

活性导向分离瓜蒌皮中具有抗肾素作用的成分

王辉俊, 柯 樱, 叶 冠*

上海医药集团股份有限公司, 上海 201203

摘要: 目的 基于活性导向分离瓜蒌皮 *Trichosanthis Pericarpium* 中具有抗肾素作用的成分。方法 瓜蒌皮经水提醇沉后取上清液, 然后透析截留获相对分子质量 1 000 以上的部分 (GLP), GLP 经活性跟踪测定、DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换树脂分离和 Superdex-75 系列凝胶纯化后得 GLP-5-1, 并对 GLP-5-1 进行 HPGPC 法分析、单糖组成测定和肾素抑制活性检测。结果 采用活性跟踪方法, 从瓜蒌皮中得到一种具有肾素抑制作用的均一多糖 GLP-5-1, 相对分子质量为 3 722, 主要由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 4 种单糖的物质的量比为 5.5 : 4.4 : 6.9 : 10.0, GLP-5-1 表现出较强的肾素抑制活性, 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $(87.4 \pm 6.8) \mu\text{g/mL}$ 。结论 从瓜蒌皮中成功分离到具有肾素抑制作用的低相对分子质量的多糖, 为瓜蒌皮的化学物质基础研究提供依据。

关键词: 瓜蒌皮; 多糖; 活性导向分离; 抗肾素作用; 化学物质基础

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)19-3935-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.006

Bioactivity guide isolation of anti-renin constituents from *Trichosanthis Pericarpium*

WANG Hui-jun, KE Ying, YE Guan

Shanghai Pharmaceuticals Holding Co., Ltd., Shanghai 201203, China

Abstract: **Objective** To isolate anti-renin constituents from *Trichosanthis Pericarpium* based on bioactivity tracking separation. **Methods** *T. Pericarpium* was extracted with boiling water and precipitated by ethanol, the supernate was collected and dialyzed, and the retentate was lyophilized giving GLP, then successively separated by DEAE Sepharose Fast Flow anion-exchange and Superdex-75 gel permeation chromatographic steps, to give GLP-5-1. A combination of HPGPC, monosaccharide composition, and anti-renin studies was performed to investigate the structure and bioactivity. **Results** An anti-renin polysaccharide, GLP-5-1, was obtained from *T. Pericarpium* based on activity tracking, the average molecular weight was estimated to 3 722, monosaccharide composition analysis showed GLP-5-1 contained arabinose, mannose, glucose, and galactose with the ratio of 5.5 : 4.4 : 6.9 : 10.0. GLP-5-1 showed potent anti-renin effect with the IC_{50} was $(87.4 \pm 6.8) \mu\text{g/mL}$. **Conclusion** In this study, a low molecular weight polysaccharide with anti-renin effect was isolated from *T. Pericarpium*, which could lay the foundation for the substance basis study of *T. Pericarpium*.

Key words: *Trichosanthis Pericarpium*; polysaccharide; activity tracking isolation; anti-renin effect; chemical substance basis

瓜蒌皮 *Trichosanthis Pericarpium* 为葫芦科栝楼属植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 或双边栝楼 *Trichosanthes rosthornii* Harms 的干燥成熟果皮^[1]。瓜蒌皮注射液为上药集团旗下子公司上海第一生化药业有限公司独家产品, 是以瓜蒌皮为原料, 经水提醇沉, 再经过离子交换树脂洗脱而制成的灭菌水溶液, 临床上用于冠心病、稳定型心绞痛的治疗, 具有行气除满、开胸除痹之功效^[2]。瓜蒌

皮注射液临床应用广泛, 但物质基础尚不明确。目前对瓜蒌皮的化学成分研究也主要集中在小分子上, 如从瓜蒌皮中分离出脂肪酸^[3]、甾醇^[4-5]、黄酮^[6]、氨基酸^[7]、核苷酸^[8]和生物碱^[9-10]等成分, 但瓜蒌皮中多糖类成分却鲜有报道。肾素-血管紧张素系统 (RAS) 是一种参与调节血压和体液电解质平衡的内分泌系统, 肾素抑制剂能够直接从源头上阻断 RAS, 有效减少 Ang I、Ang II 的生成, 在抗高血压

收稿日期: 2017-05-18

基金项目: 上海市科委科研项目 (15DZ1900101); 中国博士后科学基金面上资助项目 (2016M601637)

