

# 水飞蓟宾微量元素配合物的合成及其抗菌抗肿瘤活性研究

刘衍季<sup>1</sup>, 涂丽华<sup>1</sup>, 虞佳<sup>2\*</sup>, 李瑾<sup>1</sup>, 余卫强<sup>1</sup>, 张莉萍<sup>1</sup>, 王晓英<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南昌市卫生学校, 南昌 330006; <sup>2</sup>南昌大学第三附属医院, 南昌 330008

**摘要:**合成水飞蓟宾钙、铁、锌、硒、铬、钴配合物6个中药新药,采用IR、UV、LC-MS、EDTA络合滴定和元素分析仪表征配合物化学结构,结果显示合成的配合物配位比为2:1(水飞蓟宾:微量元素),且小鼠急性毒性实验显示6个配合物均无明显毒性。采用倍比稀释法测定配合物对枯草杆菌等9种致病菌的抑制活性,发现其最小抑菌浓度MIC均低于水飞蓟宾,抗菌活性提升至2~4倍;采用MTT法测定配合物对5株肿瘤细胞增殖的影响,发现其半数抑制浓度IC<sub>50</sub>均小于水飞蓟宾,抗肿瘤活性提升至1.11~1.53倍。综上,水飞蓟宾与微量元素形成配合物后,其抗菌及抗肿瘤活性均增强。

**关键词:**水飞蓟宾;微量元素;配合物;抗菌;抗肿瘤

中图分类号:R284.3; R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)9-1576-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.9.016

## Synthesis of silybin complexes with trace elements and their anti-bacterial and anti-tumor activities

LIU Yan-ji<sup>1</sup>, TU Li-hua<sup>1</sup>, YU Jia<sup>2\*</sup>, LI Jin<sup>1</sup>, YU Wei-qiang<sup>1</sup>, ZHANG Li-ping<sup>1</sup>, WANG Xiao-ying<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nanchang Health School, Nanchang 330006, China;

<sup>2</sup>Third Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330008, China

**Abstract:** Six new Chinese medicine complexes of silybin calcium, iron, zinc, selenium, cobalt and chromium were synthesized and characterized by IR, UV, LC-MS, EDTA complexometric titration and elemental analysis. The results showed that coordination ratios of these six silybin complexes were 2:1 (silybin ratio to trace elements). The safety of complexes was evaluated by acute toxicity test on mice, and found that no obvious toxicity of these complexes *in vivo*. Furthermore, the anti-bacterial and anti-tumor activities were determined respectively by double dilution method and MTT assay. For the anti-bacterial assay, nine types of bacteria were used in this experiment and the minimum inhibitory concentration (MIC) were determined. The results showed that the anti-bacterial effect of silybin was increased to 2 to 4 times after reaction with the six trace elements. For the anti-tumor assay, experiments were carried out in 5 types of cancer cells and the half inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the six complexes was determined. The results showed that the anti-tumor effect of these complexes was increased to 1.11-1.53 times compared with that of Silybin. In conclusion, the anti-bacterial and anti-tumor activities of silybin are elevated after the formation of complexes with the trace elements.

**Key words:** silybin; trace elements; complex; antibiosis; antitumor

在天然化合物中,黄酮类化合物是一类使用广泛且具有多种药理活性的重要中药有效成分,该类化合物结构中普遍在相邻部位同时含有羟基和羰基,从而可与具有空轨道的微量元素发生配位化学反应,反应生成的配合物药理活性比配体普遍增

强<sup>[1-4]</sup>。水飞蓟宾为菊科植物水飞蓟果实中提取分离得到的一种黄酮类化合物,具有明显的保护和稳定肝细胞膜的作用,可以改善肝功能,产生降酶效果,许多研究发现,水飞蓟宾还有其他许多广泛的药理作用,如抗菌、抗肿瘤、抗肝炎(含病毒性、药物性、酒精性等各类肝炎)、抗氧化、改善学习记忆能力、治疗阿尔茨海默病等多种生物活性<sup>[5-9]</sup>。钙、铁、锌、硒、铬、钴是人体重要的微量元素,在人体内发挥重要生理作用。目前尚未有水飞蓟宾与钙、铁、锌、

