

骨刺片对斑马鱼胚胎发育的急性毒性研究

刘 静¹, 张靖溥², 孟 杰², 戴 忠^{1*}, 马双成¹

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 北京协和医学院中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 研究两批骨刺片样品对斑马鱼胚胎发育的急性毒性作用。**方法** 以斑马鱼胚胎为试验对象, 观察骨刺片样品A (0.01、0.05、0.10、0.20、0.30、0.50、1.00 mg/mL)、样品B (0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、10.00 mg/mL) 对斑马鱼胚胎发育的影响, 包括胚胎致畸、致死检测; 同时采用超高效液相色谱法-四极杆飞行时间-质谱 (UPLC-QTOF-MS) 对两批样品所含化学成分进行定性分析。**结果** 两批样品对斑马鱼胚胎发育的影响相似, 主要表现为高浓度下的致死作用, 低浓度下主要以发育滞后表型为主; 但二者作用浓度存在一定差异, 样品A的半数致畸剂量 (TD₅₀) 为225.4 mg/mL, 半数致死剂量 (LD₅₀) 为292.0 mg/mL; 样品B的TD₅₀为60.3 mg/mL, LD₅₀为1.382 mg/mL。UPLC-QTOF-MS分析结果显示, 两批样品所含主要化学成分基本一致, 但某些成分含量存在一定差异; 初步分析显示既是有效成分又是毒性成分的士的宁含量与斑马鱼胚胎试验结果呈正相关。**结论** 斑马鱼胚胎模型可用于评价骨刺片样品的急性毒性, 两批骨刺片样品对斑马鱼胚胎发育影响均表现为高浓度下的致死作用, 低浓度下, 特别是样品B表现为轻度非正常表型, 且均可逆。

关键词: 骨刺片; 斑马鱼胚胎; 急性毒性; 定性分析; 半数致畸剂量; 半数致死剂量

中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 10-1804-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.10.010

Acute toxic effect of Guci Tablets on zebrafish embryo development

LIU Jing¹, ZHANG Jingpu², MENG Jie², DAI Zhong¹, MA Shuangcheng¹

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** To study the acute toxic effect of Guci Tablets on zebrafish embryo development. **Methods** Zebrafish embryo was used to investigate the development situation under different drug concentrations of two batches of Guci Tablets samples (sample A: 0.01, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.50 and 1.00 mg/mL, sample B: 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, and 10.00 mg/mL) including embryo teratogenic and lethal tests. Additionally, an UPLC-QTOF-MS was applied to analyze the chemical constituents of both samples. **Results** The result showed that the effects of both samples on development of zebrafish embryos were similar. The main manifestation was lethal effect under high concentrations and lag phenotypes of development under low concentrations. However, there was a certain difference in the action concentration between both samples, The half of teratogenic dose (TD₅₀) and the half of lethal dose (LD₅₀) of sample A were 0.225 4 mg/mL and 0.292 mg/mL, respectively; the TD₅₀ and the LD₅₀ of sample B were 0.060 3 mg/mL and 1.382 mg/mL, respectively. According to the results of UPLC-QTOF-MS, the main chemical constituents contained in both samples were basically in agreement. But there were some differences in the content of some constituents. And the preliminary analysis showed there was a positive correlation between the content of strychnine and the toxicity evaluation result by zebrafish embryo experiment. **Conclusion** The result indicated that the zebrafish embryo model was suitable for the toxicity evaluation of Guci Tablets. The effects of two batches of Guci Tablets on zebrafish embryonic development were lethal at high concentrations, and slightly abnormal phenotypes at low concentrations, especially sample B, all of which were reversible.

