

五倍子抑制表皮生长因子受体活性及活性部位的 UPLC/Q-TOF-MS 分析

王冬梅¹, 林森森², 郑司浩¹, 黄林芳^{1*}, 陈士林¹

1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 中国药科大学新药筛选中心, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 应用均相时间分辨荧光 (HTRF) 技术, 筛选发现具有抑制表皮生长因子受体 (EGFR) 活性的五倍子提取物, 同时采用超高效液相色谱与串联四级杆飞行时间质谱仪联用技术 (UPLC/Q-TOF-MS) 对其活性部位进行分析和鉴别。**方法** 药材经石油醚渗滤、乙醇提取、醋酸乙酯萃取和水煎煮后, 得到 4 个提取部位。采用 HTRF 法检测五倍子醋酸乙酯提取物对 EGFR 的抑制作用, 并计算抑制率。采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 200~400 nm 扫描, 使用 ESI 离子源, 在正离子模式下采集数据。**结果** 五倍子的醋酸乙酯部位显示较强的 EGFR 抑制活性, 并从其活性部位中分析鉴定出 14 个化合物, 主要成分为鞣质类化合物, 其中 11 个分别为石榴皮鞣素、香草醛、六羟基二苯酰胺葡萄糖、鞣花鞣质、杨梅苷、原儿茶素、五倍子鞣质倍酰葡萄糖、五倍子鞣质、鞣花酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸、monogalloyl-glucose, 另外 3 个为未知成分。**结论** 本研究首次发现五倍子醋酸乙酯提取部位具有较强的 EGFR 抑制活性, IC₅₀ 为 5.528 μg/mL, Q-TOF-MS 测定的相对分子质量及正离子信息鉴定表明五倍子醋酸乙酯提取物中主要为鞣质类成分, 其中五倍子鞣质、鞣花酸、鞣花鞣质为最主要成分。五倍子中含有的鞣质类成分为抑制 EGFR 活性的主要成分, 为其在抗癌方面的应用提供理论依据, 同时为进一步跟踪分离活性成分奠定基础。

关键词: 表皮生长因子受体抑制剂; 均相时间分辨荧光; 五倍子; 有效成分; UPLC/Q-TOF-MS; 鞣质

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)18-2515-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.005

Activity of anti-epidermal growth factor receptor in *Calla Chinensis* and UPLC/Q-TOF-MS analysis on its effective part

WANG Dong-mei¹, LIN Sen-sen², ZHENG Si-hao¹, HUANG Lin-fang¹, CHEN Shi-lin¹

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. New Drug Screening Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective Using homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) technology to screen the *Calla Chinensis* extracts with anti-epidermal growth factor receptor activity and to analyze the active ingredients in *Calla Chinensis* by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole-time of flight mass-spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS). **Methods** After percolation with petroleum ether, ethanol extract, ethyl acetate extraction, and boiling with water, four fractions were obtained. HTRF method was applied to detecting the inhibition of ethyl acetate fraction on EGFR, and the inhibitory rate was calculated. The chromatographic separation was performed on Acquity UPLC BEH C₁₈ column with a gradient elution of 0.1% formic acid water-acetonitrile. The mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector, data were collected under the positive ion modes, and screened at 200—400 nm. **Results** The ethyl acetate fraction of *Calla Chinensis* showed the strong inhibitory activity on EGFR. Fourteen compounds were analyzed and identified, among which tannins were the main active components, the 11 tannin compounds were punicalin, vanillin, di-HHDP-glucose, ellagitannin, myricetin 3-O-rhamnoside, protocatechuic acid, gallotannin-glucose, ellagic acid-hexose, 3, 5-dicaffeoylquinic acid, monogalloyl-glucose, and gallotannin, and the three others were unknown. **Conclusion** The ethyl acetate fraction of *Calla Chinensis* has the significant EGFR inhibitory activity, and the IC₅₀ value is 5.528 μg/mL. Tannins,

