

色谱指纹图谱与中药质量控制

易伦朝, 吴 海, 梁逸曾

(中南大学化学化工学院中药现代化研究中心, 湖南 长沙 410083)

摘要 :本文综述了近年来色谱指纹图谱研究中多种色谱技术、相关化学计量学方法的发展及其在中药质量控制中的应用,并对中药质量稳定性和有效性的全面评价方法和可行性进行了初步探讨。提出以色谱指纹图谱为核心,依托现代色谱技术、化学计量学和系统生物学方法,建立中药化学成分信息与药效(毒性)信息相关关系的中药质量控制研究策略,深层次揭示中药的内在作用机理,期望真正实现中药质量的可控、安全和有效。

关键词 :中药;质量控制;色谱指纹图谱;化学计量学;系统生物学

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)02-0166-06 栏目类别 :中药质量控制专栏

Chromatographic fingerprint and quality control of traditional Chinese medicines

YI Lunzhao, WU Hai, LIANG Yizeng

(Research Center of Modernization of Traditional Chinese Medicines, College of Chemistry
and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract :The development of modern chromatographic technologies and related chemometric methods in the research of chromatographic fingerprint, and their applications in quality control of traditional Chinese medicines (TCMs) are comprehensively reviewed. Furthermore, we preliminarily discuss the quality control methods and their feasibility to guarantee that the TCMs can be used stably and effectively. A new strategy is proposed to establish the comprehensive relationships between chromatographic fingerprints and their pharmacodynamic (toxicity) information with the help of the techniques of modern chromatography, chemometrics and system biology to reveal the working mechanism of TCMs and then to comprehensively control the quality of TCMs.

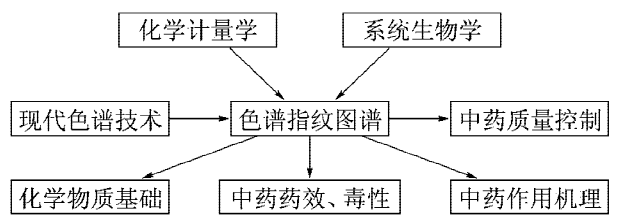
Key words :traditional Chinese medicines (TCMs); quality control; chromatographic fingerprint; chemometrics; system biology

中药的质量控制一直是中药研究与应用的难点同时也是重点问题。中药材的种类繁多,成分复杂,产地分散,类同品、代用品不断,加之生长环境、采收季节、加工炮制方法不同及制剂生产工艺的因素,造成其内在质量即所含化学成分及临床疗效的差异。模仿化学药品的质量控制模式,选定一两个有效成分、活性成分或指标成分进行鉴别和含量测定,不能反映中医用药所体现的整体疗效。这是中药与化学合成药品质量标准的根本区别^[1]。指纹图谱质量控制模式的提出使得中药(材)的研究方法和质量分析手段由针对一个或者少数几个活性成分(指标成分)的分析,发展为对整味中药化学指纹图谱的综合分析。

中药色谱指纹图谱实际上是中药(包括中药单味药与中药复方制剂)整体性的化学表征,具有“整体性”和“模糊性”^[2]。所以,它不但是中药整体质量的控制手段,而且还是中药基地规范化(GAP)、中药生产标准化(GMP)的准绳,更为重要的是,它还是中医药理论科学化化的基础。在现阶段以现代色谱分离分析技术为依托的色谱指纹图谱分析是一种可行的质量控制模式,它不要求全部的成分都搞清楚,而是从指纹图谱的整体综合特征来鉴别真伪,保证指纹图谱的专属性、可重复性与实用性^[3]。可以说,这是色谱指纹图谱用于中药质量控制的第一步,也是实现中药质量的安全、有效控制的前提条件。目前,美国食品药品监督管理局(FDA)、英国草药典、印

度草药典、德国药用植物学会、加拿大药用植物学会均接受指纹图谱的质量控制方法,这表明指纹图谱已成为国际公认的控制中成药、天然药物质量的最有效的方法^[4]。

中药药效及其毒性的物质基础是中药中组成复杂、相互协同或拮抗的各种化学成分,中药生物效用的发挥及毒性是中药多组分作用于机体的综合效应。因此要真正控制中药的质量还需要将化学物质基础研究与药效、毒性研究相结合,使得建立的标准色谱指纹图谱包括化学和药效(毒性)两方面的信息,并采用化学计量学方法寻找化学成分和药效(毒性)之间的相关关系,真正实现中药质量的可控、安全和有效。色谱指纹图谱的核心地位见下图:



