

基于色谱技术的中药药效物质研究进展

刘洁^{1,2}, 肖红斌^{2*}

(北京中医药大学 1. 北京中医药研究院, 2. 中药分析与转化研究中心, 北京 100029)

摘要: 中药药效物质的阐明是中药现代化的基础, 现代色谱技术在中药药效物质研究中发挥着重要作用, 极大推动了中药药效物质的阐明。本文结合作者研究工作, 主要从分析检测、分离制备及筛选三个层面综述基于色谱技术的中药药效物质研究进展。

关键词: 色谱; 药效物质; 中药; 检测; 制备; 筛选

中图分类号: R917 文献标识码: 文章编号: 0513-4870(2019)01-0073-09

Research progress on pharmacodynamic substances of Chinese Medicine based on chromatographic techniques

LIU Jie^{1,2}, XIAO Hong-bin^{2*}

(1. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, 2. Research Center for Chinese Medicine Analysis and Transformation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: To modernize traditional Chinese medicine, its pharmacodynamic substances should be elucidated firstly. Modern chromatographic technologies play an important role in the clarification of the pharmacodynamic substances of Chinese medicine. In this paper, the advancement and application of current chromatographic techniques in the pharmacodynamic substances of Chinese medicines were reviewed from the aspects of detection, preparation and screening methods.

Key words: chromatographic; pharmacodynamic substance; Chinese medicine; detection; preparation; screening

弄清中药药效物质是阐明中药药理作用及其机制和临床疗效的先决条件, 也是深层次开发中药方剂、改进工艺和剂型、制定质量标准、提高临床疗效的重要基础, 是中药现代化的重要组成部分^[1]。中药化学物质繁杂多样, 数量庞大。据统计, 目前有 12 807 种中药材、5 781 种中成药、61 739 首中医方剂(《普济方》)。目前共有 9 000 多种黄酮类、4 万多种萜类、1 万多种生物碱、8 000 多种酚酸类成分^[2]被发现。此外, 还有许多 I 相、II 相代谢产物, 以及其他水解、转化产物。此外,

中药化学物质的含量差异悬殊。例如丹参中丹酚酸 B 含量高达 5.407%, 而丹酚酸 A 含量则低至 0.003%, 二者含量相差 3 个数量级^[3]; 中成药生脉饮中人参皂苷含量高达 6.30%, 而人参皂苷 R_{g3} 则低至 0.001%, 二者含量也相差了 3 个数量级^[4]。

鉴于中药化学物质数量庞大、繁杂多样、含量差异十分悬殊, 中药物质基础研究仍面临着一些挑战: 成分分析不全面, 定量覆盖度低; 微量成分检测鉴定难; 极性成分、微量成分制备难; 成分分离-活性评价一体化尚不成熟; 成分与药效关联不足; 此外, 代谢产物分析、制备研究尚浅等。因此, 为了突破以上这些难点问题, 近年来发展了深度覆盖分析检测技术, 如增强色谱分离效能及检测速度、提高质谱检测及数据解析技术, 从而全面解析中药化学成分。新型色谱制备技术如增

收稿日期: 2018-08-14; 修回日期: 2018-09-19.

基金项目: 国家重大专项新药创制 (2018ZX09201008-001); 国家自然科学基金项目 (81573839, 81774155, 81803703); 中国博士后科学基金面上项目 (2018M630119).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-64286490, E-mail: hbxiao69@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0740

强制备规模及效率,和微量成分富集制备技术等的发展,解决了微量成分及代谢产物制备难点。此外,发展了亲和色谱、细胞膜色谱、谱效关联等,探索成分-活性整合分析方法。基于以上色谱技术,加快了中药药效物质研究的步伐。

1 中药化学物质的色谱全面检测及鉴定

1.1 细粒径色谱填料及超高效液相色谱的应用提高了中药化学物质检测速度

色谱填料柱作为色谱填料的载体,是色谱仪器的“心脏”。随着色谱填料的粒径从35~50 μm降至1.7/1.8 μm,以及核壳型色谱填料的发展,色谱柱展现出更高的柱效,从而增加了色谱分离效能。近年来发展的新型液相色谱技术—超高效液相色谱(UPLC)具有超快分析速度、超高分离度、超高灵敏度等特点,极大地缩短了样品分析的时间,且提高了分析容量,为中药复杂体系中成分的分​​离分析提供了良好的平台,目前已广泛应用于中药各类成分的定性定量检测分析研究^[5]。Chen等^[6]利用超高效液相色谱在20 min内对蒸制三七中R_{g6}、F₄、R_{k3}等10种人参皂苷类成分进行了同时测定,该方法具有良好的线性关系,平均回收率在95%~104%之间,并对不同头数、不同药用部位、不同蒸制时间的三七样品进行了含量测定和质量控制研究。Ren等^[7]利用UPLC在9 min内同时测定了大黄中大黄素、大黄酸、大黄酚等8个蒽醌类成分,并对其含量进行了测定,建立的方法线性关系良好,为大黄药材质量控制提供了参考。Chen等^[8]采用UPLC建立了一种在30 min内快速同时测定中药复方制剂栀子金花丸中绿原酸、栀子苷、黄芩苷等11种成分的方法,该方法较之前的HPLC法能更全面有效地控制该复方制剂。此外,超高效液相色谱也广泛应用于中药及其复方药效物质指纹图谱的研究。Liu等^[9]利用超高效液相色谱首次建立了14 min内快速鉴别益智仁的UPLC特征指纹图谱共有模式,并标定了20个共有峰,且发现19批益智仁有15批的相似度在0.970以上。

1.2 新型色谱模式拓宽了中药化学物质检测范围

近年来,随着大量不同键合基团的色谱填料如亲水作用色谱填料、立体保护键合色谱填料、体积排阻色谱填料、手性色谱填料以及聚合物基质色谱柱填料等的发展,色谱柱的选择性得到了极大扩展,更大程度地满足了中药复杂样品分离的需要。亲水作用色谱填料克服了正相色谱和反相色谱对极性化合物分离的不足,其在中药强极性成分如多糖、苷类和氨基酸等的分离中发挥着重要作用^[10];手性色谱填料拓宽了中药中手性成分分离的适用性^[11]。在此基础上发展的新色谱模式如亲水作用色谱、超临界流体色谱等极大拓宽了中药

