

目标成分敲出/敲入技术及其在 食品功能领域的应用进展

王怡雯¹, 苏安祥¹, 雍韵琪¹, 姚丽^{2*}, 马宁¹, 杨文建¹, 胡秋辉¹

(1. 南京财经大学食品科学与工程学院/江苏省食用菌保鲜与深加工工程研究中心/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 南京 210023; 2. 江苏卫生健康职业学院, 南京 211800)

摘要: 食品具有多种生物活性成分, 并且有些成分间具有协同或拮抗作用, 挖掘和发现有效活性成分是研究其健康功能的关键。目标成分敲出/敲入技术通过对比目标成分敲出/敲入前后食品功能的变化, 从而可以高效研究目标成分对食品功能的贡献。中药研究中常将两种及以上活性成分有机组合, 可以发挥更好的功能效果, 因此目标成分敲出/敲入技术在中药研究中应用较多, 而在食品领域应用较少。随着化合物分离技术的不断成熟, 已有食品中活性成分的研究应用了该项技术的思路, 但该技术在食品领域并未得到系统的应用。本文概述了目标成分敲出/敲入技术发展、分析流程及在食品功能领域的应用进展, 以期为目标成分敲出/敲入技术在食品功能研究领域的应用提供参考。

关键词: 功能食品; 活性成分; 成分敲出; 成分敲入

Target component knock-out/knock-in technology and its applications in food function

WANG Yi-Wen¹, SU An-Xiang¹, YONG Yun-Qi¹, YAO Li^{2*}, MA Ning¹,
YANG Wen-Jian¹, HU Qiu-Hui¹

(1. College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics,
Jiangsu Province Engineering Research Center of Edible Fungus Preservation and Intensive Processing,
Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Nanjing 210023, China;
2. Jiangsu Health Vocational College, Nanjing 211800, China)

ABSTRACT: Foods have a variety of bioactive components, and some components have synergistic or antagonistic effects. Finding effectively active components is key to studying the healthy function of food. Target component knock-out/knock-in technology investigated the contribution of target components to the overall function of food by analyzing the changes in efficacy of the remaining formula before and after knock-out/knock-in of the target components. This technique can efficiently study the contribution of target components to food function. In traditional Chinese medicine research, two or more active components are often combined organically to play a better functional effect, so target component knock-out/knock-in technology is more widely used in the research of traditional Chinese medicine, but less in the food field. With the continuous maturation of compound separation

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1606400)、江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)、江苏高校品牌专业建设工程资助项目(TAPP)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1606400), the Project for Construction of Advantageous Disciplines in Jiangsu Universities (PAPD), and the Jiangsu University Brand Specialty Construction Support Project (TAPP)

***通信作者:** 姚丽, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为营养与安全、高等教育管理。E-mail: 359410508@qq.com

***Corresponding author:** YAO Li, Ph.D, Assistant Professor, Jiangsu Health Vocational College, No.69, Huangshanling Road, Pukou District, Nanjing 211800, China. E-mail: 359410508@qq.com

technology, the idea of this technology has been applied to the research of active components in food, but this technology has not been systematically applied in the field of food. This paper summarized the development, analysis process and application, in order to provide reference for the application of target component knock-out/knock-in technology in the field of food function.

KEY WORDS: functional food; active component; component knock-out; component knock-in

0 引言

目标成分敲出/敲入技术(敲出也有称为敲除,为了与敲入对应,统一称为敲出)起源于中国传统医学中的复方拆方研究。中医药剂多为复方药,拆方就是去掉其中一种或几种药,通过撤药分析法或简单拆方法,对比拆方与全方的治疗效果,可以找出方剂中的核心药剂。复方主要研究药剂的配伍,各种有作用的中药组成的一个新的有机整体,各药相互联系、相互协调,达到增强药效、减轻毒副作用的目的。

源于中医复方拆方的研究思路,目标成分敲出/敲入技术目前在中药研究中应用较多。肖小河研究员于 2009 年提出基于目标成分敲出/敲入的中药药效物质辨识与质量控制模式^[1]。该技术始终把中药作为整体研究,注重各组分之间的关联作用,为中药药效物质提供了系统的研究方法^[2]。目前,此技术在姜黄^[3-4]、白芷^[5]、地黄^[6]等众多中药活性成分探究上取得了良好进展,但是其在食品领域的应用较少。中药复方通常已知所有配伍成分,其组成成分明确,利用拆方可进一步研究各物质间的协同或拮抗作用。而食品中存在更复杂的化学机制,可能存在未知的功能成分,在活性探究上不如中药简便,但利用目标成分敲

出/敲入技术来研究功能食品是具有重要意义的。

食品包含多种营养物质和活性成分,其健康功能作用和功能因子是食品学者关注的问题。研究者一方面想筛选出最有效的活性成分,另一方面想阐明各种成分之间相互关系。国际食品科学院院士、美国康奈尔大学教授刘瑞海^[7],在《Nature》杂志上发表了苹果中的抗氧化活性成分的系统研究,认为水果中植物性化学物质的综合作用是它们强大的抗氧化功能和抗癌活性的关键。这篇文章的研究方法没有写作“目标成分敲出/敲入技术”,但是其研究思路与之相似。

综合以上内容,将目标成分敲出/敲入技术定义为:成分敲出,指从食品中分离得到目标成分,并探究目标成分的主要功能活性。成分敲入,指将经纯化分离的目标成分以不同比例加入基本不含目标成分的阴性样品中,制成多份仅目标成分含量存在差异的供试样品。将敲出/敲入前后样品的生物活性进行对比,能够全面准确地分析多成分协同或拮抗作用。