1 指纹图谱研究中的色谱技术

以指纹图谱作为中药质量的控制方法已成为目前的国际共识。根据所用方法的不同将指纹图谱分为三类:色谱指纹图谱、光谱指纹图谱和 DNA 指纹图谱^[4]。光谱指纹图谱和 DNA 指纹图谱虽然也可用于中药材的鉴别,但由于它们均无法得到各化学成分的信息,信息量较小,且很难将指纹图谱、疗效(毒性)和有效成分三方面的研究结合起来,在中药质量控制中的应用具有一定的局限性。色谱具有很强的分离效能,且能够与多种检测器联用,可在实现色谱分离的同时分析获得各种波谱信息以实现物质的定性定量。目前,色谱已成为中药指纹图谱分析的主要手段,如能将多种分离模式结合,还可从不同角度探讨中药的化学组成及其与疗效的关系^[2,5,6]。中药的色谱分析主要有如下几种色谱模式:薄层色谱(TLC)、气相色谱(GC)、液相色谱(LC)、毛细管电泳(CE)、超临界流体色谱(SFC)等。薄层色谱(平面色谱)应用于中药鉴别的频率最高^[7],据统计《中国药典》2005 年版一部采用 TLC 法鉴别中药有 1 523 项。谢培山等^[8-10]早在 1987 年就采用高效薄层色谱法建立指纹图谱,对不同种属的人参药材进行鉴别,并考察了人参制剂的稳定性。目前,气相色谱法和液相色谱法是中药指纹图谱研究中应用最为广泛的两种色谱方法,二者互为补充。气相色谱适用于小分子、易挥发物质的分离分析,对于相

对分子质量大、挥发性低、不稳定和极性强的组分则需用液相色谱进行分析。中药挥发油是中药中一类具有较强生物活性的成分。气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)将气相色谱的高分离效能和质谱的高定性能力相结合,在中药挥发性成分的研究中得到了广泛的应用^[11-16]。液相色谱法具有高效、快速、灵敏、重现性好、应用范围广等特点,可分离分析中药中的生物碱、黄酮和各种苷类、有机酸和香豆素等化学成分^[17],在中药的质量控制(如有效成分的定性定量分析,杂质的限量检查和测定,稳定性考察等)及中药有效成分研究等方面都是重要的分析手段,目前已成为中药色谱指纹图谱研究的首选方法^[18-26]。毛细管电泳技术在中药材鉴别中的应用是近几年发展起来的,它具有高效、快速、分辨力强等特点,在中药质量标准制订方面的优势越来越明显,已成功应用于连翘^[27]、虎杖^[28]、大青叶^[29]等的指纹图谱研究。超临界流体色谱(SFC)由于分离效率高、分离速度快等优点,也已成为中药分析中气相色谱和液相色谱的重要补充。不断发展的 SFC 技术在中药有效成分的提取、分离、分析和制备等方面有巨大的发展潜力^[30]。

近年来联用色谱技术的发展,如气相色谱与质谱联用仪、二维气相色谱与质谱联用仪(GC-GC-MS)、液相色谱与紫外二极管阵列检测器联用仪(HPLC-DAD)、液相色谱与质谱联用仪(HPLC-MS)、毛细管电泳与紫外二极管阵列检测器联用仪(CE-DAD)、毛细管电泳与质谱联用仪(CE-MS)和液相色谱与核磁共振联用仪(HPLC-NMR)等为中药复杂体系的定性、定量分析带来了重大的变革^[31-35]。这些联用仪器集分离与分析技术于一身,它可将一个很复杂的分析体系分解成为多个相对简单的子体系,同时,由于波谱(包括质谱、红外光谱、紫外可见光谱和核磁共振谱)能提供大量的化学物质定性和结构信息,这就为中药复杂体系的快速且可靠的定性、定量、定结构分析提供了新的机遇。

