

文章编号:1001-6880(2016)10-1510-07

基于¹ H NMR 代谢组学技术的传统产区 与种植基地太子参化学成分分析

华渝教,侯 娅,王胜男,刘训红*,邹立思,谷 巍,罗益远,刘娟秀

南京中医药大学,南京 210023

摘要:探讨不同产区太子参代谢物合成积累的差异。采用¹ H NMR 代谢组学技术结合多元统计分析对传统产区与种植基地太子参中化学成分进行比较分析,并找出差异成分。共指认出 35 个化学成分;多元统计分析显示,传统产区与种植基地太子参样品能明显分开,其中差异显著的化学成分有 12 个,精氨酸、谷氨酸、乙酰乙酸、琥珀酸的相对含量在传统产区太子参中较高;赖氨酸、二甲基甘氨酸钠、苯丙氨酸、蔗糖、木糖、槲皮素、富马酸、阿魏酸的相对含量在种植基地太子参中较高。本研究结果为揭示不同产区太子参代谢物合成积累的变化规律及其药材的品质形成机制提供基础资料。

关键词:太子参;传统产区与种植基地;化学成分;¹ H NMR;多元统计分析

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.002

Analysis of Chemical Compositions in Pseudostellariae Radix from Traditional Field and Cultivated Fields by ¹ H NMR-based Metabolomics

HUA Yu-jiao, HOU Ya, WANG Sheng-nan, LIU Xun-hong*, ZOU Li-si, GU Wei, LUO Yi-yuan, LIU Juan-xiu
Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: To investigate the differences in accumulation and biosynthesis of metabolites in Pseudostellariae Radix. ¹ H NMR based metabolomic approach combined with multivariate statistical analysis was used to investigate the chemical compositions and find the different metabolites in Pseudostellariae Radix from traditional field and cultivated fields. 35 Metabditites were identified in the ¹ H NMR spectrum, and 12 of which showed remarkable differences. The multivariate statistical analysis showed that Pseudostellariae Radix from cultivated fields and from traditional field can be separated obviously. The levels of arginine, glutamate, acetoacetate and succinate in Pseudostellariae Radix from traditional field were higher, while the cultivated Pseudostellariae Radix contained more lysine, dimethylglycine, phenylalanine, sucrose, xylose, quercetin, fumarate and ferulic acid. This study will provide the basic information for exploring the quality formation mechanism and revealing the differences in accumulation and biosynthesis of metabolites in Pseudostellariae Radix.

Key words: Pseudostellariae Radix; traditional field and cultivated fields; chemical compositions; ¹ H NMR; multivariate statistical analysis

太子参为大宗常用中药材,系石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm 的块根^[1],具益气健脾、润肺生津之传统功效及保护心肌功能、促进免疫、止咳等药理作用,临幊上用于脾虚体倦、食欲不振、病后虚弱等症,是治疗小儿脾虚而食欲不佳之要药,疗效确切,临床用量大^[2]。江苏为太子参传统产区,传统药材商品一直

以江苏地产的太子参质量最优,有“道地药材”之称,近年来,除江苏传统产区栽培外,全国现已在福建柘荣、贵州施秉、安徽宣城等地建立了大规模种植基地。随着太子参栽培地域的扩大,生态环境的不同,造成太子参有效成分的积累差异较大,药材质量参差不齐,难以实现商品药材标准化及保证其临床使用有效性。

已有研究报道太子参含有环肽、皂苷、多糖、核苷、脂肪酸及挥发性成分等^[3-5],目前太子参药材质量评价大多集中在环肽、皂苷、多糖、核苷等成分的含量测定方面^[6-9],但太子参化学成分复杂,且药效

收稿日期:2016-06-16 接受日期:2016-07-22

基金项目:国家自然科学基金项目(81274016;81473312);江苏高校优势学科建设工程资助项目(yssxk-2014);江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015A070)

