

苦杏仁苷的分析、提取纯化及药理作用研究进展

夏其乐^{1,2}, 王涛^{2,3}, 陆胜民², 潘思轶^{1,*}

(1. 华中农业大学食品科学与技术学院, 湖北 武汉 430070; 2. 浙江省农业科学院食品科学研究所, 浙江 杭州 310021;

3. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321000)

摘要: 苦杏仁苷是常见的氰苷类物质, 也是传统中药苦杏仁中的有效成分, 迄今已成为医药上常用的祛痰止咳剂。大量的研究表明苦杏仁苷除了止咳平喘之外, 还具有一定抗肿瘤和调节免疫的功效。本文对苦杏仁苷的降解途径、检测、提取和纯化方法以及生物学功效等方面的研究报道进行综述, 并对苦杏仁苷今后的研究方向提出展望。

关键词: 苦杏仁苷; 降解; 检测; 提取; 药理作用

Research Progress in Analysis, Extraction, Purification and Pharmacological Effects of Amygdalin

XIA Qi-le^{1,2}, WANG Tao^{2,3}, LU Sheng-min², PAN Si-yi^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Institute of Food Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China;

3. College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321000, China)

Abstract: Amygdalin is a cyanogenic glycoside commonly detected in traditional herb bitter almond, and it has become a common cough expectorant agent. A large number of studies have shown that amygdalin possess many bioactivities such as anti-tumor and immune regulation besides the relieving of cough and asthma. The degradation pathway, detection methods, extraction and purification methods, and corresponding biological effects of amygdalin are reviewed in this article. Meanwhile, the future research directions of amygdalin are also proposed.

Key words: amygdalin; degradation; detection; extraction; pharmacological effects

中图分类号: TS255.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)21-0403-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201321079

氰苷类物质(cyanogenic glucosides)是氨基酸衍生的植物成分, 可归属为脂肪族和芳香族化合物, 目前有2500多种, 包含亚麻苦苷(linamarin)、百脉根苷(lotaustralin)、野樱苷(prunasin)和苦杏仁苷(amygdalin)等物质。氰苷是植物产生的抗生素的一种, 其主要功能是通过 β -葡萄糖苷酶(β -glucosaccharase)的激活来产生有毒的挥发性气体氢氰酸(HCN)或酮或醛来抵御草食动物和病原体的攻击^[1]。不同种植物中氰苷的种类和含量相差很大, 且不同的喂食方式可产生不同的氢氰酸释放量^[2]。在酶的作用下氰苷水解成苷元(一种 α -羟基腈)和葡萄糖(大多为D-葡萄糖), 氰苷类物质的合成和降解途径如图1所示。

苦杏仁苷是常见的氰苷类物质, 也是传统中药苦杏仁中的有效成分, 是 α -羟基腈的衍生物, 迄今已成为医药上常用的祛痰止咳剂、辅助性抗癌药物。苦杏仁苷广泛存在于枇杷、杏、桃、青梅、杨梅等植物的种仁中^[3]。苦杏

仁苷由两分子的葡萄糖和一分子的杏仁腈联结而成, 其分子结构如图2所示, 分子式为 $C_{20}H_{27}O_{11}N$, 相对分子质量为457。苦杏仁苷的三水合物为斜方柱状结晶(水), 熔点 $200^{\circ}C$, 无水物熔点约 $220^{\circ}C$, 1g可溶于12mL水、900mL乙醇或11mL沸乙醇中, 易溶于沸水, 几乎不溶于乙醚^[4]。

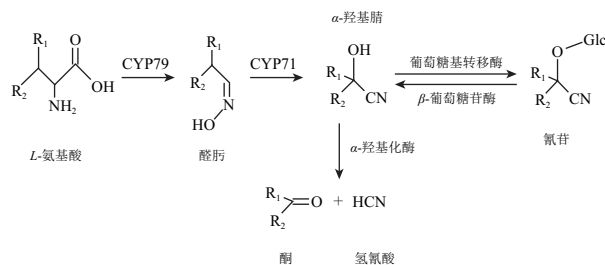


图1 氰苷的合成和降解途径

Fig.1 The biosynthetic and degradation pathways of cyanogenic glucosides

收稿日期: 2013-02-20

基金项目: 浙江省重点科技创新团队项目(2010R50032)

