻底灭菌要求。下一步我们需要检测拜耳接合酵母在强力枇杷露生产过程中的分布情况,为企业合理防治该菌的污染提供基础。

参考文献

- Zhang B(张彬), Zhou XX(周学兴), Li R(李蓉), et al. Uncertainty analysis for relative density of Qiangli Pipa Syrup. *J Emerg Tradit Chin Med*(中国中医急症), 2015, 24:

- 1195-1196.
- 2 Qin WJ(秦文杰), Ma K(马开), Gao H(高寒), *et al.* Determination of papaverine in Qiangli Pipalu by HPLC. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2006, 31:1330-1332.
 - 3 Shen P(沈萍), Chen XD(陈向东). Experiment of Microbiology. Beijing: Higher Education Press, 2007: 241.
 - 4 Barnett JA. Handbook of Characterization and Identification of Yeasts. Hu RQ Translation. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1991.
 - 5 Qing MJ(卿蔓君), Bai M(白梅), Zhang Y(张勇), *et al.* Identification and biodiversity of yeasts from Qula in Tibet and milk cake in Yunnan of China. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报), 2010, 50:1141-1146.
 - 6 Wang XJ(汪学军), Yan SL(闫双林), Min CL(闵长莉), *et al.* Isolation and antimicrobial activities of actinomycetes from Vermicompost. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2015, 40:614-618.
 - 7 Jiang Y(姜云), Huang LL(黄丽丽), Chen CQ(陈长卿), *et al.* Screen, identification and optimized fermentation condition of an actinomycete strain against pathogenic fungus *Fulvia fulva*. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报), 2007, 47:622-627.
 - 8 Zhou JP(周俊萍), Yang BS(杨本寿), Zuo X(左详), *et al.* Identification of an endophytic fungus with extensive antimicrobial and optimization of its solid-state fermentation condition. *J Yunnan Agric Univ*(云南农业大学学报), 2014, 29:766-772.
 - 9 Wang XJ(汪学军), Min CL(闵长莉), Yin ZC(殷智超). Isolation and identification of an endophytic fungus for microbial degumming of *Cannabis sativa* L. *Acta Bot Boreal-Occident*(西北植物学报), 2014, 34:623-627.
 - 10 He YM(贺玉梅), Ju ZC(据志昌), Dong K(董葵), *et al.* Identification of types of yeast polluting the foodstuff saled in Beijing. *J Hygiene Res*(卫生研究), 2004, 33:497-498.
 - 11 Pastorkova E, Zakova T, Novakova J, *et al.* Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 2013, 161:209-213.
 - 12 Ouyang YS(欧阳友生), Xie XB(谢小保), Chen QD(陈娇娣), *et al.* Isolation and identification of osmotolerant yeast from "Swollen Can" soy sauce. *Microbiol China*(微生物学通报), 2005, 32:120-123.
 - 13 Fan J(樊君), Luo HG(罗红刚), Wang HF(王惠芳), *et al.* Detection of aerogen in bag bulged and bottle bulged soy sauce. *China Condiment*(中国调味品), 2015, 10:88-91.
 - 14 Fan J(樊洁), Han Y(韩焯), Zhou ZJ(周志江), *et al.* Isolation and identification of osmophilic yeasts from honey. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2014, 35:165-168.
 - 15 Li D(李栋). The selection, identification of spoilage microorganisms in wine and optimization, application of culture conditions for *Zygosaccharomyces bailii*. Urumqi: Xinjiang Agriculture University(新疆农业大学), MSc. 2014.
 - 17 Ohkatsu Y, Kubota S, Sato T. Antioxidant and photo-antioxidant activities of phenylpropaboids. *J Jpn Petrol Inst*, 2008, 51:348-355.
 - 18 Ouyang F(欧阳发), Ji TF(吉腾飞), Su YL(苏亚伦), *et al.* Chemical constituents of the fruits of *Lycium ruthenicum*. *J Chin Med Mater*(中药材), 2012, 35:1599-1601.

(上接第 548 页)

- 15 Vasconcelos JMJ, Silva AMS, Cavaleiro JAS. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritime*. *Phytochemistry*, 1998, 49:1421-1424.
- 16 Chang YC, Chang FR, Wu YC, *et al.* The constituents of *Lindera glauca*. *J Chin Chem Soc*, 2000, 47:373-380.