作者简介: 王辉俊 (1985—), 男, 博士, 在站博士后, 从事中药和天然药物的研发工作。Tel: (021)61871700-8253 E-mail: wanghuijun@sphchina.com

*通信作者 叶 冠 (1974—), 男, 博士, 教授级高级工程师, 从事中药和天然药物的研发工作。Tel: (021)61871700-8088 E-mail: yeg@sphchina.com

作用的同时可以显著抑制动脉粥样硬化和冠心病的进展^[11],促进斑块的稳定,同时像阿利吉仑等肾素抑制剂在降低心功能不全、改善心室肥厚和缓解心绞痛等方面发挥重要作用^[12]。鉴于此,本实验将瓜蒌皮按照瓜蒌皮注射液国家药品标准进行提取,并以抗肾素活性跟踪为前提,对透析截留后的袋内大分子部分进行活性跟踪分离纯化和结构分析,得到1种具有肾素抑制作用的均一多糖 GLP-5-1,相对分子质量为3 722,主要由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,为阐明瓜蒌皮注射液的化学物质基础提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

瓜蒌皮 20 kg 购自上海康桥中药饮片有限公司(产地山东;批号 150825),经上海医药集团股份有限公司中央研究院中药研究所教授级工程师叶冠鉴定为栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥成熟果皮;DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换树脂和 Superdex 系列分子筛凝胶柱购自通用电气 GE Healthcare;普鲁兰多糖 P-82 标准品套装:P-5、P-10、P-20、P-50、P-100、P-200、P-400、P-800,Shodex 公司;水为超纯水(实验室自制);单糖标准品 *D*-葡萄糖(批号 G8270,质量分数 $\geq 99.5\%$)、*D*-阿拉伯糖(批号 E003256,质量分数 $\geq 99\%$)、*L*-岩藻糖(批号 F2252,质量分数 $\geq 99\%$)、*L*-鼠李糖(批号 R3875,质量分数 $\geq 99\%$)、*D*-甘露糖(批号 1375182,质量分数 $\geq 99\%$)、*D*-木糖(批号 X1500,质量分数 $\geq 99\%$)、*D*-半乳糖(批号 G0750,质量分数 $\geq 99\%$)、阿利吉仑(CDS023114,质量分数 $\geq 99\%$)和三氟乙酸(批号 74564,质量分数 $\geq 99\%$)均购自 Sigma 公司,荧光底物 [Nma-KHPFH LVIHK(Dnp)-NH₂,批号 991-110042] 购自 Peptide Institute 公司;无水乙醇和氯化钠均购自国药集团上海试剂有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

安捷伦 1260 系列高效液相色谱仪(包括自动进样器、输液泵、脱气机、DAD 检测器、示差折光检测器及安捷伦 Cirrus GPC 软件);安捷伦 7890B 型气相色谱仪配备 7693 型三重四级杆质谱仪, Rxi[®]-1 ms 毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m)购自 Restek 公司;利穗科技多糖分离系统配置 Shodex 示差折光检测器购自利穗科技(苏州)有限公司;赛托利斯-SECURA225D 电子天平(赛托利斯公司);

SIGMA-3K15 离心机(Sigma 公司);Buchi-Rotavapor R-300 旋转蒸发仪(Buchi 公司);Labconco-4.5L 冷冻干燥机(Labconco 公司);密理博 REFERENCE 纯水仪(密理博公司)。

2 方法

2.1 多糖的提取及分离纯化

瓜蒌皮的提取按照国家药品标准 [WS-11417 (ZD-1417)-2002-2008] 的制备流程,即取瓜蒌皮 5 kg,加水煎煮3次,第1次2 h,第2、3次各1 h,分次滤过,合并滤液并减压浓缩至相对密度为 1.10~1.25 g/cm³ (30 $^{\circ}$ C),加入 90%乙醇使含醇量为 70%,静置 72 h,取上清液,滤过,回收乙醇,真空干燥后得浸膏。浸膏经截留相对分子质量为1 000 的透析袋透析后收集袋内大分子部分,冷冻干燥后样品标记为 GLP (318.6 g,得率 6.37%)。