Key words: Guci Tablets; zebrafish embryo; acute toxicity; qualitative analysis; half of teratogenic dose; half of lethal dose

收稿日期: 2018-03-14

基金项目: 国家十二五“重大新药创制”专项课题(2014ZX09304307-002)

第一作者: 刘 静(1982—), 女, 研究员。Tel: (010)67095150; E-mail: liujing_zsm@126.com

*通信作者: 戴 忠 E-mail: daizhong@nifdc.org.cn; 马双成 E-mail: masc@nifdc.org.cn

骨刺片是由马钱子粉等15味药制成的中药复方制剂,具有散风邪、祛寒湿、舒筋活血、通络止痛的作用,用于颈椎、胸椎、腰椎、跟骨等骨关节增生性疾病,对风湿、类风湿性关节炎有一定疗效。现行标准包括卫生部药品标准中药成方制剂第十七册WS3-B-3290-98、国家食品药品监督管理总局标准WS3-B-3290-98-1、WS3-B-3290-98-2、WS3-B-3290-98-3、WS3-B-3290-2002等^[1-5],各标准检验项目有所不同。由于本品处方中含有制川乌、制草乌、附片和马钱子粉四味毒性药材,其所含主要成分包括单酯型和双酯型乌头碱毒性成分及剧毒化学品的士的宁。此外,处方分析表明,尚含有机酸、黄酮、环烯醚萜苷、皂苷及糖类等多种成分,极性差异大;而现有研究主要围绕柚皮苷、芍药苷等成分展开^[6-8]。因此,有必要开展本品毒性研究,进一步结合化学成分定性分析,从而为其安全性、有效性提供科学的数据支持。

近些年来,斑马鱼作为一种评价药物毒性研究的新模式动物备受关注^[9-11]。一方面是由于斑马鱼与高等脊椎动物人类、小鼠的基因同源性达60%~80%^[12-14],其对药物反应与人类临床反应相似^[15-16];另一方面是由于斑马鱼胚胎透明、发育时间短、数量多,便于光学显微镜直接观察组织器官发育情况^[17-18]。因此,斑马鱼模式动物既具有体外试验高效、快速、经济等优势,又具有体内试验可预测性强等优点。化学成分定性分析方面,随着液质联用技术的发展,其在中药成分分析中应用越来越多,尤其是超高效液相色谱法-四极杆飞行时间-质谱(UPLC-QTOF-MS),可获取化合物及碎片的精确分子量信息,有利于更为准确地鉴定化合物结构。

本试验以斑马鱼胚胎为观察对象,选择标准检验合格但指标成分士的宁含量差异较大的两批样品,通过考察其对斑马鱼胚胎发育的影响及胚胎畸形率、死亡率的检测,来探讨并评价样品安全性;同时,借助UPLC-QTOF-MS的优势,综合色谱的成分分离、质谱的信息分析,对两批骨刺片样品进行定性分析与比较;以期为本品安全性、有效性物质基础提供一定的科学依据。

1 材料

1.1 药品及主要试剂

骨刺片样品2批,骨刺片样品A批号为160801、样品B批号为16022321,来自中国食品药品检定研究院。

甲醇(分析纯,国药化学试剂有限公司);人工海水(反渗透水配制,高级海水晶购于天津中盐海洋生物

科学有限公司);乙腈(色谱纯,美国Thermo Fisher公司);水为超纯水(Millipore纯水机自制)。

1.2 试验动物

试验所用斑马鱼(*Danio rerio*)为野生型TU品系,由北京大学生命科学学院张博教授惠赠,养殖于 $(28.5 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的人工海水中,繁殖方法参照文献进行^[12]。

1.3 主要仪器

Waters超高效液相-飞行时间质谱系统:配有电喷雾离子源(ESI)的Synapt G2质谱系统(美国Waters公司);METTLER XS105型电子分析天平(瑞士Mettler公司);Milli-Q超纯水处理系统(美国Millipore公司);KQ-300DA型数控超声波清洗仪(中国昆山市超声仪器有限公司);奥林巴斯SZ61体式显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 样品的制备