本文概述了目标成分敲出/敲入技术发展、分析流程及在食品功能领域的应用进展,以期为目标成分敲出/敲入技术在食品功能研究领域的应用提供参考。图 1 展示了目标成分敲出/敲入技术路线图以及未来的发展趋势。

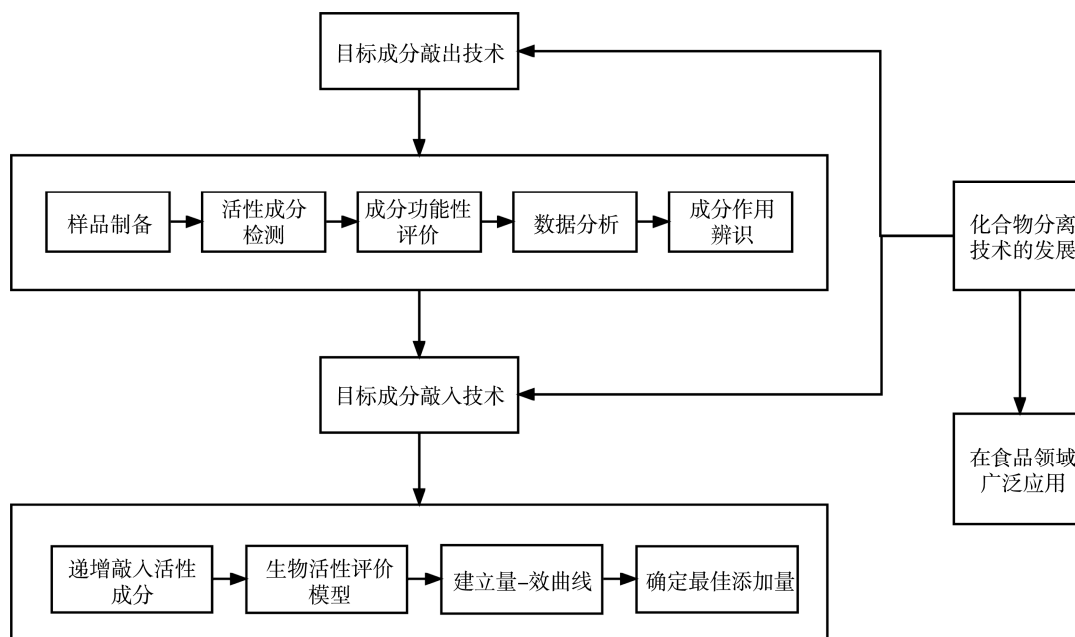


图 1 目标成分敲出/敲入技术路线图

Fig.1 Common target component knock out methods

1 成分敲出技术分析流程

1.1 样品制备(敲出方法)

目标成分敲出技术包含溶剂萃取法、免疫亲和色谱法、高效液相色谱法等多种方法,但在抗原抗体结合与色谱敲出两类方法中运用较多,故本文主要报道抗体敲出法及色谱敲出法在该技术中的应用^[8-9]。抗体敲出法通过制备小分子单克隆抗体,结合免疫亲和色谱将目标成分敲出,具有非常好的特异性筛选功能。而色谱敲出法的应用则更加广泛。由于复杂组分中各成分的理化性质存在差异,其在流动相与固定相中的分布不同。色谱敲出法运用流动相对固定相进行梯度洗脱,从而将某单一成分或者某化学组分分离出来,具有分析速度快、灵敏度高、分离效率高等特点,且与其他仪器配合效果较好^[10]。薄层色谱法、高速逆流色谱法、超临界流体色谱法等都是色谱敲出法的具体应用,在实验中都取得了较好的分离效果。

1.1.1 免疫亲和色谱法

免疫亲和色谱法将抗体或抗原试剂结合在固相介质上^[11],利用抗原抗体特异性结合的原理,使其他无关成分因不被吸附而流出色谱柱,从而实现目标成分的高效敲出^[12]。曾文浩等^[13]制备免疫亲和色谱特异性敲出甘草酸,最大载样量达到1.32611 mg,32 d内甘草酸敲除率的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为1.37%,说明该方法具有高稳定性和高敲出率。赵妍^[14]制备的芍药苷免疫色谱柱容量可达1.47 $\mu\text{g/mL}$,成功制备了敲除芍药苷的芍药甘草汤样品。免疫亲和色谱法具有极强的特异性,灵敏度高、分离效率高^[15],是目标成分敲出研究常用的方法。

1.1.2 薄层色谱法

薄层色谱法是将供试品和对照品溶液点在同一薄层板的一端,用展开剂展开,各组分由于吸附或分配作用的不同逐渐分离,根据比移值的不同从而选择分离目标成分的方法^[16-17]。何静^[18]利用薄层色谱法从姜黄中初步敲出目标成分,制备不同姜黄素类成分及其对应阴性样品。KONG等^[19]利用此方法敲出牛黄胆酸钠、熊去氧胆酸等主要成分,且分离效率高,具有快速便捷的特点。薄层色谱法与生物化学等检测方法结合,有助于检测混合物中对于整体效用有较大贡献的成分^[20],对于识别、分离、鉴定关键成分具有重要作用。