罗国安等^[36]在多维联用仪器的基础上,提出了多维多息特征谱的概念。所谓多维,即采用多种分析仪器联用模式,如高效液相色谱-二极管阵列检测器-质谱-质谱联用方式,获得多维指纹图谱,包括色谱峰图、DAD 所得的紫外光谱图、一级质谱图(各个成分的质量)和二级质谱图(某成分的特征碎片)等。所谓多息,即特征峰应努力包括化学和药效两方面的信息。这种多维多息特征谱技术如能与数据库技术相结合,有望为中药的质量控制提供更加丰富和有用的信息。

2 中药色谱指纹图谱的信息提取

采用 LC-DAD-MS、GC-MS 等高通量、高灵敏度与高精度的现代分析技术获得的色谱指纹图谱, 包含有大量的、多维的信息, 带来的问题是如何处理这些“信息”, 即信息取舍和指纹特征提取的难度加大。它往往需要借助于化学计量学方法, 联合多种数据分析技术, 对多维、分散的数据进行总结、筛选和信息提取, 发现数据间的定性、定量关系, 解读数据中蕴藏的意义, 从而利用这些色谱指纹图谱对中药的质量进行控制。为此, 发展了多种数据前处理、重叠峰解析及复杂体系间比较分析的方法。

2.1 色谱指纹图谱保留时间的偏移校正

如果色谱实验条件控制严格, 同一中药样本的色谱指纹图谱的重复性应是相对稳定的。但是, 由于实验的时间、地点以及一些不可控实验因素的影响, 会在一定程度上导致色谱保留时间的偏移, 给中药色谱指纹图谱的识别与鉴定带来不便, 如不作必要的校准, 可能会导致分析结果不够准确, 甚至得到错误结论。对于一维色谱保留时间的漂移校正, 主要有两类方法。一类方法是通过加入一个(也可以是多个)内标或选择指标物质作为基准来对色谱峰的漂移进行校正。对于漂移特别严重的样品(在中药分析中比较常见), 这些方法很难得到比较好的结果^[37-39]。另一类方法是通过构造一个目标函数来描述样品色谱峰与目标色谱峰之间的相关性, 并通过对这个目标函数进行优化以达到对色谱峰漂移进行校正的目的。这类方法对于图谱相似程度高的样品之间的校正比较有效, 而对于那些相似程度不高的样品之间的校正则结果不理想^[40-41]。

由于联用色谱仪器在色谱分离过程中还记录了各流出组分的波谱信息, 这就为我们对中药色谱指纹图谱的识别与鉴定提供了成分的信息, 使得色谱指纹图谱保留时间偏移的校正更加容易且更加准确。对于这种二维或多维色谱漂移的校正, 最近有一些新的算法提出, 如 Radulovic 等^[42]2004 年提出的基于质谱信息(峰的质荷比)和保留时间对 LC-MS 图谱进行校正的方法, Tibshirani 等^[43]用分层聚类来对基质辅助或表面增强激光解吸附电离质谱(MALDI/SELDI)图谱进行校正的方法等。

2.2 光谱相关色谱法

基于相同的化学物质具有相同的光谱, 在大多数情况下, 同一样本的化学成分在同种类型的色谱柱上虽然保留时间不可能完全相同, 但是洗脱的顺序应基本一致, 李博岩等^[44-45]提出光谱相关色谱(SCC)的新概念。基于不同的两个色谱曲线(指纹

图谱), 通过对所有不同流出时间点的光谱进行相关计算, 可得到一条类似色谱的光谱相关系数曲线, 称之为光谱相关色谱。这种方法适合于不同指纹图谱间单组分的比较分析, 对于多组分重叠色谱峰, 该法却难以应用。在单组分光谱相关色谱的基础上, 基于正交投影理论, 胡芸等^[46-47]提出了多组分光谱相关色谱(MSCC)和新的正交投影判据, 使色谱指纹图谱中复杂多组分重叠色谱峰的比较分析成为可能。利用单组分光谱相关色谱法和多组分光谱相关色谱法, 在组分不完全清楚的条件下, 可以对不同种属、不同产地、不同炮制方法的药材的化学成分进行比较研究, 找到药材两两之间在化学组分上的异同。这两种方法已成功地应用于中药材的比较研究中, 如复方与单味药的对比研究^[48-49]、不同种属药材的鉴别^[50]、药材与其在血液中吸收的比较研究^[51]等。此外, 利用光谱相关色谱还可识别相同组分在不同色谱中的流出时间, 从而对色谱指纹图谱的保留时间漂移进行准确的校正。