取骨刺片18片,除去包衣,研细,加入70%甲醇溶液25 mL,超声提取30 min(功率300 W,频率40 kHz),过滤,取续滤液1 mL,过0.22 μm 微孔滤膜,即得定性分析用样品。剩余滤液浓缩,蒸干,取适量,以斑马鱼饲养液为溶剂配制母液约50 mg/mL,保存于 -20°C ,即得毒性评价样品。

2.2 UPLC-QTOF-MS定性分析

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Acquity UPLC™ HSS T3(1.7 μm , 2.1 $\times$ 100 mm, Waters公司);流动相为0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min, 5%~15%B; 5~20 min, 15%~25%B; 20~25 min, 25%~35%B; 25~40 min, 35%~60%B; 40~54 min, 60%~95%B),柱温 30°C ,体积流量0.3 mL/min,进样量1 μL 。

2.2.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(ESI);正离子模式:扫描范围 m/z 50~1 000,脱溶剂温度 350°C ,离子喷雾电压3 500 V,脱溶剂氮气600 L/h,雾化气0.2 MPa。负离子模式:扫描范围 m/z 50~1 000,脱溶剂温度 350°C ,离子喷雾电压4 000 V,脱溶剂氮气600 L/h,雾化气0.2 MPa。

2.3 斑马鱼胚胎毒性评价

2.3.1 预试验确定浓度范围 选取早期胚胎,进行多组给药处理,野生型为阴性对照,试验浓度考察情况分别为:(1)骨刺片样品A预试验质量浓度0.000 1、0.001 0、0.005 0、0.010 0、0.050 0、0.066 0、0.080 0、0.100 0、0.200 0、0.300 0、0.500 0、1.000 0、10.000 0 mg/mL;确定试验浓度为0.01、0.05、0.10、0.20、0.30、0.50、1.00 mg/mL。(2)样品B预试验质量浓度0.000

1、0.001 0、0.005 0、0.010 0、0.050 0、0.066 0、0.080 0、0.100 0、0.200 0、0.500 0、1.000 0、1.200 0、2.000 0、10.000 0 mg/mL;确定试验质量浓度:0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、10.00 mg/mL。

2.3.2 表型观察 显微镜下选取正常发育的受精后6 h(6 hpf)左右的胚胎,分为对照组(不加药),骨刺片样品A 0.01、0.05、0.10、0.20、0.30、0.50、1.00 mg/mL组,样品B 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、10.00 mg/mL组,每组30枚,置5 mL玻璃皿中,分别浸入各测试液中,置于标准环境下使之发育,当胚胎发育至第3天(3 dpf)时,换入正常饲养液中继续发育观察直至5 dpf。每天观察记录胚胎发育情况,如脑、眼、心、血流、躯干(脊索/神经管、体节)、胚体生长速度、游动及对刺激的反应能力等(包括统计3 dpf的畸形率、死亡率,即畸形和死亡数/总胚数),直至试验结束。每个浓度测试液平行检测至少3次。

2.3.3 数据处理 畸形率和死亡率以3次试验的 $\bar{x} \pm s$

表示,制作柱状图,采用概率单位法,计算半数致畸剂量(TD₅₀)和半数致死剂量(LD₅₀)。

3 结果

3.1 UPLC-QTOF-MS定性分析

2批骨刺片样品经UPLC-Q-TOF-MS法分析,得到负、正离子模式下总离子流图(图1、2),分析表明,2批样品所含主要成分基本一致,差别在于主要成分含量存在一定差异(两份样品总离子流图中某些色谱峰强度不同)。通过分析负、正离子模式母离子峰及二级质谱得到化合物准确相对分子质量及相对应的碎片峰信息,综合文献调研结果^[19-22]对母离子峰进行归属,结合裂解规律鉴定制剂中化合物20个,见表1。其中负离子模式下鉴定化合物主要为苯丙酸类、黄酮类、单萜苷、环烯醚萜苷及达玛烷型四环三萜苷类成分,主要来自杜仲、骨碎补、桂枝、白芍、马钱子粉、三七等药味;正离子模式下鉴定化合物主要为生物碱类成分,主要来自处方中附片、制川乌、制草乌、