化学物质检测范围。

亲水作用色谱(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)是一种能有效保留和分离中等至强亲水性和极性化合物的液相色谱模式^[12]。HILIC色谱填料固定相表面都是与水有很好亲和性的氨基、羟基、酰胺基等强极性基团,从而使化合物的保留时间随化合物的极性增强而增加。因此,HILIC已成为分析中药极性化合物最有潜力的分离模式^[10]。如Jin等^[13]利用HILIC与电雾式检测器联用快速测定了枸杞子药材中的主要成分——季铵型水溶性生物碱甜菜碱,该方法较柱前衍生紫外检测甜菜碱的方法重复性和稳定性好。Qin等^[14]采用HILIC与ELSD联用同时测定了复方扶芳藤颗粒中人参皂苷R_{b1}、黄芪甲苷IV和强极性成分半乳糖醇的含量,在常规色谱条件三者不能进行同时分析,而在HILIC模式下,三者得到了非常好的分离效果。此外,HILIC色谱还可应用于中药二萜生物碱类^[15]、核苷、核碱基和核苷酸类^[16]等的检测分析。

超临界流体色谱(supercritical fluid chromatography, SFC)是以超临界流体作为流动相的一种色谱技术,具有高分离效率、高流动相速度,以及环保特性,其与液相和气相色谱相补充,适用范围广,不仅适用于小极性和中等极性化合物的分离,还适用于立体选择性化合物的分离^[17]。此外,SFC选择性高,其保留行为与GC、HPLC差异显著,致力于解决传统分离手段不能满足要求的问题^[18]。鉴于以上特点,近年来SFC被广泛应用到中药复杂成分^[19]以及具有立体选择性化合物的分析检测中。如Zhao等^[20]首次使用SFC将胡芦巴中6种25(R/S)-螺甾醇皂苷非对映异构体成功分离。Qiao等^[11]首次利用SFC对药用樟脑中7对25R/S麦角甾烷差向异构体成分进行快速分离,R/S差向异构体在SFC大赛璐手性Chiralcel OJ-H柱中的保留行为与HPLC YMC ODS-A柱中的完全相反,且所有S构型化合物相较R构型在2-乙基吡啶柱中显示更强的保留。Qing等^[21]应用SFC-MS/MS技术,以苯基柱为固定相,在10 min内从雷公藤提取物中检测并鉴定出71个倍半萜吡啶生物碱。Pfeifer等^[22]首次采用SFC技术在6 min之内测定了8个香豆素化合物的含量。此外,SFC还可适用于中药酚酸类^[23]、黄酮类^[24,25]、蒽醌类^[26]、甾体皂苷^[27]、核苷类及人参皂苷类^[28]的分离,并有较好的应用前景。

1.3 二维液相色谱联用展现了更强的中药化学物质检测能力

中药及其复方化学组成复杂、类别差异大,传统的一维色谱分离已不能提供足够的分辨率,且所得色谱峰重叠现象严重。近年来发展的二维液相色谱在中药研究中备受青睐,其通过两个不同分离过程或

机制对复杂样品进行分离,能显著降低色谱峰的重叠,提高色谱柱的峰容量,从而与质谱联用时增强色谱峰鉴定的可靠性,使分离效率与分析通量大大提高,已广泛应用于中药的分析检测研究^[29]。

全二维色谱(LC×LC)模式是将第一维的流分全部或以相同的比例依次切割进入第二维进行分离,可较好地兼顾中药中等极性、大极性和小极性的化合物。目前二维液相色谱有以下几种分离模式,如正相(NP)、反相(RP)、亲水相互作用(HILIC)、离子交换(IE)和尺寸排阻(SE),均可结合起来使用以增强2D-LC的正交性^[30]。目前用于中药复杂成分分析的全二维液相色谱多为RP×RP模式,RP×RP主要是利用两种不同键合机制的反相色谱柱(如CN、ODS、Phenyl-C18、Poroshell 120 SB-C18等)进行分离。Guo等^[31]采用全二维色谱从银杏叶提取物中检测出了61种黄酮类化合物,其分析能力较一维色谱明显提高。HILIC×RP是根据两种不同的分离机制进行分离的,二者的分离选择性有很好的正交性,且具有相似流动相体系,二者之间能进行快速切换,目前已成为解决复杂样品分离问题的有效手段之一^[32]。Cao等^[33]构建了基于XBridge Amide柱和Accucore PFP柱结合的在线亲水相互作用×反相二维液相色谱(HILIC×RP-DAD-ESI/HRMS/MSⁿ),并从丹参提取物中检测出196个极性化合物的色谱峰,二者正交性高达73%。HILIC和RP的在线联用为具有复杂基质的含有极性化合物的样品分析提供了强大的分离能力。

相比于全二维的整体模式,中心切割二维色谱(LC-LC)模式主要针对中药某些难于分离的类成分,其仅将第一维流分中感兴趣的组分切割进入第二维进行进一步分离。例如,Yao等^[34]采用基于Poroshell SB C18柱和Zorbax SB-Aq柱结合的多中心切割二维色谱实现了含有三七的8种中成药中5种人参皂苷类(noto-R₁、Re、Rg₁、Rb₁和Rd)化合物的基线分离与准确定量,而一维色谱无法完全分离这些结构极为相似的人参皂苷类化合物。

由于中药及其复方中成分繁杂且含量各异,目前常将全二维和中心切割技术联用,能更加全面地分析检测中药微量成分以及全成分表征。Qiao等^[35]通过将全二维和中心切割液相色谱技术进行联用,在35 min内从2种葛根提取物中共分别分离出271和254个色谱峰,并利用8位2通阀切割、移除主成分后,结合质谱初步鉴定了含量约为0.01%~0.1%(w/w)的21个微量成分,其中9个为首次从葛根中发现。在后续研究中,该课题组^[36]以基于C18×Phenyl-Hexyl结合的全二维液相色谱模式在42 min内从葛根芩连汤中分离出280