作者简介: 夏其乐(1979—), 男, 副研究员, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: cookxql@163.com

*通信作者: 潘思轶(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品精深加工与综合利用。E-mail: Pansiyi@mail.hzau.edu.cn

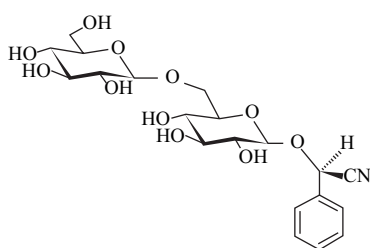


图2 苦杏仁苷分子结构图

Fig.2 Chemical structures of amygdalin

1 苦杏仁苷的分解

苦杏仁苷在苦杏仁苷酶的作用下降解为野樱苷,后者在水解酶樱叶酶的作用下进一步降解成杏仁腈。杏仁腈不稳定,遇热易分解成苯甲醛和氢氰酸,其分解路径如图3所示。

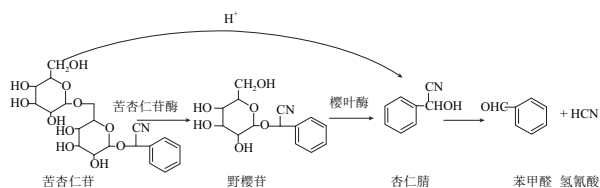


图3 苦杏仁苷的分解过程

Fig.3 The decomposing process of amygdalin

酸法水解的最优条件为盐酸浓度0.2mol/L、体积比5:1、水解温度40℃、酸解时间40min,苦杏仁苷的水解率为94.622%^[5]。苦杏仁苷中的糖苷键在微生物发酵液、酸或碱性条件下极易受到破坏,降解为氢氰酸和苯甲醛^[6],因此一些学者期望通过微生物发酵液对苦杏仁苷进行生物转化,以期找到具有抗癌活性的新物质。Chang等^[6]采用酶法水解苦杏仁苷,研究了黑曲霉粗酶提取液对苦杏仁苷的生物转化作用,研究表明在排除酸性条件的情况下,野樱苷并不是直接水解成杏仁腈和苯甲醛,而是在羟基化酶的作用下羟化成6-羟基-野樱苷,不过其抗肿瘤活性还有待进一步研究。

2 苦杏仁苷的测定方法

2.1 化学分析法

根据苦杏仁苷的分解过程(图3),葡萄糖、苯甲醛和氢氰酸的生成量即可作为衡量苦杏仁苷水解的指标。以氢氰酸为当量衡量苦杏仁苷含量的测定方法如下^[7]:取10g样品,溶解在60mL 0.1mol/L H₃PO₄中,混合2~3min,过滤;取2mL该溶液,加入2mL 4mol/L H₂SO₄在100℃条件下水解50min,并冷却;将冷却后的溶液加入5mL 3.6mol/L NaOH,混合,静置10min;取1mL该混合液

加入到含有7mL 0.2mol/L磷酸缓冲液(pH6.0)的试管中,并加入0.4mL 0.5%的氯胺-T溶液;在冰浴中冷却,加入1.6mL吡啶-巴比妥酸(40mL的吡啶加入到1g的巴比妥酸中,在200mL蒸馏水中溶解),紫色出现后反应60min,在583nm波长处检测;以磷酸缓冲液为空白,氰化钾的储备液用于标准曲线的校准,结果以mg HCN/kg(干质量)为单位,该方法的优点是仪器要求低,但是操作过程较为复杂。