* 通讯作者 Tel:86-25-85811511;E-mail:liuxunh1959@sohu.com

物质基础至今尚不清楚,一种或几种成分无法全面评价太子参的药材质量。植物代谢组学技术可对植物提取物中代谢组进行高通量、无偏差全面分析技术,因此,利用该技术对太子参药材中的整体代谢物组(化学成分组)进行系统分析,有利于全面反映药材的内在质量。基于核磁共振代谢组学技术具有显著优点:①样品制备简单;②重复性好;③信号强度与样品浓度呈正比,可提供定量信息^[10];④图谱中的化学位移、偶合常数等可提供样品的结构信息。近年来已经成功地用于款冬花^[11]、远志^[12]、黄连^[13]、黄芪^[14]等多种药材的质量评价。本研究借鉴植物代谢组学的研究思路和方法,采用¹H NMR 技术对传统产区与种植基地太子参中化学组成进行比较分析,并通过多元统计分析找出差异显著的化学成分及其变化规律,从而为揭示不同产区太子参代谢物合成积累的影响规律及探讨太子参药材的品质形成机制提供基础资料。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Agilent DD2 600 MHz 核磁共振谱仪(质子的共振频率为 599.83 MHz, 配备超低温探头, 美国安捷伦科技公司); R-210 旋转蒸发仪(瑞士步琦公司); Anke TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器厂); 高通量组织细胞破碎仪(英国 Bullet BlenderTM 公司); PHS-25 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司); MX-F 涡旋混匀仪(美国赛洛捷克公司); LABCONCO 冷冻干燥机(美国 LABCONCO 公司)。乙腈(色谱纯, 迪玛公司, 批号: 821801); 甲醇(色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司, 批号 120593; 化学纯, 南京化学试剂有限公司, 批号 081110865), 水为超纯水(由 Millipore 纯水器制备); NMR 试剂重水(D₂O, Norell, Landisville, USA), 3-三甲基硅基[2,2,3,3-d₄] 氟代丙酸钠(TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA)。

1.2 材料

传统产区太子参样品于 2013 年 7 月下旬采集于江苏句容(北纬 119°16'25", 东经 31°41'15"); 种植基地太子参样品于 2013 年 7 月下旬分别采集于福建柘荣(北纬 119°54'2", 东经 27°13'48")、安徽宣州(北纬 118°45', 东经 30°56'59")、贵州施秉(北纬 108°7'12", 东经 27°1'48") 种植基地。经南京中医药

大学药学院刘训红教授鉴定为石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. 的块根。留样保存于南京中医药大学中药鉴定实验室。

2 实验方法

2.1 样品制备

分别称取太子参各个样本粉末 100 mg 左右于 2 mL EP 管中, 分别加入 0.6 mL 提取液(CH₃OH: H₂O = 2: 1)。涡旋 1 min 后用高通量组织破碎仪进行组织破碎(30 Hz, 90 s), 冰浴静置 2 min 后离心(4 °C)收集上清液。以上步骤重复三次, 将收集到的 3 次上清液合并。合并后的上清液用旋转蒸发仪将有机溶剂(CH₃OH)除去, 再用冷冻干燥仪(冷冻干燥 24 h)除去水分后得到冻干粉末样品。磷酸盐缓冲液(0.1 M NaH₂PO₄/K₂HPO₄; NaN₃: 0.1%; pH: 7.4; 100% D₂O) 中添加 0.05 g/100 mL TSP, 将粉末样品溶于 600 μL 磷酸盐缓冲液, 涡旋混匀后离心 10 min, 取 550 μL 上清液至 5 mm 核磁管中待检。传统产区药材平行 15 份, 种植基地每份药材平行备样 5 份。

2.2 ¹H NMR 测定及条件

样品在 25 °C 下于 600 MHz 核磁共振仪上进行测定, 测定频率为 599.83 MHz, 扫描次数为 128, 谱宽 20 ppm, FID 采集次数 64 次, 32 K 数据点, 延迟时间 2 s, 采集时间为 1.36 s, 温度 298 K, HCN 三共振反向超低温探头, 手动进行相位、基线调节及峰校正。采用 NOESYPR1D 脉冲序列压制水峰, 内标为 TSP。

2.3 数据处理

核磁图谱采用 MestReNova 6.1 进行处理。对化学位移区间 10.0 ~ 0.5 ppm 进行分段积分, 采用等间距积分方式, 积分间距为 0.002 ppm, 核磁谱中 4.98 ~ 4.67 ppm(水峰)以及 3.363 ~ 3.355 ppm(残余甲醇)不进行积分。将积分后的数据进行归一化处理后, 导入 Excel 表中, 用于后续分析。将 Excel 中的积分数据导入 SIMCA-P13.0 (Umetrics, Umea, Sweden) 软件进行主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 和正交最小二乘法判别分析(orthogonal PLS-DA, OPLS-DA), 筛选出样品间的差异代谢物并对其进行鉴定。