1.1.3 高速逆流色谱法

高速逆流色谱法不同于传统的固-液分配,是一种连续高效的液-液分配色谱分离技术^[21],利用样品在固定相和流动相中分配系数不同而进行目标成分分离^[22]。JIN等^[23]将高速逆流色谱法和制备型高效液相色谱相结合,进行淫羊藿生物活性组分的提取和敲除研究,成功制备了由淫羊藿A、淫羊藿B、淫羊藿C和淫羊藿苷组成的活性

组分,并通过细胞增殖和分化实验表明敲出成分与其阴性样品在抗骨质疏松剂的作用机制上可能存在协同作用。殷梦舟等^[24]运用高速逆流色谱法从茯苓皮中敲出成分茯苓酸A和茯苓酸B,纯度分别可达92%和90%。由于其低溶剂消耗量、高回收率和高溶质装载能力等优点,高速逆流色谱自发明以来,已被广泛用于从药食同源物质、功能性食品中分离多种活性成分。

1.1.4 超临界流体色谱法

超临界流体是温度和压力高于其气、液两相平衡状态的流体。超临界流体色谱法以超临界流体为流动相,适用于分析沸点高、挥发性低的样品,并且比高效液相色谱有更快的分析速度和条件。鉴于 CO_2 无毒无害,纯度高,且易于获得等特点,食品领域绝大多数超临界流体色谱法采用 CO_2 作为流动相^[25]。于琳琳^[26]采用超临界 CO_2 作为流动相,在优化的条件下分别对白芷、木香等有效成分进行高效敲出:在50 mg白芷的粗提取物中,最终纯化得到欧前胡素、氧化前胡素、异欧前胡素3种香豆素类化合物的质量分别为7.5、10.2、5.8 mg,以及在80 mg木香粗提取物中最终纯化得到木香烃内酯、去氢木香内酯2种倍半萜内酯,质量分别为34.7、25.3 mg。由此可见超临界流体色谱法对于多种化学成分均有较高的得率,有利于进一步活性成分分析。

1.1.5 总结

对于常见的目标成分敲出方法,表1总结了各方法的优缺点供读者参考。值得注意的是,选择合适的敲出方法首先需要保证敲出成分的高效,能够将目标成分基本无保留从原样品中敲出,防止对阴性样品活性的影响,以便对照实验的准确性与显著性分析,这种影响不可避免,但研究者可尽力降低目标成分残留带来的影响。

同时经过色谱分离后,不仅引入了其他成分,还可能对食品中原有的非目标组分造成影响。对于食品这类复杂体系,选择高效并且适宜的敲出方法,是做好研究的第一步。方法并不局限于表1所论述的部分内容,研究者可根据样品特性灵活变通。

1.2 活性成分检测

色谱技术可与质谱仪^[32-33]、蒸发光检测散射器^[34]、红外光谱仪^[35]、紫外光谱仪^[36]等其他检测器联用,解析根据色谱图筛选出来的化合物信息。

液相色谱-质谱联用技术与生物分析技术结合,在食品活性成分分离与鉴定方面取得了许多重要成果^[37]。质谱仪是按分子及其碎片之间质量差异进行分离的一类仪器,能够为物质鉴定提供完整的结构信息。LI等^[38]通过高分辨质谱鉴定赤芝酸N、灵芝烯酸B、灵芝酸A等灵芝主要活性成分,并且鉴定出对于RA W264.7细胞具有抑制作用的赤芝酸A和灵芝酸J。LI等^[39]运用超高效液相色谱-串联质谱法鉴定出苹果花中的根皮苷、紫云英苷、金丝桃苷等物质,其中金丝桃苷和山奈酚是首次在苹果花中发现。

表 1 常见的目标成分敲出方法
Table 1 Common target component knock out methods

方法	原理	优点	缺点	参考文献
免疫亲和色谱法	抗原抗体特异性结合	特异性强, 灵敏度好	价格昂贵, 对配基纯度要求高不易制备	[27]
薄层色谱法	固-液吸附性色谱	操作简单, 分离速度快	无法制备大量样品, 敲出率不够理想	[28]
高速逆流色谱法	液-液分配色谱	溶剂消耗率低, 回收率高	消耗溶剂多, 灵敏度差	[29]
超临界流体色谱法	超临界流体-固体吸附性色谱	能够有效分离大分子物质, 热不稳定性化合物	难以提取分离极性强的和大分子物质	[30]
离子交换色谱	阴阳离子交换反应	耐酸碱、应用范围广、需样量小	机械强度差, 易受有机物污染	[31]

黄慧等^[40]运用该技术, 对于青黛中靛玉红、色胺酮等有效成分是否完全敲出进行精准的鉴定。可见液相色谱-质谱联用技术更加灵敏、精细, 不仅可以鉴定主要活性成分的物质结构, 还有利于新物质的发现与研究。

蒸发光散射检测是一种通用的检测方法, 能够检测任何挥发性比流动相低的样品, 且检测响应值不依赖于样品的光学性质, 不受官能团的影响。功能食品是由多个复杂化合物成分共同发挥作用的复杂物质, 有些成分不存在紫外吸收或吸收较弱, 运用蒸发光散射检测器则可以弥补传统高效液相色谱检测方法的不足^[41-42]。