收稿日期: 2013-02-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274013); 国家自然科学基金重点项目 (81130069); 人事部留学人员择优资助项目 (2009-2011); 国家重大科技专项创新药 (2011ZX09307-002-01); 教育部长江学者和创新团队发展计划 (IRT1150)

作者简介: 王冬梅 (1984—), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 主要从事药用植物研究。E-mail: dongmei78160160@sina.cn

***通信作者** 黄林芳 Tel: (010)57833197 E-mail: lfhuang@implad.ac.cn

including Chinese tannin, gallogen, and ellagitannin as main constituents, are identified through the information of positive ion and relative molecular mass determined by Q-TOF-MS. The results indicate that *Calla Chinensis* contains tannin ingredients to inhibit EGFR, in the hope to provide a theoretical basis of the application in anticancer and to lay the foundation for the further tracking separation of the active ingredients.

Key words: epidermal growth factor receptor inhibitor; homogeneous time-resolved fluorescence; *Calla Chinensis*; active ingredients; UPLC/Q-TOF-MS; tannin

五倍子 *Calla Chinensis* 为漆树科植物盐肤木 *Rhus chinensis* Mill.、青麸杨 *Rhus potaninii* Maxim. 或红麸杨 *Rhus punjabensis* Stew. var. *sinica* (Diels) Rehd. et Wils. 叶上的虫瘿, 主要由五倍子蚜 *Melaphis chinensis* (Bell) Baker 寄生而形成。其主要分为角倍和肚倍两类。角倍, 又名菱倍、花倍, 呈不规则囊状, 有若干瘤状突起或角状分枝, 干后呈黄棕色, 有灰白色绒毛, 壁厚约 1~2 mm, 破折面角质样。肚倍, 又名独角倍, 呈纺锤状囊形, 无突起或分枝, 绒毛较少, 壁厚 1~3 mm, 折断面角质样, 较角倍光亮。五倍子酸、涩、寒, 具有敛肺降火、涩肠止泻、敛汗、止血、收湿敛疮。用于治疗肺虚久咳、肺热痰嗽、久泻久痢、自汗盗汗、消渴、便血痔血、外伤出血、痈肿疮毒、皮肤湿烂^[1]。其化学成分主要有五倍子鞣质、没食子酸和五倍子油等。其活性成分主要是五倍子鞣质, 具有抗氧化^[2-4]、抗炎^[5]、抗菌^[6]、抗增殖及抗癌^[7-12]等多方面药理作用。本研究首次对“角倍”-五倍子醋酸乙酯提取物进行了表皮生长因子受体 (EGFR) 激酶抑制剂活性筛选实验, 并对其有效部位进行 UPLC/Q-TOF-MS 分析, 以期寻找其抗肿瘤活性成分, 并为其在抗肿瘤方面的应用提供理论依据。

1 仪器与材料

生物素标记的蛋白酪氨酸激酶多肽底物 (poly-Glu-Ala-Tyr), 链激毒素标记的 XL665 (经过修饰的异藻蓝蛋白), 蛋白酪氨酸激酶 VEGFR-2 和结合生物素标记的抗磷酸化酪氨酸抗体的钨联穴状化合物 (EuK) 购自 CissbioBioassay 公司; VEGFR-2、酶反应液中 $MnCl_2$ 和 $MgCl_2$ 购自 Sigma-Aldrich; ATP 和 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 购自北京拜耳迪生物公司; 384 低体积白板 (Corning, 美国); 进口枪头 (Axygen, 美国)。

EGFR 激酶 (Invitrogen, 美国); HTRF KinEASE-TK (Cisbio, 美国); ATP、 $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、二硫苏糖醇 (DTT, 国产); Waters AcquityTM 超高效液相色谱仪 (Waters, Millford, MA, 美国), 配备高压二元梯度泵、可控温自动进样器和二级管阵列检测器; Waters Premier TOF 飞行时间质谱仪

(Waters, Millford, MA, 美国), 配有 ESI 电离源接口, Lock-spray 接口和 MassLynxV4.1 工作站。ELGA PURELAB Classic—UVF 纯水机, 英国。

