

天花粉化学成分的药理活性及其提取与检测方法研究进展^Δ

丁建莹^{1*}, 刘春娟², 郭建军¹, 胡晓宇¹, 公爱娟¹, 张波^{1#} (1. 临沂大学药学院, 山东临沂 276000; 2. 枣庄市妇幼保健院药学部, 山东枣庄 277100)

中图分类号 R93 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1859-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.31

摘要 目的: 为建立天花粉的质量评价标准提供参考。方法: 以“天花粉”“化学成分”“质量评价”“天花粉蛋白”“天花粉凝集素”“天花粉多糖”“药理活性”“检测方法”“*Trichosanthis Radix*”“Chemical component”“Quality evaluation”“Trichosanthin”“*Trichosanthes kirilowii* lection”“Polysaccharides of trichosanthis radix”等为关键词, 组合查询1980年1月—2018年1月在中国知网、万方、维普、ScienceDirect、PubMed、Web of Science等数据库中的相关文献, 对天花粉化学成分的药理活性、提取与检测方法进行论述。结果与结论: 共检索到相关文献857篇, 其中有效文献54篇。天花粉含有蛋白质类、多糖类、皂苷类、黄酮类、氨基酸等多种活性成分, 其中研究较多的为天花粉蛋白、天花粉多糖、天花粉凝集素这3种成分的药理活性、提取与检测方法, 而皂苷类成分和黄酮类成分研究较少, 停留在总皂苷或总黄酮的层面上, 缺乏化学结构鉴定及药理活性研究。天花粉蛋白是天花粉的专属性成分, 具有抗病毒、抗肿瘤、中期引产等多种药理活性, 可作为天花粉质量评价指标性成分。

关键词 天花粉; 化学成分; 质量评价; 天花粉蛋白; 天花粉凝集素; 天花粉多糖

天花粉, 又名栝楼根, 为葫芦科植物栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim.)或双边栝楼(*Trichosanthes rosthornii* Harms.)的干燥根, 具有清热泻火、生津止渴、消肿排脓等多种功效^[1], 是临床常用中药材之一。据统计, 2015年版《中国药典》(一部)收录的处方制剂和单味制剂共1 943种, 其中含有天花粉的中成药有10个之多, 约占收录总量的2.3%, 使用频次较高^[2]。再者, 天花粉为“消渴圣药”, 可“通月水”“胎衣不下”^[3]。在治疗糖尿病及终止妊娠方面具有极高的新药开发利用价值。天花粉发挥其药理活性的主要成分包括天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)、天花粉凝集素(*Trichosanthes kirilowii* lection, TKL)、天花粉多糖、瓜氨酸, 此外还包括皂苷类和黄酮类成分等^[4], 但在诸多的化学成分中并没有明确其质量控制指标性成分。2015年版《中国药典》(一部)仅规定了天花粉的“水浸出物含量(冷浸法)不得少于15.0%”^[5], 指标特异性有待提高。笔者以“天花粉”“化学成分”“质量评价”“天花粉蛋白”“天花粉凝集素”“天花粉多糖”“药理活性”“检测方法”“*Trichosanthis Radix*”“Chemical component”“Quality evaluation”“Trichosanthin”“*Trichosanthes kirilowii* lection”“Polysaccharides of trichosanthis radix”等为关键词, 组合查询1980年1月—2018年1月在中国知网、万方、维普、ScienceDirect、PubMed、Web of Science等数据库中的相关文献。结果, 共检索到相关文献857篇, 其中有效文献54篇。现对天

花粉化学成分的药理活性、提取与检测方法进行综述, 以为建立天花粉的质量评价标准提供参考。

1 TCS的药理活性、提取与检测方法

1.1 药理活性

TCS是从天花粉中分离得到的一种由19种共247个氨基酸组成的碱性(等电点为9.4)失活蛋白, 分子量约27 kD, 是仅由肽链组成的简单蛋白, 且结构中不含半胱氨酸^[6]。TCS是我国医药工作者在20世纪80~90年代根据国家计划生育基本国策所需从传统中药复方中筛选获得的具有显著终止妊娠作用的活性成分, 因此其最早应用于中期引产, 其引产机制为专一性破坏滋养层细胞^[5]。由于对滋养层细胞的破坏作用显著, TCS还被广泛用于治疗恶性葡萄胎、绒毛癌、宫颈癌等与胎盘滋养层相关的疾病^[6]。TCS属I型核糖体失活蛋白, 其可水解真核细胞核糖体的28S rRNA的4324位上的腺苷酸N-C糖苷键, 使核糖体发生不可逆失活, 从而抑制蛋白质的合成, 此特性大大提高了TCS的应用范围, 如用于抗肿瘤与抗病毒。TCS对小鼠宫颈癌U14细胞、人宫颈癌HeLa细胞、人宫颈癌Caski细胞、人卵巢癌HO8910细胞、乳腺癌MDA-MB-231和MCF-7细胞、人白血病HL-60细胞、人白血病K562细胞、淋巴瘤细胞、人黑色素瘤细胞、结肠癌SW-620细胞、结肠癌CMT-93细胞、人胃癌SGC-7901细胞、食管癌Eca-109细胞、肝癌H22细胞、肺癌A549细胞、鼻咽癌CNE2细胞、小鼠前列腺癌RM-1细胞、前列腺癌PC3细胞等均表现出显著的抗肿瘤作用^[7]。高富红等^[8]对TCS的抗肿瘤机制进行了总结分析, 认为TCS发挥抗肿瘤活性除与抑制蛋白合成相关外, 还可通过抑制细胞生长、诱导细胞凋亡、增强红细胞免疫功能、调节免疫系统(增强自然杀伤细胞活性、调节细胞