2.2 仪器分析法

目前使用较多的天然产物的分析检测方法一般是色谱法与光谱法,在苦杏仁苷的检测与分析中使用较广泛的包括高效液相色谱法、分光光度法、薄层扫描法和二阶导数光谱法等。易骏^[8]分别采用紫外吸收光谱法和二阶导数光谱法测定3种不同产地桃仁中苦杏仁苷的含量,研究表明,利用紫外吸收光谱法时,背景液干扰严重,一阶导数光谱扫描测试谱图曲线中的吸收峰形不明显;采用二阶导数光谱法测定样品,不经分离即可消除背景干扰,且样品峰形与对照品相似。结果显示3种桃仁中以福建产的苦杏仁苷含量最高,达2.37%,其次是新疆产的,为2.06%,安徽产的含量最低,为1.38%。吴迪^[9]也比较了紫外分光光度法、高效液相色谱法和二阶导数光谱法对苦杏仁的分析效果,结果表明紫外分光光度法背景干扰严重,不能作为直接测定有效成分苦杏仁苷的方法。高效液相色谱法和二阶导数光谱法测得的苦杏仁苷的含量基本一致,分离度好,结果准确,其中二阶导数光谱法能很好地消除背景液的干扰,且操作简单。

高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)是一种通用型检测器,首先是由澳大利亚Union Carbide研究室开发的,20世纪90年代后期开始在我国应用于中药及其复方制剂的检测^[10]。它主要是基于不挥发的样品颗粒对光的散射程度与其质量成正比而进行检测,对没有紫外吸收、荧光或者电活性的物质以及产生末端紫外吸收的物质均能产生响应^[11]。ELSD将色谱柱的流出物雾化,细小的雾滴随之导入一个温度受控的漂移管中,该漂移管将流动相中的挥发性组分汽化。非挥发性溶质微粒的细雾进入一个光束,产生的散射光用光电倍增器测量,散射光的强度与浓度成正比^[12]。李海龙等^[13]采用HPLC-ELSD检测苦杏仁中苦杏仁苷含量,流动相为V_{甲醇}:V_水=40:60,流速1.0mL/min,柱温40℃,蒸发光散射检测器漂移管温度60℃,载气(空气)压力0.2MPa。在上述条件下测得苦杏仁苷在0.28~5.5μg范围内的线性关系良好($r=0.9975$),检出下限达58ng/L,平均加标回收率为96.2%,能够很好地用于食品中微量苦杏仁苷的检测。

2.3 酶联免疫法

酶联免疫法(ELISA)是在测定时,将受检样本与酶标抗原或抗体和固相载体表面上的抗原或抗体进行反应,

使结合在固相载体上的酶量与样本中受检物质的量呈一定的比例,加入酶反应的底物后,反应产生有色物质,有色物质的量与样本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应进行定性或定量分析^[14]。目前,酶联免疫分析法多被用于食品中有害物质残留的检测^[15-16]以及病毒感染的检测^[17-18]等。

Cho等^[19]在利用新西兰白兔的匙孔血蓝蛋白(KLH)与苦杏仁苷共轭,成功地利用苦杏仁苷在白兔体内诱导了抗血清反应,证明苦杏仁苷在白兔体内是作为一种半抗原;然后利用该多克隆抗体进行竞争性酶联免疫分析坚果中苦杏仁苷的含量。在另一实验中,他们又利用噬菌体表达的兔/人嵌合抗体库进行竞争性酶联免疫分析坚果中苦杏仁苷的含量,该方法的检出限为 1×10^{-9} mol/L;证明该方法能够有效地检测出各种种子和坚果中苦杏仁苷的含量,并且可用于食品提取液中苦杏仁苷含量的自动分析^[20]。

3 苦杏仁苷的提取与纯化方法

3.1 溶剂提取法

苦杏仁苷的提取一般采用溶剂法,该方法利用苦杏仁苷易溶于水、甲醇、乙醇等溶剂的性质,将其从植物种仁中提取出来。由于超声波具有空穴效应,能加速目标成分进入溶剂,因此提取通常采用超声波辅助,以有效缩短提取时间,提高提取效率。赵静等^[21]采用超声波法提取枇杷核中的苦杏仁苷,利用响应面法优化后得到最佳提取条件,在此条件下,苦杏仁苷的提取量为39.07mg/g。张红城等^[22]利用不同溶剂来提取杏花花粉中的苦杏仁苷,并且对溶剂含量、料液比、超声时间、提取时间各因素进行了正交试验,结果表明,苦杏仁苷的最佳提取溶剂为100%的乙醇,在料液比1:7、超声提取20min、振荡提取12h时可得到最高的苦杏仁苷得率为6.1%。