GLP 经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换树脂通过水及 0.1、0.2、0.5、1.0 mol/L NaCl 溶液洗脱,苯酚硫酸跟踪,分别对应得到洗脱组分 GLP-W、GLP-1、GLP-2、GLP-5 和 GLP-10;活性最强部位 GLP-5 以 0.2 mol/L NaCl 溶液为流动相经 Superdex 75 分子筛凝胶柱色谱,得 GLP-5-1。

2.2 多糖质量分数和相对分子质量测定

采用高效液相凝胶渗透色谱 (HPGPC) 法测定多糖的质量分数及相对分子质量^[13]。称取多糖样品配制成质量浓度为 2 mg/mL 的溶液,标准品为不同系列普鲁兰多糖,配制成质量浓度为 2 mg/mL 的混合标准品溶液。色谱柱:Ultrasphere[™] 1000 (300 mm $\times$ 7.8 mm) 串联 Ultrasphere[™] 250 (300 mm $\times$ 7.8 mm), Waters;流动相 0.2 mol/L NaCl;体积流量 0.8 mL/min;柱温 40 $^{\circ}$ C。分别精密吸取标准品与样品溶液各 10 μ L,注入 HPGPC 进行检测,图谱通过安捷伦 Cirrus GPC 软件数据处理。

2.3 单糖组成分析

还原水解法进行多糖组成分析^[14],取多糖样品 1~2 mg,置 150 mm $\times$ 15 mm 试管中,加 200 μ L 3 mol/L 三氟乙酸溶液和 50 μ L 4-甲基吗啉硼烷溶液,80 $^{\circ}$ C 油浴水解 5 min,取出加入 50 μ L 4-甲基吗啉硼烷溶液,120 $^{\circ}$ C 油浴水解 1 h,取出。再加入 100 μ L 4-甲基吗啉硼烷溶液,转入 25 mL 梨形烧瓶,60 $^{\circ}$ C 水浴减压蒸干,再加 2~3 mL 乙腈蒸干 3 次,然后加 200 μ L 三氟乙酸和 200 μ L 乙酸酐,50 $^{\circ}$ C 水浴乙酰化 10 min,加 3 mL 水终止反应,室温放置 30 min,用 5 mL 氯仿萃取全乙酰化衍

生物, 氯仿层用水洗 3 次, 无水硫酸钠干燥, 然后用氯仿稀释至 50 mL。

GC-MS 检测: 程序升温: 140~198 °C (2 °C/min), 保持 4 min, 继续升温到 217 °C (1 °C/min), 保持 4 min, 最后升温到 250 °C (3 °C/min), 保持 5 min, 进样口温度为 250 °C; 载气为氦气, 体积流量 1 mL/min。

2.4 肾素抑制活性筛选

2.4.1 试剂及肾素、荧光底物溶液和待测化合物的配制

(1) 缓冲液的配制: 取 1 片磷酸平衡缓冲盐片加入 100 mL 蒸馏水(每 100 毫升中含 NaCl 800 mg、KCl 20 mg、Na₂HPO₄ 115 mg、KH₂PO₄ 20 mg、pH 值为 7.35~7.65), 再加入 100 mg 牛血清白蛋白, 搅拌均匀, 配制成 0.1% BSA-PBS 缓冲溶液, 置于 4 °C 备用。

取 20 mL 0.1% BSA-PBS 缓冲液, 加入 10 μL DMSO, 配制成 0.05% DMSO-0.1% BSA-PBS 缓冲液, 置于 4 °C 备用。

(2) 人肾素稀释液的配制: 人肾素以 0.1% BSA-PBS 缓冲液稀释至 622.60 mU/mL, 100 μL 分装, -80 °C 保存。使用前, 每 100 微升以 15 mL 0.1% BSA-PBS 缓冲液稀释。

(3) 荧光底物稀释液的配制: 准确称量荧光底物, 以 DMSO 溶解, 配制成 10 mmol/L 的储存液, 20 μL 分装, -80 °C 避光保存。使用前取 6.25 μL 以 5 mL 0.1% BSA-PBS 缓冲液稀释备用。

(4) 阳性对照和待测化合物稀释液的配制: 阳性对照稀释液: 准确称量阿利吉仑 5.52 mg, 加 1 mL DMSO 溶解, 配制成 10 mmol/L 的储存液, 10 μL 分装, -80 °C 避光保存。使用前以 5 mL 0.1% BSA-PBS 缓冲液稀释至 3 nmol/L 备用。待测化合物稀释液 GLP-W、GLP-1、GLP-2、GLP-5 和 GLP-10 直接以 0.1% BSA-PBS 缓冲液稀释至 200 μg/mL 备用, GLP-5-1 以 0.1% BSA-PBS 缓冲液依次稀释至 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 μg/mL。