Δ 基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2017BH010)

* 本科生。研究方向: 中药质量控制。电话: 0539-7258630。

E-mail: djy201620020131@163.com

通信作者: 讲师, 博士。研究方向: 中药质量控制与品质评价。

电话: 0539-7258630。E-mail: zhangboyxy@lyu.edu.cn

因子、激活补体系统、增强细胞免疫和体液免疫功能)等途径发挥作用。研究表明,TCS对多种病毒具有抑制作用,包括乙脑病毒、流感病毒、单纯疱疹病毒、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒、麻疹病毒、肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒等,其作用机制包括核糖体失活作用、抑制病毒DNA聚合酶或核酸内切酶活性、选择性杀死病毒感染细胞、介导趋化因子等^[9]。

1.2 提取与纯化方法

TCS属于水溶性碱性蛋白质,其提取方法主要采用偏酸性的盐溶液提取,而纯化方法主要有丙酮分级沉淀法和盐析法^[10]。

1.2.1 丙酮分级沉淀法 丙酮分级沉淀法最早由汪猷^[4]提出,该法以新鲜栝楼根为原料,经去皮、捣碎、榨汁、过滤后,上清液用盐酸(2 mol/L)调节pH至4.0左右,再加入原汁体积0.8倍的丙酮,离心去除沉淀。上清液再加入原体积0.5倍量的丙酮,此次离心所得沉淀经蒸馏水溶解并透析后得TCS提取物,得率为0.1%~0.15%。

1.2.2 盐析法 硫酸铵溶解度大,溶解后可形成大量的铵根正离子和硫酸根离子,可竞争结合蛋白表面的水分子,破坏其水化膜,降低蛋白溶解度,进而聚集沉淀,是盐析法最常用的无机盐之一。孙建忠等^[11]用生理盐水抽提粉碎后的栝楼根块茎,然后加硫酸铵至滤液中使其浓度至90%,离心收集沉淀经凝胶过滤后即可获得TCS,与结晶法比较该方法提取周期短,且保持了TCS的活性。马翠丽等^[12]以新鲜栝楼根为原料,经去皮、粉碎、榨汁后,第一次向原汁中加入硫酸铵粉末使其浓度达到40%,沉淀离心后取上清,再加硫酸铵使其浓度达到75%,离心后得天花粉蛋白粗提物(沉淀)。经蒸馏水透析和柱层析纯化后,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果显示,天花粉蛋白为1条或2条完全分离的条带,表明该方法简单、高效。

1.2.3 以干栝楼根为原料的TCS提取与纯化方法 TCS最早从新鲜栝楼根中提取,但新鲜栝楼根市场使用量少,且水分含量大不易长期保存,因此近年来研究多以干栝楼根为原料。杨焯等^[13]以干栝楼根为原料,粉碎后过筛,用氯化钠(0.15 mol/L)搅拌过夜提取,过滤,上清液用醋酸盐缓冲液(0.5 mol/L, pH=2.0)调节pH=3.0,离心取上清,再用磷酸盐缓冲液(0.5 mol/L, pH=7.0)调节pH=6.5,然后用30%~85%硫酸铵分级沉淀,85%所得沉淀组分经透析、Sephacrose CL-6B层析柱纯化后得TCS纯品(得率为2.2%),SDS-PAGE与PAGE结果均显示1条条带,表明该方法可用于干栝楼根为原料的TCS提取制备。汪苗苗等^[14]以干栝楼根为原料,采用硫酸铵分级沉淀法制备TCS粗提物,并进一步利用双水相技术纯化后得到了TCS纯品,其优选的最佳硫酸铵分级沉淀条件为固液比1:12,浸泡时间24 h,溶液pH在5.0左右,最终得率为0.08%。Maraganore JM, Narayanan P等^[15-16]

采用磷酸盐缓冲液匀浆提取法,从干栝楼根中提取TCS粗品,利用柱层析或反相高效液相色谱(RP-HPLC)进一步纯化获得TCS纯品。

与丙酮分级沉淀法比较,盐析法不使用有机溶剂,减少了提取过程对人体和环境的危害,且缩短了制备周期,方法更加简便,可应用于干栝楼根为原料的TCS提取,是比较理想的提取TCS的方法。

