



色谱技术在中药有效成分辨识中的应用进展

李绍平*, 赵静, 钱正明, 李静

澳门大学中华医药研究院, 澳门

*通讯作者, E-mail: spli@umac.mo; lishaoping@hotmail.com

收稿日期: 2010-03-01; 接受日期: 2010-04-07

摘要 中药效应成分辨识是中药质量控制研究的关键, 本文从化学特性、生物靶标和整体作用三个层面综述了 2000 年以来色谱技术在中药效应成分辨识研究中的应用进展, 并提出未来发展方向.

关键词
色谱
中药
质量控制
效应成分

1 引言

中药是我国人民几千年来与疾病斗争的经验总结与智慧结晶, 是中华民族的宝贵财富. 然而, “没有标识活性化学物质含量的草药制剂, 服用剂量过大会发生危险, 而剂量过小又不起治疗作用, 让人无所适从”^[1]. 因此, 中药的质量控制是中药现代研究的关键之一, 其中又以效应成分的辨识与确认为基础, 而科学合理的效应成分标识是保证中药安全有效的前提. 由于中药化学成分多样性和作用机制的复杂性, 中药效应成分的辨识一直是中药研究的瓶颈.

效应成分是指能够表征中药功效的化学成分集合, 包括活性成分和相关成分. 活性成分是指具有特定功效的化学成分(群); 相关成分是指本身无特定功效但却能通过如增加溶解度、改善稳定性, 提高生物利用度等影响活性成分作用的化学成分(群). 多年来, 随着科学技术的进步, 中药活性成分的辨识(筛选、确认)技术得到了长足的发展, 由传统的化学分离、结构鉴定、活性筛选模式到活性导向化学分离, 进而形成以药物基本特性(亲和性 affinity 和内在活性 intrinsic activity)为基础的色谱分离和在线检测技术. 遗憾的是, 虽然中药整体作用(即多成分共同作用)已成广泛

共识, 但中药功效相关成分的研究技术却停滞不前, 成为现代中药质量控制研究亟待突破的瓶颈问题.

本文将从化学特性、生物靶标和整体作用等三个层面综述色谱技术在中药效应成分尤其是活性成分辨识方面的应用发展, 概述各方法的特点, 探讨中药效应成分辨识技术的发展策略.

2 基于化学特性的中药活性成分色谱辨识技术

自由基是含有一个或多个不对称电子的原子、分子或离子, 由其引起的膜脂质氧化性损伤是导致人体衰老和某些疾病如癌症、白内障、心血管疾病等的重要因素. 因此, 具有自由基清除能力的化合物是一类重要的中药活性成分, 且可利用自由基清除前后吸光度等变化, 在线检测色谱分离物的自由基清除能力, 进行中药活性成分的辨识(图 1). 该方法使分析样品经 HPLC 分离后, 首先进入紫外(DAD)检测器, 得到样品化学特征色谱图, 流出物再被分流分别进入 MS 检测器获取流出物的质谱信息和生物活性检测单元与活性检测试剂作用, 利用自由基清除前后吸光度等变化, 即自由基清除后, 在色谱图中形成一个倒峰, 辨识活性化合物.

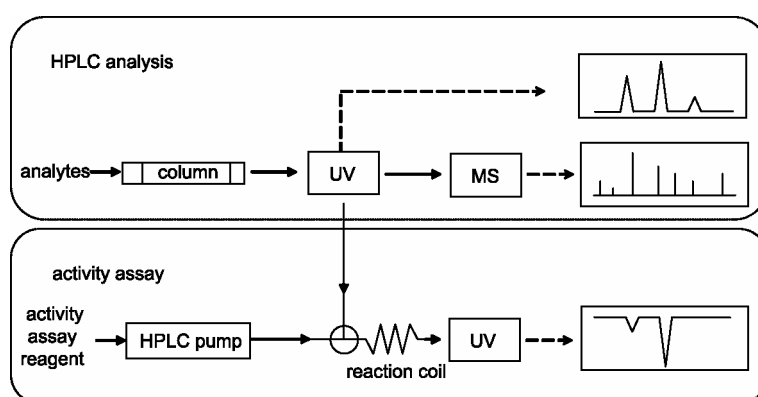


图1 典型的高效液相色谱分离-在线活性检测辨识系统结构示意图

2.1 色谱分离方法

目前, 基于化学特性的中药活性成分色谱分离-在线活性检测技术主要用于中药抗氧化活性成分的辨识, 根据所用色谱技术的不同, 分别有薄层色谱法^[2]、高效液相色谱法^[3, 4]和高效毛细管电泳法^[5~7]等, 其中又以高效液相色谱法最为常用。

笔者实验室利用建立的 HPLC-DAD-MS/ABTS 系统成功辨识了当归油和普洱茶中的自由基清除成分(抗氧化剂), 发现当归油中的主要抗氧化活性成分为阿魏酸松柏酯 (coniferyl ferulate), 体外药理实验也证实了该结果^[8]。从普洱茶中检出 10 个抗氧化活性成分, 通过与标准品或文献比对紫外光谱和质谱的方法辨识了其中的 9 个成分, 即表儿茶素 (epicatechin)、芦丁(rutin)、没食子酸 (gallic acid)、没食子儿茶素 (gallocatechin)、表没食子儿茶素(epigallocatechin)、

儿茶素 (catechin)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechingallate)、表儿茶素没食子酸酯 (epicatechingallate) 和槲皮素-3-葡萄糖苷 (quercetin-3-glucoside), 其含量高低顺序一般为: 新茶抗氧化活性成分含量高于老茶, 生茶抗氧化活性成分含量高于熟茶^[9]。

值得注意的是, 中药成分复杂, 活性成分含量低, 药物功效可能是同类成分相似活性综合作用的结果。而 HPLC 由于分离度高, 完全分离后的单体成分可能会因为浓度低、在线活性检测反应时间短等影响, 无法检出体外具有明显抗氧化作用中药提取物中的活性成分。我们采用 HPLC-DAD-MS/ABTS 系统分析体外具有明显抗氧化作用^[10]的温郁金油时, 未发现其中明显的活性成分色谱峰。改用分离度较差的 HPTLC 分离、DPPH 生物自显影法检测发现, 温郁金油中有具明显自由基清除能力的色谱条带(图 2), 取

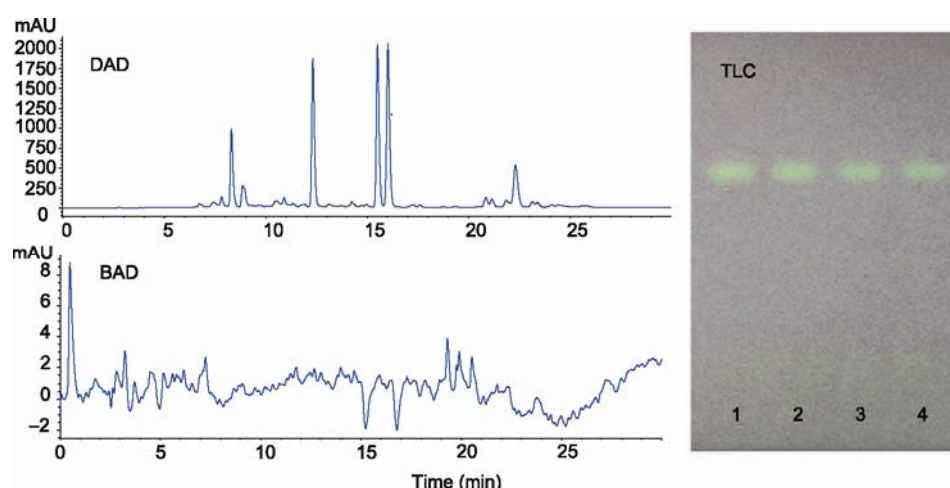


图2 温郁金油 HPLC 分离紫外(DAD)和 ABTS 检测(BAD)色谱图及 TLC 分离 DPPH 生物自显影薄层色谱图. 1~4, 温郁金油样品

出该色谱条带,其甲醇洗脱液经 GC-MS 分析显示:其成分是莪术烯(curzerene)、呋喃二烯(furanodiene)和两个未知化合物.此外,毛细管电泳分离也被用于抗氧化活性成分的辨识^[5-7],高效液相色谱分离-活性检测联用法用于抗氧化活性成分的辨识已有综述^[3,4].

值得注意的是:基于模版化学特征,具有高度选择性的分子印迹(molecularly imprinting)技术在新药研究中的应用日益广泛.该技术首先以具有适当功能基的功能单体与印迹分子结合形成单体-印迹分子复合物,然后选择适当的交联剂将功能单体互相交联起来形成共聚物-分子印迹聚合物(molecular imprinted polymer, MIP),从而使功能单体上的功能基在空间排列和空间定向上固定下来,再通过一定的方法把印迹分子脱去,这样就在高分子共聚物中留下一个与印迹分子在空间结构上完全匹配,并可与印迹分子专一结合的三维空穴. MIP 具有极高的选择性、很好的物理和化学稳定性,可用于寻找已知活性药物的类似物^[11-15],在中药活性成分筛选中也有应用^[16,17],并显示出良好的应用前景.

2.2 活性检测方法

化学发光法和分光光度法是色谱分离-活性检测体系中常用的基于化学特性的活性成分检测技术.化学发光测定法的特点是灵敏度高、化学反应与发光现象同时发生,但测定选择性差.由于自由基都可以产生化学发光,通常化学发光法检测的是总自由基的产生和存在,不能确定是哪一种自由基.因此,针对不同的自由基,可以选用特定的体系,如鲁米那-邻苯三酚(pyrogallol)体系和黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤体系检测清除 $\cdot\text{OH}$ 能力,鲁米那- H_2O_2 体系检测清除 H_2O_2 能力等.其中鲁米那反应体系是色谱分离-活性检测中化学发光检测自由基清除能力的常用方法,如鲁米那-微过氧化物酶- H_2O_2 体系、鲁米那-邻苯三酚(pyrogallol)体系、鲁米那-铁氰化钾体系、鲁米那-碘体系等^[3].不足的是鲁米那体系不适用于某些抗氧化剂如水杨酸等的检测,梯度洗脱时基线漂移严重,且化学发光检测与水-甲醇体系不兼容、所需仪器设备较高^[18].