硒、钴、铬等微量元素反应所得新配合物的研究,本文通过合成水飞蓟宾与钙、铁、锌、硒、钴、铬的配合物,并研究其抗肿瘤、抗菌活性,从而获得中药有效成分与各种重要微量元素能有机结合的新型药物。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂及实验动物

水飞蓟宾(中国食品药品检定研究院,批号:110856-201506,含量为96.3%)。氯化钙、氯化铁、氯化锌、二氧化硒、氯化铬、氯化钴(天津市化学试剂四厂,分析纯),NaOH(分析纯),EDTA(分析纯);胎牛血清(Gibco公司);胰蛋白酶(Amresco公司)。清洁级昆明系健康小鼠,6~7周龄,体重 $20 \pm 2$  g,雌雄各半,SPF级,由南昌大学动物实验中心提供(小鼠合格许可证号为赣动KM96021),每笼饲养8只,自由饮水和摄取食物,12 h光照。饲养的环境温度为18~22℃,环境相对湿度45%~65%。

### 1.2 实验仪器及耗材

电动恒温磁力搅拌器(杭州仪表电器厂);AV-ATAR370FT-IR型傅立叶变换红外光谱仪(天津市拓普仪器有限公司);U-3010紫外可见分光光度计(日本Hitachi公司);Carlo Erba 1106元素分析测试仪(意大利);Finnigan LCQ质谱仪(美国热电公司);CO<sub>2</sub>恒温培养箱(三洋公司);96孔细胞培养板(美国Sigma公司);酶标仪(奥地利TECAN公司);超净工作台(苏州净化设备厂)。

## 1.3 方法

### 1.3.1 水飞蓟宾配合物的合成及结构表征

将0.2 g水飞蓟宾按摩尔比1:1加入1%的氢氧化钠溶液,充分反应25 min。将氯化钙(或氯化铁、氯化锌、氯氧化硒、氯化铬、氯化钴)溶于水中。按摩尔比[n(水飞蓟宾):n(微量元素)=2:1]将氯化钙(或氯化铁、氯化锌、氯氧化硒、氯化铬、氯化钴)水溶液分别加入上述水飞蓟宾钠盐溶液中,在70℃下充分反应35 min,趁热过滤,分别得淡红色、黑色、砖红色、棕褐色、橙色、棕黄色沉淀,所得沉淀用乙醇和水分别洗涤数遍,于恒温烘箱中60℃下烘干。所得6个产物均分别用EDTA络合滴定法、Infra-red、UV、LC-MS、元素分析仪等进行结构表征。

### 1.3.2 水飞蓟宾及其配合物急性毒性实验

将水飞蓟宾及6个水飞蓟宾配合物溶于0.2%氢氧化钠溶液中,配置为30%水飞蓟宾及水飞蓟宾配合物溶液,按规定的最大耐受剂量法<sup>[10]</sup>每只小鼠按5 g/kg灌胃给药,持续观察两周,详细记录小鼠

活动及死亡情况。

### 1.3.3 水飞蓟宾及水飞蓟宾配合物的抗菌实验

水飞蓟宾及水飞蓟宾配合物使用0.2%氢氧化钠溶解,溶液pH值调节在7左右。使用划线法将枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、屎肠球菌、粪肠球菌、沙门氏菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌取得单个菌落于适合的培养基进行培养,菌悬液浓度为 $2 \times 10^5$ 个/mL,将水飞蓟宾及水飞蓟宾配合物分别采用倍比稀释法稀释为7个浓度(分别为400、200、100、50、25、12.5、6.25 μg/mL),每个浓度均为5个复孔,每个孔中加入等浓度等量的菌悬液,上述实验的细菌在培养箱中37℃培养24 h,上述实验的真菌在培养箱中30℃培养48 h后,观察各孔是否透明,对应化合物溶液最小浓度的透明的孔即为该化合物的最小抑菌浓度MIC。