2.3 色谱指纹图谱中重叠峰的解析

虽然目前的指纹图谱研究只要求得到药材特征的色谱指纹图谱轮廓谱, 不需要对所有的化学物质进行定性、定量分析, 但这只是中药色谱指纹图谱研究的初步要求。获取尽可能多的化学成分的定性、定量信息是我们今后中药机理研究、药效、毒性研究的基础, 是保证中药安全、有效的前提条件。中药中包含有几十、上百个化学成分, 在中药色谱指纹图谱研究中, 不可能使所有的化学成分达到基线分离, 由此产生了大量的重叠色谱峰体系。梁逸曾等^[14-52-54]采用多维联用分析技术结合化学计量学处理复杂体系的化学分析信息, 用多元分辨方法, 可对色谱峰的纯度进行可靠的快速检验, 而且还可对完全未知体系的严重重叠的色谱峰簇直接进行组分数估计和定量分辨, 建立了多组分体系定性定量解析方法, 使色谱指纹图谱中各谱峰的定性、定量全分析成为可能。

最近十几年提出了多种化学计量学分辨方法, 如: 渐进因子分析法(EFA)^[55-56]、直观推导式演进特征投影法(HELP)^[57-58]和子窗口因子分析法(SFA)^[59-60]等。这些方法已被广泛应用于实际体系中, 并成功地解决了许多实际问题。最近, 曾仲大等^[61]将 SFA 法与多组分光谱相关色谱法(MSCC)相结合, 提出了一种新的二维数据解析方法——交互移动窗口因子分析法(AMWFA)。这种方法使用移动窗口技术在不同体系间交互扫描, 可以最大限度地提取多个体系中的信息, 从而同时完成重叠色谱峰解析与复杂色谱指纹图谱体系之间的比较, 已成

为复杂数据体系研究的强有力工具^[62-64]。

3 中药色谱指纹图谱的评价

由于中药色谱指纹图谱是一种综合的、量化的色谱鉴定手段,借以鉴别真伪,评价原料药材、半成品和成品质量的均一性和稳定性,所以中药的色谱指纹图谱表达的是中药材的整体化学状况而不只是单个药理活性化合物的含量。这样,对它们的分析与传统的只对某一个化学组分的含量分析就有着本质上的区别,如采用数学语言进行描述,可以说,传统的、只针对某个化合物进行的含量分析是基于标量(scalar)数据的分析,而现在对中药的色谱指纹图谱的分析至少是对矢量(vector)数据的分析。

3.1 相似度评价方法

计算中药色谱指纹图谱的相似性,一般可从两个角度来进行。一种是直接采用完整的指纹图谱来计算指纹图谱的相似性。这样做的优点是可以直接体现指纹图谱整体性的特征,缺点是所用数据点多。另一种是只采用色谱峰高或峰面积,以局部代整体进行指纹图谱相似性计算。对于较简单的体系,采用完整色谱指纹图谱和相对峰面积来计算指纹图谱的相似度基本是一致的,而对于一些复杂的指纹图谱,即几个色谱峰重叠而且浓度分布有变化时,确实很难用相对色谱峰面积来表征哪个是共有峰(相同物质的色谱峰)或不是共有峰(不相同物质的色谱峰),但是如果采用完整色谱指纹图谱来表征和计算时,就不会出现这样的矛盾和麻烦。常用的相似度计算方法有两种:相关系数法和夹角余弦法。值得指出的是,相关系数法主要反映两矢量间的变化趋势并能尽量减少背景截距的影响;而夹角余弦法则主要反映两矢量间的夹角余弦值,表现了两矢量间的形状差异。两种方法不存在本质差异,都是矢量的内积运算。中南大学中药现代化研究中心编写的“计算机辅助相似度计算软件”能够快速准确地获得中药色谱指纹图谱的共有模式和各种相似度计算结果,已成功地应用于中药的质量评价^[65-67]。