1.3 成分功能性评价

已经敲出的目标成分及其阴性样品需要建立合适的评价模型, 通过生物活性检测才能确定其功效。生物活性检测方法主要有建立动物病理模型与细胞损伤模型。郭慧玲等^[43]通过小鼠离体子宫平滑肌收缩实验, 验证了 3 个敲出目标成分 *sugeonol*、 α -香附酮、香附烯酮对离体子宫平滑肌的收缩都有显著抑制作用。动物模型制备成本较高, 个体之间的差异大^[44], 所以成本较低, 更加高效便捷的细胞损伤模型则可以弥补一定的不足。庞晨等^[45]用微量液基法测定各样品对白色念珠菌抑制作用, 发现由丹参二萜醌类和蔡啶酸类化合物为主要成分的组分 C 抑菌效用显著强于藜蒿叶总水提物, 并且其对应的阴性样品对白色念珠菌的抑制作用较差, 可以推测组分 C 含有主要功能成分, 对其成分进一步研究即得到主要抑菌成分丹参酮 I 等物质。细胞损伤模型具有简便、直观等特点, 动物模型可用于研究更复杂的成分功能机制, 研究者可自行选择适宜的成分功能性评价模型。

1.4 数据分析与处理

目标成分敲出/敲入技术常用多元统计方法进行数据处理。包括主成分分析法(principal component analysis, PCA)、层次聚类分析法(hierarchical cluster analysis, HCA)、偏最小二乘法(partial least square, PLS)等。PCA 用于数据降维, 可以把多个复杂变量简化为少数几个具有相同特征的综合指标。HCA 在不同层次对样本进行划分, 从而形成树状的聚类结构^[46]。LIU 等^[47]首先运用 HCA 对海棠果化

学指纹图谱的共有峰进行标准化处理, 将具有相近化学成分的样品归为一类, 共分为 3 类成分存在显著差异的类别。经过 PCA 的验证, 3 类主成分可代表果实共有成分的大部分信息, 两种分类结果基本一致, 为后续关键成分分析奠定基础。PLS 是 PCA 法的进一步拓展, 能够增强变量之间的相关性, 分析主成分对于应变量的贡献率。LI 等^[39]运用 PLS, 以苹果花相关色谱峰面积为自变量, 酪氨酸酶活性激活率为应变量, 建立偏最小二乘回归方程, 鉴定出对于自由基清除作用有正相关与负相关的化合物, 验证了槲皮素对酪氨酸酶激活作用与谱-效关系一致等结论。多元统计方法的运用可以将多个成分和功能作用联合分析, 发掘食品复杂成分间的内在联系, 筛选关键活性成分。

1.5 关键成分辨析

活性评价结果可根据以下几种情况进行判定^[48]：
(1)如果某一目标成分能够较好还原样品整体的活性, 而其阴性样品基本无活性, 那么该目标成分为食品的主要活性成分之一。
(2)如果某一目标成分基本无活性, 而其阴性样品能够较好还原样品整体活性, 说明该目标成分与样品活性之间没有直接联系, 该目标成分不是食品的主要活性成分。
(3)如果某一目标成分与其阴性样品都具有一定的活性, 而两者单独作用的效用之和大于或小于整体活性, 那么可以判断出两者之间存在协同或者拮抗作用。

2 成分敲入技术

在敲出与辨识食品主要活性成分的基础上, 有学者提出目标成分敲出/敲入策略的结合可以更加准确快速地识别有效成分^[19]。目标成分敲出技术将单个成分或成分组敲出并鉴定后, 运用活性检测的方法辅助以数学模型, 来确定主要活性成分以及可能的协同或拮抗物质。在此基础上, 成分敲入技术将已敲出的活性成分按浓度梯度递增敲入其阴性样品, 利用生物活性评价模型测定添加不同含量有效成分的组分活性, 绘制量-效曲线, 建立量-效关系, 以此来确定有效成分的最佳添加量, 以期发挥其最佳效用。

胡律江等^[49]将不同浓度梯度 α -香附酮、香附烯酮和 sugeonol 敲入其对应的阴性样品,确定其敲入下限 2.48%、1.97%、0.028%,并且发现将3种主要活性成分组合敲入时,需要达到原样品的1.00倍时才能发挥相同的功效,揭示了3种成分之间的相互作用关系有待进一步考量。李钰馨^[50]在确定苍术苷和羧基苍术苷为苍耳子的主要毒性成分的基础上通过四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、台盼蓝和乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)3种细胞毒性实验,确定目标成分敲入含量上限为0.35%。李俊贤^[51]在成分敲出实验中确定小檗碱与黄连碱之间存在协同作用,且为主要活性物质,接而在成分敲入实验中采用高效液相色谱和化学动力学评价初步确定小檗碱与黄连碱敲入上下限分别为:8.08%~31.92%、4.05%~14.45%,为黄连的质量与安全控制提供依据。LI等^[22]将牛黄主要活性成分按照最优含量点配比组合得到的样品,其抗真菌效用以人工牛黄母液提高了92.21%,证明了构建活性组分的可行性。