3 实验结果

3.1 ^1H NMR 图谱分析

分别对传统产区与种植基地太子参样品进行 ^1H NMR 分析(图 1),通过对 ^1H NMR 图谱中峰的分裂情况、化学位移、耦合常数等分析,结合标准品、文献报道数据^[15,16]以及 BMRB (<http://www.bmrb.wisc.edu/>) 数据库中的标准物质对照的方式进行结

构指认,在传统产区与种植基地太子参中共指认出 35 个代谢产物(表 1)。图谱可分成 3 个区域,高场区(δ 3.10~0.00)主要包括氨基酸和有机酸类成分,如亮氨酸、赖氨酸、丙氨酸、精氨酸、伽马氨基丁酸等;碳水化合物区(δ 6.00~3.10)主要为糖类成分,包括蔗糖、葡萄糖、木糖、棉子糖等;低场区(δ 10.00~6.00)主要包括延胡索酸、维生素 B1、槲皮素、金丝桃苷、丹酚酸等化学成分。

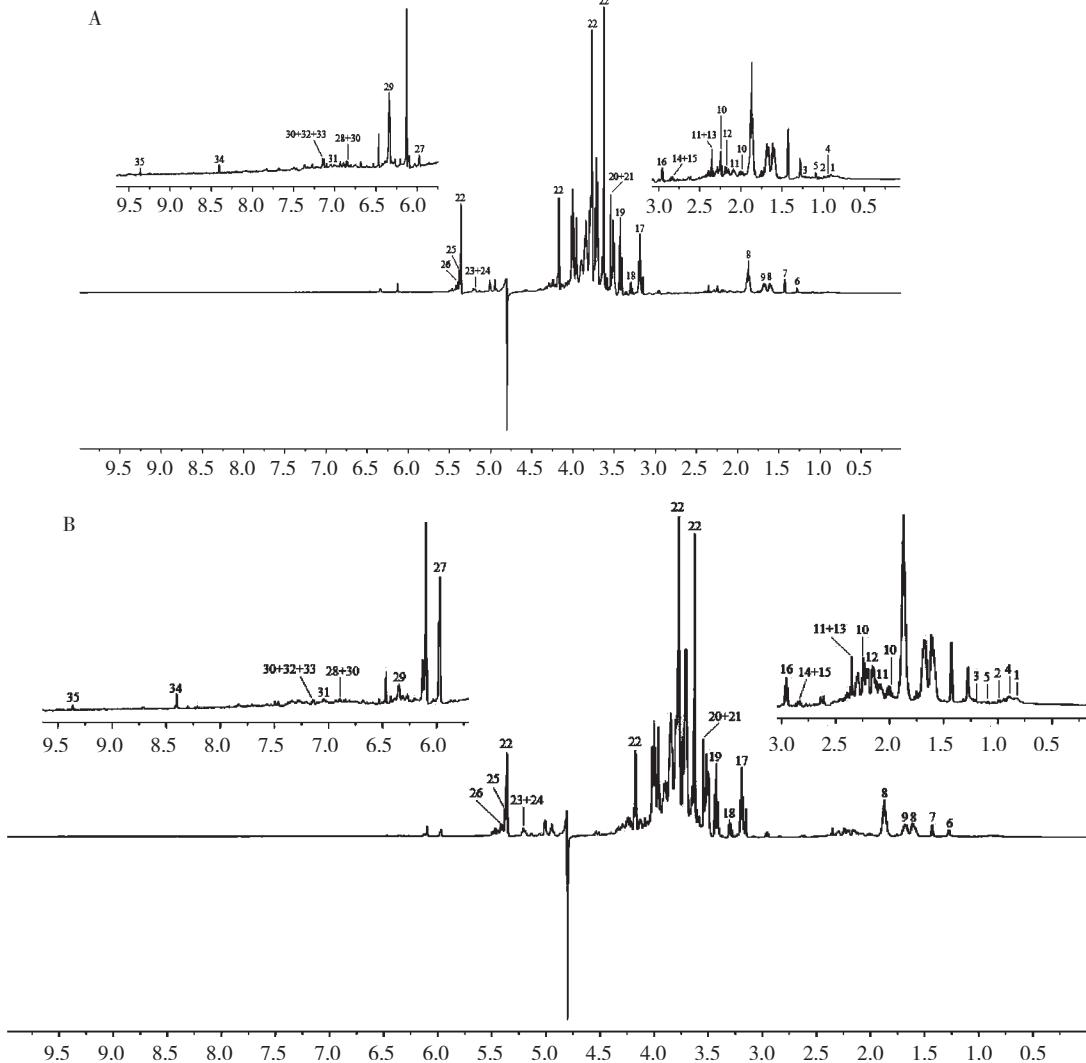


图 1 传统产区(A)和种植基地(B)太子参核磁共振图谱

Fig. 1 ^1H NMR spectra of *Pseudostellariae Radix* from traditional field (A) and cultivated fields (B)

表 1 太子参中化学成分在核磁共振图谱中的化学位移及偶合常数

Table 1 ^1H NMR chemical shifts (δ) and coupling constants (Hz) of *Pseudostellariae Radix* identified by references and using NMR spectra

编号 No.	化学成分 Metabolites	化学位移(δ) Chemical shifts(δ)
1	Leucine	3.72 (m), 0.94 (m)

编号 No.	化学成分 Metabolites	化学位移(δ) Chemical shifts(δ)
2	Isoleucine	1.00(m), 0.89(m)
3	Linolenic acid	0.96(t), 1.30(brs)
4	Valine	0.97(m)
5	2-Ketoisovaleric acid	1.10(m)
6	Lactate	1.26(m), 4.10(m)
7	Alanine	1.43(d, $J=7.3$)
8	Arginine	1.64(m), 1.90(m), 2.95(m)
