

## · 综述 ·

## 活性整合指纹图谱技术在中药研究中的应用

马文芳, 常艳旭\*

天津中医药大学 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193

**摘要:** 中药活性整合指纹图谱技术把化学分析与药理活性评价进行了有效地结合, 适合于中药活性成分的筛选, 可阐释中医药多成分、多靶点的作用特点。近年来活性整合指纹图谱技术在中医药研究中受到高度重视, 并得到广泛的应用。简要综述了常见的几种活性整合指纹图谱技术在中药活性成分筛选方面的研究进展, 并探讨中药活性整合指纹图谱技术在其发展过程中存在的问题及对策, 为其进一步广泛应用提供科学依据。

**关键词:** 活性整合指纹图谱; 脂质体色谱; 细胞膜色谱; 分子生物膜色谱; 中药

**中图分类号:** R284      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0253-2670(2014)11-1637-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.11.026

## Application of activity-integrated fingerprint in research of Chinese materia medica

MA Wen-fang, CHANG Yan-xu

Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Key words:** activity-integrated fingerprint; liposome chromatography; cell membrane chromatography; molecular biological membrane chromatography; Chinese materia medica

中药指纹图谱作为一种分析方法, 能全面、综合地反映中药所含成分及相对关系, 能较好地体现中药成分的复杂性, 但却不能很好地表征药物所含成分与药理作用之间的关系。中药活性整合指纹图谱是能同时表征中药化学成分信息和药效(活性)信息的指纹图谱技术。在指纹图谱的基础上建立各成分与药效之间的联系, 不是简单的成分谱, 而是能更好地表征药物成分对药理作用的贡献<sup>[1-2]</sup>, 把成分谱与药效谱相结合, 集化学研究和药理研究于一体, 使中药指纹图谱技术更加科学, 更具有针对性。近年来, 活性整合指纹图谱技术在中医药研究中得到快速的发展和广泛的应用, 可用于快速筛选中药活性成分、评价有效成分的活性贡献率和阐释中药作用机制等, 对中医药现代化研究具有较大的推动作用。本文针对活性整合指纹图谱技术的发展历程、在中医药研究中的应用及其面临的问题和发展前景

进行概述, 为活性整合指纹图谱技术进一步开发利用提供科学依据。

### 1 中药色谱指纹图谱技术

中药化学成分种类繁多, 由成千上百种化合物组成, 它们各自发挥不同或相同的药理作用, 在疾病治疗过程中起着协同作用, 因此测定少数几种有效成分或指标成分, 尚不能系统、完整地反映中药内在质量。目前, 指纹图谱已成为国内外公认的鉴别中药品种和评价中药质量的有效手段<sup>[3]</sup>。中药指纹图谱是一种综合的、可量化的鉴别模式, 能有效地检测和控制中药产品的真实性、质量的一致性及稳定性。中药指纹图谱包括色谱指纹图谱和生物指纹图谱, 其中生物指纹图谱可用于中药材基原真伪鉴别, 然而不能反映中药的整体化学特征及药材质量; 色谱指纹图谱主要利用光谱或色谱等现代分析技术得到中药样品中化学成分的质和量的特征, 所

收稿日期: 2014-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81374050, 81001632); 天津市高等学校创新团队培养计划资助

作者简介: 马文芳(1988—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药药效物质基础研究。Tel: 15202206352 E-mail: mawenfang812@126.com

\*通信作者 常艳旭(1981—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质基础研究。

Tel/Fax: (022)59596163 E-mail: tcmeyx@126.com

表征均是化学信息,不能反映药物的有效性。罗国安等<sup>[4]</sup>指出确定指纹图谱中微量和未知的活性成分,解决化学成分和药效的相关性,建立一个高水平的中成药质量标准,并采用多维多息特征谱和有效部分的概念来尝试解决这个问题。2004年,美国FDA颁布的《植物药生产指南》也指出,在活性化学成分未知或不能定量时,如有可能应该进行生物活性测定。因此,建立中药指纹图谱与药效信息的相关性成为了中药质量控制与评价的一个研究热点。