目标成分敲入技术既可以避免因有效成分不足而达不到应有量效,也可以避免因添加过量活性成分而导致相反的有毒或抑制等副作用,为食品的功能研究提供强有力的依据。

3 目标成分敲出/敲入技术的发展及在食品功能领域的应用

除了经典的目标成分敲出/敲入技术以外,近年来发展出了更加高效、快速的技术。经典目标成分敲出/敲入技术需要通过多个色谱等方法将生物活性化合物逐个分离制备,并分别评估其活性。这种方法耗时长、化合物需求量大,同时化合物在分离过程中易发生氧化、降解、聚合等反应而出现活性物质损失、假阴性等现象。一种基于抗氧化成分在线筛选的高效液相色谱串联自由基清除活性检测的方法逐渐建立起来,其原理是将具有高分离效能的高效液相色谱技术与清除自由基能力的测定方法联用,提取物在经高效液相色谱有效分离后立刻逐一与1,1-二苯基-2,2,3-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)或2,2'-联氮双-(3-乙基苯并噻唑林-6-磺酸)二胺盐[2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)ammonium salt, ABTS]自由基反应,利用新生成的负峰的峰面积作为评价不同成分抗氧化活性的标准。这种方法简单、快速、试剂消耗量少、节省样品,但是无法评价不同成分之间存在的协同或拮抗作用,更无法确定特定组分对总体活性的贡献。为了克服上述方法的不足,LIU等^[52]制定了在线淘汰赛策略,充分考虑了不同组成部分对整体效果的贡献提取,并成功识别强心药丸中18种活性化合物的组合。CHEN等^[53]建立了基于微电子阻抗实时细胞分析的在线敲出技术,筛选出了龙眼多酚关键抗氧化成分。JIA等^[10]通过在线敲出

方法成功从荔枝浆中筛选酚类保肝成分。这些应用实例表明,在线敲除方法是一种高效筛选活性成分新方法。

目标成分敲出/敲入技术近几年已经在功能食品研究领域开始应用。该项技术主要用于挖掘、筛选主要活性成分,探究食品主要活性成分及不同成分之间的协同或拮抗作用。敲入技术将目标成分按浓度梯度敲入其阴性样品,并通过生物活性评价模型确定敲入上下限,有助于优化食品成分比例、使其发挥更大活性。有学者利用成分敲出/敲入理念,在剔除非必需成分的条件下,将各理化性质相似的主要活性成分按照已确定的最优比例构建新活性组分。这里的组分已经通过系统化的筛选方法,可以较完整地表达原样品活性,甚至表达更优的功能^[54]。

另外,研究者在运用目标成分敲出/敲入技术时还需注意以下问题:(1)将目标成分敲出时,需选择合理的高效的敲出手段,常用的敲出技术并不能完美适用与所有样品,比如薄层色谱法无法制备大量样品,对于含量本身很低的成分敲出率不够理想。(2)有效成分的分离及其鉴定,通常需要多次循环。对于成分复杂的多组分样品,比如对龙眼科多酚的有效成分的研究,需要进行多次分离及物质鉴定。(3)在剔除非主要活性的成分时具有一定的盲目性,因为生物活性评价模型通常只能对某一个或某类功能进行筛选,如果盲目且随意的将某一成分敲出,有可能会错失其重要价值。

4 结束语

目标成分敲出/敲入技术源于中医拆方复方研究,其在中药方面的应用已经展现出其独特的优越性。目前,目标成分敲出/敲入技术在食品领域应用较少,一方面,是因为对食品整体功能和部分成分功能的关系关注不够,另一方面,目标成分的提取和分离较为困难,限制了目标成分敲出/敲入技术的广泛应用。

对于食品这一复杂的功能体系,研究其单一成分的功能是明确可行的。以灵芝为例,灵芝是生活中常见的功能食品,从中提取的多糖经研究证明具有免疫调节、抗肿瘤、降血压等多种功能^[55]。活性肽广泛存在于植物源生物中,根据其功能可以分为抗氧化肽、降血压肽等类别,是近年来功能食品领域的研究热点^[56]。灵芝中同样含有丰富的功能活性肽^[57]。作为灵芝抗氧化的两种主要成分,若敲出,两者在抗氧化功能方面是否具有协同作用,同时应用是否可以进一步提升单一成分的功能作用,以及这两种成分对于灵芝整体抗氧化活性的贡献率有多高,可以通过敲出部分与阴性样品的对照实验来验证。但需要选择合适的敲出方法,保证对于目标成分没有破坏并且高效提取,还需注意不能引入对阴性样品功能影响较大的杂质。

随着化合物的分离技术的飞速发展,必将促进目标成分敲出/敲入技术在食品科学领域的应用。在线敲出技术已经展现了其高效、快速的优势,有望在功能食品研究甚至更广阔的领域中发挥重要作用。