1.3 检测方法

1.3.1 紫外分光光度法 TCS本质是一种蛋白质,具有蛋白质的共性,所以常规蛋白质的检测方法如凯氏定氮法和紫外分光光度法均可用于TCS的定量检测^[17]。根据显色剂的不同,紫外分光光度法又可分为双缩脲法、Folin-酚法、考马斯亮蓝染色法和二喹啉甲酸(BCA)法等。张波等^[18]采用考马斯亮蓝染色法检测了雌雄栝楼根中TCS的含量差异。此外,2015年版《中国药典》(一部)采用Folin-酚法,以牛血清白蛋白为对照品,用以检测雷丸中的雷丸素含量作为其质量评价指标,为中药蛋白质类成分的质量检测标准方法提供了借鉴^[1]。但此类检测方法缺乏专一性,且检测结果易受基质干扰。

1.3.2 HPLC法 HPLC法是各国药典应用最多的质量控制方法,但其多用于小分子化合物的定性定量检测。对于TCS的定量检测,李艳萍等^[19]以硅胶基TSK-G3000SW凝胶柱为HPLC的固定相,以0.02 mol/L磷酸二氢钠-0.15 mol/L氯化钠-95%乙醇(45:45:10, V/V/V)为流动相,结果TCS保留时间为16 min,检测限为0.625 μg/mL。与紫外分光光度法比较,HPLC法对样品纯度要求较高,因此目前只适用于TCS注射液的检测,若应用于基质复杂的天花粉提取液仍有一定难度。

1.3.3 免疫检测法 免疫检测技术是基于抗原抗体特异性结合反应实现定性检测,结合抗原抗体标记技术而实现定量检测的技术,在中药质量安全性和有效性快速评价中应用广泛^[20]。TCS是大分子化合物,对于实验动物(小鼠、兔、羊等)来说是免疫原性较强的异源蛋白,因此很容易致敏动物从而获得抗血清,或进一步利用单克隆抗体技术制备单克隆抗体^[21-23]。利用放射性同位素或酶标记抗体后,通过检测放射性信号或酶促反应信号即可实现TCS的定量检测。马恒东等^[24]以放射性同位素¹²⁵I标记TCS,采用双抗体法进行牛奶中TCS的放射性免疫分析(RIA),其灵敏度为87.7 pg/管,平均回收率为100.29%。同理,郑亦辉等^[25]也建立了检测牛奶中TCS的RIA法,其灵敏度为0.3 ng/管。与紫外分光光度法、HPLC法比较,RIA法虽然灵敏度较高,但其存在放射性污染且对实验室条件要求苛刻,而以酶标记代替放射性同位素而发展起来的免疫检测方法,也称酶联免疫吸附试验(ELISA),其能有效避免放射性污染,且具有操作简单、检测快速、高通量等优势。冯成强等^[26]用TCS纯品免疫新西兰大耳兔后,制备了抗TCS的多克隆抗体,

然后建立了定性定量检测 TCS 的间接竞争 ELISA 检测法,该方法灵敏度为 10 ng/mL,并将此法应用于天花粉的真伪鉴别。结果显示,新鲜栝楼根和天花粉饮片中均有检出 TCS,而天花粉伪品(王瓜根、湖北栝楼根、木鳖子根、异叶马兜铃根等)均未检出 TCS,说明通过 ELISA 检测 TCS,可用于天花粉的真伪鉴定。

TCS 的定性定量检测方法较多,与紫外分光光度法、HPLC 法、RIA 法比较,ELISA 具有免疫检测技术的高度专一性,且灵敏度高,操作更加简便,样品前处理简单(无需柱层析纯化),无有机溶剂和放射性污染的优点,是天花粉中 TCS 检测的较为理想的检测方法。

2 TKL 的药理活性、提取与检测方法

2.1 药理活性

TKL 是从天花粉中分离得到的一种由两条肽链构成的专一结合半乳糖的蛋白质,其分子量约为 60 kD,等电点约为 5.5,结构中有一个疏水微区,无金属离子结合部位^[27]。TKL 被认为是天花粉降糖作用的主要活性成分。李琼等^[28]以盐酸二甲双胍为阳性对照,将 TKL 分为低、中、高(0.3、0.6、0.9 g/kg)3 个剂量分别灌胃链脲佐菌素诱导的糖尿病模型大鼠,3 周后结果显示,TKL 可显著改善糖尿病大鼠的血糖异常,增强大鼠抗氧化能力。其后又研究了 TKL 对自发性 2 型 KK-Ay 糖尿病小鼠血糖、血脂的影响,结果表明,TKL 对 KK-Ay 糖尿病小鼠的血糖、血脂水平均有显著的调节作用,TKL 可促进糖、脂代谢良性循环^[29]。此外,TKL 还可降低补体溶血^[30]。