## 2 中药活性指纹图谱

近年来,有些学者首先建立中药色谱指纹图谱,然后进行整个样品的药效活性测定,并利用化学计量学的方法,建立有效成分与活性的联系,进行质量控制,并取得了令人满意的成果<sup>[5]</sup>。周立艳等<sup>[6]</sup>找出了与药效呈正相关的色谱峰并制定出能代表牡丹皮有效性的HPLC指纹图谱。顾英等<sup>[7]</sup>研究了芍药-甘草效应组分血清指纹图谱与药效的相关性。上述探索研究为探讨复杂中药的药效物质基础及质量控制提供了有意义的尝试,但这种模式主要是对药材整体、有效部位的活性测定,很难快速明确中药中各有效成分的活性贡献率,原因在于需要对中药进行系统分离得到单体化学成分,再运用药理学的方法测定活性,具有周期长、成本高、工作量大等缺点,并且有时在分离与纯化过程中由于降解和稀释等原因会导致活性成分的丢失;同时中药本身化学成分复杂,由成千上万种各类型化合物组成,给中药质量控制带来了极大挑战。

## 3 中药活性整合指纹图谱技术

鉴于传统分离分析技术的局限性,在线活性测定技术有望为复杂中药质量评价提供新方法。建立色谱分离与活性在线检测联用分析技术,可更直观地反映中药有效成分与药效之间的相关性。通过活性测定与指纹图谱相结合,进行中药质量控制,使指纹图谱技术朝着活性(疗效)整合指纹图谱发展。

目前,活性整合指纹技术基本可以分为2类:一是基于化学反应的活性整合指纹技术,一是基于生物反应的活性整合指纹技术。前者主要是依据有效成分与某些化学试剂之间的反应直接或间接表征药物或化合物活性大小;后者则是利用特定的药物作用生物靶标,通过药物与靶标作用,直接、全面地反映药物的活性成分及其活性大小,阐释药物的作用机制。

### 3.1 基于化学反应的活性整合指纹图谱技术

中药样品经过一定的色谱分离技术,使不同化学成分间具有良好的分离度,通过在线的柱后反应或者离线活性反应,比较反应前后同一成分色谱峰面积的变化,确定中药药效成分。有学者采用毛细管电泳-间接化学发光联用技术,建立了黄芪的抗氧化药效指纹图谱<sup>[8]</sup>;用高效液相色谱分离-柱后固定化酶反应器酶解-电化学检测器的方法,通过检测酶解的最终产物 $H_2O_2$ ,进而分析麻醉和自由活动大鼠脑微透析液中乙酰胆碱和胆碱的量<sup>[9]</sup>。在线HPLC-DAD-DPPH目前已普遍用于中药抗氧化剂的筛选,已经成为一种活性快速筛选的工具<sup>[10-13]</sup>,并成功地实现了天然抗氧化剂的高通筛选。

基于化学反应的活性整合指纹图谱技术,通过离线或在线活性检测,对中药所含的化学成分进行活性评价,实现了中药谱-效关系有机结合,从整体上对中药材的质量进行评价。目前该技术在抗氧化活性评价中的应用比较成熟,实现了天然抗氧化剂的高通量筛选,但其筛选过程是一种体外化学反应过程,不能全面反映中药成分在体内的复杂反应,也没有考虑到活性成分在体内能否被吸收,能否透过细胞膜等生理因素的影响,某些体外无效的成分,在体内的代谢产物可能存在活性以及各成分间的协同、拮抗等相互作用的影响。

### 3.2 基于生物反应的活性整合指纹图谱技术

目前,比较成熟的基于生物反应活性整合指纹图谱技术有固定化脂质体色谱技术、细胞膜色谱技术和分子生物膜色谱技术。

**3.2.1 固定化脂质体色谱技术** 脂质体具有与生物膜相似的脂双层结构和膜流动性,由天然磷脂或磷脂类似物在水中自发形成,可通过改变温度、pH值和离子强度等因素调节其物理性能而精确地模拟生物膜的化学环境。因脂质体与细胞膜结构和功能具有相似性,作为模拟生物膜模型已经被广泛应用。1966年,Bobinski等<sup>[14]</sup>就将红细胞膜微球固定在凝胶球上作为色谱固定相,研究D-葡萄糖和L-葡萄糖在细胞膜上的保留行为。之后几十年来,生物膜色谱技术有了很大的发展,色谱固定相材料的种类、模拟生物膜的固定化方法和固定化脂质体色谱技术的应用范围等方面都有了比较深入的研究。固定化脂质体色谱柱就是将天然磷脂或磷脂类似物通过超声法、微晶沉积法、注射法等嵌入到葡萄糖凝胶或琼脂糖凝胶等软凝胶微球基质或多孔硅胶基质中,形