分光光度法较化学发光法具有仪器装置简单、基线稳定和易操作的优点,被广泛用于药用植物抗氧化剂的筛选研究^[3,4].理想的在线活性检测试剂要求响应速度快,灵敏度高,溶剂适应性广以避免柱后稀

释.分光光度法抗氧化活性检测的常用自由基为二苯代苦味酰自由基(DPPH)和 2,2-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)即 ABTS,前者使用方便,但响应速度较慢,水溶性差,特别值得注意的是 DPPH 有 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 和 2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl,虽都是自由基,但用作活性检测试剂为前者,后者分子量大,溶解性差,响应速度慢. ABTS 虽然只能由反应生成,使用不够方便,但响应迅速,溶解性好(水和有机溶剂均可以溶解),是较理想的在线活性检测试剂.薄层色谱-生物自显影技术不受在线活性检测时间的限制,可以通过延长反应时间提高检测灵敏度,尤其适用于响应速度较慢的活性检测.常用基于化学特性的活性检测方法见表 1.

3 基于单一靶标的中药活性成分色谱辨识技术

基于化学特性的中药活性成分色谱辨识技术虽具操作简单,响应快速等优点,但其非针对药物作用的靶标,特异性差(MIP 除外).因此利用化合物与药物靶标的亲和性和与靶标结合后引起的活性进行中药活性成分的辨识具有作用明确、特异好的特点,有助于揭示中药药效物质基础和发现活性先导化合物.近年来,色谱分离和药物靶标技术的结合为中药活性成分的辨识提供了一种快速方法.

3.1 基于靶标亲和性的中药活性成分辨识技术

基于靶标亲和性的中药活性成分辨识技术是指利用靶标分子和潜在药物(活性成分)的亲和性,特异性地辨识中药中可能与靶标作用的成分.由于与靶标具有亲和性的化合物未必有内地活性,所以筛选出的化合物需进一步通过活性检测给予证实.目前常用基于单一靶标亲和性的中药活性成分辨识主要采用高效液相色谱法,使用的靶标主要是非特异性的白蛋白、DNA,而特异性靶标如血管紧张素转化酶等由于来源困难,成本高,实际应用较少(表 2).

3.2 基于靶标内在活性的中药活性成分辨识技术

基于靶标内在活性的中药活性成分辨识是指利用色谱技术对中药成分进行分离后,各分离成分分别

表1 基于化学特性的中药活性成分色谱辨识技术应用(2000~2009 年)

样品	色谱方法	检测器	检测试剂	活性成分	文献
银杏叶	HPLC	CL	鲁米诺-过氧化氢-邻苯三酚	槲皮素-3-O-(2-O,6-O-双 α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖苷, 山奈酚-3-O-(2-O,6-O-双 α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖苷, 异鼠李素-3-O-(2-O,6-O-双 α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖苷, 槲皮素-3-O-(6-O- α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖苷, 3'-甲氧基杨梅树皮素-3-O-(6-O- α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖苷, 槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖苷, 槲皮素-3-O-(2-O- β -D-葡萄糖基)- α -L-鼠李糖苷, 山奈酚-3-O-(6-O- α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖苷, 异鼠李素-3-O-(6-O- α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖苷, 山奈酚-3-O-(2-O- β -D-葡萄糖基)- α -L-鼠李糖苷, 槲皮素-3-O-[2-O-(6-O-p-羟基-反式肉桂酰基)- β -D-葡萄糖基]- α -L-鼠李糖苷, 山奈酚-3-O-[2-O-(6-O-p-羟基-反式肉桂酰基)- β -D-葡萄糖基]- α -L-鼠李糖苷	[19]
山楂叶	HPLC	vis 520 nm	DPPH	绿原酸, 表儿茶素, 芦丁, 金丝桃苷和7个未鉴定成分	[20]
		CL	鲁米诺-过氧化氢	绿原酸, 表儿茶素, 芦丁, 金丝桃苷, 槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖苷和11个未鉴定成分	[21]
山楂花	HPLC	vis 520 nm	DPPH	绿原酸, 表儿茶素, 芦丁, 金丝桃苷和9个未鉴定成分	[20]
牛至	HPLC	vis 520 nm	DPPH	芦丁, 金丝桃苷, 迷迭香酸, vitexin-2 和7个未鉴定成分	[20]
牛至叶	HPLC	vis 520 nm	DPPH	芦丁, 金丝桃苷, 迷迭香酸, vitexin-2 和6个未鉴定成分	[20]
西洋耆草	HPLC	vis 520 nm	DPPH	绿原酸, 木犀草素, 芦丁, 木犀草素-7-葡萄糖苷和8个未鉴定成分	[20]
丹参注射液	HPLC	CL	鲁米诺-邻苯三酚	3,4-双羟基苯乳酸, 原儿茶酸, 原儿茶醛, 咖啡酸, 丹酚酸 D, 丹酚酸 G, 丹酚酸 E, 迷迭香酸, 紫草酸, 丹酚酸 B, 丹酚酸 A, 丹酚酸 C 和1个未鉴定成分	[22]
台湾相思树叶	HPLC	vis 517nm	DPPH	没食子酸, 儿茶素, 没食子酸甲酯, 表儿茶素, 杨梅树皮素-3-O-葡萄糖苷, 杨梅树皮素-3-O-吡喃鼠李糖苷, 杨梅树皮素-3-O-鼠李糖苷, 槲皮素-3-O-吡喃鼠李糖苷, 杨梅树皮素-3-O-(2"-O-没食子酰基)-吡喃鼠李糖苷, 杨梅树皮素-3-O-(3"-O-没食子酰基)-吡喃鼠李糖苷, 杨梅树皮素和3-甲氧基杨梅树皮素	[23]
	HPLC	vis 517 nm	DPPH	茶氨酸, 茶没食子素, 没食子儿茶素, 茶碱, 色氨酸, 表没食子儿茶素, 表没食子儿茶素没食子酸酯, 表儿茶酚, 没食子酸酯, 没食子儿茶素没食子酸酯和儿茶素没食子酸酯	[24]
茶叶	CE	CL	2-methyl-6-p-methoxyphenylethynylimidazopyrazinone-次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶	儿茶素	[5]
普洱茶	HPLC	vis 750 nm	ABTS	表儿茶素, 芦丁, 没食子酸, 没食子儿茶素, 表没食子儿茶素, 儿茶素, 表没食子儿茶素没食子酸酯, 表儿茶素没食子酸酯, 槲皮素-3-葡萄糖苷和一个未鉴定成分	[9]
甘草	HPLC	vis 517 nm	DPPH	异甘草素, 甘草香豆素, 甘草异黄酮 B 和去氢粗毛甘草素 D	[24]
贯叶连翘	HPLC	vis 515 nm	DPPH	绿原酸, 绿原酸衍化物, 芦丁, 金丝桃苷, 槲皮素, 穗花杉双黄酮, 贯叶金丝桃素, 加贯叶金丝桃素, 贯叶金丝桃素和加贯叶金丝桃素类似物	[25]
<i>Hypericum richeri</i>	HPLC	vis 517 nm	DPPH	3-O-咖啡酰基奎宁酸, 3-O-咖啡酰基奎宁酸, 杨梅树皮素-3-O-芸香糖苷, 杨梅树皮素-3-O-半乳糖苷, 杨梅树皮素-3-O-葡萄糖苷, 芦丁, 金丝桃苷, 异槲皮苷, 槲皮苷和槲皮素	[26]
槐米	CE	CL	鲁米诺-过氧化氢-Cu ²⁺	芦丁	[6]
黄芪	CE	CL	鲁米诺-过氧化氢-Cu ²⁺	12个未鉴定成分	[7]
江南卷柏	HSCCC	vis 517 nm	DPPH	穗花杉双黄酮, 扁柏双黄酮, 罗汉松黄酮 A 和银杏黄酮	[27]
<i>Fagara zanthoxyloides</i>	TLC*	-	DPPH	顺式-崖椒酰胺, 反式-崖椒酰胺, (+)-芝麻素, 8-丙酮基二氢白屈菜红碱	[28]
<i>Eriophorum scheuchzeri</i>	TLC*	-	DPPH	苜蓿素, eriophorin A, eriophorin C, 5,7,4'-三羟基-8-(2-羟基-3-甲基丁基)-二氢黄酮, parvisoflavones A, parvisoflavones B	[29]
乌药	TLC	-	DPPH	甲异波尔定	[30]
厚朴	TLC	-	DPPH	厚朴酚, 和厚朴酚	[30]
紫苏子	TLC	-	DPPH	木犀草素, 芹菜素和1个未鉴定成分	[30]
野生紫苏	TLC*	-	DPPH	迷迭香酸, 木犀草素, 芹菜素和金圣草黄素	[31]
<i>Umbilicaria antarctica</i>	TLC	-	DPPH	红粉苔酸和1个未鉴定成分	[32]
洋甘草	TLC*	-	DPPH	eicosanyl caffeate, docosyl caffeate	[33]

HSCCC, 高速逆流色谱; TLC 薄层色谱; *, 活性导向化学分离

表 2 基于单一靶标的活性成分色谱辨识技术在中药中的应用(2000~2009 年)