9	Lysine	1.87(pd, $J=14.5$), 1.66(m), 2.95(m)
10	Glutamate	2.12(m), 2.34(m), 3.74(m)
11	Glutamine	2.19(m), 2.35(m), 3.76(m)
12	Acetoacetate	2.22(m), 2.28(m)
13	Succinate	2.35(m)
14	Aspartate	2.88(m), 2.96(m), 4.00(m)
15	Dimethylglycine	2.91(m), 3.71(m)
16	γ -aminobutyrate	2.97(dd, $J=20.8$), 1.87(m), 2.25(m)
17	Choline	3.19(m)
18	Phenylalanine	3.28(m), 3.99(m), 7.14(m)
19	Taurine	3.40(m), 3.42(m)
20	Glucose	3.46(m), 5.20(m)
21	Glycine	3.54(m)
22	Sucrose	3.63(m), 3.76(m), 4.16(m), 5.36(m)
23	Xylose	5.20(m)
24	Galactose	5.21(m)
25	Raffinose	5.37(m)
26	Hyperoside	5.42(m), 6.13(m), 6.85(m)
27	Salvianolic acid B	5.97(m), 6.02(m)
28	Quercetin	6.13(m), 6.85(m)
29	Fumarate	6.34(s)
30	Tyrosin	6.83(m), 7.12(m)
31	Luteolin	6.89(m)
32	Histidine	7.10(m), 7.90(m)
33	Ferulic acid	7.14(m)
34	Formic acid	8.40(s)
35	Thiamine	9.36(m)

3.2 多元统计分析

传统产区与种植基地太子参核磁图谱中含有大量的化学指纹信息,首先对这两种太子参样品进行PCA多变量模式识别分析。图2A为传统产区与种植基地太子参PCA分析的散点图(PC1:50.6%;

PC2:21.9%),传统产区太子参样品位于PC1正半轴,种植基地太子参样品位于PC1负半轴,说明传统产区和种植基地太子参化学组成差异明显,这可能是由于不同的生态环境对样品造成的。种植基地太子参样本组内差异大于传统产区太子参,原因可