成固定化脂质体。固定化的脂质体作为填料填入色谱柱中即得固定化脂质体色谱柱。

固定化脂质体色谱技术主要用于溶质与脂质膜的相互作用研究。因脂质体结构与生物膜相似, 可用来研究生物膜与不同性质溶质分子相互作用和评价药物本身油水分配系数<sup>[15]</sup>、药物透膜吸收和转运等过程<sup>[16-17]</sup>。毛希琴等<sup>[18-20]</sup>通过将磷脂涂覆到硅胶表面, 模拟生物膜固定相, 成功建立了用于预测药物小肠吸收的模型。陈丙銮等<sup>[21]</sup>和毛希琴<sup>[22]</sup>分别利用该模型成功评价了中药复方二至丸中活性成分槲皮素、芹菜素和甘露醇、聚乙二醇、水杨酸、华法令、氢化可的松、皮质酮在小肠的吸收情况。

为了克服固定化脂质体色谱柱自身分离效果较差的缺点, 将其与 MS 等具有高分辨率和高灵敏度的仪器联用, 快速地筛选与定性鉴别中药活性成分, 为中药复方的药效物质基础及质量控制等研究提供新手段。丹参提取液分别与脂质体膜、红细胞膜和心肌细胞膜在一定条件下孵育共培养, 经离心、洗涤等过程除去吸附在表面的游离成分, 经过 LC-MS 分析可知有 12 个透膜成分; 丹参提取液与脂质体膜和红细胞膜的作用结果存在一致性; 隐丹参酮和丹参酮 II<sub>A</sub> 可与心肌细胞作用发挥药理作用<sup>[23]</sup>。通过脂质体色谱柱和反相色谱柱联用二维色谱技术, 对中药龙胆泻肝方中活性成分进行了快速筛选, 样品经过反相色谱柱和脂质体色谱柱, 通过 8 通阀的分流, 实现一部分进入部分收集器, 一部分在泵的作用下进入 LC-MS 系统进一步分离分析, 发现 50 多种成分在脂质体色谱柱上保留, 并鉴定得到 8 个黄酮类化合物和 2 个环烯醚萜类化合物可被细胞膜吸收<sup>[24]</sup>。有研究者利用脂质体二维色谱技术, 对五味子提取液中可透过细胞膜活性成分进行筛选, 鉴定了 14 种活性成分可透过细胞膜, 为不同产地五味子的质量控制指标选择提供了依据<sup>[25]</sup>。

固定化脂质体色谱技术虽能较好地反映生物膜的特性, 快速筛选出具有透膜能力的生物活性成分, 但制备的固定相的稳定性、重复性和再生性较难保证, 方法的专属性差, 透膜成分作用的特异性不强。因此, 如何通过改变固定相载体材料、减少制备过程中有机试剂的应用, 以制备出更接近人体生物膜结构和环境的固定相是固定化脂质体色谱技术面临的问题。

**3.2.2 细胞膜色谱技术** 细胞膜色谱 (cell membrane chromatography, CMC) 技术是将人或动物的活性

组织的细胞膜固定在特定的载体表面, 制备成细胞膜固定相, 利用色谱分离技术来研究药物或化合物与固定相上细胞膜或膜上受体相互作用的现代活性整合分析技术<sup>[26-28]</sup>。细胞生物学研究发现细胞膜上存在多种受体、离子通道、酶等作用靶点, 并且其种类也会随细胞的不同而有差异。药物透过细胞膜进入细胞内, 与相应的受体结合, 激活离子通道或特定的通路, 进而发挥生物效应。在细胞膜色谱柱上被分析中药化学成分如果与细胞膜受体存在特异性结合, 则其在细胞膜色谱柱中的色谱行为就会有所变化, 通过灵敏的仪器检测, 可快速地筛选出中药有效成分, 同时消除无效成分的干扰<sup>[29]</sup>。色谱参数因与药物的药理作用有一定相关性, 可动态地反映药物与膜受体作用特异性。细胞膜色谱柱既有细胞膜活性, 又有一定的色谱分离能力, 可快速高效地对中药活性成分进行筛选, 已逐渐成为中药药效物质基础研究的重要手段。