### 1.3.4 水飞蓟宾及水飞蓟宾配合物体外抗肿瘤实验

取处于对数生长期的5种肿瘤细胞(HepG2、MGC803、A549、Tca8113、TPC1),用RPMI-1640培养基(胎牛血清含量为10%)配置浓度为 $1 \times 10^4$ 个/mL,将上述肿瘤细胞接种于96孔板内,每孔为100 μL,在37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养24 h。吸出并更换新的培养基,再加入6个浓度(分别为10、20、40、80、160、320 μmol/L)的水飞蓟宾及水飞蓟宾配合物,每个孔量为100 μL,每个浓度均设置5个复孔,空白实验组仅加入培养基。放置在培养箱中继续培养48 h之后,每孔再加入MTT继续培养4 h,培养结束后弃上清液并加入DMSO,振荡后放置于酶标仪内在570 nm处测定吸光度值。以仅加溶剂的肿瘤细胞为对照实验组,数据取5个复孔平均值,按公式:抑制率=(1-实验组A值/对照组A值)×100%计算各化合物对肿瘤细胞抑制率。

## 2 结果与分析

### 2.1 水飞蓟宾配合物产量及产率

结果见表1。

### 2.2 水飞蓟宾配合物的结构表征结果

#### 2.2.1 紫外光谱数据结果与分析

由表2可知,水飞蓟宾最大吸收峰为288 nm,水飞蓟宾分子中苯环上的双键共轭体系的π→π\*跃迁和苯环的振动相重叠所产生,为B带。而水飞蓟宾与微量元素形成配合物后,配合物B吸收带相比水飞蓟宾B吸收带(288 nm)红移了8~9 nm,一方面是因为由于水飞蓟宾与微量元素形成配位共价键后,正价态的微量元素离子有一定的吸电子能力

表 1 水飞蓟宾配合物产量及产率

Table 1 The yield and productivity of silybin complexes

化合物 Compound	钙配合物 Ca-complex	铁配合物 Fe-complex	锌配合物 Zn-complex	硒配合物 Se-complex	铬配合物 Cr-complex	钴配合物 Co-complex
产量 Yield(g)	0.187 0	0.207 7	0.183 9	0.175 5	0.190 0	0.180 9
产率 Productivity(%)	89.96	98.36	86.31	81.23	90.32	85.43

导致整个分子中电子的离域程度增大,使电子跃迁所需的激发能减小,可导致B吸收带红移;另一方面,水飞蓟宾与微量元素形成配合物后,分子的共平面性增强,使得电子跃迁的能量降低,从而使B吸

收带红移。因此,上述结果说明水飞蓟宾与微量元素发生了反应,形成了配位共价键,且与微量元素发生反应形成配位键的位置之一是水飞蓟宾分子中吡喃环上的4位碳氧双键。

表 2 水飞蓟宾及水飞蓟宾配合物紫外吸收峰

Table 2 The ultraviolet absorption peak of silybin and its complexes

化合物 Compound	水飞蓟宾 Silybin	钙配合物 Ca-complex	铁配合物 Fe-complex	锌配合物 Zn-complex	硒配合物 Se-complex	铬配合物 Cr-complex	钴配合物 Co-complex
最大吸收波长 Maximum absorption wavelength(nm)	288	296	296	297	296	296	297

## 2.2.2 红外光谱结果与分析

由表3可知,水飞蓟宾分子中吡喃环上4位碳氧双键(C=O)的伸缩振动峰为1 641.16 cm<sup>-1</sup>,6个水飞蓟宾配合物的4位碳氧双键(C=O)吸收峰相对水飞蓟宾红移了约40 cm<sup>-1</sup>,导致红移的原因是4

位碳氧双键(C=O)上氧的孤对电子与钙、铁、锌、硒、铬和钴微量元素的空轨道形成配位键,导致碳氧双键(C=O)上的电子云密度降低,从而使力常数变小发生吸收峰红移现象。可见水飞蓟宾与微量元素形成配位共价键的部位之一是4位碳氧双键(C=O)。