辨识原理	样品	靶标	色谱方法	检测器		活性成分	文献
				化学	活性		
亲和性	苦参	小牛胸腺 DNA	HPLC	UV 260 nm	—	未发现活性成分	[41]
	黄连	小牛胸腺 DNA	HPLC	UV 345 nm APCI MS	—	药根碱, 巴马丁, 小檗碱和 4 个未鉴定成分	[42]
	黄柏	小牛胸腺 DNA	HPLC	UV 345 nm	—	药根碱, 巴马丁, 小檗碱和 4 个未鉴定成分	[41]
	人血清白蛋白	人血清白蛋白	2D-HPLC	UV 250 nm APCI MS	—	芦荟大黄素-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷, 大黄酚-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷, 芦荟大黄素, 大黄素-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷和大黄酚	[43]
	大黄	小牛胸腺 DNA	2D-HPLC	UV 280 nm APCI MS	—	大黄酚-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷, 大黄素甲醚-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷, 芦荟大黄素, 大黄酸, 大黄素和 9 个未鉴定成分	[42]
	人血清白蛋白	人血清白蛋白	HPLC	vis 430 nm APCI MS	—	大黄酚-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷, 大黄素甲醚-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷, 芦荟大黄素, 大黄酸, 大黄素和 6 个未鉴定成分	[44]
	川芎	牛血清白蛋白	HPLC	UV 215 nm APCI MS	—	阿魏酸, 3-丁基苯酚和 2 个未鉴定成分	[45]
	牛血清白蛋白	牛血清白蛋白	HPLC	UV 215 nm	—	阿魏酸, 川芎嗪, 藜本内酯和 2 个未鉴定成分	[46]
	川芎	牛血清白蛋白	HPLC	UV 240 nm 280 nm	—	3-亚丁基-1,3,4,5-四氢-1-异苯并呋喃醇, 藜本内酯和 4 个未鉴定成分	[47]
	α 1-酸性糖蛋白	α 1-酸性糖蛋白	HPLC	UV 215 nm	—	阿魏酸, 川芎嗪, 藜本内酯和 2 个未鉴定成分	[46]
	当归补血汤	牛血清白蛋白	HPLC	UV 280 nm ESI MS	—	绿原酸, 阿魏酸, 芒柄花苷, 毛蕊异黄酮, 洋川芎内酯 I 或 H, 6-O-丙二酰基-7-O- β -D-葡萄糖毛蕊异黄酮苷, 6-O-丙二酰基-7-O- β -D-葡萄糖芒柄花苷和 2 个未鉴定成分	[48]
	金银花	牛血清白蛋白	HPLC	UV 360 nm ESI MS	—	绿原酸, 4-咖啡酰奎尼酸, 咖啡酸, 芦丁, 槲皮素-3-O-葡萄糖苷, 木犀草素-7-O-葡萄糖苷, 忍冬苷, 3,5-二咖啡酰奎宁酸, 4,5-二咖啡酰奎宁酸和 3,4-二咖啡酰奎宁酸	[49]
	小牛胸腺 DNA	小牛胸腺 DNA	HPLC	UV 360 nm ESI MS	—	芦丁, 槲皮素-3-O-葡萄糖苷, 木犀草素-7-O-葡萄糖苷和忍冬苷	[50]
	地龙	血管紧张素转化酶	HPLC	UV 280 nm	—	3 个未鉴定成分	[51]
	山楂	血管紧张素转化酶	HPLC	UV 265 nm	—	2 个未鉴定成分	[51]
	茵陈蒿	人血清白蛋白	HPLC	UV 238 nm	—	滨蒿内酯, 茵陈色原酮和 6 个未鉴定成分	[52]
	当归	人血清白蛋白	HPLC	UV 205 nm 313 nm	—	阿魏酸, 藜本内酯和 5 个未鉴定成分	[53]
	龙胆泻肝汤	人血清白蛋白	2D-HPLC	UV 254 nm APCI MS	—	黄芩苷, 异龙胆酮苷, 龙胆苦苷, 龙胆二糖苷, 京尼平苷, 芹糖甘草苷, 芒柄花苷, 甘草黄苷, 汉黄芩苷, ferfertoside, 6-epiferfertoside, 4'-O- β -D-葡萄糖龙胆苦苷, 6-阿拉伯糖基-8-葡萄糖基白杨素苷, 6-葡萄糖基-8-阿拉伯糖基白杨素苷, 汉黄芩素-5-O- β -D-葡萄糖苷, 粘毛黄芩素 III-2'-O- β -D-葡萄糖苷, 白杨素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷, 千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷	[54]
	苦杏仁	β 2-肾上腺素受体	HPLC	UV APCI MS	—	苦杏仁苷	[55]
内在活性	水仙	乙酰胆碱酯酶	HPLC	UV 215 nm ESI MS	vis 405nm	加兰他敏和 1 个未鉴定成分	[56]
				—	MS	ungiminorine	[57]
						加兰他敏	[58]

续表 2

辨识原理	样品	靶标	色谱方法	检测器		活性成分	文献
				化学	活性		
	天然产物	磷酸二酯酶	HPLC	ESI MS	FD	胆茶碱, 罂粟碱	[59]
	天然产物	碱性磷酸酶	HPLC	ESI MS	FD	四咪唑	[60]
	红三叶草	组织蛋白酶B	HPLC	—	ESI MS	未发现酶抑制剂	[61]
	纳丽石蒜	乙酰胆碱酯酶	HPLC	UV ESI MS	FD	恩其明	[62]
	茶叶	组织蛋白酶B	HPLC	—	MS	未发现酶抑制剂	[63]
	罗勒	人细胞色素P450 1A2酶	HPLC	UV 225 nm	FD	3个未鉴定成分	[64]
	卡瓦	人细胞色素P450 1A2酶	HPLC	UV 355 nm	FD	5个未鉴定成分	[64]
	长萼鸡眼草	雌激素受体	HPLC	ESI/APCI MS	FD	1个未鉴定成分	[65]
	石榴皮	雌激素受体	HPLC	APCI/MS	FD	木犀草素, 槲皮素, 山奈酚	[66]
	<i>Galanthus nivalis</i>	乙酰胆碱酯酶	TLC	—	—	加兰他敏	[67]
	<i>Leucojum vernum</i>	乙酰胆碱酯酶	TLC	—	—	加兰他敏	[67]
	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	乙酰胆碱酯酶	TLC	—	—	加兰他敏	[67]
	<i>Ismene festalis</i>	乙酰胆碱酯酶	TLC	—	—	加兰他敏	[67]
	<i>Gentiana campestris</i>	乙酰胆碱酯酶	TLC*	—	—	雏菊叶龙胆酮, 去甲当药苷和当药醇苷	[68]
	欧前胡	乙酰胆碱酯酶	TLC*	—	—	奥斯竹生, 戊烯氧呋豆素, 奥斯竹素, 水合羟基前胡素和前胡色原酮	[69]
	<i>Galium latoramosum</i>	黄嘌呤氧化酶	TLC	—	—	未发现酶抑制剂	[36]
	小杉兰	乙酰胆碱酯酶	TLC	—	—	石杉碱甲	[70]
	<i>Solanum diflorum</i>	β -葡萄糖苷酶	TLC	—	—	1个未鉴定成分	[35]
	<i>Setaria parviflora</i>	β -葡萄糖苷酶	TLC	—	—	1个未鉴定成分	[35]
	大叶醉鱼草	乙酰胆碱酯酶	TLC*	—	—	蒙花苷	[71]
	白屈菜	乙酰胆碱酯酶	TLC	—	—	刺罂粟碱	[38]
	<i>Corydalis solida</i>	乙酰胆碱酯酶	TLC	—	—	延胡索碱和球紫堇碱	[38]
	<i>Corydalis bulbosa</i>	乙酰胆碱酯酶	TLC	—	—	延胡索碱和球紫堇碱	[38]
	<i>Warszewiczia coccinea</i>	乙酰胆碱酯酶	TLC*	—	—	3 β ,6 β ,19 α -trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid 和 3 β a,6 β -dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid	[72]
	<i>Peganum Nigellastrum</i>	乙酰胆碱酯酶	TLC*	—	—	鸭嘴花酮碱, 鸭嘴花碱, 去氢骆驼蓬碱, 去氧鸭嘴花酮碱, 去氧鸭嘴花碱, 骆驼蓬碱, 哈尔醇, 哈尔满, nigellastrine I 和 nigellastrine II	[73]
	长寿花	乙酰胆碱酯酶	TLC	UV 207 nm	vis 565 nm	加兰他敏和二氢加兰他敏	[74]
	丹参	乙酰胆碱酯酶	TLC*	—	—	二氢丹参酮 I	[76]
	<i>Triclisia sacleuxii</i>	乙酰胆碱酯酶	TLC*	—	—	lindoldhamine	[77]

* 活性导向化学分离

生化变化检测该成分是否有内在活性,进而直接辨识中药活性成分的方法.目前常用的色谱方法有:薄层色谱法和高效液相色谱法^[2,3].

高效液相色谱法辨识中药活性成分过程主要有两部分组成(图 1):样品高效液相色谱分离和分离成分靶标活性检测.高效液相色谱法根据柱后添加靶分子类型的不同可分为:酶抑制剂检测法和配体检测法.根据靶标活性检测对象性质的不同,应用的检测器有紫外/可见光检测器、荧光检测器(FD)和质谱检测器^[3].紫外/可见光检测器具有简单实用的特点,但其灵敏度较低;荧光检测器较紫外/可见光检测器具有更好的灵敏度和特异性,但该方法只有当反应前后体系的荧光发生变化才能使用;质谱检测器则具有灵敏度高,特异性强,能同时提供被检测成分化学结构信息等优点,但只能使用挥发性缓冲盐系统.近年来,高效液相色谱分离-靶标活性检测法在植物药活性成分辨析中的应用日益增多,详见表 2.

薄层色谱法是利用靶标反应液作为薄层色谱分离的显色剂,根据色谱斑点颜色的变化判断分析样品各薄层色谱斑点是否具有相关活性.该方法已被广泛应用于药用植物中活性成分的筛选,包括胆碱酯酶抑制剂^[34]、葡萄糖苷酶抑制^[35]、黄嘌呤氧化酶抑制剂^[36]和雌激素类化合物^[37]筛选,其中报道最多的是胆碱酯酶抑制剂的筛选.由于薄层色谱分离能力较差,对化合物定性又主要依靠 R_f 值,因此,对筛选出具活性的斑点成分难于进行鉴定,文献报道主要用于植物药活性组分的初步筛选及化学分离过程的活性成分追踪. Berkov 等^[38]将薄层色谱-靶标活性检测和 GC-MS 结合使用,建立了快速筛选乙酰胆碱酶抑制剂方法,利用该方法分别从白屈菜, *Corydalis solidia* 和 *Corydalis bulbosa* 中发现了具乙酰胆碱酶抑制活性的刺罂粟碱 (stylophine)、延胡索碱 (corydaline) 和球紫堇碱 (bulbocapnine), 详见表 2. 未来,薄层分离活性斑点如使用 MALDI-TOF 进行成分鉴定^[39,40],将有利于促进薄层色谱技术在中药活性成分辨识中的应用.

4 基于多靶标的中药活性成分色谱辨识技术

受体模型和酶模型是药物高通量筛选的主要方法,也是基于单一靶标中药活性成分色谱辨识技术的基础.遗憾的是,中药成分复杂,作用靶标不明,

且其功效常为多种靶标综合作用的结果.因此,基于单一靶标的中药活性成分辨识具有效率低、作用单一、使用成本高等缺点.现代细胞生物学发现,细胞膜上存在多种受体,虽然同一受体在不同细胞膜上的受体数目不同,一般受体密度均可达 $10^3 \sim 10^4$ 个/细胞,是多靶标的理想材料.近年来,基于靶标与化学成分的亲和性,各种细胞膜^[78]和活体细胞^[79]均被用于中药活性成分的筛选.而利用的色谱方式则各不同,主要有固定化生物膜色谱法和生物特异萃取法等.