甲醇为色谱纯, 美国 Fisher 公司; 超纯水, 实验室自制; 其他试剂均为市售国产分析纯; 阳性药选 EGFR 非选择性抑制剂星形孢菌素 (批号 37095—10MG, Sigma-Aldrich, 美国)。

五倍子于 2011 年 11 月由黄林芳副研究员和银福军副研究员采于重庆长寿云集。样品经中国科学院药用植物研究鉴定中心林余霖教授鉴定为盐肤木 *Rhus chinensis* Mill. 叶上虫瘿。

2 方法

2.1 样品的制备

药材样品粉碎成粗粉, 取粗粉 500 g, 先用石油醚浸泡 1 d 后渗滤提取至提取液颜色变浅 (或 5 倍药材量), 回收石油醚, 得石油醚提取物 (10.54 g); 残渣挥去石油醚, 用 80% 乙醇湿润后, 再用 3 倍量 80% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压回收乙醇至无醇味, 用等体积醋酸乙酯萃取 2 次, 合并醋酸乙酯萃取液, 回收醋酸乙酯至干, 得醋酸乙酯萃取物 (15.93 g); 母液浓缩至干, 得乙醇提取物 (20.47 g); 残渣挥干乙醇, 用 3 倍量的水煎煮 2 次, 每次 2 h, 合并水煎液, 浓缩至干, 得水提取物 (44.82 g)。

2.2 活性测定方法

2.2.1 原理 均相时间分辨荧光 (HTRF) 方法分为 2 个步骤: 一是酶促反应, 即当加入 ATP 后启动反应, 激酶使底物发生磷酸化反应, 将磷酸根连接在有生物素标记的底物上; 二是终止及检测过程, 在这个过程中 EDTA 终止了反应的进行, 有钨元素标记抗磷酸化酪氨酸抗体靠近底物的磷酸根上, 标记 XL665 的异藻蓝蛋白结合在底物的生物素标记上, 2 个荧光基团在互相靠近的过程中发生能量共振转移并发射出荧光, 其信号强弱与底物的磷酸化程度成正相关。所以通过检测荧光强弱就可得出激酶活性强弱。HTRF 是对待测样品进行双波长检测, 样品分别在 620 nm 和 665 nm 处发射荧光, 其中发生能量

共振转移时在665 nm处产生荧光,游离的TK antibody (标记铈离子)在620 nm处发生荧光,此信号可作为背景信号,而游离的SA-XL665只产生短暂的荧光,通过延后检测时间(加入终止剂后1 h再进行检测)可将其忽略。最终仪器的信号值由以下公式计算。

$$\text{信号比率} = (F1 - B1) / (F2 - B2)$$

F1 为所测样品孔在 665 nm 处的荧光强度值, F2 为所测样品孔在 620 nm 处的荧光强度值, B1 为空白对照在 665 nm 处的荧光强度值, B2 为空白对照在 620 nm 处的荧光强度值

2.2.2 EGFR 活性测定方法 以 384 孔板为实验容器每孔加入 20 μL 缓冲液, 10 μL 反应底物, 10 μL VEGFR-2 激酶, 10 μL ATP。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育 30 min。然后, 依次加入 25 μL 链激酶素标记的 XL665 及 25 μL EuK 标记的抗磷酸化的酪氨酸激酶抗体, 室温反应应用 60 min。荧光信号参数设置如下: 激发波长 670 nm, 发射波长 670、612 nm, 延迟时间 150 s, 测量时间 500 s, 增益值 150。反应设 3 复孔, 检测时每孔读数 10 次, 每次读取吸光度 (A) 值, 设阴性对照及空白对照。计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.3 样品筛选 计算抑制率后对五倍子醋酸乙酯提取物进行复筛。复筛时每个样品依次稀释为 5 个质量浓度, 实验重复 3 次, 分别为 10、1、0.1、0.01、0.001 $\mu\text{g/mL}$ 。根据测定结果计算 IC_{50} 值。