3.2 化学模式识别分析方法

在色谱指纹图谱分析中,我们还常常碰到这样一个问题,即指纹图谱提取物的总体含量在相似度评价中如何体现。显然,无论是采用相关系数还是矢量夹角余弦来计算相似度对此均难以体现。因为在相似度的度量中,它们比较的只是色谱指纹图谱的整体相似,没考虑它们的“量”的不同。若采用化学模式识别的方法,对此给出适当评价是可能的。目前,有监督和无监督的模式识别方法均已被广泛应用于中药的质量控制领域^[68]。无监督的模式识

别方法用于从原始谱图信息或预处理后的信息中对样本进行归类,并采用相应的可视化技术直观地表达出来,如主成分分析(PCA)、非线性映射(NLM)、簇类分析(HCA)等^[69-73]。易伦朝等结合色谱指纹图谱和PCA法对橘皮整个生长期挥发油成分的变化足迹(见图1)和化学特征成分进行了细致研究,解决了陈皮、青皮药材采收时间难以确定,两者作为不同药材使用化学物质基础不清楚的问题,为“成对药材”的质量控制研究开辟了新的思路。有监督的模式识别方法用于建立类别间的数学模型,使各类样品间达到最大的分离,并利用建立的多参数模型对未知的样本进行预测。在这种方法中经常需要建立用来确认样品归类的训练集(Training set)和用来测试模型性能(防止过拟合)的测试集(Test set)。应用于该领域的主要是基于PCA、偏最小二乘(PLS)、神经网络(NN)的改进方法,常用的有软独立建模分类法(SIMCA)和偏最小二乘-判别分析法(PLS-DA)^[19,74]。作为非线性的模式识别方法,人工神经网络(ANN)技术也得到广泛应用^[75,76]。

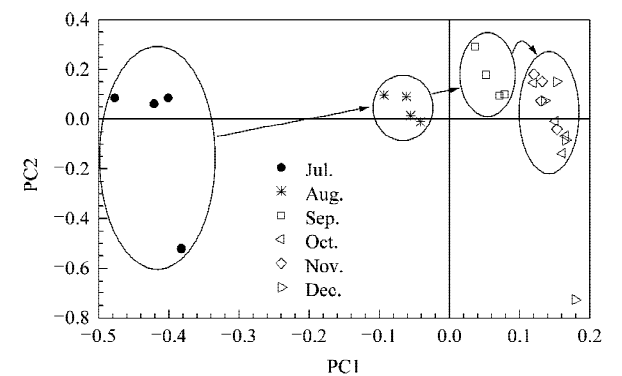


图 1 橘皮整个生长期挥发油成分的变化足迹
Fig. 1 Changes of footprints of volatile components in the tangerine peels during the growth process

4 中药质量的综合评价

中药发挥药效作用是其多组分以多靶点、多层次对机体代谢网络中某些环节作用的一个综合结果。对中药质量的评价和控制一定要真正反映其“内在”、“综合”的质量。指纹图谱的开发从一方面体现了中药质量研究向着全面、综合性发展的趋势。但是指纹图谱中所表达的化学成分在体内疾病治疗中是否有效,或对某些代谢网络系统是否有害,各成分间有何种量的关系,所有成分间是否存在协同或拮抗作用,其作用机制是什么等问题,仅用指纹图谱本身还不能解决^[77]。以基因组学、转录组学、蛋白组学和代谢组学为核心的系统生物学方法从整体的角度来研究有机体,为中药的研究开辟了新的思路

和方法。其中特别是代谢组学和蛋白组学,它们从整体上展示生物体内在的蛋白及代谢物的变化状态,能够获得生物体整体性和动态性的信息,从蛋白组学和代谢组学的视角来看待疾病过程,与中医的整体观和辨“证”论治思维方式不谋而合^[78-81]。期望将系统生物学与中药成分的整体性研究相结合,在中药药效物质组学研究的基础上,系统地研究其化学成分及其在体内的作用(或毒性)机制,建立指纹图谱与中药疗效之间的谱效学关系,实现对中药内在质量的综合评价和控制。最近,余雁等^[82]以代谢组学的研究方法,研究了中药尖萼耧斗菜的色谱指纹图谱和抗菌模式,利用 HPLC-DAD-ESI(电喷雾离子源)-MS 联用仪器获得药材的色谱指纹图谱以及药材提取物和 9 种已知抗菌模式的抗生素作用于金黄色葡萄球菌的代谢产物的多维色谱指纹图谱,并结合主成分分析法得到了尖萼耧斗菜可能的抗菌模式和特征的生物活性成分。此实验为我们提供了一种可能的将色谱指纹图谱与中药的作用机理研究结合起来以综合控制中药质量的研究思路。