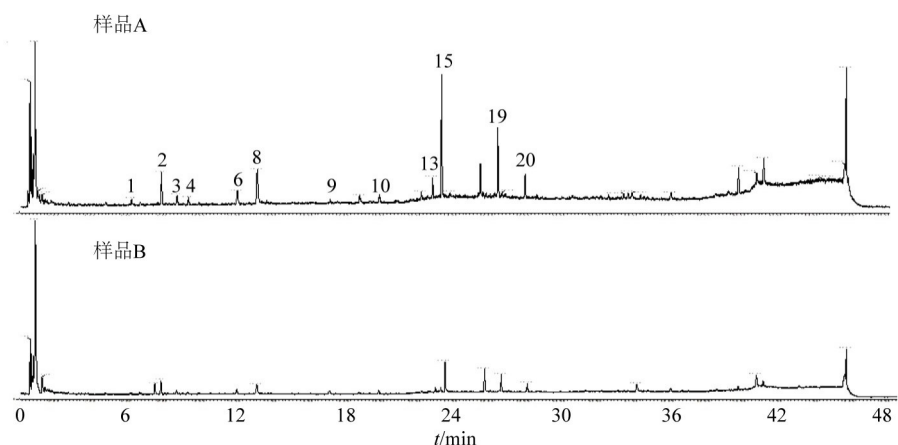


图1 样品UPLC-QTOF-MS负离子模式总离子流图

Fig. 1 UPLC-QTOF-MS total ion chromatograms of samples in negative mode

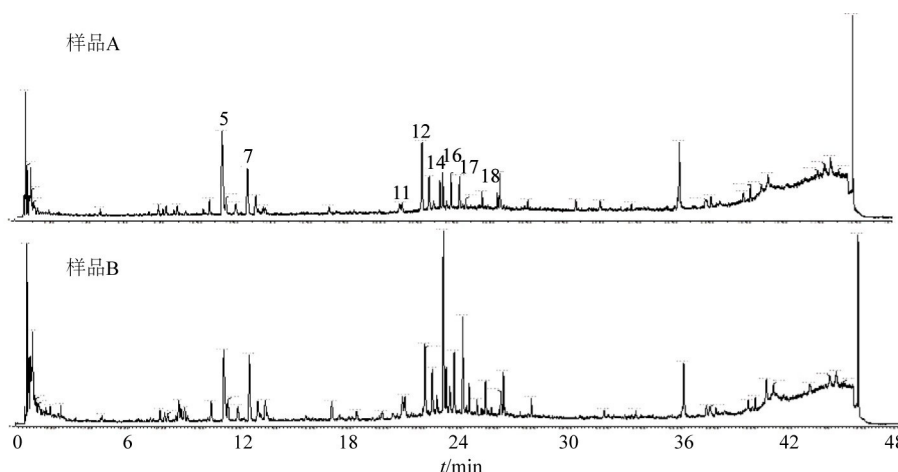


图2 样品UPLC-QTOF-MS正离子模式总离子流图

Fig. 2 UPLC-QTOF-MS total ion chromatograms of samples in positive mode

表1 样品UPLC-QTOF-MS成分分析结果
Table 1 Components analysis result by UPLC-QTOF-MS

编号	t_R /min	成分	分子式	离子模式	分子离子峰	主要碎片峰
1	6.24	新绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	负	353.090 5 $[M-H]^-$	191.054 4, 179.031 1, 174.958 1, 135.043 2
2	7.91	马钱苷酸	$C_{16}H_{24}O_{10}$	负	375.131 2 $[M-H]^-$	213.079 8, 174.958 1
3	8.77	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	负	353.090 5 $[M-H]^-$	191.054 4, 174.958 1, 135.043 2
4	9.40	隐绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	负	353.090 5 $[M-H]^-$	179.031 1, 135.043 2
5	11.37	土的宁	$C_{21}H_{23}N_2O_2$	正	335.174 0 $[M+H]^+$	/
6	12.12	芍药内酯苷	$C_{23}H_{28}O_{11}$	负	525.163 9 $[M+HCOO]^-$	479.157 1, 121.028 1
7	12.76	马钱子碱	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	正	395.195 5 $[M+H]^+$	324.123 8
8	13.22	芍药苷	$C_{23}H_{28}O_{11}$	负	525.163 9 $[M+HCOO]^-$	479.157 1, 449.145 0, 327.103 6, 121.028 1
9	17.27	新北美圣草苷	$C_{26}H_{29}O_{16}$	负	595.162 0 $[M-H]^-$	304.910 0, 174.952 3
10	20.00	柚皮苷	$C_{27}H_{32}O_{14}$	负	579.171 3 $[M-H]^-$	304.910 0, 130.963 4