个色谱峰,并鉴定出125种化合物,在此基础上,以14位6通阀的中心切割模式针对性地多分离出13种化合物,实现了葛根芩连汤的全面物质基础表征。

1.4 质谱数据的深度解析策略的发展极大促进了中药药效物质的辨识 得益于超高效液相色谱及高分辨质谱串联技术的发展,复杂中药物质成分深度覆盖检测技术已建立,且已广泛应用于中药黄酮类^[37]、生物碱类^[38]、萜类^[39]、酚酸类^[40]等成分的检测鉴定。与此同时,液质数据的深度解析对于中药复杂体系中成分的分析鉴定也尤为重要,新型鉴定策略的不断应用,促进了复杂中药化学成分的快速高效全面辨识。如作者课题组^[41]利用基于分子特征的前体离子定向扫描数据处理策略(PIS-MS/MS)在20 min内从益心舒胶囊中辨识出276种化学成分。该策略根据中药复方中各类成分的分子特征,进行查找、提取各类型化合物的前离子,最后对前离子进行靶向MS/MS分析。在给定的保留时间和 m/z 范围内,使用PIS-MS/MS获得的前离子数量是auto-MS/MS方式的1.3倍,有利于进一步获取低丰度化合物的碎片信息,其可实现高、低含量甚至微量化合物的同步鉴定。Ye等^[42]通过整合中性丢失/前体离子扫描以及结合全局分析及多元统计学(MNPSS)的研究策略从中药姜黄中快速识别出846个萜烯类成分,且其中包含大量的潜在新化合物。该策略根据前期分离得到的萜烯类成分的质谱碎裂规律,确定了12个中性丢失片段和产物离子信息,利用该信息进行数据采集,从而对姜黄中的成分进行靶向及非靶向分析。Guo等^[43]构建了一个增强目标识别策略,共从红花中鉴定了107个黄酮-O-糖苷类成分,其中80个成分为首次从红花中报道的。该策略通过整合离线二维液相色谱-线性离子阱-obitrap质谱-高分辨诊断产物离子/中性丢失过滤和固相萃取-核磁共振,离线二维液相色谱使共洗脱组分获得更好地分离,碰撞诱导解离和高能C-trap解离的组合使用可以产生互补的碎片信息,糖苷配基亚型和表征糖基化模式可通过HCD-MS²光谱中糖苷配基离子种类的强度来识别,五种糖苷配基结构进一步通过LC-SPE-NMR的¹H NMR数据得到了确认。此外,其中的一个新化合物被分离并完全鉴定,这从某种程度上验证了MS导向鉴定的可靠性。

中药药效物质除了原形成分外,还存在一些代谢产物。近年来用于鉴定药物代谢产物的常用数据挖掘策略有以下这些,如提取离子色谱、本底扣除、质量亏损过滤、产物离子过滤、质谱树状图过滤、同位素过滤、SWATH和MS^E以及这些技术的联用等^[44]。作者课题组^[45]通过整合质量亏损过滤、提取离子色谱、同位素模

式匹配和生物转化补偿分子式等鉴定策略对质谱数据进行综合解析,共从益心舒胶囊给药血浆中鉴定了184种代谢产物。Zhou等^[46]通过UPLC-Q-TOF/MS结合质量亏损过滤两步法共从栀子-连翘药对给药血浆鉴定出36个原形成分和16个代谢产物。第一步是通过UPLC-Q-TOF/MS结合质量亏损过滤从不同结构类型的代表性化合物中快速鉴定了未知类似物,并进一步通过标准物质和已发表的文献进行了确认。类似地,在第二步中,通过质量亏损过滤从第一步中鉴定的化合物中快速发现其他未知组分。

2 中药化学物质的色谱高效制备

借助于新的色谱模式及多维色谱技术,中药中微量、亲水性强极性成分的分选、制备难点获得突破,制备了一系列高活性微量成分,为中药发现奠定基础。如集成色谱与波谱联用、组合色谱与活性筛选及新型亲水性醇/盐双水相分离体系结合高速逆流色谱、二维液相色谱、电化学-色谱联用等技术方法,突破了中药微量活性成分“难识别、难获取、难评价”和亲水性强极性类成分难高效分离的问题。

2.1 高柱效色谱柱及富集循环制备系统促进中药化学物质分离制备

中药化学物质高效分离制备可从以下4个方面进行改善:①发展新型高柱效的柱填充技术;②增大载样量;③回收处理填料,以便降低损耗;④优化分离,达到缩短时间、减少溶剂消耗。基于此,作者课题组前期成功研制出了制备量大、分离效果好的动态轴向加压大型高效制备柱,其采用动态压缩系统、移动柱头,优化的分配盘、匀浆及装填方法系统。所研制出来的动态轴向加压柱,经反复试用,其分离性能与进口产品相当。相比进口产品,其成本低廉,简单易用,适用于中药物质成分及化学对照品高效、批量制备。同时,作者课题组^[47]利用该设备同步规模制备了淫羊藿中5个对照品,在一个月内制备得到淫羊藿苷大于30 g,朝藿定C大于10 g,朝藿定A、B大于1 g,朝藿定A₁(别名hexandraside F)大于100 mg,纯度均大于98%。

目前市场上已推出Sepmatix 8柱平行制备色谱、多维制备色谱、Waters-Thar-SFC制备色谱、以及Waters自动纯化系统等设备应用于成分的分选制备,但这些设备价格昂贵,高达200~300万元,使用其进行分离制备中药成分,成本过高,且效果不佳。因此,价格低廉、简单易操作、且能实现快速高效分离的分选纯化系统成为研究的重点。基于以上考虑,作者课题组^[48,49]发展研制出一套成本低廉、简单易用的分选纯化系统,其采用捕集柱接口设计,实现不断进样-分离-捕集,从而使微量成分达到连续富集和循环分离。