固定化细胞膜色谱法,即将活性细胞膜固定在特定载体表面,制备成细胞膜固定相,用液相色谱的方法研究化学成分与固定相上膜受体相互作用的技术.在国内,常称为细胞膜色谱法(Cell Membrane Chromatography, CMC),也是生物膜色谱技术常用的形式.西安交大贺浪冲教授等在国内率先建立固定化细胞膜色谱技术,将高效液相色谱、细胞生物学与受体药理学相结合,用液相色谱法在动态条件下研究化合物与固定相上细胞膜及受体的相互作用^[80,81].该方法的主要流程包括:1,分离活性细胞膜;2,固定化活性细胞膜;3,制备细胞膜色谱柱;4,细胞膜色谱分离、分析,研究化合物与细胞膜受体相互作用特性.固定化细胞膜色谱法常用的分析方法有亲和选择色谱法(Selective affinity chromatography)和前沿亲和色谱(Frontal affinity chromatography)法,前者是将细胞膜固定在色谱柱固相载体上,样品与固定化膜在结合缓冲溶液中孵育.不结合的化合物用相同的缓冲溶液洗脱掉,在适当的变性条件下,如增加盐或有机溶剂浓度、降低 pH 值等方法使受体和配基解离,将结合成分从柱中洗脱下来.前沿亲和色谱则是在分析前用结合缓冲溶液平衡固定化细胞膜色谱柱,然后切换到含配基的结合缓冲溶液中,使混合物不断经过柱子,与细胞膜不结合的化合物以死体积流出,配基与膜上的靶标结合而被保留.当靶标饱和或被更强的配基替代后,结合配基从柱子中流出.至今,固定化细胞膜色谱法已成功应用于当归、川芎、淫羊藿、菟丝子、红毛七、太白花、红花、四物汤、心康平、原小檗碱、长春七、金刷把等中药及其制剂中活性成分的筛选(表 3),相关内容也已有综述^[78,82].

固定化细胞膜色谱法的主要优点是:药物可不经提取分离步骤,直接在相应的固定化细胞膜色谱模型上完成筛选过程;若通过基因改造方法使细胞

膜受体密度增加,也可选择性快速富积活性化合物.但该方法的最大缺点是细胞生理作用环境与色谱分离和质谱检测等条件不能兼容,导致色谱分离能力差,活性成分鉴定困难;细胞膜固定化过程中,靶标生物学特性可能发生改变,甚至完全失活;细胞膜色谱柱使用寿命短;操作繁琐.因此,如何提高细胞膜亲和作用与色谱的兼容性是生物膜色谱应用发展的关键.

我们采用生物特异萃取法结合高效液相色谱分离进行中药活性成分的辨识,很好地解决了细胞膜亲和作用与复杂成分色谱分离的兼容问题,取得了满意的结果.该方法即是样品与靶细胞(膜)在结合缓冲溶液中孵育,不结合的化合物用相同的缓冲溶液洗脱掉,在适当的变性条件下使结合成分和受体解离,从柱中洗脱下来;应用HPLC比较结合前后和/或洗脱液中的化学成分,即可辨识准活性成分(图3),以供进一步的活性确认.

生物特异萃取-高效液相色谱法优点是:细胞(膜)亲和结合与化学成分色谱分离分开进行,有利于维持细胞膜的生理状态;操作简便易行.为了更好地模拟细胞膜上受体生理功能,简化亲和萃取操作过程,也可采用活细胞作为生物特异萃取材料.该方法已成功用于当归^[83]、三七^[84]、冬虫夏草^[85]、丹参^[86]、脉络宁^[87]等中药活性成分的辨识(详见表3),显示出了良好的应用前景^[88, 89].

5 基于整体作用的中药效应成分色谱辨识技术

无论是基于化学特性还是靶标亲和性或内在活性的色谱辨识技术,针对的均是活性成分.然而,中药的一些非活性成分可能对药物功效的发挥起着至关重要的作用.如贯叶连翘(*Hypericum perforatum* L.)抗抑郁活性成分主要是金丝桃素(hypericin)和贯叶金丝桃素(hyperforin)等,但这些成分的作用却与无抗抑郁活性的芦丁含量密切相关,只有芦丁含量在3%以上的提取物才具明显作用^[112].小檗属植物中存在的细菌多重耐药外排泵抑制剂5'-methoxyhydnocarpin本身也无抗菌活性,但可明显增强小檗碱的抗菌作用^[113].从药物作用的本质来看,中药提取物就象是个西药制剂配方,不同的是:西药制剂配方中的活性成分明确,各种辅料的作用清楚,增效剂、吸收促进

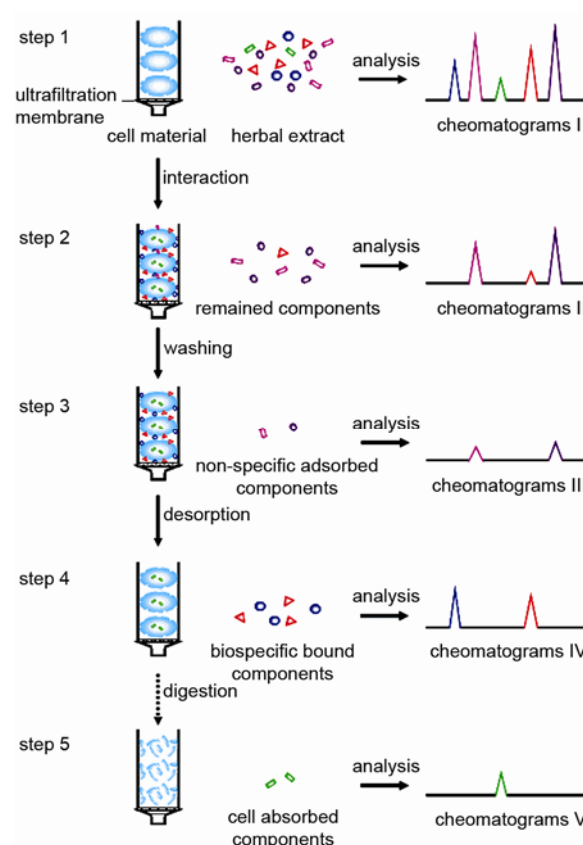


图3 生物特异萃取-高效液相色谱法辨识中药活性成分流程示意图

剂、增(助)溶剂、稳定剂、着色剂等一一对应;而中药提取物则常常活性成分不清,协同活性成分作用的辅助物质不明,进而限制了中药科学性的表征.因此,现代中药研究应在揭示中药作用核心物质基础(活性成分)的同时,着力弄清影响活性成分作用的关键相关成分,唯此,才能在整体(多成分相互作用)水平揭示中药的科学内涵,保证用药的有效性.

笔者认为:组(份)效(应)比较法即比较化学与比较药理学相结合可能是在整体水平揭示中药效应成分(活性成分和相关成分)切实可行的方法.其策略是通过同一中药采用不同提取方法或相近中药采用同一提取方法,得到部分化学组份相似、含量各异的系列提取物,再对提取物进行化学分析和效应评价,通过对各提取物中化学成分的组(组成)份(含量)与其效应关系的比较分析,明确影响效应的关键物质.该方法具有:1)模型适用性强,有利于效应评价方法的灵活性;2)可辨识各种效应成分,包括活性成分和相关成分.常用的比较分析方法有:直观比较、回归分

表3 基于多靶标中药活性成分辨识应用(2000~2009年)

亲和作用模式	样品	多靶标来源	化学分析	活性成分	文献
固定化细胞(膜)色谱	当归乙醚提取物	血管细胞膜	HPLC-UV	2个未鉴定活性成分	[90]
	当归挥发油	血管细胞膜	HPLC-DAD	2个未鉴定活性成分	[91]
	淫羊藿乙醚提取物	血管细胞膜	HPLC-UV	2个未鉴定活性成分	[92]
	菟丝子乙醚提取物	血管细胞膜	HPLC-UV	1个未鉴定活性成分	[93]
	红毛七正丁醇提取物	血管细胞膜	HPLC-UV	1个未鉴定活性成分	[94]
	太白花乙醚提取物	血管细胞膜	HPLC-DAD	2个未鉴定活性成分	[95]
	太白花石油醚提取物	心肌细胞膜	HPLC-UV	1个未鉴定活性成分	[95]
	红花石油醚提取物	血管细胞膜	HPLC-DAD	2个未鉴定活性成分	[96]
	川芎	血管细胞膜	HPLC-UV	藁本内酯, 丁烯基苯酐	[97]
		心肌细胞膜	HPLC-DAD	川芎嗪、香兰素、大黄酚	[98]
	四物汤正己烷-乙酸乙酯提取物(熟地黄、当归、白芍、川芎)	血管细胞膜	HPLC-UV	藁本内酯、邻苯二甲酸二甲酯和邻苯二甲酸二乙酯	[99]
	长春七	红细胞膜	HPLC-UV	蛇床子素	[100]
	金刷把乙醚提取物	红细胞膜	HPLC-UV	1个未鉴定活性成分	[101]
生物特异萃取-HPLC法	当归	红细胞膜	HPLC-DAD-MS	阿魏酸, 藁本内酯G, 洋川芎内酯H和洋川芎内酯I	[83]
	三七	血小板	HPLC-DAD-MS	鸟苷, 腺苷, 人参皂苷Rh1, 人参皂苷F1和1个未鉴定活性成分	[84]
	冬虫夏草	巨噬细胞	HPLC-DAD-MS	鸟苷和腺苷	[85]
	脉络宁注射液	血小板	HPLC-DAD	绿原酸、咖啡酸、5-羟甲基糠醛和5个未鉴定活性成分	[87]
	莪术油葡萄糖注射液	肝癌细胞	GC-MS	β -榄香烯, δ -榄香烯, β -丁香烯, γ -榄香烯, α -丁香烯, 莪术烯, 大根香叶烯 B, β -榄香烯酮, 新郁金二酮, 吉玛酮, 大根香叶烯 D, 西车烯, 8-isopropenyl-1,5-dimethyl-2,5-cyclodecadiene 和一个未鉴定活性成分	[102]
	玄参	内皮细胞	HPLC-DAD-MS	安格洛昔 C、肉桂酸、哈巴俄昔和3个未鉴定成分	[103]
	栀子	肝细胞	HPLC-DAD	栀子苷和1个未鉴定成分	[104]
		Caco-2 细胞	HPLC-DAD-MS	毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷、芒柄花苷、(6 α R,11 α R)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -D-葡萄糖苷、(3R)-2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-O- β -D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、(6 α R,11 α R)-3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷、(3R)-7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷、芒柄花素、黄芪皂苷II、黄芪皂苷I	[105]
	黄芪	红细胞	HPLC-DAD-MS	毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷-6"-O-丙二酸酯、芒柄花苷、(6 α R,11 α R)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -D-葡萄糖苷、(3R)-2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-O- β -D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素-7-O-b-D-葡萄糖苷-6"-O-丙二酸酯、(6 α R,11 α R)-3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷、(3R)-7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷、芒柄花素、黄芪甲苷、黄芪皂苷II、黄芪皂苷I、异黄芪甲苷I	[105]
	当归补血汤	脐静脉上皮细胞	HPLC-DAD-MS	毛蕊异黄酮, 3-丁基苯酐, 川芎内酯, 芒柄花素苷和2个未鉴定成分	[106]