11	21.21	延胡索乙素	$C_{21}H_{25}NO_4$	正	356.189 5 $[M+H]^+$	192.103 1
12	22.30	苯甲酰新乌头原碱	$C_{31}H_{43}NO_{10}$	正	590.293 6 $[M+H]^+$	540.255 1
13	22.93	三七皂苷R1	$C_{47}H_{80}O_{18}$	负	977.536 0 $[M+HCOO]^-$, 931.526 2 $[M-H]^-$	799.471 7, 637.430 5, 475.378 7
14	23.29	苯甲酰乌头原碱	$C_{32}H_{45}NO_{11}$	正	604.3153 $[M+H]^+$	554.278 7
15	23.43	人参皂苷Rg1	$C_{42}H_{72}O_{14}$	负	845.485 8 $[M+HCOO]^-$, 799.484 1 $[M-H]^-$	637.430 5, 475.378 7
16	23.89	苯甲酰次乌头原碱	$C_{31}H_{43}NO_9$	正	574.301 6 $[M+H]^+$	542.275 0
17	24.35	脱氢紫堇碱	$C_{22}H_{24}NO_4$	正	366.172 5 $[M+H]^+$	/
18	26.43	次乌头碱	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	正	616.311 7 $[M+H]^+$	556.293 9, 524.271 1
19	26.54	人参皂苷Re	$C_{48}H_{82}O_{18}$	负	945.535 0 $[M-H]^-$	783.486 3, 621.422 1, 576.294 9, 553.295 1
20	28.06	人参皂苷Rd	$C_{48}H_{82}O_{18}$	负	945.548 4 $[M-H]^-$	783.486 3, 621.422 1, 459.375 0

马钱子粉及延胡索(制)药味。

3.2 斑马鱼胚胎毒性评价

3.2.1 骨刺片对斑马鱼胚胎发育影响的观测 以在斑马鱼饲养液中发育的胚胎为对照组,在体式光学显微镜下于24、48、72、96和120 hpf时间点观察给药后胚胎的发育情况与形态变化并详细记录。结果显示,样品A、B对斑马鱼胚胎发育的影响相似,主要表现为高浓度下的致死作用,低浓度下主要以发育滞后表型为主;但二者作用浓度存在一定差异。

样品A质量浓度低于0.3 mg/mL时,斑马鱼胚胎主要表现为发育滞后表型,在3 dpf时,少数胚胎孵化后体轴轻度弯曲,头部和眼睛比正常斑马鱼略小,腹部和卵黄囊延伸结构呈现类似48 hpf形态;在5 dpf时,未见鱼鳔发育,幼体侧卧或斜位静止,但触及反

应正常。质量浓度为0.3 mg/mL组胚胎在给药24 h出现大量死亡,存活胚胎均严重畸形:体轴短而弯、头部和眼变小,体表颜色浅,总主静脉淤血,心脏小而畸形,无血色;多数胚胎不能孵化,结果见图3。