2.2 提取与检测方法

同 TCS 一样,TKL 属于蛋白质类成分,提取与检测方法类似。目前已报道的 TKL 的提取方法以无机盐溶液浸提-硫酸铵分级沉淀法纯化为主。李琼等^[31]采用磷酸盐缓冲液浸提天花粉中的 TKL,通过硫酸铵分级沉淀和蒸馏水透析纯化后,利用考马斯亮蓝染色法检测 TKL 含量,并利用单因素试验和正交试验考察了以磷酸盐缓冲液提取 TKL 的最佳工艺,最终确定料液比为 1:30 (g/mL),提取时间为 24 h,缓冲液 pH 为 7.2,硫酸铵饱和度为 70%,结果表明由优化工艺提取得到的 TKL 降糖活性较好。

3 天花粉多糖的药理活性、提取与检测方法

天花粉多糖是从天花粉中分离得到的一种多糖类成分,但由于分离纯化的方法不同、检测方法及标准品不同,导致测定的相对分子量(M_r)及其单糖组成存在差异。黄晓兰等^[32]利用超声波振荡提取、乙醇沉淀制备天花粉粗多糖,然后用重结晶、色谱柱纯化获得精制天花粉多糖,分别利用气相色谱-质谱(GC-MS)、HPLC 和凝胶渗透色谱(GPC)分析了天花粉多糖的单糖组成及其 M_r 。结果显示,天花粉粗多糖及精制后的多糖均是由葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖、果糖、甘露糖组成的杂多糖,且 GPC 显示粗多糖和多糖均有 2 个有效峰,但其

M_r 存在差异:粗多糖的 M_r 分别为 181 000 和 1 460,而精制天花粉多糖的 M_r 分别为 160 000 和 4 554。屠婕红等^[33]经水提醇沉提取及多步柱纯化后精制的天花粉活性多糖 RIPS-1 的 M_r 为 17 555,且经 GC、GPC、红外光谱、核磁共振分析确定其是由葡萄糖组成的均多糖。许林琴等^[34]通过高效凝胶渗透色谱法研究了天花粉多糖的 M_r ,结果表明,天花粉多糖的重均 M_r 在 7 555~15 423 之间。

3.1 药理活性

3.1.1 免疫增强活性 徐水凌等^[35]采用噻唑蓝(MTT)法测定了不同浓度天花粉多糖的促人外周血单个核细胞淋巴细胞增殖作用,结果表明,天花粉多糖具有显著的免疫增强作用,可促进人外周血单个核细胞淋巴细胞的增殖和活化作用,上调 T 细胞含量,并诱导外周血单个核细胞淋巴细胞高水平分泌肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6。

3.1.2 抗肿瘤活性 曹丽莉等^[36]在人乳腺癌 MCF-7 细胞培养液中添加不同浓度的天花粉多糖(0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$),并采用 MTT 法观察 MCF-7 细胞的生长情况。结果证实,10 $\mu\text{mol/L}$ 以上的天花粉多糖培养 2 d 即可诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡,凋亡率为 27.6%。赵桂珠等^[37]用添加了不同浓度(0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mmol/L)天花粉多糖的培养基培养人宫颈癌 HeLa 细胞和人乳腺癌 MCF-7 细胞 3 d,结果表明,5.0 mmol/L 以上的天花粉多糖仅培养 1 d 即可有效抑制人宫颈癌 HeLa 细胞和人乳腺癌 MCF-7 细胞生长,抑制率分别为 53.1%、29.0%。

3.1.3 降糖活性 Hikino H 等^[38]从天花粉中分离得到了 5 种多糖类成分,即 Trichosans A、B、C、D、E,这 5 种多糖在正常大鼠中均可表现出降糖活性,其中 Trichosans A 可显著降低四氧嘧啶引起的糖尿病模型大鼠血糖浓度,且经检测 Trichosans A 的组成为鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖、果糖(摩尔比 0.8:2.0:0.4:1.0:0.2:0.3),与黄晓兰等^[32]的研究结果相似。

3.2 提取与检测方法

天花粉多糖的提取方法总体上以水提醇沉法为主,其中水提方法包括回流提取^[39]、超声提取^[40-41]、微波提取^[42]等,醇沉方法均为添加乙醇使提取液中乙醇浓度达到 80%,多糖即可析出。为消除天花粉中脂溶性成分、单糖、低聚糖、苷类成分对多糖提取的影响,研究者使用石油醚、乙醚和 80%乙醇加热回流处理后再进一步提取多糖^[39,41]。黄晓兰等^[40]优选的天花粉多糖超声波振动提取条件为温度 45 $^{\circ}\text{C}$ 、料液比 1:5 (g/mL)、提取时间 2 h。谭志灿等^[41]采用星点设计-效应面法优选的天花粉多糖超声提取最佳条件为温度 52 $^{\circ}\text{C}$ 、料液比 1:16 (g/mL)、超声提取 2 次、每次 71 min,多糖提取率可达 4.36%。微波具有极强穿透力,可用于细胞破壁,提高提取率。王莉等^[42]采用微波技术提取天花粉中多糖,整个提取过程约