续表 3

亲和作用模式	样品	多靶标来源	化学分析	活性成分	文献
		肝细胞	HPLC-DAD-E LSD, HPLC -MS	毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷, 毛蕊异黄酮, (6αR,11αR)-3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷, (3R)-7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷, 芒柄花素, Z-藜本内酯, 黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 I	[107]
		巨噬细胞	HPLC-DAD-E LSD, HPLC -MS	毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷, 毛蕊异黄酮, (3R)-7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷, 芒柄花素, 3-丁基苯酚, Z-藜本内酯和黄芪皂苷I	[107]
		Caco-2 细胞	HPLC-DAD-E LSD, HPLC -MS	毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷, 阿魏酸,毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷6-O-丙二酸酯, 川芎内酯I 或 H, 芒柄花苷, (3R)-2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷, 毛蕊异黄酮, (3R)-7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷, 芒柄花素, 3-丁基苯酚, Z-藜本内酯和黄芪皂苷I	[107]
	土荆皮	乳腺癌细胞	HPLC-UV-MS	土槿甲酸A和土槿甲酸B	[108]
	粉防己	乳腺癌细胞	HPLC-UV-MS	汉防己甲素	[108]
		Caco-2 细胞	HPLC-DAD- MS	丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸D、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸B、丹酚酸A	[109]
		上皮细胞	HPLC-DAD- MS	原儿茶醛, 紫草酸, 丹参缩酚酸, 二氢丹参酮I, 丹参新醌B, 隐丹参酮, 丹参酮 I, 亚甲基丹参酮, 丹参酮IIA, 次丹参酮和一个未鉴定成分	[110]
	丹参	心肌细胞	HPLC-DAD- MS	丹参缩酚酸, 二氢丹参酮I, 丹参新醌B, 隐丹参酮, 丹参酮 I, 亚甲基丹参酮, 丹参酮IIA, 次丹参酮和一个未鉴定成分	[110]
			HPLC-DAD	原儿茶醛和 5 个未鉴定活性成分	[86]
		血小板	HPLC-DAD- MS	丹参素, 原儿茶醛, 丹参缩酚酸D, 迷迭香酸, 紫草酸, 丹参缩酚酸, 二氢丹参酮I, 丹参新醌B, 隐丹参酮, 丹参酮I, 亚甲基丹参酮, 丹参酮IIA和2个未鉴定成分	[110]
		红细胞	HPLC-DAD- MS	原儿茶醛, 隐丹参酮、丹参酮 I, 丹参酮IIA和1个未鉴定成分	[109]
	少腹逐瘀汤	脐静脉上皮 细胞	HPLC-DAD- MS	芍药苷和香蒲新苷	[111]

析、相关分析和聚类分析等。

5.1 直观比较法

贯叶连翘提取物治疗轻、中度忧郁症疗效确切, 应用广泛. Nöldner 等在比较贯叶连翘甲醇提取物和乙醇提取物抗抑郁作用时发现, 60%乙醇提取物具有明显的抗抑郁作用, 而同等剂量的 80%甲醇提取物却无明显活性. HPLC 分析显示: 两种提取物的主要差异在于其芦丁的含量, 芦丁含量高者有活性, 低者无活性. 进一步研究发现: 芦丁含量低的无活性贯叶连翘提取物, 通过添加 3%提取物量的芦丁, 即可产生明显的抗抑郁作用, 而添加 1%提取物量的芦丁时, 该提取物则仍无活性^[112]. 该研究提示: 某些无活性化合物(如芦丁无抗抑郁活性)的存在, 对植物提取物

功效(如贯叶连翘提取物抗抑郁作用)的发挥具有决定作用, 且这种作用的产生在量上体现为有阈值(芦丁在贯叶连翘提取物抗抑郁作用的阈值为 3%)的存在. 这种现象恰恰是中药功效成分研究的关键与难点所在, 应引起高度重视.

赤芝和紫芝是灵芝的两个基原, 具有相同的功效和临床用途(中国药典 2005). 三萜类化合物一直被认为是灵芝中重要的抗肿瘤活性成分, 但我们的研究显示: 赤芝和紫芝中三萜类成分差异显著, 赤芝含有多多种三萜类化合物, 而在相同条件下, 紫芝中却未检出三萜类成分^[114]. 为了比较赤芝和紫芝的抗肿瘤作用, 我们对赤芝和紫芝的乙醇提取物分别进行了化学分析和抗肿瘤作用评价. HPLC 分析显示: 赤芝主要含有核苷类、三萜类和甾醇类化合物, 而紫芝主

要含有核苷类和甾醇类化合物(图 4). 药理作用比较发现: 赤芝细胞毒(抑制肿瘤细胞增殖)作用明显强于紫芝, 但其诱导肿瘤细胞凋亡和对细胞周期的影响却与紫芝无明显差异^[115]. 结合已有文献^[116~119], 可以推测: 灵芝中除三萜类成分外, 尚有非细胞毒作用的抗肿瘤活性成分, 其中甾醇类化合物值得关注, 有待进一步的研究.

5.2 回归分析法

回归分析是研究一个或多个自变量于一个因变量之间是否存在某种线性或非线性关系的一种统计分析方法. 针对中药多成分共同作用的特点, 在中药活性成分分析中主要采用多元回归分析, 即以多个化学成分的含量或峰面积为自变量以某一药理活性指标为因变量, 进行多元回归分析, 从而筛选得到相关效应成分. 李发美等^[120]通过对 20 份金银花样品分别进行 HPLC 化学分析和抑菌活性测试, 建立了金银花药材的 HPLC 指纹图谱, 以指纹图谱中 10 个共有峰的相对峰面积作为化学数据, 以抑菌实验中抑菌圈的直径作为药理数据, 多元线性回归分析结果显示: 金银花中有 6 个色谱峰与抑菌活性呈正相关, 其中包括已知效应成分绿原酸 (chlorogenic acid). 此外, 该方法也成功运用于吴茱萸汤镇痛和止呕效应成分的分析^[121], 发现了 4 个与镇痛和止呕呈正相关的效

应成分, 其中包括吴茱萸次碱(表 4).

5.3 相关分析法

相关分析是研究现象之间是否存在某种依存关系, 并对具体有依存关系的现象探讨其相关方向以及相关程度, 是研究随机变量之间相关关系的一种统计方法. 宋宗华等^[122]运用该方法对苓桂术甘汤的药效物质基础进行了研究, 选择小鼠常压耐缺氧、对抗氯仿所致小鼠心律失常和利尿三项药理指标对 16 个处方进行药理实验, 从而获得 16 个处方的药理数据. 同时采用 HPLC 的方法对 16 个苓桂术甘汤处方进行了指纹图谱分析, 以各指纹峰的峰面积作为处方的化学数据. 利用双变量相关分析的方法对所得到的化学数据和药理数据进行处理, 结果显示复方中有 9 个峰与药效有显著相关性, 其化学成分包括桂皮酸、甘草酸和去氢土莫酸. 刘曼等^[123]运用该方法对骨疏丹中促成骨样细胞增殖效应成分进行了研究, 从中发现了 9 个与促成骨样细胞增殖活性显著相关效应成分, 包括柚皮苷、淫羊藿、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷和淫羊藿次苷 II(表 4). 理论上, 组效比较法可以体现中药多成分的综合作用, 有助于探寻混合物中对药效具有显著影响的非活性成分, 但要求色谱分离充分; 药效学模型选择准确、与临床应用一致性好, 对组份变化反应灵敏.

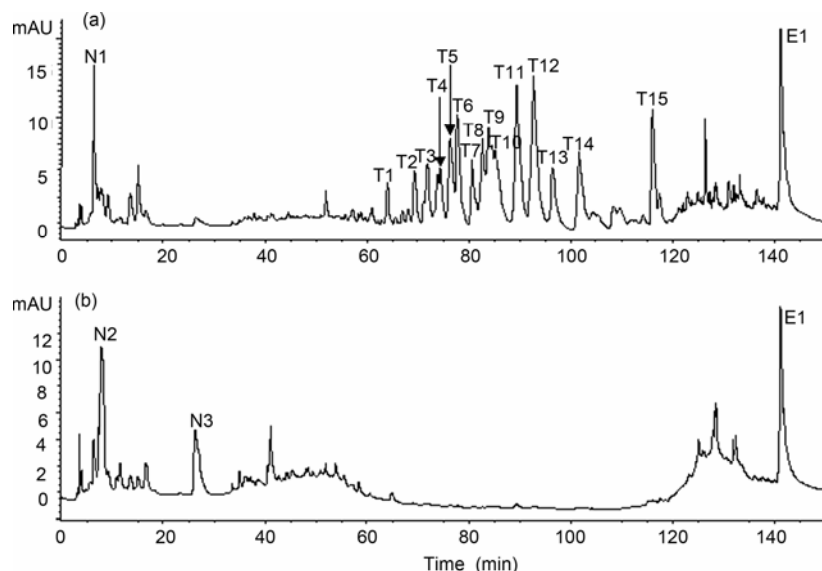


图 4 赤芝(a)和紫芝(b)乙醇提取物 HPLC 图谱. N1, 胞嘧啶核苷; N2, 尿核苷; N3, 腺苷; T1, T2, 未知峰; T3, 灵芝酸 C2; T4, 灵芝酸 C6; T5, 灵芝酸 G; T6, 灵芝烯酸 B; T7, 灵芝酸 B; T8, 灵芝烯酸 K; T9, 赤芝酸 E; T10, 灵芝酸 K; T11, 灵芝酸 A; T12, 灵芝酸 H; T13, 灵芝烯酸 D; T14, 灵芝酸 D; T15, 灵芝酸 F; E1, 麦角甾醇