3.2 超临界CO₂流体萃取法

近20年来,超临界流体技术(SCF)在食品、医药、香料和天然色素等领域都有广泛的应用。国外这方面的研究主要集中在食品原料的处理、有效成分的提取以及在食品工业中有害成分的脱除等^[23]。例如利用SCF技术萃取分离食品中的苏丹红染料^[24]、利用超临界-色谱技术分馏百里香提取物^[25]、从艾草中萃取艾草油^[26]、从桉树皮中萃取酚类化合物^[27]等。目前大部分超临界流体都采用CO₂作为溶剂,具有不污染、不破坏样品中的有效成分等优点,因此,所得产物显得更安全可靠^[28]。Kawahito等^[29]利用超临界CO₂流体技术萃取枇杷仁中的生物活性成分β-谷甾醇和苦杏仁苷,结果显示在80℃、20MPa的条件下提取180min,苦杏仁苷的萃取率最高。然而,由于CO₂介电常数较小,对极性较强的物质溶解性较差,从而限制

了溶质在超临界流体中的溶解率,导致提取率低^[30]。因此在溶质和超临界CO₂流体二元体系中加入少量可以与超临界流体混溶的另一种溶剂即夹带剂(cosolvent),可有效地拓展了超临界流体的萃取范围^[31]。

3.3 苦杏仁苷的纯化

目前,比较常用的苦杏仁苷的纯化方法主要有乙醇结晶法和柱层析法。根据苦杏仁苷不溶于95%的冷乙醇的性质,可以在苦杏仁苷粗提液中加入15~30倍的95%的冷乙醇,并加入少量乙醚作为纯化剂以纯化苦杏仁苷,重结晶后得到的苦杏仁苷纯品含量可达75%左右^[32]。近年来,柱层析法在天然产物的分离纯化中应用广泛,在纯化苦杏仁苷的过程中,采用的填料主要是大孔树脂、聚酰胺以及硅胶等。崔国庭等^[33]采用大孔吸附树脂分离纯化苦杏仁中的苦杏仁苷,筛选后得到最佳树脂为LSA-30,最佳吸附条件为室温、pH6.0~9.0、在40℃条件下用pH6或pH8的60%乙醇洗脱可得到纯度为93.6%的苦杏仁苷白色晶体。李强^[34]采用聚酰胺柱层析-乙醇结晶相结合的方法纯化苦杏仁苷,经此方法纯化后,苦杏仁苷收率为77.84%,纯度达96.36%。

4 苦杏仁苷的药理作用

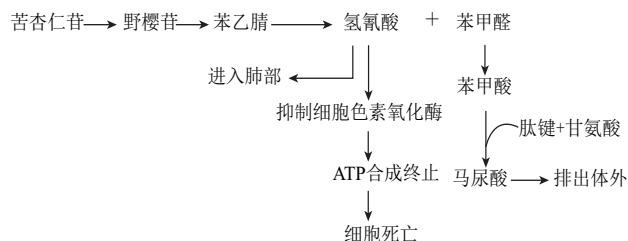


图4 苦杏仁苷在大鼠体内的代谢过程

Fig.4 The metabolic process of amygdalin in rats

经研究发现,苦杏仁苷单体和苦杏仁中苦杏仁苷在体内的代谢过程并不完全相同,苦杏仁苷灌胃后在血浆中仅检测到一种代谢产物M1,而苦杏仁生品与各炮制品灌胃给药后可在血浆中检测到2种代谢产物M1和M2(M1和M2为野樱苷的同分异构体),因此推测苦杏仁中其他成分对苦杏仁苷的代谢及异构体的转化存在一定的影响^[35]。付志玲等^[36]对大鼠进行灌胃给药苦杏仁,研究发现苦杏仁中苦杏仁苷在大鼠体内的代谢过程如下:苦杏仁苷首先经脱糖转化为野樱苷,再经脱糖转化为苯乙腈,后者不稳定,转化为氢氰酸和苯甲醛,氢氰酸进入肺部发挥止咳平喘的功效,苯甲醛被氧化成苯甲酸,后者被输送到肝脏后,在ATP、Mg²⁺和CoA的作用下与肽键和甘氨酸结合生成尿酸排出体外(图4)。此外,经研究发现苦杏仁苷在β-葡萄糖苷酶的作用下可分解产生氢氰酸,氢氰酸