表 3 水飞蓟宾及水飞蓟宾配合物主要基团红外光谱数据

Table 3 The infrared data of main group of silybin and its complexes

化合物 Compound	$\nu(4-C=O)$ (cm <sup>-1</sup> )	$\nu(5-O-H)$ (cm <sup>-1</sup> )	$\nu(5-C-O)$ (cm <sup>-1</sup> )
水飞蓟宾 Silybin	1 641.16	3 401.96 cm <sup>-1</sup>	1 279.22
钙配合物 Ca-complex	1 600.93	3 343.26	1 270.17
铁配合物 Fe-complex	1 601.09	3 343.17	1 269.96
锌配合物 Zn-complex	1 600.85	3 342.98	1 270.25
硒配合物 Se-complex	1 600.91	3 343.06	1 270.11
钴配合物 Co-complex	1 601.15	3 342.93	1 269.89
铬配合物 Cr-complex	1 601.19	3 343.10	1 270.06

水飞蓟宾4位碳氧双键(C=O)与5位羟基可缔合为分子内氢键,其伸缩振动峰为3 401.96 cm<sup>-1</sup>,6个配合物该处的伸缩振动峰水飞蓟宾红移了约59 cm<sup>-1</sup>,这是因为在微量元素与水飞蓟宾的5位羟基形成配位键时,由于微量元素带有正电荷,其较强的吸电子倾向,使分子中的电子云向微量元素方向移动所致。可见水飞蓟宾5位羟基与微量元素发生反

应形成了配位共价键。

水飞蓟宾5位C的C-O伸缩键为1 279.22 cm<sup>-1</sup>,水飞蓟宾配合物在该处的吸收峰红移了约9 cm<sup>-1</sup>,说明水飞蓟宾5位的C-O键上的氧与微量元素发生了反应,带正电的微量元素对C-O键氧的电子离域作用导致该键吸收峰发生了红移。

### 2.2.3 质谱结果与分析

由表4可知,水飞蓟宾ESI-MS  $m/z$ 为480.7,为水飞蓟宾的分子量。6个配合物的ESI-MS  $m/z$ 分别为1 000.8、1 016.6、1 025.9、1 039.8、1 019.6、1

012.7,可见所有配合物的分子离子峰均为2倍的水飞蓟宾的分子量加上微量元素的分子量,所以水飞蓟宾配合物由(水飞蓟宾 $\times 2 +$ 微量元素)组成。

表4 水飞蓟宾及水飞蓟宾配合物的分子离子峰和碎片离子峰数据

Table 4 The molecular ion peaks and fragment ion peaks of silybin and its complexes

化合物 Compound	$m/z$
水飞蓟宾 Silybin	480.7, 462.7, 452.7, 300.6
钙配合物 Ca-complex	1 000.8, 480.6, 462.7, 452.7, 300.8
铁配合物 Fe-complex	1 016.6, 480.7, 462.6, 452.7, 300.7
锌配合物 Zn-complex	1 025.9, 480.7, 462.9, 452.9, 300.9
硒配合物 Se-complex	1 039.8, 480.9, 462.8, 452.7, 300.9
钴配合物 Cr-complex	1 019.6, 480.7, 462.7, 452.7, 300.6
铬配合物 Co-complex	1 012.7, 480.6, 462.6, 452.7, 300.7

### 2.2.4 元素分析结果与分析

表5 水飞蓟宾及水飞蓟宾配合物的元素分析数据

Table 5 The elemental analysis data of silybin and its complexes

元素 Element	数值 Numerical value	钙配合物 Ca-complex	铁配合物 Fe-complex	锌配合物 Zn-complex	硒配合物 Se-complex	铬配合物 Cr-complex	钴配合物 Co-complex
C	实测值 Measured value	59.96%	58.79%	58.33%	57.76%	59.12%	58.84%
	理论值 Theoretical value	59.88%	58.94%	58.42%	57.64%	59.17%	58.77%
H	实测值 Measured value	4.21%	4.19%	4.06%	4.05%	4.10%	4.16%
	理论值 Theoretical value	4.19%	4.13%	4.09%	4.03%	4.14%	4.11%
O	实测值 Measured value	31.91%	31.49%	31.21%	30.68%	31.62%	31.30%
	理论值 Theoretical value	31.94%	31.43%	31.16%	30.74%	31.56%	31.34%
微量元素 Trace element	实测值 Measured value	3.92%	5.53%	6.40%	7.51%	5.16%	5.70%
	理论值 Theoretical value	3.99%	5.50%	6.33%	7.59%	5.13%	5.78%
配合物化学式 Chemical formula of complexes		$(C_{25}H_{21}O_{10})_2Ca(C_{25}H_{21}O_{10})_2Fe(C_{25}H_{21}O_{10})_2Zn(C_{25}H_{21}O_{10})_2Se(C_{25}H_{21}O_{10})_2Cr(C_{25}H_{21}O_{10})_2Co$					

注:表中理论值为两分子水飞蓟宾络合一分子微量元素所得化合物的各元素占化合物的百分率数值。

Note: The theoretical value in the table is the percentage of each element in the compound obtained by complexation of two molecules of silybin with one molecule of microelement.