2.4.2 肾素抑制活性测定

(1) 荧光 (fluo) (实验组) 的测试: 将 20 μL 待测化合物稀释液或阳性对照稀释液、40 μL 人肾素稀释液和 40 μL 荧光底物稀释液依次转移到分析板中, 加入荧光底物稀释液前, 在多功能酶标仪 Flexstation 3 上进行预读数, 计作 pre (实验组), 荧光激发波长 (λ_{ex}) = 340 nm, 荧光发射波长 (λ_{em}) =

440 nm, 截止波长 (Cutoff) = 420 nm。化合物各浓度进行 3 复孔检测, 加入荧光底物稀释液后立即在多功能酶标仪 Flexstation 3 上读数, 计作 0 h (实验组), λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 440 nm, Cutoff = 420 nm。读数后用封板膜封板加盖, 于 37 °C 孵育。孵育 1 h 后取出, 在多功能酶标仪 Flexstation 3 上读数, 计作 1 h (实验组), λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 440 nm, Cutoff = 420 nm。计算各浓度下化合物的 fluo 均值: fluo (实验组) = average [1 h (实验组) - 0 h (实验组)]。

(2) fluo (对照组) 的测试: 将 20 μL 0.1% BSA-PBS 缓冲液、40 μL 人肾素稀释液与 40 μL 荧光底物稀释液依次转移到分析板中, 加入荧光底物稀释液前, 在多功能酶标仪 Flexstation 3 上进行预读数, 计作 pre (对照组), λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 440 nm, Cutoff = 420 nm。进行 12 复孔检测, 加入荧光底物稀释液后立即在多功能酶标仪 Flexstation 3 上读数, 计作 0 h (对照组), λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 440 nm, Cutoff = 420 nm。读数后用封板膜封板加盖, 于 37 °C 孵育。孵育 1 h 后取出, 在多功能酶标仪 Flexstation 3 上读数, 计作 1 h (对照组), λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 440 nm, Cutoff = 420 nm。计算各对照组的 fluo 均值: fluo (对照组) = average [1 h (对照组) - 0 h (对照组)]。

(3) fluo (空白组) 的测试: 将 20 μL 待测化合物稀释液或阳性对照化合物稀释液、40 μL 0.1% BSA-PBS 缓冲液和 40 μL 荧光底物稀释液依次转移到分析板中, 加入荧光底物稀释液前, 在多功能酶标仪 Flexstation 3 上进行预读数, 计作 pre (空白组), λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 440 nm, Cutoff = 420 nm。各浓度进行 6 复孔检测, 加入荧光底物稀释液后立即在多功能酶标仪 Flexstation 3 上读数, 计作 0 h (空白组), λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 440 nm, Cutoff = 420 nm。读数后用封板膜封板加盖, 于 37 °C 孵育。孵育 1 h 后取出, 在多功能酶标仪 Flexstation 3 上读数, 计作 1 h (空白组), λ_{ex} = 340 nm, λ_{em} = 440 nm, Cutoff = 420 nm。计算各空白组的 fluo 均值: fluo (空白组) = average [1 h (空白组) - 0 h (空白组)]。

(4) 按如下公式计算人肾素活性的抑制率: 人肾素活性的抑制率 = $1 - [\text{fluo (实验组)} - \text{fluo (空白组)}] / [\text{fluo (对照组)} - \text{fluo (空白组)}]$ 。

以 log (GLP-5-1 浓度) 为横坐标, 人肾素活性的抑制率为纵坐标绘制曲线, 进行回归分析得出回

归方程用于计算 GLP-5-1 的半数抑制浓度 (IC_{50})。

3 结果

3.1 GLP-5-1 的分离纯化

瓜蒌皮样品 GLP (5.0 g) 经 DEAE Sepharose Fast Flow 分别以蒸馏水和 0.1、0.2、0.5、1.0 mol/L NaCl 溶液洗脱分离后, 依次分为 5 个部分 GLP-W (432.5 mg, 得率 8.65%)、GLP-1 (118.3 mg, 得率 2.37%)、GLP-2 (412.8 mg, 得率 8.26%)、GLP-5 (109.5 mg, 得率 2.19%) 和 GLP-10 (44.5 mg, 得率 0.89%); 活性最强的洗脱组分 GLP-5 (100 mg) 再经 Superdex 75 凝胶柱进一步纯化, 收集 140~170 min 流分, 经浓缩、脱盐和冷冻干燥后得 GLP-5-1 (37.8 mg, 得率 37.8%) (图 1), 苯酚硫酸法检测 GLP-5-1 显色明显, 表明 GLP-5-1 为多糖成分。