40 min,且多糖提取率由回流提取法的0.84%提高到18.30%。与水提醇沉法比较,纤维素酶法具有设备需求简单、提取率高、成本低、适于工业化生产等优点。牛宪立等^[43]优选了纤维素酶法提取天花粉多糖的最佳工艺为温度60℃、pH 5.0、酶用量0.2%、提取时间1.5 h,天花粉多糖得率为5.48%。

目前天花粉多糖的含量测定方法大多采用糠醛缩合显色-紫外分光光度法(或苯酚-硫酸分光光度法或蒽酮-硫酸分光光度法)^[39-43],在2015年版《中国药典》(一部)中广泛应用于玉竹多糖、灵芝多糖、昆布多糖、金樱子多糖、枸杞多糖、铁皮石斛多糖、海藻多糖和黄精多糖等中药多糖成分的含量测定^[1]。

4 天花粉中总皂苷的药理活性、提取与检测方法

4.1 药理活性

陈颖等^[44-45]以熊果酸为对照品,以香草醛-冰醋酸为显色剂,采用紫外分光光度法测定了天花粉中总皂苷含量,结果表明天花粉约含有1.9%~2.4%的总皂苷,且皂苷类成分表现出较强的体外抗氧化活性^[46]。李晓芳等^[47]从天花粉中分离纯化了1个四环三萜类化合物,进一步药理实验表明,该化合物对四氧嘧啶诱导的糖尿病模型小鼠表现出显著的降糖作用。此外,陈颖等^[48]研究发现,天花粉皂苷对缺血性脑血管疾病具有较好的治疗作用。

4.2 提取与检测方法

天花粉总皂苷的提取方法有2种,即乙醇超声提取和乙醇回流提取。陈颖等^[44]优选的天花粉总皂苷超声辅助萃取条件为温度80℃、乙醇体积分数80%、提取时间10 min。黄庆勇等^[49]优选的回流提取条件为料液比1:15(g/mL)、乙醇体积分数48%、温度85℃、时间120 min。天花粉总皂苷的含量测定方法主要以5%香草醛-冰醋酸和高氯酸为显色剂的紫外分光光度法为主^[45]。

5 瓜氨酸的药理活性、提取与检测方法

天花粉中富含多种氨基酸。张波等^[50]采用柱前衍生HPLC法检测了雌、雄栝楼根中的氨基酸含量,结果表明天花粉中含有17种氨基酸,其中必需氨基酸7种(苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸),非必需氨基酸10种,且雌、雄栝楼根中氨基酸组成比例差异明显,雄株碱性氨基酸(尤其是精氨酸)含量高于雌株,而酸性氨基酸低于雌株。瓜氨酸是一种非蛋白质 α -氨基酸,具有抗衰老、增强免疫力活性,由于瓜氨酸可在人体内转换成精氨酸,因此瓜氨酸还可用于治疗精氨酸缺乏引起的系列疾病,如心血管类疾病、糖尿病、代谢性疾病等^[51]。2015年版《中国药典》(一部)采用乙醇超声提取^[1],茚三酮显色的薄层色谱法检测瓜氨酸的有无作为天花粉真伪鉴定的主要依据之一。天花粉中瓜氨酸的提取主要以乙醇超声提取为主,检测方法则以薄层色谱法和柱前衍生-HPLC法为主。

6 其他成分

除TCS、TKL、天花粉多糖、三萜皂苷和氨基酸外,天花粉中还含有黄酮类成分、葫芦素B、淀粉以及微量元素。天花粉中黄酮类成分含量极低,以至于汪猷^[4]认为天花粉中不含黄酮,而杨申明等^[52]利用1%氢氧化钠、三氯化铝甲醇溶液、盐酸-镁粉、浓硫酸等进行显色反应定性鉴定天花粉中含黄酮,并利用亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定天花粉总黄酮,结果其平均含量约为0.1184 mg/g。葫芦素B是天花粉中的毒性成分,剂量越大毒副作用越明显,可致人出现恶心、呕吐、腹泻等症状,其在天花粉伪品中的含量比正品高出1 000倍。彭朝霞等^[53]采用超声提取法提取天花粉并建立了检测葫芦素B含量的HPLC法,为天花粉中葫芦素B的含量检测提供了参考。天花粉中含有大量淀粉,在其性状鉴定中亦有“粉性足者佳”的说法。此外,天花粉中还含有大量微量元素,包括铁、锰、锌、铜、钙等^[54]。