能在种植基地太子参的产地不同,生境有异,而传统产区太子参均来自江苏句容。

PCA 为无监督的分析方法,在确定差异成分时候不能忽略组内误差和消除与研究目的无关的随机误差。因此,需要采用有监督的正交偏最小二乘法-显著性分析(OPLS-DA)确定不同传统产区与种植基地太子参之间的化学差异成分。但是,OPLS 的使用必须以 PLS 模型的通过验证为基础,且 OPLS 仅适用于寻找差异成分。排列实验是一种外部模型验证方法,主要用于验证 PLS-DA 模型的拟合程度^[14]。图 2B 为传统产区与种植基地太子参 PLS-DA 散点图($R^2X: 92.1\%$, $R^2Y: 87.6\%$, $Q^2: 80.2\%$),可以看出两类太子参样品明显分开。通过排列试验随机多次($n = 200$)改变分类变量 y 的排列顺序得到相应不同的随机 Q^2 值对模型有效性做进一步的检验。从图 2C 可见,PLS-DA 模型排列

实验中左端随机排列产生的 R^2 和 Q^2 值均小于右端的原始值,表明原始模型的预测能力大于随机排列 y 变量的预测能力,即模型有效,可以进行后续的差异成分分析^[17]。图 2D 为传统产区与种植基地太子参 OPLS-DA 散点图($R^2X: 92.1\%$, $R^2Y: 87.6\%$, $Q^2: 83.8\%$),可以看出分类效果优于 PCA 分析,组内差异降低,更有利于准确地确定组间差异。通过相应的 VIP 值,从表 2 中可以看出两组样品差异化学成分有 12 个。相关系数载荷图中的正信号对应的化合物在传统产区太子参中含量较高,负信号对应的化合物在种植基地太子参中含量较高。与传统产区太子参比较,种植基地太子参中的赖氨酸、二甲基甘氨酸钠、苯丙氨酸、蔗糖、木糖、槲皮素、富马酸、阿魏酸的含量较高;精氨酸、谷氨酸、乙酰乙酸、琥珀酸的含量较低。

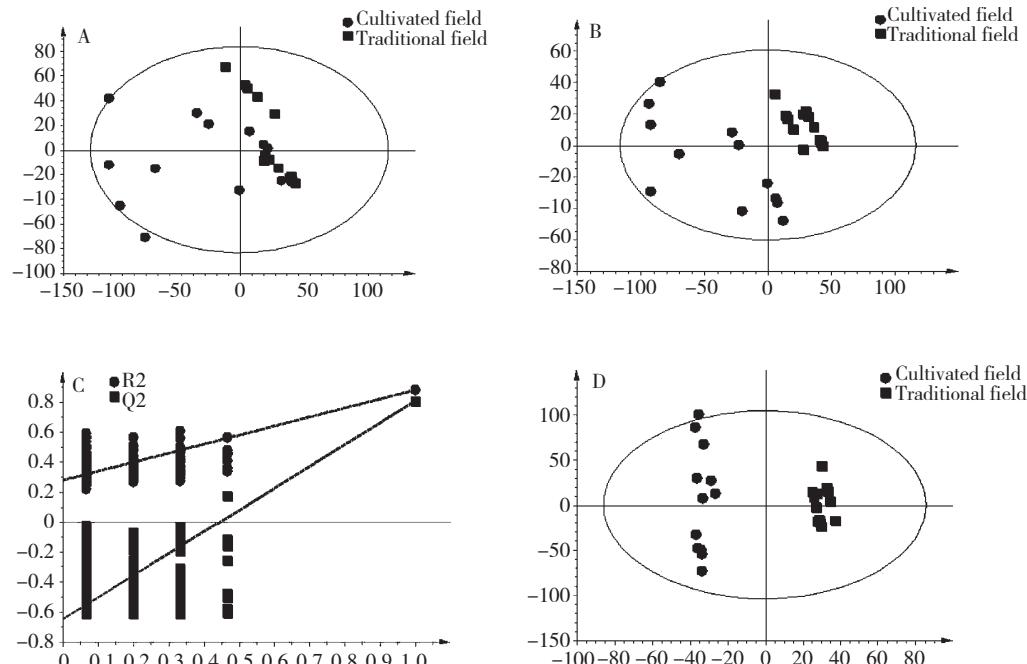


图 2 传统产区与种植基地太子参中 PCA 得分图(A)、PLS-DA 得分图(B)、200 个排列模型验证(C)及 OPLS-DA 得分图(D)