表 4 组效比较研究在中药效应成分分析中的应用(2000~2009 年)

样品	化学分析	活性检测	数据处理方法	活性成分	文献
吴茱萸汤	HPLC-UV	镇痛、止呕	逐步回归分析	吴茱萸次碱及 3 个未知色谱峰	[121]
苓桂术甘汤	HPLC-UV	小鼠常压耐缺氧、对抗氯仿所致小鼠心律失常和利尿	回归分析 相关分析	桂皮酸、甘草酸和去氢土莫酸和14个未知色谱峰	[122]
鱼腥草注射液	GC-MS	小鼠耳肿胀、大鼠胸膜炎	聚类分析 直观比较	甲基正壬酮、癸酰乙醛、月桂醛、辛醛、 β -蒎烯、 β -芳樟醇、1-壬醇、4-松油醇、 α -松油醇、乙酸龙脑酯和癸酸和乙酸香叶酯	[124]
金银花	HPLC-DAD	抗菌	回归分析	绿原酸和 5 个未知色谱峰	[120]
贯叶连翘提取物	HPLC-DAD	抗抑郁	直观比较	芦丁	[112]
骨疏丹	HPLC-DAD	促成骨样细胞增殖	相关分析 回归分析	柚皮苷、淫羊藿、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、淫羊藿次苷II和3个未知色谱峰	[123]
加味四妙丸	GC-FID	降尿酸、抗炎和镇痛	相关分析 回归分析	21 个未知色谱峰	[125]
	HPLC-DAD	降尿酸、抗炎和镇痛	相关分析 回归分析	12 个未知色谱峰	[126]
森登-4汤	HPLC-DAD	抗炎和镇痛	回归分析	15 个未知色谱峰	[127]
灵芝	HPLC-DAD-MS	抗肿瘤	直观比较	三萜和甾醇类化合物	[115]

因此,在中医药辨证与现代医学疾病模型难以对应的情况下,如何选择确实能够反映中药功效,并具备准确、易测等特点的药效学指标是组效比较研究的关键.实际上,中药的治疗作用主要是通过调节机体部分或整体机能而实现的.从蛋白组的观点看,就是通过对蛋白最终表达的调控起作用.因此,采用蛋白组学技术,分析中药作用前后整个机体不同细胞、组织、器官中蛋白表达差异,就有可能从众多的中药成分中迅速筛选到效应成分,克服药效模型难以选择、不易把握的缺点,应是未来发展的重点.

6 结语

中药功效是多种化学物质(功效成分)综合作用的结果,各成分间的相互作用关系复杂,且各化学成分与药效的关系可能是非线性的.因此,如何根据中医药的特点,提出一整套既具有现代科学特征,又切实可行的现代中药功效成分研究策略是突破中药研究瓶颈的关键,以比较化学和比较药理学为基础的组效比较学值得深入研究,色谱技术在与分子生物学、蛋白组学和代谢组学等多学科结合的中药活性成分筛选中必将发挥更加重要的作用.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(30928033)、澳门特别行政区科学技术发展基金(028/2006/A2)和澳门大学研究基金(UL015/09-Y1)资助,特此致谢.

参考文献

- 1 Fischman J. Herbs and prescriptions can make a risky mixture. *US News World Rep*, 2000, 128(17): 64—65
- 2 曲建博, 娄红祥, 范培红. TLC 生物自显影技术在药物筛选中的应用. *中草药*, 2005, 36(1): 132—137
- 3 Shi SY, Zhang YP, Jiang XY, Chen XQ, Huang KL, Zhou HH. Coupling HPLC to on-line, post-column (bio)chemical assays for high-resolution screening of bioactive compounds from complex mixtures. *Trends Anal Chem*, 2009, 28(7): 865—877
- 4 Niederländer HAG, van Beek TA, Bartasiute A, Koleva II. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2008, 1210(2): 121—134
- 5 Tsukagoshi K, Taniguchi T, Nakajima R. Analysis of antioxidants using a capillary electrophoresis with chemiluminescence detection system. *Anal Chim Acta*, 2007, 589(1): 66—70
- 6 郑国灿, 陈华, 陈志涛, 甘婷婷, 冯波, 夏之宁. 抗氧化剂的毛细管电泳-间接化学发光联用在线评价方法研究. *分析化学*, 2006, 64(23): 2344—2350
- 7 夏之宁, 庞媛, 郑国灿. 基于毛细管电泳的黄芪抗氧化生物指纹图谱研究. *分析化学*, 2008, 36(12): 1646—1650

- 8 Li SY, Yu Y, Li SP. Identification of antioxidants in essential oil of *Radix Angelicae sinensis* using HPLC coupled with DAD-MS and ABTS-based assay. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(9): 3358—3362
- 9 Qian ZM, Guan J, Yang FQ, Li SP. Identification and quantification of free radical scavengers in Pu-erh tea by HPLC-DAD-MS coupled online with 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid) diammonium salt assay. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(23): 11187—11191
- 10 Li SY, Li SP. Antioxidant activities of essential oil of *Curcuma longa* and *Curcuma wenyujin*. *Int J Essential Oil Therapeutics*, 2009, 3: 31—34
- 11 Vallano PT, Remcho VT. Affinity screening by packed capillary high-performance liquid chromatography using molecular imprinted sorbents. I. Demonstration of feasibility. *J Chromatogr A*, 2000, 888(1-2): 23—34
- 12 Khasawneh MA, Vallano PT, Remcho VT. Affinity screening by packed capillary high performance liquid chromatography using molecular imprinted sorbents. II. Covalent imprinted polymers. *J Chromatogr A*, 2001, 922(1-2): 87—97
- 13 Mosbach K, Yu Y, Andersch J, Ye L. Generation of new enzyme inhibitors using imprinted binding sites: the anti-idiotypic approach, a step toward the next generation of molecular imprinting. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(49): 12420—12421
- 14 Ye L, Yu Y, Mosbach K. Towards the development of molecularly imprinted artificial receptors for the screening of estrogenic chemicals. *Analyst*, 2001, 126(6): 760—765
- 15 O'Connor NA, Paisner DA, Huryn D, Shea KJ. Screening of 5-HT_{1A} receptor antagonists using molecularly imprinted polymers. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(6): 1680—1689
- 16 Zhu L, Xu X. Selective separation of active inhibitors of epidermal growth factor receptor from *Caragana jubata* by molecularly imprinted solid-phase extraction. *J Chromatogr A*, 2003, 991(2): 151—158
- 17 Xie J, Zhu L, Luo H, Zhou L, Li C, Xu X. Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoids from ginkgo leaves using a molecularly imprinted polymer for quercetin. *J Chromatogr A*, 2001, 934(1-2): 1—11
- 18 Dapkevicius A, van Beek TA, Niederlander HA. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates. *J Chromatogr A*, 2001, 912(1): 73—82
- 19 Ding XP, Qi J, Chang YX, Mu LL, Zhu DN, Yu BY. Quality control of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves by high-performance liquid chromatography with diode array detection and on-line radical scavenging activity detection. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2204—2210
- 20 Raudonis R, Jakštas V, Burdulis D, Benetis R, Janulis V. Investigation of contribution of individual constituents to antioxidant activity in herbal drugs using postcolumn HPLC method. *Medicina (Kaunas)*, 2009, 45(5): 382—394
- 21 Ding XP, Wang XT, Chen LL, Qi J, Xu T, Yu BY. Quality and antioxidant activity detection of *Crataegus* leaves using on-line high-performance liquid chromatography with diode array detector coupled to chemiluminescence detection. *Food Chem*, 2010, 120(3): 929—933
- 22 Chang YX, Dong-Mei YAN, Chen LL, Ding XP, Jin QI, Kang LY, Zhang BL, Yu BY. Potency fingerprint of herbal products danshen injection for their quality evaluation. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(6): 586—590
- 23 Tung YT, Wu JH, Hsieh CY, Chen PS, Chang ST. Free radical-scavenging phytochemicals of hot water extracts of *Acacia confusa* leaves detected by an on-line screening method. *Food Chem*, 2009, 115(3): 1019—1024
- 24 王虹, 陈军辉, 赵恒强, 王磊磊, 张道来, 王小如, 杨东方. 高效液相色谱-质谱-二苯基三硝基苯肼在线筛选与鉴别茶叶中抗氧化活性成分. *分析化学*, 2009, 37(6): 795—800
- 25 Gioti EM, Fiamegos YC, Skalkos DC, Stalikas CD. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chem*, 2009, 117(3): 398—404
- 26 Zdunić G, Godevac D, Šavikin K, Novaković M, Milosavljević S, Petrović S. Isolation and identification of phenolic compounds from *Hypericum richeri* Vill. and their antioxidant capacity. *Nat Prod Res*, 2009, 16: 1—13
- 27 Shi S, Zhou H, Zhang Y, Huang K. Hyphenated HSCCC-DPPH• for rapid preparative isolation and screening of antioxidants from *Selaginella moellendorffii*. *Chromatographia*, 2008, 68(3-4): 173—178
- 28 Chaaib F, Queiroz EF, Ndjoko K, Diallo D, Hostettmann K. Antifungal and antioxidant compounds from the root bark of *Fagara zanthoxyloides*. *Planta Med*, 2003, 69(4): 316—320
- 29 Maver M, Queiroz EF, Wolfender JL, Hostettmann K. Flavonoids from the stem of *Eriophorum scheuchzeri*. *J Nat Prod*, 2005, 68(7): 1094—1098
- 30 谷丽华, 吴弢, 张紫佳, 俞桂新, 王峥涛. 应用薄层色谱-生物自显影技术评价乌药等三种中药的抗氧化活性. *药学学报*, 2006, 41(10): 956—962
- 31 Gu L, Wu T, Wang Z. TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. *LWT - Food Sci Technol*, 2009, 42(1): 131—136
- 32 Luo H, Yamamoto Y, Kim JA, Jung JS, Koh YJ, Hur JS. Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from