我们认为以色谱指纹图谱为核心对中药质量进行综合评价主要应该包括以下内容:1)中药化学成分分析:应用先进的色谱技术,如 HPLC、GC、CE 等,联合多柱、多检测器,对中药的不同提取部位进行系统分析,利用色谱指纹图谱获取全面的化学成分特征信息;2)药效、毒性分析:引入“组学”研究策略,采用色谱及其联用技术,以色谱指纹图谱描述和表征中药对机体网络中疾病部分的恢复(药效)情况或对某些正常部分的损伤(毒性)情况;3)数据信息处理:以化学计量学、生物信息学等方法对大量的复杂信息进行整合、筛选,以提取特征信息、寻找“谱-效”关系;4)质量控制标准建立:最后建立包括中药各化学成分信息、毒性和药效、“谱-效”预测的全面综合反映中药质量且可操作性强的质量控制标准。

参考文献:

[1] Xie P S. China Journal of Chinese Materia Medica (谢培山. 中国中药杂志), 2001, 26(10): 653

[2] Xie P S. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology (谢培山. 中药新药与临床药理), 2001, 12(3): 141

[3] Xie P S. Chinese Pharmaceutical Information (谢培山. 中国医药情报), 2002, 8(1): 17

[4] Wang X Y. Chinese Traditional and Herbal Drugs (王夏炎. 中草药), 2004, 35(7): 6

[5] Huang X D, Kong L, Li X, et al. J Chromatogr B, 2004, 812: 71

[6] Drasar P, Moravcova J. J Chromatogr B, 2004, 812: 3

[7] Xie P S. World Science and Technology-Modernization of

Traditional Chinese Medicine (谢培山. 世界科学技术-中药现代化), 2001, 3(6): 28

[8] Xie P S, Yan Y Z. HRCCC, J High Resolut Chromatogr & Chromatogr Commun, 1987, 10: 607

[9] Xie P S, Chen S B, Liang Y Z, et al. J Chromatogr A, 2006, 1112(1/2): 171

[10] Xie P S, Yuan Y Z. J Planar Chromatogr-Mod TLC, 1988, 1(3): 258

[11] Lu H M, Liang Y Z, Chen S. J Ethnopharmacol, 2006, 105(3): 436

[12] Hang T J, Zhang Z X, Xiang B R, et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs (杭太俊, 张正行, 相秉仁, 等. 中草药), 2001, 32(9): 796

[13] Guo F Q, Liang Y Z, Huang L F, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (郭方道, 梁逸曾, 黄兰芳, 等. 高等学校化学学报), 2005, 26(11): 2 027

[14] Li X N, Cui H, Song Y Q, et al. Acta Pharmaceutica Sinica (李晓宁, 崔卉, 宋又群, 等. 药学报), 2001, 36(3): 215

[15] Wang Y, Wang J F, You H, et al. Chinese Pharmaceutical Journal (王炎, 王进福, 尤宏, 等. 中国药学杂志), 2001, 36(2): 91

[16] Guo F Q, Liang Y Z, Xu C J, et al. J Chromatogr A, 2003, 1016(1): 99

[17] Liu C L, Liu M C, Zhu P L. Chinese Journal of Analytical Chemistry (刘春丽, 刘满仓, 朱彭龄. 分析化学), 2000, 28(5): 631

[18] Wang S, Ma H Q, Sun Y J, et al. Talanta, 2007, 72(2): 434

[19] Yi L Z, Yuan D L, Liang Y Z, et al. Anal Chim Acta, 2007, 588(2): 207

[20] Chen J H, Xie M Y, Fu Z H, et al. Microchem J, 2007, 85(2): 201

[21] Chen Y, Fan G R, Zhang Q Y, et al. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(3): 926