Fig. 2 PCA scores plot (A), PLS-DA score plot (B), 200 permutation test model validation plot (C) and OPLS-DA score plot (D) of *Pseudostellariae Radix* from traditional field and cultivated fields

表 2 传统产区与种植基地太子参中 12 个显著差异代谢物

Table 2 12 significantly differential metabolites between *Pseudostellariae Radix* from cultivated fields and traditional field

编号 No.	化学成分 Metabolite	VIP 值 VIP value	相对含量高低 Trend
8	Arginine	1.63322	↑
9	Lysine	1.322	↓

编号 No.	化学成分 Metabolite	VIP 值 VIP value	相对含量高低 Trend
10	Glutamate	1.31299	↑
12	Acetoacetate	1.68146	↑
13	Succinate	1.56208	↑
15	Dimethylglycine	1.31504	↓
18	Phenylalanine	1.32763	↓
22	Sucrose	1.32902	↓
23	Xylose	1.3116	↓
28	Quercetin	1.3367	↓
29	Fumarate	1.36557	↓
33	Ferulic acid	1.77234	↓

注:↑:在传统产区太子参中相对含量较高;↓:在传统产区太子参中相对含量较低($P < 0.01$)。

Note: ↑: Relatively higher in *Pseudostellaria heterophylla* from traditional field; ↓: Relatively lower in *Pseudostellariae Radix* from traditional field ($P < 0.01$).

4 讨论

代谢组学最大的优势在于通过统计分析可以确定不同样本之间的化学成分的相似性和差异性。本实验建立了基于核磁共振(¹H NMR)和多元统计分析对传统产区与种植基地太子参中化学组成进行比较分析。通过PCA分析得出,传统产区与种植基地产区太子参样品组间差异明显,说明传统产区与种植基地太子参样品中的化学成分差异明显。进一步通过PLS-DA和OPLS-DA分析得到12个影响样品间差异的主要化学成分,其中精氨酸、谷氨酸、乙酰乙酸、琥珀酸的相对含量在传统产区太子参中较高;赖氨酸、二甲基甘氨酸钠、苯丙氨酸、蔗糖、木糖、槲皮素、富马酸、阿魏酸的相对含量在栽培太子参中较高。这说明产区的不同对太子参代谢组整体化学成分组成的变化起到重要的作用,本研究结果为揭示不同产区太子参代谢物合成积累的影响规律及其药材的品质形成机制提供基础资料。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015, Vol I, 68.
- 2 Fu XS(傅兴圣), Liu XH(刘训红), Xu H(许虎), et al. Research status and trends of pseudostellariae radix. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志) 2012, 21:757-760.
- 3 Hirshi M, Takashi K, Hideyuli K, et al. Pseudostellarins A-C, new tyrosinase inhibitory cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla*. *Tetrahedron*, 1994, 50:6797-6804.
- 4 Hirshi M, Takashi K, Hideyuli K, et al. Pseudostellarins D-F, new tyrosinase inhibitory cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla*. *Tetrahedron*, 1994, 50:9975-9982.
- 5 Tan NH, Zhou J, Chen CX, et al. Cyclopeptides from the roots of *Pseudostellaria heterophylla*. *Phytochemistry*, 1993, 32: 1327-1330.
- 6 An K (安坤), He J(何静), Wan ZM(万忠民), et al. Determination and multivariate statistical analysis of amino acid in *Pseudostellaria heterophylla* from different producing areas. *Nat Prod Res* (天然产物研究与开发), 2012, 24:594-598.
- 7 Song JP(宋建平), Zeng YP(曾艳萍), Liu XH(刘训红), et al. Determination of polysaccharide in *Radix Pseudostellariae* from different habitats by HPLC-ELSD. *Shanghai J TCM* (上海中医药杂志), 2008, 42(10):77-79.
- 8 Ma Y(马阳), Hou Y(侯娅), Zou LS(邹立思), et al. QTRAP LC-MS/MS analytical study on nucleosides and nucleobases of *Pseudostellariae Radix* cultivated in different Idioplasm resources. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2014, 23:2325-2330.
- 9 Fu XS(傅兴圣), Zou LS(邹立思), Liu XH(刘训红), et al. Analysis of cyclic peptides in *Pseudostellariae Radix* by UPLC-ESI-TOFMS/MS. *J Chi Mass Spec Soc* (质谱学报), 2013, 34:179-184.
- 10 Griffiths L, Irving AM. Assay by nuclear magnetic resonance spectroscopy: quantification limits. *Analyst*, 1998, 123:1061-1068.
- 11 Mi X(米霞), Li ZY(李震宇), Qin XM(秦雪梅), et al. Monitoring of chemical components with different color traits of *Tussilago farfara* using NMR-based metabolomics. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2013, 48:1692-1697.
- 12 Wang XJ(王雪洁), Li ZY(李震宇), Xue SY(薛水玉), et al.