通过增加一个手动十通阀和溶剂泵,并与六通阀组合切换,使目标化合物被有效捕集后再转移入循环色谱制备柱中进行分离,实现一根捕集柱和一根制备柱即可完成微量成分的在线富集和循环分离过程。该新型在线循环制备色谱系统具有高效快速、高回收率、节省成本等特点。作者课题组^[50]利用该系统快速对雪莲细胞培养的提取物中的10%多酚类成分进行分离,制备纯度达到大于95%,三次循环纯化后回收率超过95%。

2.2 导向高效识别分离制备中药化学物质

中药含有的化学成分复杂,显示出显著的药理活性的成分可能为主要成分或微量成分。如何从中药中快速高效分离制备微量或活性成分仍是目前一大难点问题。系统分离中药化学成分时,由于已知化合物和其他杂质的干扰,导致了大量重复性的分离工作,造成了大量时间和经费的浪费。近年来发展出的导向分离制备目标成分或活性成分策略,已大大提高了工作效率。Yu等^[51]针对微量活性成分“难识别、难获取、难评价”等技术瓶颈,历经13年的研究,集成利用色谱与波谱联用、组合色谱与活性筛选等新技术新方法,创建了中草药微量活性物质的高效识别、快速锁定和定向获取的新技术体系,获取了一批新的微量高活性成分,为中药发现提供了新源头,揭示了天麻等8种中草药的微量关键药效物质,开辟了中草药研究的新热点,并获得了2014年度国家科技进步奖二等奖。此外,Liu等^[52]通过高效液相色谱-质谱-固相萃取-核磁共振(HPLC-MS-SPE-NMR)联用方法从杜鹃花中导向地分离得到4个微量三萜类化合物,3个新的重排三萜类化合物rhodoterpenoid A-C以及1个新生物合成途径的化合物rhodoterpenoid D。

以活性为导向从中药复杂体系分离制备活性成分,不仅能提高从复杂的中药成分体系中分离单体化合物的工作效率,同时也克服了传统分离工作中存在的局限性和盲目性问题。Wang等^[53]首先利用超滤质谱筛选技术从黄芩提取物中筛选并鉴定出11种 α -葡萄糖苷酶抑制剂,并以此为导向,联合使用高速逆流色谱(HPCCC)和快速制备色谱(RP-MPLC)方法,从黄芩粗提取物中分离得到6种 α -葡萄糖苷酶抑制剂。Zhou等^[54]采用1,1-二苯基-2-苦肟基自由基乙醇溶液(DPPH)和传统显色剂显色的薄层色谱-生物自显影法,从菝葜的丙酮提取物中导向分离制备得到4个主要抗氧化活性成分。

2.3 二维液相色谱加快中药化学物质分离制备

近年来,随着二维液相色谱在中药成分分析检测研究中的广泛应用,其亦逐渐应用于中药化学物质分离制备方面,大大提高了分离制备效率。Li等^[55]采用新开发

的真空蒸发辅助吸附 (VEAA) 界面构建了在线二维正相液相色谱×反相液相色谱 (2D NPLC×RPLC) 结合制备系统, 其可快速去除 NPLC 溶剂。该系统在真空条件下, 成功解决了 NPLC 与 RPLC 之间的溶剂不相容问题, 实现了两个维度在线溶剂交换, 在此基础上, 通过约 20 h 的分离从蟾蜍毒液中共制备获得 19 个具有高纯度的化合物。与传统方法相比, 该 2D 系统借助于 VEAA 界面, 在分离效率和自动化方面表现出明显的优势, 对于中药复杂成分的常规分离具有广阔的应用前景。Jiao 等^[56]采用亲水相互作用固相萃取法结合离线二维反相液相色谱/亲水相互作用液相色谱从苦马豆的粗制样品中分离制备黄酮苷类成分。首先使用 XAmide 固相萃取柱富集苦马豆的粗制样品中黄酮类化合物, 再通过第一维液相分离得到 15 个富含黄酮类成分的目标部分, 然后进一步通过第二维液相对其中的 3 个目标部分进行分离制备, 共得到了 8 个黄酮苷, 且纯度均大于 97%。

2.4 新型双水相高速逆流色谱增强中药强极性成分分离制备 传统的中药物质基础研究常集中在中等极性和弱极性化合物的分离与表征, 对强极性化合物则少有涉足。如何高效、高通量地实现中药强极性成分的分离, 是中药药效物质基础研究领域一项重大难题。一直以来, 天然产物的分离基本局限于有机/水相两相溶剂体系, 而传统的双水相体系由聚合物/聚合物体系和聚合物/盐体系组成, 主要用于生命大分子如蛋白质的分离制备, 因此, 有机溶剂/水两相体系和双水相体系之间留有的大片极性空白区一直没有找到合适的溶剂体系填补, 这一极性跨度区域成为分离极性中药化学物质最应关注的区域。作者课题组 Liu 等^[57]将亲水性醇/盐新型双水相应用于高速逆流色谱, 建立了新型亲水性醇-盐双水相高效逆流色谱体系, 并成功利用该技术高效分离获得 4 个咖啡酰奎尼酸同分异构体和 4 个核苷类小分子极性化合物^[58]。该新型双水相体系是指在一定条件下, 甲醇、乙醇、丙酮等亲水有机溶剂与水和无机盐在适当浓度下混合, 体系中的盐不析出, 而是出现液/液分相现象, 从而形成一种亲水性醇/盐两相体系, 该体系的极性介于有机溶剂/水两相体系和双水相体系间, 上相含水量可达 22%~60%, 适用于极性化合物的萃取分离。在此基础上, Zou 等^[59]提出了一种基于 pH 区的高速逆流色谱的有效策略, 用于从中药中分离制备极性生物碱。该方法使用由乙腈、氯化钠和水组成的亲水性有机/含盐两相体系 (54%:5%:41%, w%), 加入 10 mmol·L⁻¹ 三乙胺作为保留剂和 15 mmol·L⁻¹ 盐酸作为洗脱剂, 同时从 500 mg 5% 乙醇大孔吸附树脂洗脱部分的蟾蜍毒液中分离得到 3 种极