根据元素分析数据、质谱结果以及红外结果4

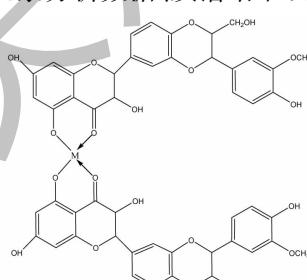


图1 水飞蓟宾-M配合物可能的化学结构

Fig. 1 The possible chemical structures of silybin-M complexes

注:M=Ca、Fe、Zn、Se、Cr、Co。

位碳氧双键( $C=O$ )和5位羟基与微量元素发生配位反应,可知水飞蓟宾-钙、铁、锌、硒、铬、钴6个微量元素配合物可能的化学结构如图1所示。

### 2.2.5 水飞蓟宾及其配合物急性毒性实验结果与分析

灌胃给药后,所有小鼠活动均稍微减弱,短时间内得到恢复,两周后,未观察到有中毒反应,所有小鼠均未出现死亡,生长良好,表明水飞蓟宾配合物对小鼠灌胃  $LD_{50} > 5 g/kg$ 。根据急性毒性( $LD_{50}$ )剂量分级<sup>[10]</sup>,水飞蓟宾及其配合物经口给药属实际无毒范围。

### 2.2.6 水飞蓟宾及其配合物的抗菌和抗肿瘤实验结果与分析

水飞蓟宾及水飞蓟宾配合物对革兰氏阳性菌(枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、屎肠球菌、粪肠球菌)、革兰氏阴性菌(沙门氏菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌)、真菌(白色念珠菌)均具有一定抑制作用,表明配合物为广谱抗菌化合物;抗菌数据

显示水飞蓟宾配合物抗菌活性均显著强于水飞蓟宾,针对9种菌,水飞蓟宾配合物的抗菌活性是水飞蓟宾的2~4倍(表6)。水飞蓟宾配合物对HepG2、MGC803、A549、Tca8113、TPC1共5种肿瘤细胞均具有抑制作用,配合物抗肿瘤活性是水飞蓟宾的1.11~1.53倍(表7)。水飞蓟宾配合物体内的抗肿瘤抗菌作用机制还需进一步深入研究。

表6 水飞蓟宾及其配合物的抑菌活性(MIC)

Table 6 The antibacterial activity of silybin and its complexes (MIC)

菌种 Strain	MIC(μg/mL)						
	水飞蓟宾 Silybin	钙配合物 Ca-complex	铁配合物 Fe-complex	锌配合物 Zn-complex	硒配合物 Se-complex	铬配合物 Cr-complex	钴配合物 Co-complex
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	400	200	200	100	200	200	100
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	400	200	200	100	200	200	200
表皮葡萄球菌 <i>S. epidermidis</i>	50	25	25	25	25	25	25
屎肠球菌 <i>E. faecium</i>	400	200	100	200	200	200	200
粪肠球菌 <i>E. faecalis</i>	400	200	200	200	200	200	200
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	>400	400	400	400	400	400	400
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	>400	200	400	200	400	400	400
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	>400	400	400	200	400	200	400
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	>400	400	200	400	400	400	400