参考文献

- [1] 肖小河, 鄢丹, 袁海龙, 等. 基于成分敲除/敲入的中药药效组分辨识与质量控制模式的商建[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1345–1348, 1488.
- XIAO XH, YAN D, YUAN HL, *et al.* Commercial establishment of pharmacodynamic identification and quality control model of traditional Chinese medicine based on component knockout/knock in [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2009, 40(9): 1345–1348, 1488.
- [2] 崔文博, 李爱平, 崔婷, 等. 基于目标成分敲除/敲入技术辨识中药药效物质基础研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1279–1286.
- CUI WB, LI AIP, CUI T, *et al.* Research progress on identification of pharmacodynamic substance basis of traditional Chinese medicine based on target constituent knock-out/knock-in technology [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(6): 1279–1286.
- [3] 李兴丰. 基于目标成分“敲出/敲入”的姜黄药效物质辨识与质量控制方法的初步研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2011.
- LI XF. Preliminary study on the identification and quality control method of active substances of turmeric based on the target ingredient “knock out/knock in” [D]. Changsha: Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 2011.
- [4] 秦宇雯, 费程浩, 张伟, 等. 姜黄属中药活血化瘀功效关联物质研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(1): 24–35.
- QIN YW, FEI CH, ZHANG W, *et al.* Research progress of related substances of *Curcuma* herb in promoting blood circulation and removing blood stasis [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(1): 24–35.
- [5] 彭琳娜. 中药白芷对酪氨酸酶活性功效关联性研究[D]. 开封: 河南大学, 2017.
- PENG LN. Correlative study on the effect of angelica dahurica on tyrosinase activity [D]. Kaifeng: Henan University, 2017.
- [6] 孙香荣. 地黄化感自毒物质分离及酚酸类成分敲出效应研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.
- SUN XR. Isolation of allelopathic and autotoxic substances from *Rehmannia glutinosa* and knockout effect of phenolic acids [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2021.
- [7] EBERHARDT MV, LEE CY, LIU RH. Antioxidant activity of fresh apples [J]. Nature, 2000, 405: 903–904.
- [8] 邵晓, 朱珂璇, 张蕾, 等. 成分敲除技术在中药药效物质基础研究中的应用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(9): 1563–1566.
- SHAO X, ZHU KX, ZHANG Q, *et al.* Application of component knockout technique in the study of the material basis of the efficacy of traditional Chinese medicine [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2016, 18(9): 1563–1566.
- [9] 乔雪, 张亚群, 果德安, 等. 中药药效物质研究方法进展[J]. 中国科学(生命科学), 2022, 52(6): 908–919.
- QIAO X, ZHANG YQ, GUO DAN, *et al.* Research methods and progress of effective substances of traditional Chinese medicine [J]. Sci Chin (Life Sci), 2022, 52(6): 908–919.
- [10] JIA XC, DONG LH, WEN YJ, *et al.* Discovery of possible hepatoprotective components from lychee pulp phenolic extract by online knockout methods [J]. Food Biosci, 2022, 50: 102053.
- [11] 黄陈, 于生兰, 徐加兵, 等. 黄芩甲苷免疫亲和色谱介质的制备及应用[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(3): 218–221.
- HUANG C, YU SL, XU JB, *et al.* Preparation and application of astragaloside A immunoaffinity chromatographic medium [J]. Jiangsu Agric Sci, 2020, 48(3): 218–221.
- [12] 屈会化, 赵琰, 王庆国. 中药小分子单克隆抗体技术平台的构建[J]. 中草药, 2014, 45(7): 895–899.
- QU HH, ZHAO Y, WANG QG. Construction of a technical platform for small molecule monoclonal antibody of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(7): 895–899.
- [13] 曾文浩, 孔慧, 屈保平, 等. 利用免疫亲和色谱柱特异性敲除甘草酸的方法学研究[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2838–2842.
- ZENG WH, KONG H, QU BP, *et al.* Methodological study on specific knockout of glycyrrhizic acid by immunoaffinity chromatography [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(16): 2838–2842.
- [14] 赵妍. 利用基于单克隆抗体的特异性敲除技术解析芍药苷与芍药甘草汤镇痛作用的相关性研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- ZHAO Y. Study on the Correlation between paeoniflorin and analgesic effect of *Paeonia glycyrrhiza* decoction by using specific knock out technique based on monoclonal antibody [D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [15] 章飏, 李彦川, 高雯, 等. 中药小分子单克隆抗体制备技术研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(10): 2469–2476.
- ZHANG B, LI YC, GAO W, *et al.* Research progress in preparation technology of small molecule monoclonal antibody of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(10): 2469–2476.
- [16] 王秀芹, 林彤, 江英桥. 薄层色谱法标准化操作要点及实例分析[J]. 中成药, 2018, 40(7): 1655–1659.
- WANG XQ, LIN T, JIANG YQ. Key points of standardization operation of thin-layer chromatography and case analysis [J]. Chin Tradit Pat Med, 2018, 40(7): 1655–1659.
- [17] 巢颖欣, 刘梦诗, 杨秀娟, 等. 薄层色谱法快速鉴别广陈皮与陈皮[J]. 中成药, 2021, 43(7): 1937–1940.
- CHAO YX, LIU MS, YANG XJ, *et al.* Rapid discrimination of Guangchen pi from Chenpi by thin layer chromatography [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(7): 1937–1940.
- [18] 何静. 基于目标成分“敲出/敲入”质量控制模式的中药姜黄抗氧化药效物质辨识[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2011.
- HE J. Identification of antioxidant active substances of curcuma longa based on the quality control mode of “knock out/knock in” of target components [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2011.
- [19] KONG WJ, WANG JB, ZANG QC, *et al.* A novel “target constituent knock-out” strategy coupled with TLC, UPLC-ELSD and microcalorimetry