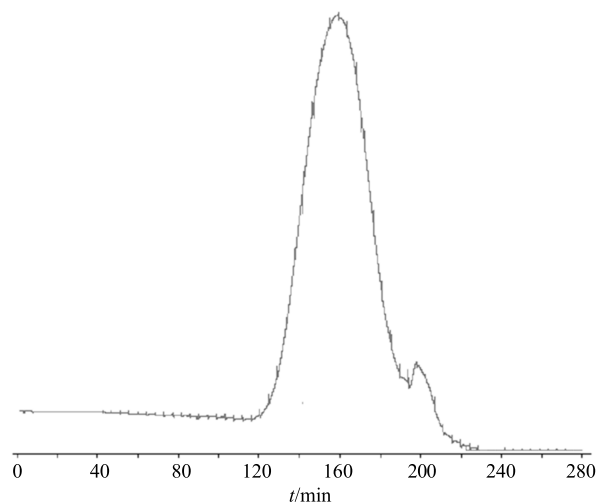


图 1 GLP-5 经 Superdex 75 凝胶分离图谱

Fig. 1 Profile of GLP-5 in Superdex 75 gel column

3.2 纯度和相对分子质量测定

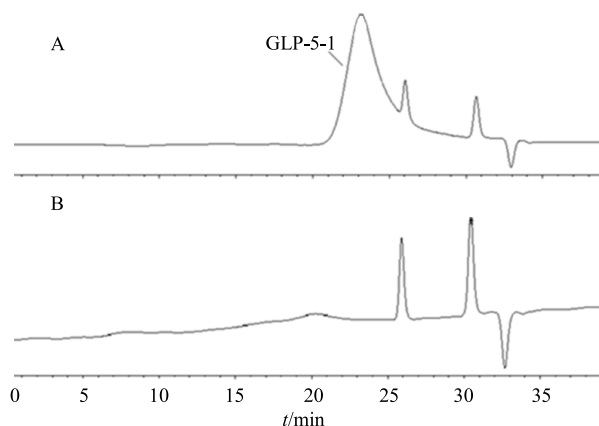
GLP-5-1 的纯度和相对分子质量采用 HPGPC 法进行测定, 结果显示 GLP-5-1 的 HPGPC 谱图呈单一峰 (图 2), 表明 GLP-5-1 为均一多糖。以不同相对分子质量的普鲁兰多糖为标准品, 经 Cirrus GPC 软件分析测得 GLP-5-1 平均相对分子质量为 3 722。

3.3 单糖组成分析

采用还原水解法对单糖组成进行分析, 结果表明 GLP-5-1 主要含阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖, 4 种单糖的物质的量比为 5.5 : 4.4 : 6.9 : 10.0 (图 3)。