性吲哚生物碱, 5-羟色胺 (19 mg)、5-羟基-N'-甲基色胺 (45 mg)、bufotenine (33 mg), 其纯度分别为 91.3%、97.5% 和 89.4%。

2.5 电化学-色谱联用技术有望加快体内代谢产物分离制备 中药及其复方含有的化学成分繁杂, 其吸收入体内的化学成分及代谢产物亦繁杂, 随着药物代谢研究领域的进步, Xu 等^[60]认为中药药效物质的显效形式或为原形成分, 或其代谢产物, 亦或两者皆是, 不仅 I 相代谢产物具有活性, II 相代谢产物如黄酮类的葡萄糖醛酸结合物也具有活性。目前, 制备中药体内代谢物主要有 3 种技术: ① 化学合成技术, 该技术制备代谢物产量较大, 但不能保证化学合成产物在光学活性上与体内产生的代谢物一致; ② 体外生物合成技术, 但其要求所用中药成分和酶反应底物具有一定的水溶性; ③ 从人体受试者或实验动物的排泄物中直接提取, 但由于排泄物组成复杂, 色谱分离纯化难度较大。

电化学 (electrochemical, EC) 系统 ROXY TM 是高效的代谢产物合成的一种新的技术工具, 能很好地避免生物基质、生物危害、副产品、时间长、成本高的问题, 且能制备得到大量的代谢产物, 获得更高的收益, 与质谱联用 (EC-MS) 几乎可以模拟任何分析领域的自然界的氧化还原反应, 可在很短的时间得到 (药物) 分子的氧化代谢指纹, 且不需要生物体就可直接检测代谢产物或结合物 (例如 GSH、蛋白质、DNA), 使用制备电极作为代谢产物合成提供了一种新型平台。欧美科学家利用该仪器模拟体内、体外药物的 I 相和 II 相代谢, 并进行代谢物快速制备。Baumann 等^[61]分别采用“体内实验”、“体外实验”、“EC-MS 法模拟药物代谢”得到化学药 tetrazepam 的代谢数据, 说明 EC-MS 法模拟药物代谢具有极高的一致性; Khera 等^[62]通过比较电化学和酶氧化制备他汀类药物代谢物研究发现, 电化学模拟方法具有较高的得率; Brauckmann 等^[63]通过使用 LC/ESI-MS 检测到顺铂及西咪替丁之间的加合物与产品其各自的电化学氧化产物。基于以上研究, 作者课题组^[64]首次利用 ROXY EC 模拟中药川芎中藁本内酯的体内氧化代谢反应, 并分离制备得到其代谢产物 senkyunolide I、senkyunolide H 和 6,7-epoxyiligustilide。senkyunolide I 和 senkyunolide H 可在大鼠血浆和肝脏中检测到, 而藁本内酯的关键中间代谢产物 6,7-epoxyiligustilide 在体内难以检测到。因此, 基于电化学技术模拟中药中的单体成分的体内代谢, 对于阐明中药体内药效成分具有极高的应用价值。

3 中药药效物质的色谱筛选

随着色谱技术的发展及新型填料的应用, 新色谱

技术的引入为高通量筛选活性成分带来了新的契机。借助于亲和色谱、细胞膜色谱及谱效关联等色谱技术,加快了复杂中药提取物中直接筛选药效成分发现的速度。

3.1 亲和色谱加快中药药效物质筛选 亲和色谱是基于固定相特异性识别活性分子的色谱分离技术^[65],其采用固定化技术将药物靶标如酶、受体与合适的固相支持物进行共价、非共价结合后用于活性分子的筛选,实现了高效液相色谱分离和受体药理学的有机结合和药物-受体亲和作用的快速表征。基于固定化靶酶的亲和捕获筛选模型,具有作用机制明确、直接结合活性单体等优点,是一种快速筛选活性成分的新方法,其先将目标靶酶固定于色谱填料上,装填入色谱柱,进而进行平衡、上样、清洗、洗脱,最后获得药效物质。作者课题组^[66]以 α -葡萄糖苷酶 (AGH) 为靶酶,在优化固定化 AGH 合成方法的基础上,制备出固定化 AGH 亲和材料,将其与 UHPLC-MS 联用,搭建了集“成分分离-活性筛选-结构鉴定”于一体的 AGHI 筛选平台,并通过亲和捕获筛选出绿茶中 3 个强 AGH 抑制剂 (EGCG、GCG、ECG),而 3 个阴性分子 (GA、EGC、EC) 尽管在绿茶中的含量较大,但其与 AGH 酶之间仅有弱亲和作用而未被筛选出来。此外, Wang 等^[67]以含有环氧反应基团的甲基丙烯酸酯基整体毛细管作为固定目标靶酶乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的载体,结合液质联用技术,构建了一个在线配体垂钓平台,并利用该平台从延胡索提取物中筛选出 8 个具有 AChE 结合亲和力的化合物。

3.2 细胞膜色谱促进中药药效物质筛选 细胞膜色谱技术 (cell membrane chromatography, CMC) 是用液相色谱法研究药物与固定相上细胞膜受体相互作用的一种生物色谱分析方法^[68],其固定相为含靶标受体的活性组织细胞膜 (或高表达细胞)。1996 年 He 等^[69]提出的 CMC 具有受体亲和与色谱分离双重功能,将色谱分离与活性成分筛选结合,可在体外实现药物体内过程的动态模拟,从而进行药物分离、活性筛选以及药物鉴定,其在中药复杂体系成分分离和筛选研究方面有独特的优势。至今为止,已建立了多种细胞膜色谱成功地用于中药活性成分筛选体系。He 等^[70]用大鼠前列腺细胞膜层析结合液相色谱-质谱 (LC-MS) 发现了钩藤提取物中的 4 个活性成分 (corynoxine、isorhynchophylline、isocorynoxine 和 rhynchophylline),且竞争性结合测定结果表明,这 4 个成分在同一个结合位点处直接竞争,并以与坦索罗辛相似的方式与 α_1 肾上腺素能受体 (α_1A -AR) 相互作用。这种 CMC 结合 LC-MS 系统通过筛选天然药材提供了一种药物发现方法,