- for preliminary screening of antibacterial constituents in *Calculus bovis* [J]. J Chromatogr B, 2011, 879(30): 3565–3573.
- [20] CABEZUDO I, SALAZAR MO, RAMALLO I A, *et al.* Effect-directed analysis in food by thin-layer chromatography assays [J]. Food Chem, 2022, 390: 132937 7.
- [21] 李淑芳, 陈晓明, 丁舒, 等. 高速逆流色谱技术在天然产物研究中的应用进展[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(9): 122–128.
- LI SF, CHEN XM, DING S, *et al.* Development of high speed countercurrent chromatography for the study of natural products [J]. Storage Process, 2021, 21(9): 122–128.
- [22] LI LX, ZHAO J, YANG TT, *et al.* High-speed countercurrent chromatography as an efficient technique for large separation of plant polyphenols: A review [J]. Food Res Int, 2022, 153: 110956.
- [23] JIN J, LI Y, TANUI EK, *et al.* Fishing and knockout of bioactive compounds using a combination of high-speed counter-current chromatography (HSCCC) and preparative HPLC for evaluating the holistic efficacy and interaction of the components of *Herba epimedii* [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(2): 357–365.
- [24] 殷梦舟, 刘莹, 张莉佳, 等. 高速逆流色谱法分离制备茯苓皮中茯苓酸 A 和茯苓酸 B[J]. 食品科学, 2020, 41(16): 179–184.
- YIN MZ, LIU Y, ZHANG LJ, *et al.* Preparation of poric acid A and B from *Poria cocos* cortex by high speed countercurrent chromatography [J]. Food Sci, 2020, 41(16): 179–184.
- [25] 刘娜. 超临界流体色谱的应用进展[J]. 军事医学, 2021, 45(7): 558–560.
- LIU N. Advances in supercritical fluid chromatography [J]. Mil Med Sci, 2021, 45(7): 558–560.
- [26] 于琳琳. 超临界流体色谱分离纯化白芷、木香等中药有效成分的研究[D]. 聊城: 聊城大学, 2016.
- YU LL. Study on the separation and purification of the effective components of *Angelica dahurica*, *Aucklandia odora* and other traditional chinese medicines by supercritical fluid chromatography [D]. Liaocheng: Liaocheng university, 2016.
- [27] 刘姝晨. 利用中药小分子单克隆抗体技术解析芍药甘草汤配伍机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- LIU SC. Analysis of compatibility mechanism of peony and licorice decoction using small-molecule monoclonal antibody technology of traditional Chinese medicine [D]. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2017.
- [28] 熊朝栋, 陈丹, 洪丽婷, 等. 玟玟果黄酮提取物效应组分新橙皮苷及柚皮苷敲出分离制备[J]. 福建中医, 2020, 51(4): 32–35.
- XIONG CD, CHEN D, HONG LT, *et al.* Extraction, separation and preparation of neohesperidin and naringin as effect component of Daidai fruit flavonoid extract [J]. Fujian J Tradit Chin Med, 2020, 51(4): 32–35.
- [29] SUN SS, XIN XL, ZHU LJ, *et al.* Preparative separation of five polyphenols from the fruits of *Sorbus pohuashanensis* Hedl. by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr B, 2021, 1172: 122620.
- [30] TORIBIO L, BERNAL J, MT M, *et al.* Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry: A valuable tool in food analysis [J]. TrAC Trends Anal Chem, 2021, 143: 116350.
- [31] 颜东妹, 魏晗婷, 王宁丽, 等. 离子色谱法在中药化学成分分析中的应用进展[J]. 分析测试技术与仪器, 2022, 28(2): 179–187.
- JIE DM, WEI HT, WANG NL, *et al.* Application progress of ion chromatography in the analysis of chemical components of traditional Chinese medicine [J]. Anal Test Technol Instrum, 2022, 28(2): 179–187.
- [32] LI H, LI TS, WANG YB, *et al.* Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for comprehensive quantification of crustacean tropomyosin and arginine kinase in food matrix [J]. Food Control, 2022, 140: 109137.
- [33] BARTOSIŃSKA E, BUSZEWSKA-FORAJTA M, SILUK D, *et al.* GC-MS and LC-MS approaches for determination of tocopherols and tocotrienols in biological and food matrices [J]. J Pharm Biomed, 2016, 127: 156–169.
- [34] KOH DW, PARK JW, LIM JH, *et al.* A rapid method for simultaneous quantification of 13 sugars and sugar alcohols in food products by UPLC-ELSD [J]. Food Chem, 2018, 240: 694–700.
- [35] ZHAO YL, YUAN TJ, WU LH, *et al.* Identification of *Gentiana rigescens* from different geographical origins based on HPLC and FTIR fingerprints [J]. Anal Methods, 2020, 12: 2260–2271.
- [36] CETÓ X, SÁNCHEZ C, SERRANO N, *et al.* Authentication of paprika using HPLC-UV fingerprints [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 124: 109153.
- [37] 庞博, 刘舒, 刘志强, 等. 微透析-液相色谱-质谱联用技术在中药研究中的应用[J]. 质谱学报, 2021, 42(5): 553–562.
- PANG B, LIU S, LIU ZQ, *et al.* Application of microdialysis-liquid chromatography-mass spectrometry in the research of traditional Chinese medicine [J]. J Mass Spectrom, 2021, 42(5): 553–562.
- [38] LI CQ, CUI YP, LU J, *et al.* Spectrum-effect relationship of immunologic activity of *Ganoderma lucidum* by UPLC-MS/MS and component knock-out method [J]. Food Sci Hum Well, 2021, 10(3): 278–288.
- [39] LI WJ, ZHANG Y, SHI SJ, *et al.* Spectrum-effect relationship of antioxidant and tyrosinase activity with *Malus pumila* flowers by UPLC-MS/MS and component knock-out method [J]. Food Chem Toxicol, 2019, 133: 110754.
- [40] 黄慧, 李泳宁, 戴雅彬, 等. 基于目标成分敲出的中药药效组分辨识的方法及应用: CN202110239303.9 [P]. 2021-06-22.
- HUANG H, LI YN, DAI YB, *et al.* Method and application of identification of effective components of traditional Chinese medicine based on knock out of target components: CN202110239303.9 [P]. 2021-06-22.
- [41] 张悦晗, 甄汉深, 成莉. 蒸发光散射检测器(ELSD)应用概况[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(4): 831–833.
- ZHANG YH, ZHEN HS, CHENG L. Application of evaporative light scattering detector (ELSD) [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2007, 25(4): 831–833.
- [42] 石岩, 魏锋, 吕宝俊, 等. HPLC-ELSD 测定培植牛黄中主要胆汁酸类成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(10): 790–793.
- SHI Y, WEI F, LV BJ, *et al.* Determination of major bile acids in cultured *Calculus bovis* by HPLC-ELSD [J]. Chin Pharm J, 2021, 56(10): 790–793.