通过抑制线粒体电子传递链的终端酶(细胞色素氧化酶)而使细胞ATP合成中断而死亡^[37],这可能与苦杏仁苷调节免疫功能和抗肿瘤的功​​效有关。

4.1 止咳平喘

哮喘是一类由于黏液分泌过度和气道持续增生引起的呼吸受阻的慢性疾病,气道重组是哮喘中观察到的一种病理现象,以黏液腺肥大、表皮下细胞纤维化和气道平滑肌细胞增殖为特征^[38]。因此,也就是说,能抑制气管平滑肌细胞增殖的物质就可以用来治疗哮喘。甘露^[39]研究发现苦杏仁苷对大鼠支气管平滑肌细胞(BSMC)存在一定的抑制作用,不同浓度的苦杏仁苷作用于BSMC后,在24h后开始出现抑制,并且随着浓度的增大抑制作用增强,加药浓度为0.704mmol/L时抑制率达到50%。房敏峰等^[40]在研究大鼠苦杏仁生品和霜制品灌胃给药后苦杏仁苷及其代谢产物在组织的分布情况时发现生品在0.5h时达到最高(肺中分布量为34.79 μ g/mL),后呈依次递减趋势;霜制品在0.5h达到较大浓度(肺中分布量为17.03 μ g/mL)之后趋于稳定。苦杏仁苷及其代谢产物除肝肾(药物的主要代谢器官)的分布量较大之外,在肺部的也有相对较多的分布,这可能与苦杏仁苷止咳平喘的功​​效有关。 β 2-肾上腺素受体是止咳平喘药物发挥药效的主要靶体,郑晓晖等^[41]将从家兔肺组织中纯化得到的 β 2-肾上腺素受体制成亲和色谱,用于苦杏仁中有效成分的筛选,结果表明苦杏仁苷与该受体色谱柱结合良好,说明苦杏仁中苦杏仁苷具有止咳平喘的作用。

4.2 治疗肿瘤的作用

细胞凋亡(apoptosis)是对于细胞坏死的一种主动的、程序性的细胞死亡过程,肿瘤细胞具有无限制增殖的生物学特性,这主要与肿瘤细胞死亡率过低有关^[42]。现已发现苦杏仁苷与苯甲醛或 β -葡萄糖苷酶的协同作用可明显提高抗癌效力。通常而言,癌细胞的无氧酵解占优势,该过程产物乳酸形成的偏酸性环境有利于提高 β -葡萄糖苷酶的活性,促使苦杏仁苷在癌细胞中水解出较多的氢氰酸和苯甲醛,而癌细胞内的硫氢化酶较正常细胞少,对氢氰酸的解毒能力较差,从而加速癌细胞的死亡^[43]。连彦军等^[37]将苦杏仁苷(0.1~1.0mmol/L)和 β -葡萄糖苷酶(250nmol/L)共同作用于人大肠癌LoVo细胞24h,通过形态学观察发现细胞呈现凋亡为主的形态改变,少数呈现坏死的特征;进一步细胞检测可见典型的细胞凋亡特征,说明苦杏仁苷被 β -葡萄糖苷酶特异性激活后具有诱导LoVo细胞凋亡的作用,因此苦杏仁苷有可能作为一种新的治疗肿瘤的细胞凋亡诱导剂。Zhou等^[43]利用苦杏仁苷单体及在 β -葡萄糖苷酶激活的苦杏仁苷对HepG2细胞进行了细胞活性测验,细胞活性(MTT)测验结果显示所有样品对癌细胞HepG2的增殖均有影响,苦杏仁苷单体和 β -葡萄糖苷酶激活的苦杏仁苷在48h时的IC₅₀分别为458.10mg/mL和3.2mg/mL。