利用吸附法将细胞膜固定在硅胶载体表面, 制作固定相填料制备细胞膜色谱柱。细胞膜色谱柱不破坏细胞膜的整体性, 也不破坏受体结构的完整性, 保持周围环境的一致性和酶活性的完好性, 主要用于研究中药成分与膜受体间作用。有学者选用人表皮鳞状癌 A<sub>431</sub> 细胞和能表达表皮生长因子受体 HEK293 为靶细胞, 制作细胞膜色谱柱, 并结合高效液相色谱-质谱联用技术, 对苦参和独活中的表皮生长因子受体的配体成分进行了筛选<sup>[30-31]</sup>。有学者以牙周韧带细胞膜色谱柱为模型, 对黄连中具有成骨活性的部位与成分进行筛选, 发现小檗碱和对照药斯伐他汀都能促进牙周韧带细胞的生长; 小檗碱通过增强碱性磷酸酶的活性来增加人牙周韧带细胞的成骨活性, 在一定浓度范围内小檗碱还能加快矿化小结的形成<sup>[32]</sup>。有研究者以鼠胸主动脉平滑肌细胞为固定相制备细胞膜色谱柱, 结合 GC-MS 联用技术对白芷、羌活、北沙参、独活的 CO<sub>2</sub> 超临界萃取液进行鉴别、分离和定性研究, 发现欧前胡素和蛇床子素是其主要的活性成分<sup>[33]</sup>。用 CMC-GC/MS 分析筛选川芎中具有扩血管作用的活性成分, 发现川芎内酯和丁烯基酯内酯具有扩血管作用, 能明显抑制去甲肾上腺素和 CaCl<sub>2</sub> 诱导的缩血管作用, 并与体外药理实验结果一致<sup>[34]</sup>。

利用具有特定效应靶器官的细胞, 在一定条件下处理获得相应的细胞膜结构, 在适宜条件下与中药提取液共培养, 使化学成分与细胞膜进行特异性结合,

再经离心、洗涤、变性等处理后进样分析筛选可能的结合成分。经多次洗涤与药物作用后的细胞膜,可以排除大量非结合成分的干扰。有学者利用细胞膜萃取法分别对当归、冬虫夏草以及中药复方当归补血方中的活性成分进行了研究<sup>[35-37]</sup>,取得了满意的结果。此外,随着基因克隆和转染技术的发展,可以获得细胞膜高表达某一受体的细胞株。根据受体、配体特异性结合原理,特定的细胞膜色谱柱还可与特定亚型受体对相应配体结合能力的强弱进行筛选<sup>[38-39]</sup>,或对一些人工合成的化学成分进行活性筛选<sup>[40]</sup>,提高了细胞膜色谱的精确性和灵敏性。

细胞膜色谱技术通过有效地结合药理和分析技术,增强了活性成分筛选的靶向性,可直接从中药的提取液中筛选出活性成分,与传统的分离和分析方法相比,筛选时间明显缩短,工作量明显降低。细胞膜色谱柱存在固定相制备困难、保存时间短、分离能力差、实验的重现性和精密度得不到保证等缺点,难以实现商业化生产。同时,色谱柱中细胞不能正常存活,也不能完全的模拟体内环境,所以无法排除非特异性结合成分的干扰。基于受体学说的细胞膜色谱技术只能筛选有明确作用靶点的成分。尽管该技术可以证明某成分具有活性,却不能对该成分发挥作用的机制进行说明,从而使细胞膜色谱技术的发展受到一定的限制<sup>[20]</sup>。

**3.2.3 分子生物色谱法** 分子生物色谱是基于分子特异性识别原理逐渐发展起来的一种以生物大分子为固定相配基的液相色谱技术<sup>[27]</sup>。它可从复杂混合物中快速筛选具有生物活性的化合物和测定相关的生物活性参数。酶、受体、抗体、传输蛋白、DNA、肝微粒体和其他具有重要生理功能的生物大分子均可作为分子生物色谱的配基,使分子生物色谱筛选活性成分应用范围越来越广和靶向性越来越强<sup>[28]</sup>。