[22] Liu A H, Lin Y H, Yang M, et al. J Chromatogr B, 2007, 846(1/2): 32

[23] Liu C Z, Zhou H Y, Yan Q. Anal Chim Acta, 2007, 582(1): 61

[24] Cai M, Zhou Y, Gesang S L, et al. J Chromatogr B, 2006, 844(2): 301

[25] Jin W, Ge R L, Wei Q J, et al. J Chromatogr A, 2006, 1132(1/2): 320

[26] Yi L Z, Xie P S, Liang Y Z, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (易伦朝, 谢培山, 梁逸曾, 等. 药物分析杂志), 2006, 26(7): 918

[27] Sun G X, Mu S X, Hou Z F, et al. Chinese Journal of Chromatography (孙国祥, 慕善学, 侯志飞, 等. 色谱), 2006, 24(2): 196

[28] Huang S, Zhang G Q, Lou Z Y, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (黄晟, 张国庆, 娄子洋, 等. 药物分析杂志), 2006, 26(1): 24

[29] Sun G X, Mu S X, Hou Z F, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (孙国祥, 慕善学, 侯志飞, 等. 分析化学), 2005, 33(6): 853

[30] Yan J Z, Tong S Q, Jin J. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (颜继忠, 董胜强, 金洁. 时珍国医国药), 2004, 15(3): 179

[31] Qiu Y Q, Lu X, Pang T, et al. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(5): 1 721

[32] Wang P, Liang Y Z, Zhou N, et al. Rapid Commun Mass

Spectrom, 2007, 21 : 99

[33] Drasar P, Moravcova J. J Chromatogr B, 2004, 812(1/2) : 3

[34] Chen Y R, Wen K C, Her G R. J Chromatogr A, 2000, 866 (2) : 273

[35] Zschocke S, Klaiber I, Bauer R, et al. Molecular Diversity, 2005, 9(1/3) : 33

[36] Luo G A, Wang Y M, Cao J. Chinese Traditional Patent Medicine (罗国安, 王义明, 曹进. 中成药), 2000, 22(6) : 395

[37] Pino J A, McMurry J E, Jurs P C, et al. Anal Chem, 1985, 57 : 295

[38] Parrish M E, Good B W, Hsu F S, et al. Anal Chem, 1981, 53 : 826

[39] Johnson K J, Wright B W, Jarman K H, et al. J Chromatogr A, 2003, 996(1/2) : 141

[40] Nielsen N P V, Carstensen J M, Smedsgarrd J. J Chromatogr A, 1998, 805(1/2) : 17

[41] Malmquist G, Danielsson R. J Chromatogr A, 1994, 687 (1) : 71

[42] Radulovic D, Jelveh S, Ryu S, et al. Mol Cell Proteomics, 2004, 3 : 984

[43] Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, et al. Bioinformatics, 2004, 20 : 3 034

[44] Li B Y, Liang Y Z, Xie P S, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (李博岩, 梁逸曾, 谢培山, 等. 分析化学), 2003, 31(7) : 799

[45] Li B Y, Hu Y, Liang Y Z, et al. J Sep Sci, 2004, 27(7/8) : 581

[46] Hu Y, Liang Y Z, Li B Y, et al. J Agric Food Chem, 2004, 52(26) : 7 771

[47] Hu Y, Liang Y Z, Li B Y, et al. Acta Chimica Sinica (胡芸, 梁逸曾, 李博岩, 等. 化学学报), 2003, 61(9) : 1 466

[48] Wang Y L, Liang Y Z, Hu Y, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (王亚丽, 梁逸曾, 胡芸, 等. 高等学校化学学报), 2006, 27(2) : 222

[49] Wang Y L, Liang Y Z, Li B Y, et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs (王亚丽, 梁逸曾, 李博岩, 等. 中草药), 2005, 36(10) : 1 457

[50] Zhou Z F, Liang Y Z, Li B Y, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (周枝凤, 梁逸曾, 李博岩, 等. 分析化学), 2004, 32(5) : 561

[51] Wang Y L, Liang Y Z, Hu Y, et al. Chemom Intell Lab Syst, 2006, 82(1/2) : 229