4.3 调节免疫功能

苦杏仁苷除了在治疗哮喘、咳嗽、肿瘤疾病方面的作用外,对调节免疫系统也能起到至关重要的作用^[44]。目前危害人类健康的免疫疾病包括胰岛素依赖型糖尿病、动脉粥样硬化以及类风湿性关节炎等。IA型糖尿病是一种器官特异性自身免疫疾病,Heikkila等^[45]以Swiss-Webster小鼠为研究对象,首先对小鼠腹腔注射3g/kg的苦杏仁苷,1h后,对其静脉注射75mg/kg的四氧嘧啶,研究发现苦杏仁苷可有效保护小鼠防止四氧嘧啶诱导糖尿病的行为。其保护机制主要是由于苦杏仁苷可以高效清除由四氧嘧啶产生的有害高活性自由基,从而起到预防糖尿病的作用。

动脉粥样硬化是一种由T细胞介导的慢性自身免疫疾病^[46]。Deng等^[47]研究发现经腹腔注射苦杏仁苷后的载脂蛋白E缺陷(Apoe^{-/-})的动脉粥样硬化小鼠的甘油三酯(TG)减少了2倍,总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白(LDL)均减少了1.5倍。研究人员对管腔面积和主动脉斑块覆盖百分率进行了评价,流式细胞仪和实时PCR数据显示经苦杏仁苷处理后的小鼠调节性T细胞表达有所增加,由此说明苦杏仁苷在治疗动脉粥样硬化中对调节性T细胞的表达具有积极的作用,并能扩大管腔面积,减少主动脉斑块的覆盖率。

Hwang等^[48]采用体外脂多糖(LPS)诱导的细胞系和角叉菜胶诱导的踝关节炎大鼠模型研究苦杏仁苷的消炎和镇痛作用。研究发现1mmol/L的苦杏仁苷能有效抑制TNF- α 和IL-1 β mRNA在LPS诱导的细胞系中的表达。在角叉菜胶诱导大鼠关节炎疼痛后立刻注射一定浓度的苦杏仁苷,通过测量脚和脚踝的沉重分布律以及分析c-Fos、TNF- α 和IL-1 β 3种标记因子在脊髓中的表达对其作用效果进行评价。结果表明0.005mg/kg剂量条件下的苦杏仁苷能显著减轻关节炎痛觉,c-Fos、TNF- α 和IL-1 β 3种标记因子在脊髓中的表达也显著降低,因此认为苦杏仁苷能有效缓解LPS诱导的细胞系反应以及炎性疼痛。

5 结 语

目前在苦杏仁苷的分析研究方面已做了大量的工作,苦杏仁苷的分析检测方法比较完善和成熟;且大量研究表明苦杏仁苷在肿瘤、糖尿病、免疫抑制、动脉粥样硬化、麻风病等疾病方面的治疗都起到了一定的辅助作用,但对苦杏仁苷分离提取纯化工艺的深入研究较少。利用我国丰富的蔷薇科植物资源,对苦杏仁苷提取纯化工艺进行系统的研究并进行药品开发具有重要应用价值。然而,由于食用了含氢氰酸的果仁后,它在口腔、食道、胃或肠内水解可产生氢氰酸,将导致细胞不能正常呼吸;国际食品法典委员会颁布的食用木薯粉标

准中氢氰酸的限量指标为 10mg/kg ^[49]；氢氰酸对人类的急性致死剂量为 $0.5\sim 3.5\text{mg/kg}$ 体质量^[50]。因此，在饮料等食品的制作过程中，应当适当控制氢氰酸的含量或考虑将氢氰酸直接去除。今后，关于苦杏仁苷的研究将主要集中于苦杏仁苷的分离纯化、所释放的氢氰酸的毒理学和药理学作用、抗肿瘤机制、血浆中苦杏仁苷及其代谢产物的鉴定等方面。