样品B质量浓度低于0.5 mg/mL时以造成斑马鱼胚胎发育滞后为主,少数胚胎孵化后体轴轻度弯曲,头部和眼睛比正常斑马鱼略小,在5 dpf时,未见鱼鳔发育,幼体侧卧或斜位静止,但触及反应正常。质量浓度为0.5 mg/mL时,出现少数胚胎死亡现象;存活的部分胚胎出现中度畸形:体轴较短、头部和眼变小,总主静脉淤血,心脏无血色。质量浓度为2 mg/mL时,胚胎畸形类似于样品A质量浓度0.3 mg/mL组,死亡数目明显升高。浓度为10 mg/mL时,斑马鱼胚胎在给药48 h内全部死亡。结果见图3。

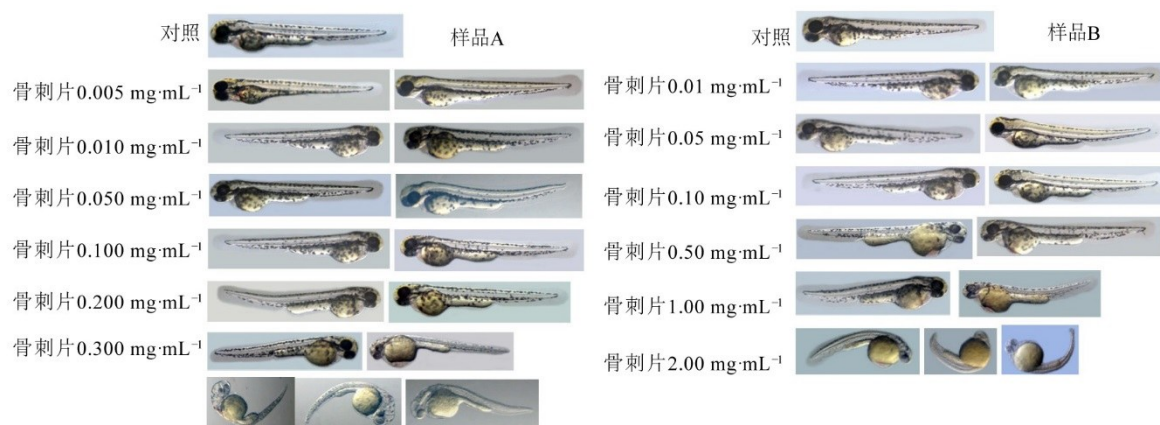


图3 骨刺片样品导致斑马鱼胚胎发育异常的表型(3 dpf)

Fig. 3 Phenotypes of abnormal development of zebrafish embryos caused by GuciTablets (3 dpf)

3.2.2 数据分析 样品A质量浓度低于0.3 mg/mL时,死亡率较低;当达到0.3 mg/mL及以上浓度时,死亡率急剧升高,0.5 mg/mL组的斑马鱼胚胎在给药的24 h内全部死亡。将畸形率和死亡率加合,样品A的 TD_{50} 为0.225 4 mg/mL, LD_{50} 为0.292 mg/mL。样品B

mg/mL, LD_{50} 为1.382 mg/mL。结果见图4、5。

4 讨论

样品前处理考察了70%甲醇、甲醇超声提取等条件,经HPLC-DAD-ELSD检测分析,结果表明,70%甲醇提取物色谱峰信息最为丰富,能够更好地反映样品中可溶性成分信息。UPLC-QTOF-MS定性分析结果显示,骨刺片2批样品所含主要化学成分基本一致,但其毒性表现差异较大,主要是由于某些成