[52] Gong F, Liang Y Z, Song Y Q, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (龚范, 梁逸曾, 宋又群, 等. 高等学校化学学报), 2001, 22(9) : 1 481

[53] Li X N, Cui H, Song Y Q, et al. Phytochem Anal, 2003, 14 (1) : 23

[54] Gong F, Liang Y Z, Chau F T. J Sep Sci, 2003, 26 : 112

[55] Maeder M. Anal Chem, 1987, 59 : 527

[56] Maeder M, Zilian A. Chemom Intell Lab Syst, 1988, 3(3) : 205

[57] Kvalheim O M, Liang Y Z. Anal Chem, 1992, 64 : 936

[58] Liang Y Z, Kvalheim O M, Keller H R, et al. Anal Chem, 1992, 64 : 946

[59] Manne R, Shen H L, Liang Y Z. Chemom Intell Lab Syst, 1999, 45 : 171

[60] Zhao C X, Li X N, Liang Y Z, et al. Chemom Intell Lab Syst, 2006, 82 : 218

[61] Zeng Z D, Liang Y Z, Wang Y L, et al. J Chromatogr A, 2006, 1 107(1/2) : 273

[62] Yi L Z, Liang Y Z, Zeng Z D, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (易伦朝, 梁逸曾, 曾仲大, 等. 高等学校化学学报), 2006, 27(11) : 2 052

[63] Yi L Z, Liang Y Z, Zeng Z D, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (易伦朝, 梁逸曾, 曾仲大, 等. 高等学校化学学报), 2006, 27(9) : 1 626

[64] Zeng Y X, Zhao C X, Liang Y Z, et al. Anal Chim Acta, 2007, 595 : 328

[65] Gong F, Liang Y Z, Xie P S, et al. J Chromatogr A, 2003, 1 002 : 25

[66] Gong F, Liang Y Z, Fung Y S, et al. J Chromatogr A, 2004, 1 029 : 173

[67] Liang Y Z, Xie P S, Chan K. J Chromatogr B, 2004, 812 (1/2) : 53

[68] Zhao Y X, Li M L. China Journal of Chinese Materia Medica (赵宇新, 李曼玲. 中国中药杂志), 2002, 27(11) : 808

[69] Yi L Z, Xie P S, Liang Y Z, et al. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology (易伦朝, 谢培山, 梁逸曾, 等. 中药新药与临床药理), 2004, 15(6) : 403

[70] Zhang L, Ma R L, Xu J, et al. Journal of China Pharmaceutical University (张亮, 马仁玲, 徐娟, 等. 中国药科大学学报), 1996, 27(2) : 91

[71] Lu G H, Chan K, Liang Y Z, et al. J Chromatogr A, 2005, 1 073 : 383

[72] Yan S K, Xin W F, Luo G A, et al. J Chromatogr A, 2005, 1 090(1/2) : 90

[73] Wang L, Wang L X, Xiao H B, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (王莉, 王龙星, 肖红斌, 等. 中国中药杂志), 2007, 32(6) : 536

[74] Gong F, Wang B T, Chau F T, et al. Anal Lett, 2005, 38 (14) : 2 475

[75] Cai Y D, Gong J W. Chinese Traditional and Herbal Drugs (蔡煜东, 宫家文. 中草药), 1994, 25(4) : 187

[76] Tang D, Li W, Xu Y, et al. Journal of Chinese Medicinal Materials (汤丹, 李薇, 许毅, 等. 中药材), 2004, 27(7) : 534

[77] Li F M, Xiong Z L, Lu X M, et al. Chinese Journal of Chromatography (李发美, 熊志立, 鹿秀梅, 等. 色谱), 2006, 24(6) : 537

[78] Jia W, Jiang J, Liu P, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (贾伟, 蒋健, 刘平, 等. 中国中药杂志), 2006, 31(8) : 621

[79] Shen Y D, Fei G Q, Zhang Y. Fine Chemicals (沈一丁, 费贵强, 张宇. 精细化工), 2005, 22(6) : 444

[80] Kell D B. Drug Discov Today, 2006, 11(23/24) : 1 085

[81] Fiehn O. Plant Mol Biol, 2002, 48 : 155

[82] Yu Y, Yi Z B, Liang Y Z. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17 : 1 855