参考文献：

- [1] CONN E. Cyanogenic compounds[J]. Ann Review Plant Physiology Plant Molecules Biology, 1980, 31: 433-451.
- [2] NIELSEN K, OLSEN C, PONTOPPIDAN K, et al. Leucine derived cyano glucosides in barley[J]. Plant Physiology, 2002, 129: 1066-1075.
- [3] VETTER J. Plant cyanogenic glycosides[J]. Toxicon, 2000, 38: 11-36.
- [4] 孙文基, 谢世昌. 天然药物成分定量分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 37.
- [5] 李强, 徐小琴, 李艳, 等. 酸法水解苦杏仁苷的研究[J]. 中国现代中药, 2009(1): 23-25.
- [6] CHANG J, ZHANG Y. Catalytic degradation of amygdalin by extracellular enzymes from *Aspergillus niger*[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(2): 195-200.
- [7] BRADURY J H E S. Analysis of cyanide in cassava using acid hydrolysis of cyanogenic glucosides[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1991, 55(2): 277-290.
- [8] 易骏. 3种不同产地桃仁中苦杏仁甙含量测定[J]. 时珍国医国药, 2000(7): 597-598.
- [9] 吴迪. 山杏仁中苦杏仁苷的提取工艺研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2006: 24-39.
- [10] 寿国香, 刘冰, 赫连淑. HPLC-蒸发光散射检测法中药及其复方制剂检测中的应用[J]. 中草药, 2001, 32(10): 958-959.
- [11] JIM F H. Separation and quantitation of cationic liposome components by high performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection[J]. Pharmaceutical Research, 1997, 14(9): 1269-1271.
- [12] LANTZ M D, RISLEY D S. Simultaneous resolution and detection of a drug substance, impurities, and counterion using a mixed-mode HPLC column with evaporative light scattering detection[J]. Peterson J A Liq Chromatography Related Technology, 1997, 20(9): 1409-1422.
- [13] 李海龙, 王静, 张英春, 等. HPLC-ELSD法测定苦杏仁中苦杏仁苷的含量[J]. 食品与发酵工业, 2007(1): 109-112.
- [14] TIJSEN P. Practice and theory of enzyme immunoassay[M]. Amsterdam: Elsevier, 1985: 3.
- [15] JOSEP V M, AGULLÓ C, FRANCESC A. Immunoassays for pyrrolo-clostin analysis in processed food products using novel monoclonal antibodies and quenchers-based extracts[J]. Food Control, 2013, 32(1): 42-48.
- [16] SANTOS P M, PEREIRA-FILHO E R, RODRIGUEZ-SANONA L E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared micro-spectroscopy and chemo-metrics analysis[J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 19-24.
- [17] RAUE R, HARMMEYER S, NANJIANI I A. Antibody responses to inactivated vaccines and natural infection in cattle using bovine viral diarrhea virus ELISA kits: assessment of potential to differentiate infected and vaccinated animals[J]. The Veterinary Journal, 2011, 187(3): 330-334.
- [18] MARS M H, van MAANEN C, VELLEMA P, et al. Evaluation of an indirect ELISA for detection of antibodies in bulk milk against blue-tongue virus infections in the Netherlands[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 146(3/4): 209-214.
- [19] CHO A, YI K S, RHIM J H. Detection of abnormally high amygdalin content in food by an enzyme immunoassay[J]. Molecules and Cells, 2006, 21(2): 308-313.
- [20] CHO A, SHIN K, CHUNG J, et al. A sensitive enzyme immunoassay for amygdalin in food extracts using a recombinant antibody[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(10): 2048-2052.
- [21] 赵静, 段杨峰, 孔繁渊, 等. 超声波辅助提取枇杷核苦杏仁苷工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 37-42.
- [22] 张红城, 尹策, 董捷, 等. 杏花花粉中苦杏仁苷的提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 236-241.
- [23] 钟宏, 梁瑾. 超临界流体技术的应用[J]. 精细化工中间体, 2006, 36(1): 11-13; 20.
- [24] ÁVILA M, ZOUGAGH M, EACARPA A, et al. Determination of sudan dyes in food samples using supercritical fluid extraction-capillary liquid chromatography[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2011, 55: 977-982.