- Umbilicaria antarctica in maritime Antarctica (King George Island). *Polar Biol*, 2009, 32(7): 1033—1040
- 33 Dey S, Deepak M, Setty M, D'Souza P, Agarwal A, Sangli GK. Bioactive caffeic acid esters from Glycyrrhiza glabra. *Nat Prod Res*, 2009, 23(18): 1657—1663
- 34 Hostettmann K, Borloz A, Urbain A, Marston A. Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Curr Org Chem*, 2006, 10(8): 825—847
- 35 Salazar MO, Furlan RLE. A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors. *Phytochem Anal*, 2007, 18(3): 209—212
- 36 Ramallo IA, Zacchino SA, Furlan RLE. A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochem Anal*, 2006, 17(1): 15—19
- 37 Müller MB, Dausend C, Weins C, Frimmel FH. A new bioautographic screening method for the detection of estrogenic compounds. *Chromatographia*, 2004, 60(3-4): 207—211
- 38 Berkov S, Bastida J, Nikolova M, Viladomat F, Codina C. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochem Anal*, 2008, 19(5): 411—419
- 39 Fuchs B, Schiller J, Suss R, Zscharnack M, Bader A, Muller P, Schurenberg M, Becker M, Suckau D. Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 392(5): 849—860
- 40 Fuchs B, Schiller J, Suss R, Schurenberg M, Suckau D. A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(3): 827—834
- 41 Su X, Kong L, Li X, Chen X, Guo M, Zou H. Screening and analysis of bioactive compounds with biofingerprinting chromatogram analysis of traditional Chinese medicines targeting DNA by microdialysis/HPLC. *J Chromatogr A*, 2005, 1076(1-2): 118—126
- 42 Su X, Hu L, Kong L, Lei X, Zou H. Affinity chromatography with immobilized DNA stationary phase for biological fingerprinting analysis of traditional Chinese medicines. *J Chromatogr A*, 2007, 1154(1-2): 132—137
- 43 Hu L, Li X, Feng S, Kong L, Su X, Chen X, Qin F, Ye M, Zou H. Comprehensive two-dimensional HPLC to study the interaction of multiple components in Rheum palmatum L. with HSA by coupling a silica-bonded HSA column to a silica monolithic ODS column. *J Sep Sci*, 2006, 29(6): 881—888
- 44 Su X, Kong L, Li X, Chen X, Guo M, Zou H. Biological fingerprinting analysis by liquid chromatography/mass spectrometry for evaluation of DNA structural selectivity of multiple compounds in natural products. *J Comb Chem*, 2006, 8(4): 544—550
- 45 Guo M, Su X, Kong L, Li X, Zou H. Characterization of interaction property of multicomponents in Chinese Herb with protein by microdialysis combined with HPLC. *Anal Chim Acta*, 2006, 556(1): 183—188
- 46 Wang H, Zou H, Ni J, Guo B. Comparative separation of biologically active components in Rhizoma chuanxiong by affinity chromatography with α 1-acid glycoprotein and human serum albumin as stationary phases. *Chromatographia*, 2000, 52(7-8): 459—464
- 47 毛希琴, 邹汉法, 封顺, 孔亮, 黄晓冬, 厉欣, 罗权舟. 3 种色谱模式联用在中药活性成分初步筛选中的应用. *分析化学*, 2003, 31(8): 992—995
- 48 Wen XD, Qi LW, Chen J, Song Y, Yi L, Yang XW, Li P. Analysis of interaction property of bioactive components in Danggui Buxue Decoction with protein by microdialysis coupled with HPLC-DAD-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 852(1-2): 598—604
- 49 Qian ZM, Wen XD, Li HJ, Liu Y, Qin SJ, Li P. Analysis of interaction property of bioactive components in Flos Lonicerae Japonicae with protein by microdialysis coupled with HPLC-DAD-MS. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(1): 126—130
- 50 Zhou JL, Qian ZM, Luo YD, Tang D, Chen H, Yi L, Li P. Screening and mechanism study of components targeting DNA from the Chinese herb Lonicera japonica by liquid chromatography/mass spectrometry and fluorescence spectroscopy. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(10): 1164—1172
- 51 黄燕, 田清清, 李谭瑶, 陈波, 姚守拙. 亲和色谱法筛选中药中血管紧张素转化酶抑制剂. *中国科学 B:化学*, 2009, 39(8): 760—766
- 52 Wang H, Zou H, Ni J, Kong L, Gao S, Guo B. Fractionation and analysis of Artemisia capillaris Thunb. by affinity chromatography with human serum albumin as stationary phase. *J Chromatogr A*, 2000, 870(1-2): 501—510
- 53 孔亮, 邹汉法, 汪海林, 倪坚毅, 张玉奎. 以人血清白蛋白为固定相的分子生物色谱分析几种中药活性成分的研究. *高等学校化学学报*, 2000, 21(1): 36—40
- 54 Wang Y, Kong L, Hu L, Lei X, Yang L, Chou G, Zou H, Wang C, Annie Bligh SW, Wang Z. Biological fingerprinting analysis of the traditional Chinese prescription Longdan Xiegan Decoction by on/off-line comprehensive two-dimensional biochromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 860(2): 185—194
- 55 郑晓晖, 赵新锋, 杨荣, 王世祥, 卫引茂, 郑建斌. 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. *科学通报*, 2007, 52(28): 2111—2115
- 56 Ingkaninan K, De Best CM, Van Der Heijden R, Hofte AJP, Karabatak B, Irth H, Tjaden UR, Van Der Greef J, Verpoorte R. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of

- acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *J Chromatogr A*, 2000, 872(1-2): 61—73
- 57 Ingkaninan K, Hazekamp A, De Best CM, Irth H, Tjaden UR, Van Der Heijden R, Van Der Greef J, Verpoorte R. The application of HPLC with on-line coupled UV/MS-biochemical detection for isolation of an acetylcholinesterase inhibitor from *Narcissus* 'Sir Winston Churchill'. *J Nat Prod*, 2000, 63(6): 803—806
- 58 de Jong CF, Derks RJE, Bruyneel B, Niessen W, Irth H. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. *J Chromatogr A*, 2006, 1112(1-2): 303—310
- 59 Schenk T, Breel GJ, Koevoets P, Van Den Berg S, Hogenboom AC, Irth H, Tjaden UR, Van Der Greef J. Screening of natural products extracts for the presence of phosphodiesterase inhibitors using liquid chromatography coupled online to parallel biochemical detection and chemical characterization. *J Biomol Screen*, 2003, 8(4): 421—429
- 60 Schenk T, Appels NMGM, Van Elswijk DA, Irth H, Tjaden UR, Van Der Greef J. A generic assay for phosphate-consuming or -releasing enzymes coupled on-line to liquid chromatography for lead finding in natural products. *Anal Biochem*, 2003, 316(1): 118—126
- 61 De Boer AR, Letzel T, Van Elswijk DA, Lingeman H, Niessen WMA, Irth H. On-line coupling of high-performance liquid chromatography to a continuous-flow enzyme assay based on electrospray ionization mass. *Anal Chem*, 2004, 76(11): 3155—3161
- 62 Rhee IK, Appels N, Hofte B, Karabatak B, Erkelens C, Stark LM, Flippin LA, Verpoorte R. Isolation of the acetylcholinesterase inhibitor ungeremine from *Nerine bowdenii* by preparative HPLC coupled on-line to a flow assay system. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(11): 1804—1809
- 63 De Boer AR, Alcaide-Hidalgo JM, Krabbe JG, Kolkman J, Van Emde Boas CN, Niessen WMA, Lingeman H, Irth H. High-temperature liquid chromatography coupled on-line to a continuous-flow biochemical screening assay with electrospray ionization mass spectrometric detection. *Anal Chem*, 2005, 77(24): 7894—7900
- 64 Jeurissen SMF, Claassen FW, Havlik J, Bouwmans EE, Cnubben NHP, Sudhölter EJR, Rietjens IMCM, van Beek TA. Development of an on-line high performance liquid chromatography detection system for human cytochrome P450 1A2 inhibitors in extracts of natural products. *J Chromatogr A*, 2007, 1141(1): 81—89
- 65 Schobel U, Frenay M, Van Elswijk DA, McAndrews JM, Long KR, Olson LM, Bobzin SC, Irth H. High resolution screening of plant natural product extracts for estrogen receptor α and β binding activity using an online HPLC-MS biochemical detection system. *J Biomol Screen*, 2001, 6(5): 291—303
- 66 Van Elswijk DA, Schobel UP, Lansky EP, Irth H, Van Der Greef J. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*, 2004, 65(2): 233—241
- 67 Marston A, Kissling J, Hostettmann K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem Anal*, 2002, 13(1): 51—54
- 68 Urbain A, Marston A, Queiroz EF, Ndjoko K, Hostettmann K. Xanthones from *Gentiana campestris* as new acetylcholinesterase inhibitors. *Planta Med*, 2004, 70(10): 1011—1014
- 69 Urbain A, Marston A, Hostettmann K. Coumarins from *Peucedanum ostruthium* as inhibitors of acetylcholinesterase. *Pharm Biol*, 2005, 43(8): 647—650
- 70 Borloz A, Marston A, Hostettmann K. The determination of huperzine A in European Lycopodiaceae species by HPLC-UV-MS. *Phytochem Anal*, 2006, 17(5): 332—336
- 71 Fan P, Hay AE, Marston A, Hostettmann K. Acetylcholinesterase-inhibitory activity of linarin from *Buddleja davidii*, structure-activity relationships of related flavonoids, and chemical investigation of *Buddleja nitida*. *Pharmaceutical Biology*, 2008, 46(9): 596—601
- 72 Calderon AI, Simithy J, Quaggio G, Espinosa A, Lopez-Perez JL, Gupta MP. Triterpenes from *Warszewiczia coccinea* (Rubiaceae) as inhibitors of acetylcholinesterase. *Nat Prod Commun*, 2009, 4(10): 1323—1326
- 73 Zheng XY, Zhang ZJ, Chou GX, Wu T, Cheng XM, Wang CH, Wang ZT. Acetylcholinesterase inhibitive activity-guided isolation of two new alkaloids from seeds of *Peganum nigellastrum* Bunge by an *in vitro* TLC- bioautographic assay. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(9): 1245—1251
- 74 Mroczek T. Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(12): 2519—2528
- 75 Mroczek T, Mazurek J. Pressurized liquid extraction and anticholinesterase activity-based thin-layer chromatography with bioautography of Amaryllidaceae alkaloids. *Anal Chim Acta*, 2009, 633(2): 188—196
- 76 Yang Z, Zhang X, Duan D, Song Z, Yang M, Li S. Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts. *J Sep Sci*, 2009, 32(18): 3257—3259
- 77 Murebwayire S, Ingkaninan K, Changwijit K, Frédéric M, Duez P. *Triclisia saculeuxii* (Pierre) Diels (Menispermaceae), A potential source of acetylcholinesterase inhibitors. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61(1): 103—107