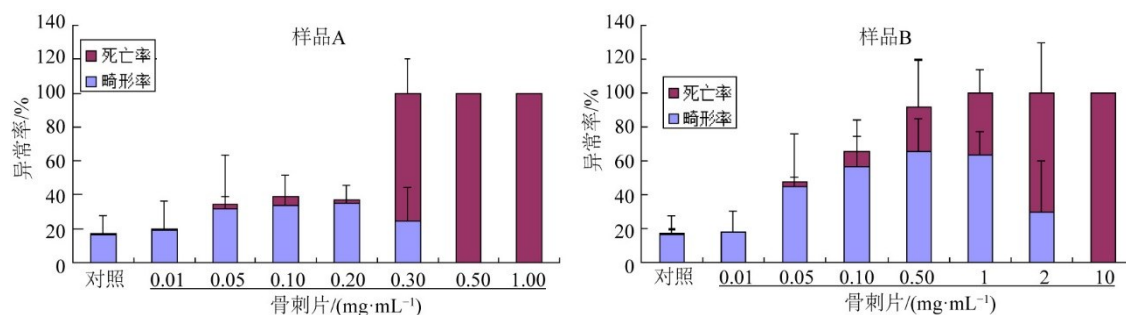
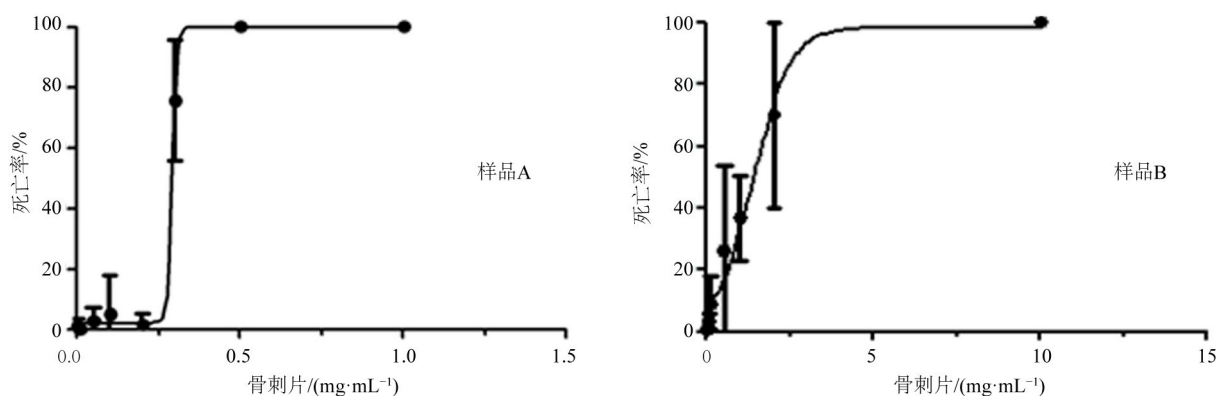


图4 骨刺片导致斑马鱼胚胎发育异常的统计图(3 dpf)

Fig. 4 Statistical chart of zebrafish embryos abnormal development caused by GuciTablets (3 dpf)

图5 骨刺片导致斑马鱼胚胎的死亡率(3 dpf)(样品A LD_{50} 0.292 $mg \cdot g^{-1}$; 样品B LD_{50} 1.382 $mg \cdot g^{-1}$)Fig. 5 Death rate of zebrafish embryos caused by GuciTablets (3 dpf) (sample A LD_{50} 0.292 $mg \cdot g^{-1}$; sample B LD_{50} 1.382 $mg \cdot g^{-1}$)

分,特别是具有毒性作用的成分含量存在一定差异;以本品含量测定指标成分士的宁为例,它既是有效成分也是毒性成分,按标准检验其在样品A、B中质量分数分别为0.57、0.17 mg/g。

斑马鱼胚胎急性毒性评价结果表明,两批骨刺片样品对斑马鱼胚胎发育的影响较为相似,都主要表现为高浓度下的致死作用和低浓度下的发育滞后;但二者作用浓度存在一定差异。样品急性毒性作用以LD₅₀来量度,样品A、B LD₅₀分别为0.292、1.382 mg/mL。与此同时,试验过程中发现样品在低浓度时,特别是样品B主要表现为轻度非正常表型,但均可逆、可恢复,试验重复多次结果均一致,经统计计算二者TD₅₀分别为0.225 4、0.060 3 mg/mL,引起该现象的原因仍有待继续深入,初步分析可能由于某些成分不同和/或含量差异所致。此外,分析还显示,样品急性毒性与其中士的宁含量呈正相关性;由于样品定性分析鉴定尚含有单酯型乌头碱及个别双酯型乌头碱类毒性成分,而且制剂所含成分种类复杂多样,影响斑马鱼胚胎发育的具体成分还有待进一步深入研究。