- [25] MÓNICA R G, GONZALO V, GUILLERMO R, et al. Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2011, 55: 949-954.
- [26] MARTIN L, MAINAR A M, GONZÁLEZ-COLOMA A, et al. Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.)[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2011, 56: 64-71.
- [27] SONIA A O S, JUAN J V, CARLOS M S, et al. Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* labill bark[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2012, 71: 71-79.
- [28] MACHMUDAH S, KAWAHITO Y, SASAKI M, et al. Supercritical CO₂ extraction of rosehip seed oil: fatty acids composition and process optimization[J]. Journal of Supercritical Fluid, 2007, 41(3): 421-428.
- [29] KAWAHITO Y, KONDO M, MACHMUDAH S, et al. Supercritical CO₂ extraction of biological active compounds from loquat seed[J]. Separation and Purification Technology, 2008, 61: 130-135.
- [30] 牟天成, 韩布兴. 超临界流体的共溶剂效应和混合流体研究进展[J]. 化学进展, 2006, 18(1): 19-23.
- [31] PENNINGER J M L. Supercritical fluid technology[M]. London: Elsevier Science Publishers, 1985: 8.
- [32] 崔国庭. 杏仁油浸提及苦杏仁苷提取纯化技术研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2005: 37-42.
- [33] 崔国庭, 田呈瑞. 大孔吸附树脂分离纯化苦杏仁苷的研究[J]. 食品工业科技, 2005(4): 89-92.
- [34] 李强. 志丹杏杏仁中苦杏仁苷提取、纯化及水解研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2006: 45-46.
- [35] 房敏峰, 付志玲, 王启林, 等. 炮制对苦杏仁中苦杏仁苷在大鼠体内代谢的影响[J]. 中国中药杂志, 2010(20): 2684-2688.
- [36] 付志玲, 郑晓晖, 房敏峰. 霜制对苦杏仁中苦杏仁苷在大鼠尿液中的代谢与排泄影响[J]. 中成药, 2011(7): 1202-1205.
- [37] 连彦军, 陈道达, 黄韬, 等. β -葡萄糖苷酶激活苦杏仁苷诱导LoVo细胞凋亡及活性对Bax与bcl-2基因表达和Caspase-3的影响[J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(6): 413-416.
- [38] 景红娟, 汪长东, 露甘, 等. 麻黄碱抑制支气管平滑肌细胞增殖的机制[J]. 细胞生物学杂志, 2008(30): 647-650.
- [39] 甘露. 大鼠pEGFP-N1_BK_1真核表达载体_省略_构建及苦杏仁苷对支气管平滑肌细胞增殖的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007: 28-30.
- [40] 房敏峰, 付志玲, 王启林, 等. 霜制对苦杏仁中苦杏仁苷在大鼠体内代谢及组织分布的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011(11): 132-137.
- [41] 郑晓晖, 赵新锋, 杨荣. β 2-肾上腺素受体亲和色谱及其在苦杏仁活性成分筛选中的应用[J]. 科学通报, 2007, 52(18): 2111-2115.
- [42] KERR J, WINTERFORD C, HARMON B. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer-therapy[J]. Cancer, 1994, 73(8): 2013-2026.
- [43] ZHOU C, QIAN L, MA H, et al. Enhancement of amygdalin activated with β -D-glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(1): 516-523.
- [44] BARONI A, PAOLETTI I, GRECO R, et al. Immunomodulatory effects of a set of amygdalin analogues on human keratinocyte cells[J]. Experiment Dermatology, 2005, 14(11): 854-859.
- [45] HEIKKILÄ R E, CABBAT F S. The prevention of alloxan-induced diabetes by amygdalin[J]. Life Sciences, 1980, 27(8): 659-662.
- [46] HANSSON G K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2005, 352(16): 1685-1695.
- [47] DENG J, LI C, WANG H, et al. Amygdalin mediates relieved atherosclerosis in apolipo-protein E deficient mice through the induction of regulatory T cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 411(3): 523-529.
- [48] HWANG H, LEE H, KIM C, et al. Inhibitory effect of amygdalin on lipopolysaccharide-inducible TNF-alpha and IL-1 beta mRNA expression and carrageenan-Induced rat arthritis[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(10): 1641-1647.
- [49] Codex Stan 176-1989, Codex standard for edible cassava flour[S]. 1995.
- [50] BURNS A E, BRADBURY J H, CAVAGNARO T R, et al. Total cyanide content of cassava food products in Australia[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2012, 25: 79-82.