- 78 方艺霖, 张艺, 肖小河, 杜娟, 张静. 细胞膜色谱技术用于中药活性成分筛选的研究进展. 中草药, 2008, 39(7): 附3—附5
- 79 吴茜, 毕志明, 李萍, 齐炼文. 基于整体观的中药药效物质基础的生物活性筛选/化学在线分析研究新进展. 中国药科大学学报, 2007, 38(4): 389—293
- 80 贺浪冲, 耿欣笃. 细胞膜受体色谱法—研究药物与受体作用的新方法. 生物医药色谱新进展, 1999, 3: 8—9
- 81 He L, Yang G. Enzymatic activity and chromatographic characteristics of the cell membrane immobilized on silica surface. *Chin Sci Bull*, 1999, 44(9): 826—831
- 82 陈婷, 周玖瑶, 徐贝佳. 细胞膜色谱法及其在药理学研究中的应用进展. 中华中医药学刊, 2007, 25(5): 983—985
- 83 Dong ZB, Li SP, Hong M, Zhu Q. Hypothesis of potential active components in *Angelica sinensis* by using biomembrane extraction and high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(4): 664—669
- 84 Wang J, Huang ZG, Cao H, Wang YT, Hui P, Hoo C, Li SP. Screening of anti-platelet aggregation agents from *Panax notoginseng* using human platelet extraction and HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *J Sep Sci*, 2008, 31(6-7): 1173—1180
- 85 Yu L, Zhao J, Zhu Q, Li SP. Macrophage biospecific extraction and high performance liquid chromatography for hypothesis of immunological active components in *Cordyceps sinensis*. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2): 439—443
- 86 樊宏伟, 余黎, 洪敏, 朱荃. 血小板细胞膜固相色谱法的建立及其对丹参效应物质的初步分析. 中国药学杂志, 2004, 39(5): 375—378
- 87 樊宏伟, 朱荃, 洪敏, 余黎. 血小板细胞膜固相色谱法在脉络宁注射液效应物质分析中的应用. 中国药学杂志, 2006, 41(1): 63—66
- 88 Wang J, Zhao J, Yu L, Li SP. Cell material biospecific extraction for hypothesis of active components in Chinese medicines. In: Li SP, Wang YT. eds. *Pharmacological Activity-based Quality Control of Chinese Herbs*. 1st ed. New York: Nova Science Publishers, Inc, 2008: 11—19
- 89 汪宁, 段金廛, 朱荃, 丁安伟, 李庆林, 彭代银. 细胞膜生物色谱法在中药研究中的应用. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(5): 82—85
- 90 赵惠茹, 杨广德, 贺浪冲. 用细胞膜色谱法筛选当归中的有效成分. 中国药学杂志, 2000, 35(1): 13—15
- 91 赵惠茹, 杨广德, 贺浪冲. 生物活性跟踪分离法筛选当归挥发油中的有效成分. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 112—113
- 92 赵小娟, 党高潮, 杨广德, 贺浪冲. 淫羊藿根与叶活性成分的分析 and 比较. 分析化学, 2002, 30(2): 195—197
- 93 王锐平, 陈蓁, 贺浪冲. 用细胞膜色谱法筛选菟丝子的有效成分. 陕西中医, 2003, 24(6): 553—554
- 94 高琨, 贺浪冲, 杨广德. 用细胞膜色谱法筛选研究红毛七中的有效成分. 中国药学杂志, 2003, 38(1): 14—16
- 95 张汉利, 杨广德, 贺浪冲. 太白花活性成分的筛选与药理作用相关性研究. 中国药学杂志, 2003, 38(2): 92—94
- 96 陈蓁, 王锐平, 贺浪冲, 徐迪琴. 细胞膜色谱法筛选红花中的有效成分. 陕西中医, 2004, 25(7): 643—644
- 97 Liang MJ, He LC, Yang GD. Screening, analysis and *in vitro* vasodilatation of effective components from *Ligusticum Chuanxiong*. *Life Sci*, 2005, 78(2): 128—133
- 98 张延妮, 岳岳峰, 张志琪. 4种川芎化学成分与心肌细胞膜受体作用的研究. 中国中药杂志, 2004, 29(7): 660—662
- 99 梁明金, 贺浪冲. “四物汤”中当归有效部位及有效成分的研究. 分析化学, 2004, 32(1): 83—86
- 100 张宇洁, 贺浪冲. 用细胞膜色谱模型筛选长春七抑制 HeLa 细胞增殖的活性成分. 中国药学杂志, 2005, 40(6): 463—465
- 101 张博, 贺浪冲. 用细胞膜色谱法分析金刷把中具有细胞活性的有效成分. 现代医药卫生, 2006, 22(15): 2303—2304
- 102 Zhang HY, Hu CX, Liu CP, Li HF, Wang JS, Yuan KL, Tang JW, Xu GW. Screening and analysis of bioactive compounds in traditional Chinese medicines using cell extract and gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(1): 151—157
- 103 祝艳斐, 毕志明, 刘承伟, 任美婷, 吴斐华, 李萍. 内皮细胞提取和高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱联用预测玄参中的活性成分. 中国药科大学学报, 2008, 39(3): 228—231
- 104 洪敏, 马宏宇, 朱荃. 肝细胞萃取-HPLC 分析法的建立及其在栀子保肝效应物质初步分析中的应用. 中国中药杂志, 2009, 34(4): 450—453
- 105 张溪, 齐炼文, 李萍, 余庆涛, 李艳蕊, 任美婷. 体外细胞模型和高效液相质谱联用分析预测黄芪中的活性成分. 分析化学, 2008, 36(6): 745—749
- 106 Li SL, Li P, Sheng LH, Li RY, Qi L W, Zhang LY. Live cell extraction and HPLC-MS analysis for predicting bioactive components of traditional Chinese medicines. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(2): 576—581
- 107 Zhang X, Qi LW, Yi L, Li P, Wen XD, Yu QT. Screening and identification of potential bioactive components in a combined prescription of Danggui Buxue decoction using cell extraction coupled with high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(2): 157—163
- 108 Lei X, Kong L, Zou H, Ma H, Yang L. Evaluation of the interaction of bioactive compounds in *Cortex Pseudolarix* and *Radix Stephaniae* by the microdialysis probe coupled with high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2179—2184
- 109 董倩倩, 李萍, 闻晓东. 丹参成分在 Caco-2 细胞中吸收的研究. 中国天然药物, 2007, 5(1): 59—62
- 110 Qu FN, Qi LW, Wei YJ, Wen XD, Yi L, Luo HW, Li P. Multiple target cell extraction and LC-MS analysis for predicting bioactive

- components in Radix Salviae miltiorrhizae. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(3): 501—506
- 111 Su SL, Yu L, Hua YQ, Duan JA, Deng HS, Tang YP, Lu Y, Ding AW. Screening and analyzing the potential bioactive components from Shaofu Zhuyu decoction, using human umbilical vein endothelial cell extraction and high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(12): 1385—1392
- 112 Noldner M, Schotz K. Rutin is essential for the antidepressant activity of Hypericum perforatum extracts in the forced swimming test. *Planta Med*, 2002, 68(7): 577—580
- 113 Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1433—1437
- 114 Zhao J, Zhang XQ, Li SP, Yang FQ, Wang YT, Ye WC. Quality evaluation of Ganoderma through simultaneous determination of nine triterpenes and sterols using pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography. *J Sep Sci*, 2006, 29(17): 2609-2615
- 115 Liu YW, Gao JL, Guan J, Qian ZM, Feng K, Li SP. Evaluation of antiproliferative activities and action mechanisms of extracts from two species of Ganoderma on tumor cell lines. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(8): 3087—3093
- 116 Bradford PG, Awad AB. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51(2): 161—170
- 117 Awad AB, Chinnam M, Fink CS, Bradford PG. Targeting ceramide by dietary means to stimulate apoptosis in tumor cells. *Curr Top Nutraceutical Res*, 2004, 2(2): 93—100
- 118 Chang LC, Tsai TR, Wang JJ, Lin CN, Kou KW. The rhamnose moiety of solamargine plays a critical role in triggering cell death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 242: 21—25
- 119 Awad AB, Williams H, Fink CS. Phytosterols reduce *in vitro* metastatic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr Cancer*, 2001, 40(2): 157—164
- 120 Li FM, Yuan B, Xiong ZL, Lu XM, Qin F, Chen HS, Liu ZG. Fingerprint analysis of Flos Lonicerae japonicae using binary HPLC profiling. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20(6-7): 634—641
- 121 宁黎丽, 毕开顺, 王瑞, 车镇涛, 王玺, 罗旭. 吴茱萸汤药效物质基础的方法学研究. *药学报*, 2000, 35(2): 131—134
- 122 宋宗华, 冯东, 许俊博, 毕开顺. 苓桂术甘汤配伍机制及药效物质基础研究. *中成药*, 2003, 25(2): 132—137
- 123 刘曼, 刘惠平, 梁茂新, 熊志立, 李发美. 骨疏丹指纹图谱分析及其活性相关性研究. *沈阳药科大学学报*, 2007, 24(12): 758—762
- 124 卢红梅, 梁逸曾, 钱频. 鱼腥草注射液质量控制中的谱效学初步探讨. *药学报*, 2005, 40(12): 1147—1150
- 125 尹莲, 钱俊. 加味四妙丸有效部位群 GC 指纹图谱谱效关系及配伍变化研究. *中成药*, 2007, 29(5): 634—637
- 126 钱俊, 尹莲. 加味四妙丸有效部位群 HPLC 指纹图谱归属分析及谱效关系研究. *世界科学技术—中医药现代化*, 2007, 9(1): 40—45
- 127 许良, 毕开顺. 多元线性回归分析法在蒙药森登_4 汤谱效关系解析中的应用. *计算机与应用化学*, 2008, 25(10): 1189—1192

Advanced development of chromatography in screening and identification of effective compounds in Chinese materia medica

LI ShaoPing, ZHAO Jing, QIAN ZhengMing & LI Jing

Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macao SAR, China

Abstract: Screening and identification of effective compounds in Chinese materia medica is the key for its quality control, which is critical for ensuring the safety and efficacy in clinic. Herein, the advanced development of chromatography in screening and identification of effective compounds in Chinese materia medica since 2000 was reviewed based on the strategies of chemical characteristics, drug targets and integrating chemical analysis and pharmacological assay. The prospect of chromatography in this field was also discussed.

Keywords: chromatography, Chinese materia medica, quality control, effective compounds