3.4 肾素抑制活性测定

通过测量内源性人血管紧张素原的人工合成肽

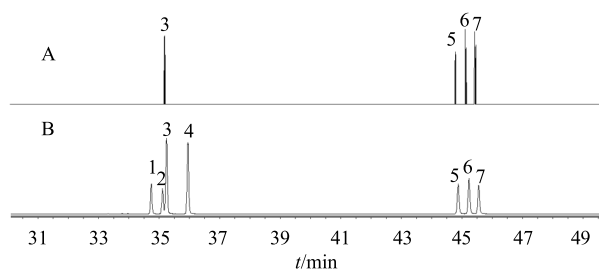


A-多糖 GLP-5-1 B-空白样品

A-GLP-5-1 B-blank

图 2 GLP-5-1 的 HPGPC 图谱

Fig. 2 Profile of GLP-5-1 in HPGPC



A-GLP-5-1 B-单糖混合对照品 1-D-鼠李糖 2-L-岩藻糖

3-D-阿拉伯糖 4-D-木糖 5-D-甘露糖 6-D-葡萄糖 7-D-半乳糖

A-GLP-5-1 B-mixed reference substances 1-D-rhamnose 2-

L-fucose 3-D-arabinose 4-D-xylose 5-D-mannose 6-D-glucose

7-D-galactose

图 3 GLP-5-1 多糖组成分析的气相色谱图

Fig. 3 Gas chromatogram of GLP-5-1 for sugar composition analysis

片段荧光值来检测人肾素的活性, 当人肾素从裂解位点将底物裂解为 2 部分时, 在 $\lambda_{ex}=340$ nm, $\lambda_{em}=440$ nm 时, 荧光基团因为没有淬灭基团的影响, 而使荧光值增加。通过检测荧光值的变化, 检测化合物抑制人肾素活性, 结果显示各化合物的人肾素抑制活性在 0.05~3.11 mU/mL 时, 37 °C 孵育 1~2 h 内, 荧光读数呈线性增加。其中, 当人肾素活性在 1.56 mU/mL 时, 荧光值与时间的线性关系最佳, 实验条件为人肾素活性为 1.56 mU/mL, 孵育时间为 1 h。通过测量内源性人血管紧张素原的工合成肽片段荧光值来检测待测化合物对人肾素活性的抑制作用, 待测化合物可以阻止人肾素从裂解位点裂解荧光淬灭底物, 在 $\lambda_{ex}=340$ nm, $\lambda_{em}=440$ nm 时, 由于待测化合物的作用, 荧光基团受淬灭基团影响,

使得荧光值不断增加。通过检测荧光值的变化,检测待测化合物对人肾素活性的抑制作用。实验结果显示 GLP-W、GLP-1、GLP-2、GLP-5 和 GLP-10 在 200 $\mu\text{g/mL}$ 时均表现出肾素抑制作用,其中 GLP-5 的活性最强,抑制率为 $(83.68 \pm 1.02)\%$,与阳性对照阿利吉仑在 3 nmol/L 时的肾素抑制率相当(图 4-A)。GLP-5 经 Superdex 75 凝胶纯化后的均一多糖 GLP-5-1 在质量浓度 1.56~200 $\mu\text{g/mL}$ 下进行肾素抑制率活性检测,结果 200 $\mu\text{g/mL}$ 时肾素抑制率为 $(92.03 \pm 5.05)\%$, IC_{50} 为 $(87.4 \pm 6.8) \mu\text{g/mL}$ (图 4-B)。

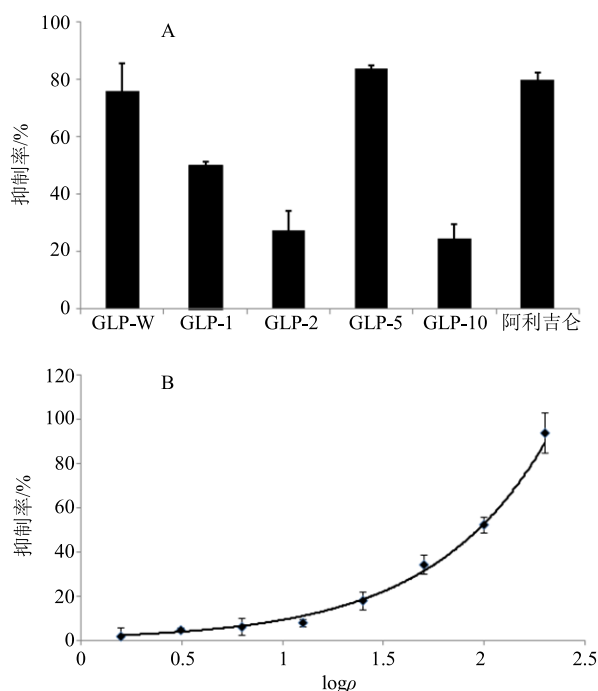


图 4 瓜蒌皮多糖 (A) 及其纯化后多糖 GLP-5-1 (B) 的肾素抑制活性

Fig. 4 Renin inhibitions of polysaccharides from *Trichosanthis Pericarpium* (A) and GLP-5-1 (B)