用于筛选靶向特定受体的新药理活性分子。此外, He 等^[71]以高表达受体细胞膜色谱技术为核心,研究了集“识别-分离-鉴定”于一体的细胞膜色谱-HPLC/MS 二维分析系统,在此基础上研制开发了“天然药物中目标物快速‘识别鉴定’二维色谱系统”。研究者们^[72]以酪氨酸激酶受体 (TKR) 作为抗肿瘤药物筛选的靶点,构建了 EGFR、VEGFR、bFGFR1 和 bFGFR4 等稳定膜高表达亚型 TKR 受体细胞株,并利用 TKR/CMC 二维色谱分析仪,对红毛七等 50 多种中药材中的抗肿瘤活性成分进行筛选,得到了塔斯品碱等抗肿瘤血管生成先导化合物。

3.3 谱效关联提高中药药效物质筛选整体性 对于中药药效物质的高通量筛选固然十分重要,但如果只是一味的关注于活性单体化合物的发现,难免会与中药药效的整体评价标准有所割裂。作者认为,对于中药药效物质的认识,不仅要有技术方法上的创新,更需要研究思路的指导,“谱效关联”的概念与中药多靶点、协同作用的整体研究思路十分契合。建立基于谱效关联的中药药效物质筛选方法能有效加快中药药效物质发现的速度。作者课题组^[73,74]根据多个组分和化合物的 LC-MS 信息及活性数据进行建模,然后进行变量筛选,最后成功从淫羊藿中筛选出抗骨质疏松及从狼毒中筛选出抗癌的有效组分及化合物。

此外,中药具有多成分、弱效应、协调整合作用特点,其整体药效的发挥不是单一成分药效的简单加合,而是存在着成分间多层次、多环节、多维度的非线性作用。基于此, Li 等^[75]建立了一套符合中药作用特点的药效物质基础研究体系:在整体中解析部分,由部分回归整体,即在中药复方整体的基础上,遵循原方成分含量比例,评估“部分”对“整体”的贡献,从众多成分中寻找能基本代表原方疗效的“等效成分群”。以复方丹参滴丸为例,该课题组^[76]从中发现了一个由 18 个成分组成的等效成分群,其总含量占复方制剂的 15.01%,可视作该制剂的有效组分“标示量”。该成分群在细胞模型和大鼠心肌梗死、缺血再灌注模型上均呈现出与复方丹参滴丸相当的药效。中药等效成分群发现策略为建立基于中药整体作用特点、药效关联的质量控制标准提供了新思路,也为基于中药复方的创新药物研发开拓了新途径。

4 结语

中药药效物质是中药现代化研究的基础。借助领先的色谱、质谱、波谱检测设备和活性评价平台,中药药效物质研究取得突破性进展,但仍存在下列问题:① 临床中药体内药效物质浓度极低、全面检测仍十分困难;② 中药代谢产物制备十分困难;③ 中药成分分

离与活性评价仍然脱节。因此, 中药物质基础研究仍然具有相当的挑战性, 需要不断改进、创新和大力发展相关技术及方法。

References

- [1] Zhang BL, Chen CH. Modernization of Chinese Medicine for Twenty Years (中药现代化二十年) [M]. Shanghai: Shanghai scientific & technical publishers, 2016, 39.
- [2] Gao JM. Phytochemistry (植物化学) [M]. Beijing: Science Press, 2015.
- [3] Cheng P, Han DQ, Hu WH, et al. Simultaneous determination of ten hydrophilic compounds and four lipophilic compounds in Radix Salviae Miltiorrhizae by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2015, 35: 991-996.
- [4] Guo C, Gao YG, Zang P, et al. Simultaneous determination of sixteen ginsenosides in *Panax ginseng* and its preparation by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 2009-2013.
- [5] Ying JN, Han XM. Progress in the application of ultra performance liquid chromatography in traditional Chinese medicine and its compound research [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med (江苏中医药), 2015, 47: 81-84.
- [6] Chen B, Cai T, Jia XB. Simultaneous determination of ten active ginsenosides in steamed notoginseng by UPLC [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 1614-1619.
- [7] Ren WG, Wang DM, Huang LF. Simultaneous determination of 8 components in Radix at Rhizoma Rhei by UPLC method [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2014, 34: 1565-1570.
- [8] Chen XH, Su J, Wang H, et al. Simultaneous determination of 11 components in Zhizi Jinhua pill by UPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 955-959.
- [9] Liu B, Jiang B, Liao ZZ, et al. Study on UPLC fingerprint of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 906-911.
- [10] Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402: 231-247.
- [11] Qiao X, An R, Huang Y, et al. Separation of 25R/S-ergostane triterpenoids in the medicinal mushroom *Antrodia camphorata* using analytical supercritical-fluid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2014, 1358: 252-260.
- [12] Encarnación RG, Diego GG. Hydrophilic Interaction Chromatography: Current Trends and Applications [M]. Elsevier: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, 2018: 1-7.
- [13] Zhang ML, Jin Y. Determination of betaine in Lycii Fructus with HILIC column and charged aerosol detector [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2014, 36: 2128-2131.
- [14] Qin JP, Feng J, Li Y, et al. Ultrasonic-assisted liquid-liquid extraction and HILIC-ELSD analysis of ginsenoside Rb₁, astragaloside IV and dulcitol in sugar-free "Fufangfufangteng Heji" [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 56: 836-840.
- [15] Sun JG, Zhang FY, Peng Y, et al. Quantitative determination of diterpenoid alkaloid Fuziline by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-electrospray ionization mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study in rats [J]. J Chromatogr B, 2013, s 913914: 55-60.
- [16] Guo S, Duan JA, Qian DW, et al. Hydrophilic interaction ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry for determination of nucleotides, nucleosides and nucleobases in *Ziziphus* plants [J]. J Chromatogr A, 2013, 1301: 147-155.
- [17] Zhu LL, Zhao Y, Sun XG, et al. Application of supercritical fluid chromatography in natural products [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2016, 36: 1317-1323.
- [18] Hartmann A, Ganzera M. Supercritical fluid chromatography - theoretical background and applications on natural products [J]. Planta Med, 2015, 81: 1570-1581.
- [19] Huang Y, Tang GY, Zhang TT, et al. Supercritical fluid chromatography in traditional Chinese medicine analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 147: 65-80.
- [20] Zhao Y, McCauley J, Pang X, et al. Analytical and semipreparative separation of 25 (R/S)-spirostanol saponin diastereomers using supercritical fluid chromatography [J]. J Sep Sci, 2013, 36: 3270-3276.
- [21] Fu Q, Li ZY, Sun CC, et al. Rapid and simultaneous analysis of sesquiterpene pyridine alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. Using supercritical fluid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry [J]. J Supercrit Fluid, 2015, 104: 85-93.
- [22] Pfeifer I, Murauer A, Ganzera M. Determination of coumarins in the roots of *Angelica dahurica* by supercritical fluid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 129: 246-251.
- [23] Sun MZ, Lidden G, Sandahl M, et al. Ultra-high performance supercritical fluid chromatography of lignin-derived phenols from alkaline cupric oxide oxidation [J]. J Sep Sci, 2016, 39: 3123-3129.
- [24] Huang Y, Feng Y, Tang GY, et al. Development and validation of a fast SFC method for the analysis of flavonoids in plant extracts [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 140: 384-391.
- [25] Ganzera M. Supercritical fluid chromatography for the separation of isoflavones [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 107: 364-369.
- [26] Aichner D, Ganzera M. Analysis of anthraquinones in rhubarb (*Rheum palmatum* and *Rheum officinale*) by supercritical fluid chromatography [J]. Talanta, 2015, 144: 1239-1244.
- [27] Zhu LL, Liu C, Xu YW, et al. Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the separation of spirostanol saponins [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 120: 72-78.
- [28] Huang Y, Zhang TT, Zhao YM, et al. Simultaneous analysis of nucleobases, nucleosides and ginsenosides in ginseng extracts using supercritical fluid chromatography coupled with single