表7 水飞蓟宾及其配合物的抗肿瘤活性

Table 7 The antineoplastic activity of silybin and its complexes

肿瘤细胞 Tumor cell	IC <sub>50</sub> (μmol/L)						
	水飞蓟宾 Silybin	钙配合物 Ca-complex	铁配合物 Fe-complex	锌配合物 Zn-complex	硒配合物 Se-complex	铬配合物 Cr-complex	钴配合物 Co-complex
HepG2	36.6	32.3	30.9	28.3	26.1	29.6	27.3
MGC803	223.6	186.9	192.3	170.1	164.6	190.9	180.7
A549	122.1	103.2	109.6	105.7	100.1	108.1	106.9
Tca8113	112.6	93.6	94.9	87.3	73.6	97.7	86.5
TPC1	39.2	31.5	33.6	34.3	26.9	28.5	30.6

### 3 结论

本实验所合成的6个水飞蓟宾配合物(钙、铁、锌、硒、铬、钴)均为未见报道的首次合成的新化合

物。

水飞蓟宾是一类重要的中药有效成分,具有抗菌、抗肿瘤、抗炎等多种药理活性,其与微量元素发

生配合反应后抗菌抗肿瘤活性增强,可能是由于理化性质如化学键类型、氧化还原电位、表面张力、电子分布及分子立体构象变化导致的,这些理化性质的变化可能使配合物的立体结构更贴合肿瘤或细菌细胞上的受体或靶点的构象,从而产生特异性结合使药效增强。此外钙、铁、锌、硒、铬、钴等微量元素也具有广泛的药用价值,在人体生理功能中发挥重要作用,而多数中药中本身也含有十分丰富的微量元素<sup>[11]</sup>,根据“中药有效化学成分的配位学学说<sup>[12]</sup>”,中药有效成分与金属离子络合之后,中药有效成分与金属离子二者有机结合而发挥协同作用,这或许也是水飞蓟宾与微量元素配合物抗肿瘤抗菌活性强于水飞蓟宾的原因。可见中药有效成分与无机盐离子生成配合物有望成为开发中药新药的新思路,有必要不断深入探索研究。

## 参考文献

- 1 Dimitrić Marković JM, Amić D, Lučić B, et al. Oxidation of kaempferol and its iron (Ⅲ) complex by DPPH radicals: spectroscopic and theoretical study [J]. Monatsh Chem, 2014, 145:557-563.
- 2 Wang YN, Zhang K, Jiang Q, et al. Study on synthesis and anti-inflammatory activity of coordination compound of puerarin-germanium[J]. J Harbin Univ Commer(Nat Sci(哈尔滨商业大学学报:自科版)), 2015, 31:149-152.
- 3 Lin JY, Lu X. Free radical scavenging and antibacterial activities of rutin-rare earth samarium complex[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2013, 25:1334-1338.
- 4 Ikeda NE, Novak EM, Maria DA, et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of rutin-zinc(Ⅱ) flavonoid-metal complex[J]. Chem Biol Interact, 2015, 239:184-191.
- 5 Tyagi A, Agarwal C, Dwyer-Nield LD, et al. Silibinin modulates TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  mediated signaling to regulate COX2 and iNOS expression in tumorigenic mouse lung epithelial LM2 cells[J]. Mol Carcinog, 2012, 51:832-842.
- 6 Bosch-Barrera J, Sais E, Cañete N, et al. Response of brain metastasis from lung cancer patients to an oral nutraceutical product containing silibinin[J]. Oncotarget, 2016, 7:32006-32014.
- 7 Trouillas P, Marsal P, Svobodová A, et al. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study[J]. J Phys Chem A, 2008, 112:1054-1063.
- 8 Lu P, Mamiya T, Lu LL, et al. Silibinin attenuates amyloid  $\beta_{25-35}$  peptide-induced memory impairments: implication of inducible nitric-oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  in mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 331:319-326.
- 9 Lin CJ, Sukarieh R, Pelletier J. Silibinin inhibits translation initiation: implications for anticancer therapy[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8:1606-1612.
- 10 Ministry of Health, PRC, China National Standardization Management Committee. GB15193.3. Acute Toxicity Test of National Standards of the People's Republic of China(中华人民共和国国家标准急性毒性试验)[S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003:17-31.
- 11 Yang Y, Zhang XF, Jiang H, et al. Assay of flavonoids and trace elements in *V. yedoensis* Makino from different habitats [J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2016, 36: 342-346.
- 12 Li YH, Lu XY, Liu X, et al. Research advances in coordination chemistry of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31:1309-1313.