2.3 活性成分测定条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC $^{\text{TM}}$ BEH C_{18} 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 体积流量 0.35 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~3 min, 15% B; 3~4 min, 15%~18% B; 4~6 min, 18% B; 6~7 min, 18%~22% B; 7~8 min, 22%~27% B; 8~9 min, 27%~30% B; 9~10 min, 30%~45% B; 10~11 min, 45%~70% B; 11~12 min, 70%~85% B; 12~13 min, 85%~95% B; 13~14 min, 95%~100% B; 进样量 4 μL 。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 采用正离子模式检测; 脱溶剂气流量为 800 L/h, 脱溶剂气温为 450 $^{\circ}\text{C}$, 锥孔气流量为 50 L/h, 离子源温度为 120 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压为 3 kV, 锥孔电压为 40 V。0.1 s (间隔 0.02 s), 质量扫描范围 m/z 50~1200。

2.4 供试品溶液的制备

取已制得的五倍子醋酸乙酯提取物 50.12 mg, 精密称定, 置于 25 mL 的量瓶中, 加甲醇定容至刻度(终

质量浓度 2.004 8 mg/mL), 摇匀, 滤过, 备用。

3 结果与分析

由表 1、图 1 可见, 五倍子 4 个部位具有不同程度的 EGFR 抑制活性。在终质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时, 石油醚提取物、乙醇提取物、醋酸乙酯提取物、水提取物抑制率分别为 63.77%、19.08%、77.38%、63.88%。而五倍子醋酸乙酯部位活性最强, 其 IC_{50} 值为 5.528 $\mu\text{g/mL}$, 其他 3 个部位未检测到。图 1 表明, 五倍子醋酸乙酯提取物在对数浓度为 1 时, 对 EGFR 活性抑制作用才达到测定要求, 故本实验选定的五倍子提取物终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

按“2.3”项下分析条件进行测定, 绘制五倍子醋酸乙酯溶液的 UPLC/Q-TOF-ESI/MS (+) 离子流图, 见图 2。

采用 Micro mass Marker lynx 软件进行数据处理, 根据正离子模式的一级质谱的分子离子峰得到化合物的准确相对分子质量, 计算出其元素组成。再由正离子的二级质谱中碎片信息, 结合文献报道^[14-17], 对五倍子用 UPLC 分离出的 14 个主要峰进行分析, 推断出其可能的成分, 结果见表 2。

表 1 五倍子各提取部位对 EGFR 的抑制率及 IC_{50} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Inhibitory rates of various fractions of *Calla Chinensis* on EGFR and IC_{50} values ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

测试部位	抑制率 / %	$\text{IC}_{50} / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
石油醚提取物	63.77	—
乙醇提取物	19.08	—
醋酸乙酯提取物	77.38	5.528 0
水提取物	63.88	—
星形孢菌素	94.43	0.367 5

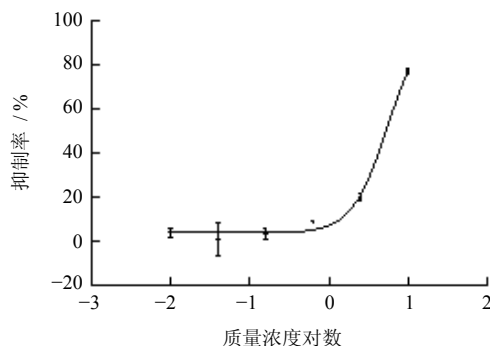


图 1 五倍子醋酸乙酯提取部位对 EGFR 活性抑制作用

Fig. 1 Inhibition of ethyl acetate fractions of *Calla Chinensis* on EGFR activity