4 讨论

瓜蒌皮注射液主要选取水提醇沉上清液,根据文献报道,上清液中可能含极性较大的小分子成分、寡糖和低相对分子质量的多糖成分^[15-16],而大相对分子质量的多糖成分主要集中在沉淀部分^[17]。本课题组前期已对瓜蒌皮注射液中小分子成分进行了系统的 UPLC/ESI-QTOF-MS 分析,共鉴定了 19 个成分,主要为极性较大的小分子,包含氨基酸、核苷酸、黄酮、多肽和唾液酸等^[7],但未检测到有肾素

抑制活性。由于瓜蒌皮注射液样品量的限制,本实验并未直接用瓜蒌皮注射液进行分离纯化,而是按照国家药品标准 [WS-11417(ZD-1417)-2002-2008] 瓜蒌皮注射液的制备流程进行制备,并采用活性跟踪方法筛选抗肾素成分,从瓜蒌皮中分离得到 1 种具有较强肾素抑制作用的均一多糖 GLP-5-1,相对分子质量为 3 722,主要由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,4 种单糖的物质的量比为 5.5:4.4:6.9:10.0,其肾素抑制活性 IC_{50} 为 $(87.4 \pm 6.8) \mu\text{g/mL}$ 。本研究结果提示瓜蒌皮注射可能存在具有抗肾素作用的低相对分子质量多糖成分,对心血管病人的血压具有调节作用,同时可抑制动脉粥样硬化和冠心病的进展,进一步阐明瓜蒌皮注射液在冠心病治疗和缓解心绞痛方面的作用机制,为瓜蒌皮及瓜蒌皮注射液治疗心血管疾病的化学物质基础研究提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 桑俊, 雍秀华. 瓜蒌皮注射液辅助治疗冠心病稳定型心绞痛的临床观察 [J]. 中国卫生产业, 2013(7): 63-63.
- [3] 王玲娜, 于京平, 张永清. 栝楼化学成分研究概述 [J]. 环球中医药, 2014, 7(1): 72-76.
- [4] 滕勇荣, 张永清. 瓜蒌化学成分研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2011, 35(1): 85-86.
- [5] 刘金娜, 刘铭, 杨太新, 等. 栝楼各药用部位蛋白质含量的比较分析 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(5): 87-89.
- [6] Li A, Sun A, Liu R, et al. An efficient preparative procedure for main flavonoids from the peel of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. using polyamide resin followed by semi-preparative high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 965: 150-157.
- [7] 王辉俊, 柯樱, 叶冠. 瓜蒌皮注射液中化学成分的 UPLC/ESI-QTOF-MS 分析 [J]. 上海医药, 2017, 38(5): 60-65.
- [8] 李爱峰, 孙爱玲, 柳仁民. 一种从瓜蒌皮中分离纯化 4 种核苷类化学成分的方法: 中国, CN103304613A [P]. 2013-09-18.
- [9] 巢志茂, 刘静明. 双边栝楼中栝楼酯碱的结构研究 [J]. 药学报, 1995, 30(7): 517-520.
- [10] Chen K C, Chen H Y, Chen C. Potential protein phosphatase 2A agents from traditional Chinese medicine

- against cancer [J]. *Evid Based Compl Alter Med*, 2014, 2014(1): 436863.
- [11] Yamamoto E, Kataoka K, Dong Y F, *et al.* Aliskiren enhances the protective effects of valsartan against cardiovascular and renal injury in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice [J]. *Hypertension*, 2009, 54(3): 633-638.
- [12] 刘 军, 郝 炎. 直接肾素抑制剂抗动脉粥样硬化作用研究进展 [J]. *中国医师杂志*, 2011, 2(S2): 208-210.
- [13] Wang H, Wang H, Shi S, *et al.* Structural characterization of a homogalacturonan from *Capparis spinosa* L. fruits and anti-complement activity of its sulfated derivative [J]. *Glycoconj J*, 2012, 29(5): 379-387.
- [14] Wang H, Shi S, Bao B, *et al.* Structure characterization of an arabinogalactan from green tea and its anti-diabetic effect [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 124: 98-108.
- [15] 陆杰霖, 柴 尧, 贾梦蛟, 等. 四角蛤蜊、菲律宾蛤仔及文蛤水提醇沉上清液中相关核苷类物质的含量测定 [J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(1): 76-78.
- [16] 侯小涛. 甘蔗叶化学成分及药效学研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2014.
- [17] 邹 胜, 徐 溢, 张 庆. 天然植物多糖分离纯化技术研究现状和进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(8): 1501-1509.