分子生物膜色谱法与 LC-MS 等技术联用,可建立一种融色谱分离、靶标活性筛选和结构鉴定的高效的中药活性筛选平台。王雪艳<sup>[41]</sup>以  $\alpha_1A$ -肾上腺素受体 ( $\alpha_1A$ -adrenoceptor,  $\alpha_1A$ -AR) 为配基,建立了一种  $\alpha_1A$ -肾上腺素配体在线筛选的分子生物色谱法,确定了羟基红花黄色素是红花中与  $\alpha_1A$ -AR 有特异性结合的活性成分。有学者认为三维细胞培养可真实地模拟体内细胞生长的三维微环境,进行药物筛选更有效,并建立了三维细胞反应器,并结合 HPLC-MS 技术,从中药中筛选抗癌活性成分<sup>[42]</sup>。国外有学者选择了氯氮平和 3 种选择性地结合人类

组胺 H4 受体先导化合物喹啉林类 VUF10148 以及氮磺酰喹恶林类 VUF10519 和 VUF11488,建立了一个对人类组胺 H4 受体结合活性的先导化合物的代谢物活性筛选的代谢指纹图谱筛选平台<sup>[43]</sup>。Giera 等<sup>[44]</sup>将百端木样品经液相分离后,流出液按 1:9 的比例分别进入 QTOF-MS 和 1536 孔板,样品在进入 1536 孔板前与蛋白激酶和底物混匀,对百端木中蛋白激酶抑制剂活性成分进行了筛选,建立了样品的微分离、定性以及生物活性一体分析方法,保证了样品活性峰与样品色谱峰间的对应关系,基本能够实现每个色谱峰生物活性的表征。毛希琴等<sup>[45]</sup>提出了基于 RP-HPLC、固定化脂质体色谱、固定化载体蛋白色谱 3 种色谱模式联用筛选既有细胞膜的穿透能力,又有与载体蛋白的结合能力的生物活性成分的分析方法,并成功用于川芎甲醇提取液活性成分快速筛选研究。

分子生物色谱以生物大分子为固定相,活性成分可与其发生特异性结合,有效避免了非活性成分的干扰,同时能保持生物大分子活性不变,具有良好的重复性。分子生物色谱具有测量精度高,数据变异系数小,不需要进行样品预处理,可对提取液直接进样和分析时间短等特点。通过药物成分在色谱柱上保留行为与其生理活性密切相关,可用于筛选生物活性成分。分子生物色谱作为一种体外活性筛选技术,具有模拟体内环境不完全、制备固定相困难、使用色谱柱寿命短和处理量小等亟待解决的问题<sup>[46]</sup>。

#### 4 前景展望

在中药活性成分筛选方面,活性整合指纹技术具有很大的发展空间和良好的发展前景。从脂质体色谱、细胞膜色谱到分子生物色谱,活性整合指纹技术朝着具体某一特定作用靶点方向发展,使药物筛选的靶向性和目的性增强、筛选周期缩短、时效性加强。目前,活性整合指纹技术在中药研究领域应用和推广存在诸多问题,有待于进一步研究,如活性整合指纹技术只用于复杂体系中原型活性成分筛选、忽视了对其体内代谢产物筛选;注重了单个成分谱效关系研究,忽略了中药多成分间的相互作用;药物活性评价靶标越来越具体,忽视了药物通过靶标之间相互影响而发挥作用;药物与靶点间的相互作用,存在非特异性作用带来的干扰;仅局限于部分靶分子和靶细胞成分筛选,应用范围有待于扩大。

实现生物色谱与 MS 等高分辨率和高灵敏度仪器联用, 解决生物色谱柱的使用寿命短、分离效力低、柱内保留成分的量少, 后续检测的难度大等问题; 实现生物色谱柱的商业化, 保证实验良好的重复性, 减小体外模拟条件与体内环境的差别, 更好地反映体内过程; 实现活性整合指纹技术在药物间相互作用, 药物与多靶点间的作用关系, 同分异构体的作用差异等领域的研究应用, 将是未来的发展趋势。相信随着中医药研究工作者们的不断努力, 活性整合指纹图谱将不断完善和成熟, 进一步推动中医药现代化进程。

参考文献

[1] Kong W J, Zhao Y L, Xiao X H, *et al.* Spectrum-Effect Relationships between ultra performance liquid chromatography fingerprints and anti-bacterial activities of rhizome cupids [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 634(2): 279-285.

[2] 罗志江, 徐彦, 吴建英, 等. 虎杖指纹图谱及其抗氧化活性的“谱-效”关系研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2012, 34(1): 138-142.