斑马鱼胚胎模型可用于评价骨刺片样品急性毒性,此外,鉴于两批骨刺片样品对斑马鱼胚胎发育影响均表现为高浓度下的致死作用,因此建议着重强调孕妇忌服的注意事项,以更好地保障用药安全性。

参考文献

- [1] 卫生部药品标准中药成方制剂第十七册 WS3-B-3290-98 [S]. 1998.
- [2] 国家食品药品监督管理局标准 WS3-B-3290-2002 [S]. 2002.
- [3] 国家食品药品监督管理局标准 WS3-B-3290-98-1 [S]. 2014.
- [4] 国家食品药品监督管理局标准 WS3-B-3290-98-2 [S]. 2014.
- [5] 国家食品药品监督管理局标准 WS3-B-3290-98-3 [S]. 2014.
- [6] 张舒,袁晓芳,张艳.HPLC法测定骨刺片中柚皮苷、芍药苷的含量[J]. 广州化工, 2015, 43(16): 140-142.
- [7] 曹玲,冯有龙,王亚超,等.骨刺片的质量标准研究[J]. 中国药品标准, 2011, 12(3): 191-195.
- [8] 袁晓芳,张舒.骨刺片制剂的HPLC指纹图谱[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(4): 314-317.
- [9] 梁爱华.斑马鱼-一种可用于中药药效和毒性筛选的鱼类模型[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2839.
- [10] 郭隽,耿兴超,汪巨峰.药物发育毒性体外替代方法研究进展及组合策略[J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 345-349.
- [11] 佟军威,张靖溥,孟杰.17 α -乙炔雌二醇对斑马鱼胚胎发育的致畸作用及其基因靶位[J]. 药理学学报, 2011, 46(1): 50-55.
- [12] 胡占英,张靖溥.长春新碱对斑马鱼神经发育和行为的影响[J]. 毒理学杂志, 2014, 28(12): 98-103.
- [13] Rinkwitz S, Mourrain P, Becker T S. Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences [J]. Prog Neurobiol, 2011, 93(2): 231-243.
- [14] De Esch C, Sliker R, Wolterbeek A, et al. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review [J]. Neurotoxicol Teratol, 2012, 34(6): 545-553.
- [15] Mittelstadt S W, Hemenway C L, Craig M P, et al. Evaluation of zebrafish embryos as a model for assessing inhibition of hERG [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2008, 57(2): 100-105.
- [16] Zhu J J, Xu Y Q, He J H, et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish [J]. Appl Toxicol, 2014, 34 (2): 139-148.
- [17] 张勇,郭胜亚,邓中平,等.斑马鱼在中药毒性靶器官研究中的进展[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(12): 1343-1347.
- [18] 许冰洁,张立将,李春启,等.斑马鱼胚胎评价5种药物的发育毒性与模型验证[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(1): 74-79.
- [19] 汪艳平,戴德雄,谢媛媛,等.骨刺胶囊HPLC指纹图谱[J]. 中成药, 2016, 38(1): 98-103.
- [20] 赵静,秦振娴,彭冰,等.基于UPLC-Q-TOF MS技术的三七中皂苷类成分质谱裂解规律研究[J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 97-108.
- [21] 赵何峰,王永林,郑林,等.UPLC-PDA-ESI-MS分析杜仲中化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 59-62.
- [22] Yang Y, Yin X J, Guo H M, et al. Identification and comparative analysis of the major chemical constituents in the extracts of single Fuzi herb and Fuzi-Gancaohe-pair by UPLC-IT-TOF/MS [J]. Chin J Nat Med, 2014, 12(7): 542-553.