- quadrupole mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 144: 213-219.
- [29] Cao JL, Wei JC, Chen WM, et al. Application of two-dimensional chromatography in the analysis of Chinese herbal medicines [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1371: 1-14.
- [30] Li Z, Chen K, Guo MZ, et al. Two-dimensional liquid chromatography and its application in traditional Chinese medicine analysis and metabonomic investigation [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39: 21-37.
- [31] Guo RZ, Liu XG, Gao W, et al. A strategy for screening antioxidants in *Ginkgo biloba* extract by comprehensive two-dimensional ultra high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1422: 147-154.
- [32] Guo ZM, Zhang XL, Xu Q, et al. Stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography and their applications in separation of traditional Chinese medicines [J]. *Chin J Chromatogr (色谱)*, 2009, 27: 675-681.
- [33] Cao JL, Wang SS, Hu H, et al. Online comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction chromatography \times reversed-phase liquid chromatography coupled with hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry for the analysis of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1536: 216-227.
- [34] Yao CL, Yang WZ, Wu WY, et al. Simultaneous quantitation of five Panax notoginseng saponins by multi heart-cutting two-dimensional liquid chromatography: method development and application to the quality control of eight Notoginseng containing Chinese patent medicines [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1402: 71-81.
- [35] Qiao X, Song W, Ji S, et al. Separation and detection of minor constituents in herbal medicines using a combination of heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1362: 157-167.
- [36] Qiao X, Wang Q, Song W, et al. A chemical profiling solution for Chinese medicine formulas using comprehensive and loop-based multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1438: 198-204.
- [37] Qiao X, Li R, Song W, et al. A targeted strategy to analyze untargeted mass spectral data: rapid chemical profiling of *Scutellaria baicalensis* using ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry and key ion filtering [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1441: 83-95.
- [38] Pan HQ, Yang WZ, Yao CL, et al. Mass defect filtering-oriented classification and precursor ions list-triggered high-resolution mass spectrometry analysis for the discovery of indole alkaloids from *Uncaria sinensis* [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1516: 102-113.
- [39] Jia SL, Du ZF, Song CW, et al. Identification and characterization of curcuminoids in turmeric using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1521: 110-122.
- [40] Zhang JY, Wang ZJ, Li Y, et al. A strategy for comprehensive identification of sequential constituents using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer, application study on chlorogenic acids in *Flos Lonicerae Japonicae* [J]. *Talanta*, 2016, 147:16-27.
- [41] Wang HP, Chen C, Liu Y, et al. Identification of the chemical constituents of Chinese medicine Yi-Xin-Shu capsule by molecular feature orientated precursor ion selection and tandem mass spectrometry structure elucidation [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38: 3687-3695.
- [42] Qiao X, Lin XH, Ji S, et al. Global profiling and novel structure discovery using multiple neutral loss / precursor ion scanning combined with substructure recognition and statistical analysis (MNPS): characterization of terpene-conjugated curcuminoids in *Curcuma longa* as a case study [J]. *Anal Chem*, 2016, 88: 703-710.
- [43] Yao CL, Yang WZ, Si W, et al. An enhanced targeted identification strategy for the selective identification of flavonoid *O*-glycosides from *Carthamus tinctorius* by integrating offline two-dimensional liquid chromatography/linear ion-trap-Orbitrap mass spectrometry, high-resolution diagnostic product ions / neutral loss filtering and liquid chromatography-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1491: 87-97.
- [44] Zhang D, Wang CH, Jin Y, et al. Identification of drug metabolites using data post-processing strategies based on high performance chromatography coupled with high resolution mass spectrometer [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2017, 38: 410-416.
- [45] Wang HP, Chen C, Liu Y, et al. Metabolic profile of Yi-Xin-Shu capsule in rat by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry analysis [J]. *RSC Adv*, 2015, 5: 80583-80590.
- [46] Zhou W, Shan JJ, Meng MX. A two-step ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight mass spectrometry with mass defect filtering method for rapid identification of analogues from known components of different chemical structure types in Fructus Gardeniae-Fructus Forsythiae herb pair extract and in rat's blood [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1563: 99-123.
- [47] Xiao HB, Wang L, Lei YJ. Method for simultaneously preparing icariin and radix A, B and C chemical reference materials: CN, 101747393A [P]. 2010-06-23.
- [48] Xiao HB, Gao MZ, Zou XW, et al. Two-dimensional preparative chromatography instrument system with online enrichment function and its application: CN, 104713973A [P]. 2015-06-17.
- [49] Xiao HB, Zou XW, Liu D, et al. A preparation type circulating chromatography device: CN, 104422735A [P]. 2015-03-18.
- [50] Zou XW, Gao MZ, Liu D, et al. A novel preparative liquid chromatograph for repetitive enrichment and purification of low-abundance compounds [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1351: 90-95.
- [51] Yu SS, Shi JG, Zhang DM, et al. A new technology system for revealing the efficacy of trace ingredients in Chinese herbal medicine [J]. *Tradit Chin Med Today (现代中医药)*, 2015, 2: 76-77.