[3] Jiang Y, David B, Tu P F, *et al.* Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines—A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 657(1): 9-18.

[4] 罗国安, 王义明, 曹进. 多维多息特征谱及其在应用 [J]. 中成药, 2000, 22(6): 395-397.

[5] 姚卫峰, 胡育筑, 牟玲丽, 等. 基于最小二乘支持向量机的色谱指纹图谱预测银杏叶总抗氧化活性 [J]. 分析化学, 2009, 37(3): 383-388.

[6] 周立艳, 梁生旺, 王淑美, 等. 牡丹皮高效液相色谱“药效指纹图谱”研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(6): 1337-1339.

[7] 顾英, 冯怡, 徐德生. 芍药甘草效应组分血清指纹图谱与药效的相关性研究 [J]. 中成药, 2008, 30(1): 6-10.

[8] 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 [J]. 分析化学, 2008, 36(12): 1646-1650.

[9] 叶惟冷, 马晓峰, 梅镇彤. 高效液相色谱-柱后固定化酶反应器-电化学检测法分析大鼠脑微透析液中的乙酰胆碱和胆碱 [J]. 色谱, 1998, 16(5): 375-378.

[10] 常艳旭, 朱子微, 李晋, 等. 补骨脂抗氧化活性指纹图谱研究 [J]. 天津中医药, 2011, 28(2): 158-160.

[11] Chang Y X, Ding X P, Qi J, *et al.* The antioxidant activity-integrated fingerprint: An advantageous tool for evaluation of quality of herbal medicines [J]. *J*

*Chromatogr A*, 2008, 1208(1/2): 76-82.

[12] Chang Y X, Yan D M, Chen L L, *et al.* Potency fingerprint of herbal products Danshen injection for their quality evaluation [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(6): 586-590.

[13] Ding X P, Qi J, Chang Y X, *et al.* 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]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(16): 2204-2210.

[14] Bobinski H, Stein W D. Isolation of a glucose-binding component from human erythrocyte membranes [J]. *Nature*, 1966, 211(5056): 1366-1368.

[15] Liu X L, Fan P, Chen M, *et al.* Drug-membrane interaction on immobilized liposome chromatography compared to immobilized artificial membrane (IAM), liposome/water, and octan-1-ol/water systems [J]. *Helv Chim Acta*, 2010, 93(2): 203-211.

[16] 丁岗, 董自波, 李智立, 等. 生物色谱法及其在药物研究中的应用 [J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(4): 92-95.

[17] Boija E, Lundquist A, Martinez-Pla J J, *et al.* Effects of ions and detergents in drug partition chromatography on liposomes [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1030(1/2): 273-278.

[18] 毛希琴, 孔亮, 汪海林, 等. 生物膜色谱及其在药物活性成分分析中的应用 [J]. 分析化学, 2002, 30(2): 231-236.

[19] 毛希琴, 邹汉法, 罗权舟, 等. 卵磷脂涂敷生物膜色谱固定相的制备及其稳定性的考察 [J]. 色谱, 2001, 19(5): 433-435.

[20] 毛希琴, 邹汉法, 罗权舟, 等. 模拟生物膜色谱用于预测药物的小肠吸收 [J]. 分析化学, 2001, 29(10): 1136-1139.

[21] 陈丙奎, 盛亮洪, 李萍, 等. 固定化脂质体色谱研究二至丸及其组成药物的经肠吸收成分 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(7): 776-779.

[22] 毛希琴. 固定化脂质体色谱固定相的制备及其在应用 [D]. 大连: 中国科学院研究生院, 2002.

[23] Chen X P, Deng Y C, Xue Y, *et al.* Screening of bioactive compounds in *Radix Salviae Miltiorrhizae* with liposomes and cell membranes using HPLC [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 70: 194-201.