- al. Quality control over different processed products of *Polygoniae Radix* based on plant metabolomics. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43:1727-1737.
- 13 Fan G, Tao LH, Yue QH, et al. Metabolic discrimination of Rhizoma Coptidis from different species using ^1H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Planta Med*, 2012, 78:641-648.
- 14 Tian D(田栋), Li ZY(李震宇), Fan SC(范圣此), et al. NMR-based analysis of water soluble extracts of different Astragalus Radix. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2014, 49: 89-94.
- 15 Sandipan C, Shatakshi S, Asna K, et al. Comprehensive metabolic fingerprinting of *Withania somnifera* leaf and root extracts. *Phytochemistry*, 2010, 71:1085-1094.
- 16 Hye KK, Young HC, Robert V. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat Protoc*, 2010, 5:536-549.
- 17 Li ZY(李震宇), Fan ML(范玛莉), Qin XM(秦雪梅). Comparison of chemical composition between raw and vinegar-baked *Paeoniae Radix Alba* using NMR based metabolomic approach. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2015, 50:211-217.

(上接第 1596 页)

- 12 Zhou HL(周鸿立), Yang XH(杨晓虹). Removal of proteins from corn silk polysaccharide by a combined enzymatic-sevag method. *Food Sci* (食品科学), 2011, 8:129-132.
- 13 Xiong JH(熊建华), Wu Q(吴琴), Lin LP(林丽萍), et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction techniques champhor seed oil by using response surface methodology. *J China Cel Oils Assoc* (中国粮油学报), 2013, 28(3):65-69.
- 14 Han L(韩林), Zhang HD(张海德), Li GS(李国胜). Optimization of extraction technology and antioxidant activities of total phenom from betel nut seed. *Agric Mach* (农业机械学报), 2010, 4:134-139.
- 15 Chen L(陈林), Han L(韩林), Zhou N(周浓). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of crude polysaccharide from *Fritillary taipaiensis* P. Y. Li using response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:109-113.
- 16 Yu F(余凡), Lei Y(雷迎), Ren JR(任坚忍), et al. Study on extraction and stability of pigment from *Lagerstroemia indica* flowers. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2012, 33:231-234.
- 17 Li LY(李良玉), Cao RA(曹荣安), Yu W(于伟), et al. Study on extraction of flavonoids from wheat germ assisted by ultrasonic. *Sci Technol Cereals, Oils Foods* (粮油食品科技), 2014, 22(4):42-47.
- 18 Tang JB(唐健波), Xiao X(肖雄), Yang J(杨娟). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Rosa roxburghii* tratt using response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 314-320.
- 19 Lu Y(陆洋), Peng F(彭飞), Huang LX(黄丽霞), et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction conditions of polyphenol from *Cyrtomium fortunei* by response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:103-108.
- 20 Chen J(陈健), Sun AD(孙爱东), Gao XJ(高雪娟), et al. Process optimization for ultrasonic-assisted solvent extraction of proanthocyanidins from *Areca catechu* L fruit by response surface analysis. *Food Sci* (食品科学), 2011, 32(4):82-86.
- 21 Li CX(李彩霞), Gao HN(高海宁), Zhang XF(张喜峰), et al. Ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of flavonoids from *Sophora japonica* leaf. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:1387-1391.
- 22 Zhao SM(赵思明). Computer Application in Food Science and Engineering. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 47-54.
- 23 He N(何宁), Wu LB(吴黎兵). The Statistical Analysis System Sas. Wuhan: Wuhan University Press, 2005. 195-211.