7 结语

通过以上对天花粉中化学成分的药理活性和提取与检测方法的系统梳理可知,天花粉中虽然含有多种活性成分,但以TCS、TKL、天花粉多糖三者研究最为广泛,且TCS是目前研究的热点;而对于皂苷类成分和黄酮类成分的研究则相对较少,尤其在化学结构的鉴定和药理活性的筛选方面存在较多空白,有待研究。

以《中国药典》为标准的中药质量评价方法现阶段多以单个、多个或一类具有相关药理活性或相对特异性的化学成分为指标,设置最低含量要求。而天花粉虽然具有显著的临床疗效和广泛的临床应用,但其药典标准中以“水浸出物总量”为质量评价指标缺乏特异性。通过本文的归纳分析,笔者认为TCS的药理活性最为广泛、作用机制较为清晰、提取与检测方法成熟,且是天花粉中的特异性成分,既可起到药材真伪鉴定的作用,又部分反映了天花粉的主要药理活性,是较为理想的真伪鉴定及品质评价指标性成分。因此,笔者建议对于天花粉及其饮片可建立以TCS为指标性成分的基于盐析法提取-ELISA定量检测的质量评价标准。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:56-1726.
- [2] 明·李时珍.本草纲目[M].北京:人民卫生出版社,1982:1267.
- [3] 冯果,陈娟,刘文,等.天花粉有效成分及药理活性研究进展[J].微量元素与健康研究,2015,32(6):59-62.
- [4] 汪猷.天花粉蛋白[M]. 2版.北京:科技出版社,2000:21-47.
- [5] 钱瑞卿.天花粉蛋白[J].科学,1986,38(2):89-93.
- [6] 李枝玲,丁玉,白云峰.天花粉蛋白的药用研究概况[J].中国药房,2007,18(36):2868-2870.
- [7] 周海洋,卜平,董小耘,等.天花粉蛋白抗肿瘤作用及机制的研究进展[J].医学综述,2017,23(16):3197-3201.