[24] Wang Y, Kong L, Lei X Y, *et al.* Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography system with immobilized liposome chromatography column and reversed-phase column for separation of complex traditional Chinese medicine Longdan Xiegan

- Decoction [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2185-2191.
- [25] Wang S W, Wang C, Zhao X, *et al.* Comprehensive two-dimensional high performance liquid chromatography system with immobilized liposome chromatography column and monolithic column for separation of the traditional Chinese medicine *Schisandra chinensis* [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 713: 121-129.
- [26] 王丽莉, 张铁军. 细胞膜色谱法及其在中药活性成分研究中的应用 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(2): 110-114.
- [27] 方艺霖, 张 艺, 肖小河, 等. 细胞膜色谱技术用于中药活性成分筛选的研究进展 [J]. *中草药*, 2008, 39(7): 附3-附5.
- [28] 陈媛媛, 郭 姣. 细胞膜色谱技术在中药活性成分筛选中的应用进展 [J]. *中草药*, 2012, 43(7): 383-387.
- [29] 汪海林, 邹汉法, 孔 亮, 等. 分子生物色谱用于中药活性成分筛选及质量控制方法的研究 [J]. *色谱*, 1999, 17(2): 123-127.
- [30] Wang S C, Sun M, Zhang Y M, *et al.* A new A 431/cell membrane chromatography and online high performance liquid chromatography/mass spectrometry method for screening epidermal growth factor receptor antagonists from *Radix Sophorae Flavescens* [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 12(17): 5246-5225.
- [31] Wang S C, Sun M, Zhang Y M, *et al.* EGFR/cell membrane chromatography-online-high performance liquid chromatography/mass spectrometry method for screening EGFR antagonists from *Radix Angelicae Pubescentis* [J]. *Chemistry*, 2010, 53(11): 2357-2362.
- [32] Liu J, Yang J, Wang S C, *et al.* Combining human periodontal ligament cell membrane chromatography with online HPLC/MS for screening osteoplastic active compounds from *Coptidis Rhizoma* [J]. *J Chromatogr B*, 2012, 904: 115-120.
- [33] Hou X F, Zhou M Z, Jiang Q, *et al.* A vascular smooth muscle/cell membrane chromatography-offline-gas chromatography/mass spectrometry method for recognition, separation and identification of active components from traditional Chinese medicines [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(42): 7081-7087.
- [34] Liang M J, He L C, Yang G D. Screening analysis and *in vitro* vasodilatation of effective components from *Ligusticum chuanxiong* [J]. *Life Sci*, 2005, 78(2): 128-133.
- [35] Dong Z B, Li S P, Hong M, *et al.* Hypothesis of potential active components in *Angelica sinensis* by using biomembrane extraction and high performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(4): 664-669.
- [36] Song L L, Li P, Sheng L H, *et al.* Live cell extraction and HPLC-MS analysis for predicting bioactive components of traditional Chinese medicines [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(2): 576-581.
- [37] Yu L, Zhao J, Zhu Q, *et al.* Macrophage biospecific extraction and high performance liquid chromatography for hypothesis of immunological active components in *Cordyceps sinensis* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2): 439-443.
- [38] 张 典. 用  $\alpha_1D$  受体高表达细胞膜色谱研究 9 种配体的生物亲和作用 [J]. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2004, 34(2): 173-177.
- [39] 王 瑜, 邓秀玲, 袁秉祥, 等. 一种提高细胞膜色谱精确性和灵敏性的方法 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(12): 2362-2366.
- [40] 张 洁, 代 斌, 闫豫君, 等. 细胞膜色谱法筛选噻唑烷酮酯类化合物活性 [J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(2): 88-91.
- [41] 王雪艳.  $\alpha_1A$ -肾上腺素受体生物色谱的建立及应用 [D]. 西安: 西北大学, 2010.
- [42] Zhao L M, Xiao N Q, Rui L L, *et al.* Three-dimensional cell bioreactor coupled with high performance liquid chromatography-mass spectrometry for the affinity screening of bioactive components from herb medicine [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1243: 33-38.
- [43] Kool J, Rudebeck A F, Fleurbaaij F, *et al.* High-resolution metabolic profiling towards G protein-coupled receptors: Rapid and comprehensive screening of histamine H4 receptor ligands [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1259: 213-220.
- [44] Giera M, Heus F, Janssen L, *et al.* Micro-fractionation revisited: A 1536 well high resolution screening assay [J]. *Anal Chem*, 2009, 81: 5460-5466.
- [45] 毛希琴, 邹汉法, 封 顺, 等. 3 种色谱模式联用在中药活性成分初步筛选中的应用 [J]. *分析化学研究简报*, 2003, 31(8): 992-995.
- [46] 孙小芬, 刘汉清, 李 婧. 分子生物色谱技术在中药研究中的应用进展 [J]. *医药导报*, 2010, 29(9): 1186-1189.