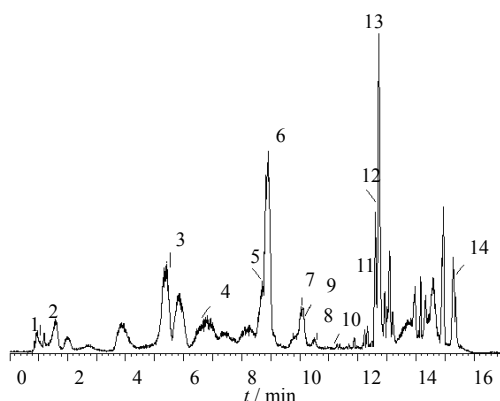


图2 五倍子醋酸乙酯提取物总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of ethyl acetate extracts of *Calla Chinensis*

表2 五倍子醋酸乙酯提取物中成分鉴定表

Table 2 Compounds identified in ethyl acetate extract of *Calla Chinensis*

峰号	<i>t</i> / min	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	MS ² 碎片 (<i>m/z</i>)	相对分子质量	化学式	结构鉴定
1	0.93	783.114 3	782.114 6	782	C ₃₄ H ₂₂ O ₂₂	石榴皮肉素素 ^[17]
2	1.19	153.008 9	136.009 3	152	C ₈ H ₈ O ₃	香兰素 ^[15, 17]
3	5.41	785.113 4	481.301 0	784	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	六羟基联苯二甲酰基葡萄糖 ^[14-15]
4	6.82	934.128 7	757.104 6, 633.102 4, 527.110 1, 301.107 8	933	C ₃₆ H ₅₂ O ₂₈	鞣花鞣质 ^[14-15]
	8.24	1 086.147 0	783.146 8, 301.108 0	1 085		
	10.69	1 125.524 7 [M+Na] ⁺	1101.120 4, 627.092 7, 144.105 9	1 102		
5	8.72	464.340 8	463, 3 162	463	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	杨梅素 3- <i>O</i> -鼠李糖苷 ^[17]
	12.23	518.322 1 [M+Na] ⁺	492.069 7, 476.095 8, 193.025 3, 175.090 2	494		
6	8.92	155.009 3	153.008 9, 109.009 0	154	C ₇ H ₆ O ₄	原儿茶酸 ^[15]
7	10.63	982.681 1	981.680 1, 802.680 8, 331.073 4, 169.025 3	981	C ₄₀ H ₅₂ O ₂₈	五倍子鞣质葡萄糖 ^[14]
8	10.72	465.341 3	464.340 9, 301.321 0	464	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	鞣花酸己糖 ^[16-17]
9	10.74	856.734 5	857.735 0			未知
10	11.04	539.096 2 [M+Na] ⁺	516.095 6, 353.095 4, 179.095 8, 172.099 4	516	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	3, 5-二咖啡酰奎宁酸 ^[15]
11	11.68	274.265 9				未知
12	12.61	520.338 7				未知
13	12.72	333.328 9	271.322 2, 169.025 4	332	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₁	单没食子酸葡萄糖 ^[15]
14	15.37	788.561 8	788.560 6	787	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	五倍子鞣质 ^[15]

这些省份的五倍子产量占全国总产量的90%以上。以角倍的产量最大,肚倍的质量为佳。商品五倍子中角倍类主产区分布在长江以南,产量约占全国五倍子总产量的75%;肚倍类则主产于长江以北,产量约占总产量的20%;倍花类分布较分散,仅占总产量的5%^[19],随着五倍子活性的发现和作用机制的阐明,作为中国特产的五倍子的应用前景将会越来越广阔。

本实验采用均相时间分辨荧光免疫分析方法筛

4 讨论

五倍子始载于《开宝本草》,陈静岚等^[18]用五倍子注射液治疗早期宫颈癌是五倍子各种药理活性的综合体现。本研究对五倍子醋酸乙酯提取物进行了EGFR活性筛选,并对其活性部位进行成分分析,分析鉴定出鞣质类成分14种,如五倍子鞣质,鞣花酸,鞣花鞣质,这些化合物具有抗癌等药理作用,作为中国特产的五倍子在抗癌方面其物质基础和作用机制方面有待更深入的研究,以利于新药的开发和为临床应用研究提供严确实可靠的依据。

五倍子适宜生长在温暖湿润的山区和丘陵地带。我国主要产区集中在四川、贵州、云南、湖北、陕西、湖南、甘肃、广东、浙江、江西、福建、山西等地。

选得到了抑制EGFR活性较好的提取部位,其特点是方法简便快速、灵敏度高、重复性好。本实验通过UPLC/Q-TOF-MS对五倍子醋酸乙酯提取物进行分析,具有快速、准确的特点,是一种相对较好的定性方法,为今后五倍子药材的质量控制及应用提供方法基础。

参考文献

- [1] 中国药典[S]一部.2010.