- [43] 郭慧玲, 董能峰, 胡律江, 等. 基于成分敲出策略辨识四制香附抗痛经的主要效应成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10): 7-11.
GUO HL, DONG NF, HU LJ, *et al.* Identification of the main effective components of the four system *Rhizoma cyperi* against dysmenorrhea based on the component knocking out strategy [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2017, 23(10): 7-11.
- [44] 延春霞. 基于成分“敲出/敲入”的中药牛黄药物质辨识模式研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2013.
YAN CX. Study on identification mode of effective substances of Chinese traditional medicine bezoar based on component “knock out/knock in” [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2013.
- [45] 庞晨, 贤欢, 李慧, 等. 基于成分敲出/敲入模式辨识藜蒿叶抗白色念珠菌的药效物质[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 28-35.
PANG C, XIAN H, LI H, *et al.* Identification of effective substances of *Artemisia selengensis* leaves against *Candida albicans* based on component knock out/knock in patterns [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2017, 23(24): 28-35.
- [46] GRANATO D, SANTOS JS, ESCHER JB, *et al.* Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective [J]. Trends Food Sci Technol, 2018, 72: 83-90.
- [47] LIU CY, MA CY, LU J, *et al.* A rapid method and mechanism to identify the active compounds in *Malus micromalus* Makino fruit with spectrum-effect relationship, components knock-out and molecular docking technology [J]. Food Chem Toxicol, 2021, 150: 112086.
- [48] 谭婵子, 刘彩霞, 朱秋燕, 等. 黄芪当归主要活性成分配伍对人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(24): 4141-4148.
TAN YZ, LIU CX, ZHU QY, *et al.* Study on the protective effect of compatibility of main active components of *Astragalus* and *Angelica* on oxidative damage of human umbilical vein endothelial cells [J]. Chin J Integr Tradit West Med Card Cereb Dis, 2020, 18(24): 4141-4148.
- [49] 胡律江, 赵晓娟, 郭慧玲, 等. 基于目标成分“敲入”的四制香附质量控制研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1969-1973.
HU LJ, ZHAO XJ, GUO HL, *et al.* Study on quality control of four system *cyperus rotundus* based on target component “Knocking in” [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(4): 1969-1973.
- [50] 李钰馨. 基于目标成分“敲出/敲入”的苍耳子毒性物质辨识和质量评价研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2016.
LI YX. Identification and quality evaluation of *Xanthium sibiricum* toxic substances based on target component “Knock out/Knock in” [D]. Hefei: Anhui University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [51] 李俊贤. 基于成分敲出/敲入的中药(黄连)药效物质辨识和质量控制模式的研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2013.
LI JX. Study on identification and quality control mode of effective substances of Chinese traditional medicine (*Coptis chinensis*) based on knock out/knock in of components [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2013.
- [52] LIU P, YANG H, LONG F, *et al.* Bioactive equivalence of combinatorial components identified in screening of an herbal medicine [J]. Pharm Res, 2014, 31: 1788-1800.
- [53] CHEN JY, GE ZZ, WEI Z, *et al.* Screening of key antioxidant compounds of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract by combining online fishing/knockout, activity evaluation, FT-ICR-MS and HPLC-ESI-MS methods [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(40): 9744-9750.
- [54] 傅靖, 张宝, 刘红燕, 等. 基于中药药效物质“敲出/敲入”辨识模式筛选植物化感物质的思考[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 805-808.
FU J, ZHANG B, LIU HY, *et al.* Thinking of screening plant allelochemicals based on the identification mode of “knock out/knock in” of the effective substances of traditional Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(4): 805-808.
- [55] 张若冰, 杨玉赫, 李陈雪, 等. 灵芝多糖药理作用及机制的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 29(24): 5.
ZHANG RB, YANG YH, LI CX, *et al.* Research progress in pharmacological action and mechanism of *Ganoderma lucidum* polysaccharide [J]. Nat Prod Res Dev, 2018, 29(24): 5.
- [56] 杨文清, 黄秀芳, 陈耀兵, 等. 植物源生物活性肽的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(1): 270-278.
YANG WQ, HUANG XF, CHEN YB, *et al.* Research progress of bioactive peptides from plants [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(1): 270-278.
- [57] 黄佳, 王浩锦, 伍强, 等. 灵芝活性蛋白和多肽研究进展及展望[J]. 菌物研究, 2022, 20(2): 79-86, 76.
HUANG J, WANG HJ, WU Q, *et al.* Research progress and prospect of *ganoderma lucidum* active protein and polypeptide [J]. J Fung Res, 2022, 20(2): 79-86, 76.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



王怡雯, 主要研究方向为食品科学。
E-mail: yiwenwang@126.com



姚丽, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为营养与安全、高等教育管理。
E-mail: 359410508@qq.com