- [8] 高富红,孙健,吴国娟.天花粉蛋白抗肿瘤作用机理研究概况[J].动物医学进展,2005,26(11):9-11.
- [9] 张茹,黄利鸣,岑畅飞.天花粉蛋白作用机制研究进展[J].时珍国医国药,2009,20(12):3116-3117.
- [10] 王飞,丁玉,陈明达,等.天花粉蛋白的纯化技术进展及其药理概况[J].安徽农业科学,2010,38(1):29-30.
- [11] 孙建忠,季瑞华,王克夷.简便快速分离天花粉毒蛋白的一种方法[J].生物化学杂志,1994,10(6):740-742.
- [12] 马翠丽,毕黎琦.天花粉蛋白新有效组分的纯化及相对分子质量测定[J].吉林大学学报(医学版),2008,34(2):332-335.
- [13] 杨焯,范翔,李刚锐,等.天花粉蛋白的制备及其性质[J].华西药理学杂志,2014,29(5):510-512.
- [14] 汪苗苗,丁玉.天花粉蛋白的盐析工艺和亲和双水相分离工艺[J].中国食品添加剂,2012(1):128-133.
- [15] MARAGANORE JM, JOSEPH M, BAILEY MC. Purification and characterization of trichosanthin[J]. *J Biol Chem*,1987,262(24):11628-11633.
- [16] NARAYANAN P, MAK NK, LUONG PB, et al. Isolation and characterization of new isoforms of trichosanthin from *Trichosanthes kirilowii*[J]. *Plant Sci*,2002,162(1):79-85.
- [17] 周跃男,王湛,赵小川,等.浅谈蛋白质含量的定量检测方法[J].食品研究与开发,2014,35(7):127-130.
- [18] 张波,刘红燕,李佳,等.基于植株性别差异的天花粉多糖、蛋白质含量比较[J].中国药师,2014,17(4):617-619.
- [19] 李艳萍,戎隆富,杜贤宇,等.高效液相色谱检测聚乙二醇化天花粉蛋白方法比较[J].现代生物医学进展,2006,6(8):10-11.
- [20] 张波,南铁贵,孙晴,等.免疫检测技术在中药质量快速评价中的应用[J].中国中药杂志,2017,42(3):420-427.
- [21] 黄嘉陵,吴筱兰,李淑贞,等.分泌抗天花粉蛋白单克隆抗体的淋巴细胞杂交瘤细胞系(简报)[J].实验生物学报,1983,16(4):120-123.
- [22] 杨黎明,马宝骊,周莉莉,等.小鼠抗天花粉蛋白单克隆抗体的制备和鉴定[J].上海免疫学杂志,1991,11(1):23-24.
- [23] 赵巧云,黎志东,宋纪蓉,等.天花粉蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系的制备及鉴定[J].科学技术与工程,2006,6(9):1188-1192.
- [24] 马恒东,郑亦辉,金善炜,等.奶中天花粉蛋白放射免疫分析法的建立[J].核农学通报,1993,14(3):134-138.
- [25] 郑亦辉,马恒东,何玉龙,等.牛奶中天花粉蛋白的放射免疫测定[J].中国兽医杂志,1994,20(3):6-8.
- [26] 冯成强,黄璐琦,柳川,等.蛋白免疫检测技术在天花粉真伪鉴别中的初步研究[J].中国药学杂志,2005,40(8):574-577.
- [27] 孙建忠,王克夷.天花粉凝集素的荧光光谱研究[J].生物化学与生物物理学报,1994,26(6):649-655.
- [28] 李琼,张鹏,郭晨,等.天花粉凝集素对糖尿病大鼠血糖及氧化应激的影响[J].食品工业科技,2015,36(10):356-359.
- [29] 李琼,张鹏,郭晨,等.天花粉凝集素对2型KK-Ay糖尿病小鼠血糖、血脂的调节作用[J].西南大学学报(自然科学版),2016,38(2):182-188.
- [30] 潘华珍,李彩华,王克夷,等.天花粉凝集素对红细胞补体敏感溶血作用的影响[J].生物化学与生物物理进展,1984(3):36-38.
- [31] 李琼,叶小利,曾红,等.天花粉凝集素的提取工艺及降糖活性研究[J].中药材,2012,35(3):475-479.
- [32] 黄晓兰,吴惠勤,王蔚,等.天花粉多糖的单糖组成和相对分子质量的测定[J].中草药,2008,39(12):1810-1812.
- [33] 屠婕红,黄佳,傅应华,等.天花粉免疫活性多糖RTPS-I的分离及性质结构研究[J].中国药师,2017,20(2):270-273.
- [34] 许林琴,舒梦珂,屠婕红. HPGPC法测定天花粉免疫活性多糖的相对分子质量[J].海峡药学,2015,27(9):56-58.
- [35] 徐水凌,赵桂珠,屠婕红,等.天花粉多糖对人外周血单个核细胞的免疫活性作用[J].中国中药杂志,2010,35(6):745-749.
- [36] 曹丽莉,徐妍,徐水凌,等.天花粉多糖诱导人乳腺癌MCF-7细胞凋亡及其Caspase-3和Caspase-8活化对凋亡的影响[J].浙江大学学报(医学版),2012,41(5):527-534.
- [37] 赵桂珠,朱逢佳,徐水凌,等.天花粉多糖促人外周血单个核细胞增殖和对人乳腺癌细胞人子宫颈癌细胞的生长抑制作用[J].时珍国医国药,2011,22(9):2140-2142.
- [38] HIKINO H, YOSHIZAWA M, SUZUKI Y, et al. Isolation and hypoglycemic activity of Trichosans A, B, C, D, and E: Glycans of *Trichosanthes kirilowii* roots[J]. *Planta Med*,1989,55(4):349-351.
- [39] 鲁建江,王莉,顾承志,等.天花粉多糖的提取及含量测定[J].天津药学,2001,13(2):54-55.
- [40] 黄晓兰,吴惠勤,王蔚,等.天花粉多糖的提取、分离与纯化研究[J].中草药,2008,39(11):1662-1665.
- [41] 谭志灿,丘思兰,黄洁靖,等.星点设计-效应面法在天花粉多糖提取工艺中的应用[J].中南药学,2015,13(5):481-483.
- [42] 王莉,鲁建江,顾承志,等.天花粉多糖的微波提取及含量测定[J].药学实践杂志,2001,19(3):168-169.
- [43] 牛宪立,姬可平,钟静君,等.纤维素酶法提取天花粉多糖的工艺优化[J].贵州农业科学,2014,42(7):164-166.
- [44] 陈颖,孙海燕,曹银萍,等.正交实验优选天花粉总皂苷的提取工艺[J].时珍国医国药,2011,22(7):1668-1669.
- [45] 陈颖,董孝刚,孟丽,等.天花粉中总三萜皂苷的含量分析[J].中国野生植物资源,2010,29(4):61-63.
- [46] 陈颖,周岩,曹银萍,等.天花粉总皂苷的提取及其清除DPPH自由基作用的研究[J].药物生物技术,2010,17(5):397-399.
- [47] 李晓芳,叶小利,李平,等.天花粉降血糖活性成分的分离和活性观察[J].中成药,2011,33(12):2175-2178.