- [52] Liu F, Wang YN, Li Y, et al. Rhodoterpenoids A-C, three new rearranged triterpenoids from *Rhododendron latoucheae* by HPLC-MS-SPE-NMR [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:7944.
- [53] Wang J, Liu S, Li SN, et al. Ultrafiltration LC-PDA-ESI/MS combined with reverse phase-medium pressure liquid chromatography for screening and isolation potential α -glucosidase inhibitors from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Anal Methods*, 2014, 6: 5918-5924.
- [54] Zhou YL, Min JG, Wang LS, et al. Isolation of antioxidant activity constituents from *Smilax china* guiding by TLC-bioautography [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2012, 27: 799-802.
- [55] Li JF, Fang H, Yan X, et al. On-line comprehensive two-dimensional normal-phase liquid chromatography \times reversed-phase liquid chromatography for preparative isolation of toad venom [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1456: 169-175.
- [56] Jiao LJ, Tao YD, Wang WD, et al. Preparative isolation of flavonoid glycosides from *Sphaerophysa salsula* using hydrophilic interaction solid-phase extraction coupled with two-dimensional preparative liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40: 3808-3816.
- [57] Xiao HB, Liu D, Zou XW, et al. A new type of two-phase high-speed countercurrent chromatography: CN, 104707358A [P]. 2015-06-17.
- [58] Liu D, Zou XW, Gao MZ, et al. Hydrophilic organic/salt-containing aqueous two-phase solvent system for counter-current chromatography: a novel technique for separation of polar compounds [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1356: 157-162.
- [59] Zou DL, Du YR, Kuang JY, et al. pH-zone-refining counter-current chromatography with a hydrophilic organic/salt-containing two-phase solvent system for preparative separation of polar alkaloids from natural products [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1553: 1-6.
- [60] Cai SQ, Wang X, Shang MY, et al. "Efficacy Theory" may help to explain characteristic advantages of traditional Chinese medicines [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2015, 40: 3435-3443.
- [61] Baumann A, Lohmann W, Karst U, et al. Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to *in vivo* and *in vitro* methods [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 3192-3198.
- [62] Khera S, Hu N. Generation of statin drug metabolites through electrochemical and enzymatic oxidations [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405: 6009-6018.
- [63] Brauckmann C, Faber H, Karst U, et al. Influence of cimetidine and its metabolites on cisplatin—investigation of adduct formation by means of electrochemistry/liquid chromatography/electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1279: 49-57.
- [64] Duan FP, Xu WJ, Liu J, et al. Preparing the key metabolite of Z-ligustilide *in vivo* by a specific electrochemical reaction [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41: 2799-2807.
- [65] Feng YS, Tong SS, Xu XM, et al. Progresses in screening active compounds from herbal medicine by affinity chromatography [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2015, 40: 1032-1037.
- [66] Deng SR, Xia LB, Xiao HB. Screening of α -glucosidase inhibitors from green tea extracts using immobilized enzymes affinity capture combined with UHPLC-QTOF MS analysis [J]. *Chem Commun*, 2014, 50: 2582-2584.
- [67] Wang LH, Zhao YM, Zhang YY, et al. Online screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural products using monolith-based immobilized capillary enzyme reactors combined with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1563: 135-143.
- [68] Hou XF, Wang SC, Zhang T, et al. Recent advances in cell membrane chromatography for traditional Chinese medicines analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 101: 141-150.
- [69] Ma WY, Xie YY, Wang YM, et al. Emerging application and reflections of cell membrane chromatography in the quality evaluation of traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2017, 52: 1827-1838.
- [70] He JY, Han SL, Yang FF, et al. Prostate cell membrane chromatography-liquid chromatography-mass spectrometry for screening of active constituents from *Uncaria rhynchophylla* [J]. *J Chromatogr Sci*, 2013, 51: 905-909.
- [71] He LC, Wang SC. The application of CMC hyphenated technique on the identification of property subjects and the development of two-dimensional chromatograph [C]//Proceedings of the 20th National Symposium and Exhibition on Chromatography of China. Vol 1. (第二十届全国色谱学术报告会及仪器展览会论文集·第一分册). Xi'an: China association of chemistry and Chromatography, 2015: 38.
- [72] Hou XF, Du H, He XS, et al. Advances in research on the application of cell membrane chromatography in the study of drug-receptor interactions [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2015, 39: 882-888.
- [73] Yang QX, Liu YQ, Wang L, et al. Screening of bioactive components in epimedium for osteoporosis treatment by model population analysis [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2012, 47: 1205-1209.
- [74] Yang QX, Cheng MC, Wang L, et al. Antitumor components screening of *Stellera chamaejasme* L. under the case of discrete distribution of active data [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2014, 49: 927-931.
- [75] Yang H, Qi LW, Li HJ, et al. "Bioactive equivalent combinatorial components" as defined labeled amount of active constituents for quality control of traditional Chinese medicines [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med -World Sci Technol* (世界科学技术—中医药现代化), 2014, 16: 510-513.
- [76] 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.