- [2] 毕良武, 吴在嵩, 陈箭鸿, 等. 鞣质在抗爱滋病研究中的应用 [J]. 林产化工通讯, 1998, 32(2): 11-15.
- [3] Tian F, Li B, Ji B, *et al.* Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Calla Chinensis* [J]. *LWT Food Sci Technol*, 2009, 42(7): 1289-1295.
- [4] Cao Y, Luo Q, Sun M, *et al.* Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer [J]. *Life Sci*, 2004, 74(17): 2157-2184.
- [5] Panico A, Cardile V, Santagati N A, *et al.* Antioxidant and protective effect of sumac leaves on chondrocytes [J]. *J Med Plant Res*, 2009, 3(11): 855-861.
- [6] Erdelyi K, Kiss A, Bakondi E, *et al.* Gallotannins inhibits the expression of kemokines and inflammatory cytokines in A549 cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2005(68): 895-904.
- [7] Engels C, Knödler M, Zhao Y Y, *et al.* Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(17): 7712-7718.
- [8] Jagan S, Ramarihshnan G, Anandakumar P, *et al.* Antiproliferative potential of gallic acid against diethylnitrosamine-induced rat hepato cellular carcinoma [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 319(1/2): 51-59.
- [9] Gali H U, Perchellet E M, Gao X M, *et al.* Antitumor-promoting effects of gallotannins extracted from various sources in mouse skin *in vivo* [J]. *Anticancer Res*, 1993, 546(13): 915-922.
- [10] Hun J E, Lee E O, Kim M S, *et al.* Penta-O-galloyl-L-d-glucose suppresses tumour growth via inhibition of angiogenesis and stimulation of apoptosis: roles of cyclooxygenase-2 and mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(8): 1436-1445.
- [11] Hu H, Zhang J, Lee H J, *et al.* Penta-O-galloyl-L-d-glucose induces S-and C-cell cycle arrests in prostate cancer cells targeting DNA replication and cyclin D1 [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(5): 818-823.
- [12] Kuo P T, Lin T P, Liu L C, *et al.* Penta-O-galloyl-L-d-glucose suppresses prostate cancer bone methastasis by trascriptionally repressing EGF-induced MMP-9 expression [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(8): 3331-3339.
- [13] Li L, Shaik A A, Zhang J, *et al.* Preparation of penta-O-galloyl-L-d-glucose from tannic acid and plasma pharmacokinetic analyses by liquid-liquid extraction and reverse-phase HPLC [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(3): 545-550.
- [14] Romani A, Campo M, Pinelli P. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species [J]. *Food Chem*, 2012, 130(1): 214-221.
- [15] Fernandes A, Sousa A, Mateus N, *et al.* Victor de Freitas. Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC-DAD/ESI-MS [J]. *Food Chem*, 2011, 125(4): 1398-1405.
- [16] Fischer U A, Carle R, Kammerer D R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS [J]. *Food Chem*, 2011, 127(2): 807-821.
- [17] Regazzoni L, Arlandini E, Garzon D, *et al.* A rapid profiling of gallotannins and flavonoids of the aqueous extract of *Rhus coriaria* L. by flow injection analysis with high-resolution mass spectrometry assisted with database searching [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 72(1): 202-207.
- [18] 陈静岚, 刘 姝, 张国平. 五倍子注射液治疗早期宫颈癌 24 例 [J]. 黑龙江医药, 1996(1): 10.
- [19] 朴春梅. 五倍子的研究近况 [J]. 中国民间疗法, 2005, 13(2): 63-65.