三七的指纹图谱研究概述[△]

柯昌虎^{1*}, 黄慧敏¹, 赵阳², 李志浩^{1#} (1. 湖北医药学院附属东风医院药学部, 湖北十堰 442000; 2. 西安交通大学第二附属医院药物临床试验机构, 西安 710004)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1864-09
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.32

摘要 目的: 为全面控制中药三七的质量提供参考。方法: 以“三七”“指纹图谱”“*Panax notoginseng*”“Fingerprint”等为关键词, 组合查询2003年1月—2017年12月在中国知网、万方、维普、PubMed等数据库中的相关文献, 对三七指纹图谱的相关研究进行综述。结果与结论: 共检索到相关文献209篇, 其中有效文献80篇。目前三七指纹图谱分析方法主要有色谱法(包括高效液相色谱法、薄层色谱法、毛细管电泳色谱法、气相色谱法等)、光谱法(包括红外光谱法、紫外光谱法、荧光光谱法、核磁共振等)、非线性化学法、生物学方法等。三七化学指纹图谱的研究报道较多, 特别是色谱指纹图谱广泛应用于三七及其制剂的质量评价, 而基于其指纹图谱与药效作用结果的谱-效关系研究有待进一步深入。

关键词 三七; 指纹图谱; 检测技术; 质量控制

中药三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 为五加科人参族植物, 盛产于云南、广西、贵州等地区, 药用历史已达数百年, 是我国治疗血证的传统中药, 被认定为“外伤科之圣药、止血之神药、理血之妙品”^[1]。三七的根茎(剪口)、支根(筋条)、叶、花等部位均可用于治疗疾病, 且常以主根入药^[2], 是三七化瘀口服液、三七配方颗粒、三七通舒胶囊、血塞通注射液等中药制剂的有效成分之一, 以其为配方的许多制剂大多纳入了《国家基本药物目录》。现代药理学研究发现, 三七药材在止血活血、保护心血管、保护神经系统、抗炎、抗肿瘤等方面药效显著, 主要依赖其天然皂苷类活性成分。目前已从三七不同部位中分离出80余种达玛烷型皂苷, 人参皂苷 Rb₁ (G-Rb₁)、人参皂苷 Rd (G-Rd)、人参皂苷 Re (G-Re)、人参皂苷 Rg₁ (G-Rg₁) 和三七皂苷 R₁ (N-R₁) 这5种皂苷成分常用于三七药材含量分析及内在质量控制的考察指标^[3-5]。其中, G-Rb₁、G-Rg₁、N-R₁ 在三七总皂苷中含量分别高达30%、20%、2.5%^[6], 在2015年版《中国

药典》(一部)中, 上述3种成分被列为三七的药材和相关制剂的质量控制指标^[7]。

由于受到产地、生长环境、年限、采收时间等因素的影响, 三七药材质量不一, 从而直接造成临床用药疗效的不稳定, 加之市场上三七药材质量差异大, 商品质量更是真伪难辨, 给临床用药安全带来危害^[8-9]。目前在相关研究中, 由于缺乏皂苷参照或色谱分离能力差, 半数以上的总皂苷还不能被定量检测, 而可供的参照物远远不符合分析要求^[6, 10]。因此, 借助现代技术, 全面、系统地控制三七药材内在质量, 对确保产品的安全与稳定尤为重要。指纹图谱分析是基于现代光谱、色谱、分子生物学技术等方法而建立起来的质量控制模式, 并逐步应用于中药质量控制领域, 成为确定其身份、真实性和一致性的有力工具。与经验鉴别“辨状论质”、初期的理化鉴别等传统质量控制方法比较, 指纹图谱可以更全面地反映出中药复杂体系的内部状况, 获得准确而完整的指纹, 实现中药的稳定与可控, 现已成为诸多中药及其

[48] 陈颖, 周岩, 黄立勇, 等. 天花粉皂苷及其在制备治疗缺血性脑血管疾病药物中的用途: 中国, 101983637A[P]. 2011-03-09.
[49] 黄庆勇, 叶森, 李煌, 等. 响应面法优选天花粉总皂苷的提取工艺[J]. 中成药, 2015, 37(7): 1595-1599.
[50] 张波, 刘红燕, 李佳, 等. 基于性别差异的栝楼药用部位氨基酸含量比较研究[J]. 中国药师, 2014, 17(9): 1517-

1519.
[51] 刘娟, 路欣欣, 孟慧. 瓜氨酸的药理作用及生产方法的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2011, 29(3): 173-175.
[52] 杨申明, 王振吉, 韦薇, 等. 天花粉中总黄酮提取工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(5): 870-874.
[53] 彭朝霞, 曹敏, 张运杰, 等. HPLC测定天花粉中葫芦素B的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(11): 946-948.
[54] 夏侯国论, 刘丽华, 李银保. 微波消解-火焰原子吸收法测定天花粉中的微量元素[J]. 赣南医学院学报, 2009, 29(3): 321-322.

[△] 基金项目: 湖北省卫生和计划生育委员会科研立项项目(No. WJ2017F080); 十堰市科学技术研究与开发项目(No. 17Y58)

* 硕士。研究方向: 中药活性成分与质量控制。电话: 0719-8272595。E-mail: kchdfzyy@163.com

通信作者: 副主任药师, 副教授。研究方向: 中药分析与筛选。电话: 0719-8272346。E-mail: 281395565@qq.com

(收稿日期: 2018-03-01 修回日期: 2018-05-08)
(编辑: 余庆华)