

基于细胞萃取及分子对接的淫羊藿中 雌激素样作用成分分析

杨珍, 王媛, 张艳军, 李爱主, 田梦, 范思邈, 杨坤坤, 李遇伯*
(天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的:利用 T47D 细胞/液质联用及分子对接筛选淫羊藿中具有雌激素样作用的成分。方法:采用溶有淫羊藿提取物的培养基培养 T47D 细胞,具有雌激素样作用的成分选择性地与 T47D 细胞结合,培养一定时间后,清洗并破碎细胞,释放出与其结合的成分,最后利用液质联用技术进行分析鉴定。对于鉴定出的可与细胞结合的成分,采用分子对接的方法研究其与雌激素受体的相互作用。结果:初步检测出淫羊藿中可与 T47D 细胞结合的 7 个成分,分别为淫羊藿苷,朝藿定 B,宝藿苷-II,淫羊藿次苷-I,宝藿苷-I,朝藿苷甲,脱水淫羊藿素,其中宝藿苷-II,脱水淫羊藿素可与雌激素受体发生相互作用。结论:宝藿苷-II,脱水淫羊藿素可与 T47D 细胞结合,且均可与 2 种雌激素受体发生作用,提示两者可能具有雌激素样作用。

[关键词] 细胞萃取; 分子对接; 淫羊藿; 雌激素样作用

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)20-0062-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016200062

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1050.024.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 10:50

Compounds with Estrogen-like Effects from Epimedii Folium Based on Cell Sorption and Molecular Docking

YANG Zhen, WANG Yuan, ZHANG Yan-jun, LI Ai-zhu, TIAN Meng,
FAN Si-miao, YANG Shen-shen, LI Yu-bo*
(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To screen out compounds with estrogen-like effects from Epimedii Folium by liquid chromatography/mass spectrometry technology and molecular docking for breast cancer T47D cell. **Method:** The T47D cells were cultured by medium with Epimedii Folium extract, and the compounds with estrogen-like effects selectively bound with the cells. After culturing for a certain period of time, T47D cells were cleaned and broken to release the binding compounds. Then high performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC-TOF/MS) technology was used to identify the binding compounds. After that, molecular docking was used to study the interactions between the identified binding compounds and estrogen receptors. **Result:** Seven compounds from Epimedii Folium were identified preliminarily, namely icariin, epimedin B, baohuoside-II, icariin-I, baohuoside-I, korepimidoside A and anhydroicaritin. Among them, baohuoside-II and anhydroicaritin can interact with estrogen receptor- α and estrogen receptor- β . **Conclusion:** Compounds baohuoside-II, and anhydroicaritin can be bound with T47D cells and interact with estrogen receptor- α and estrogen receptor- β , which indicates that baohuoside-II and anhydroicaritin may have estrogen-like effects.

[Key words] cell extraction; molecular docking; Epimedii Folium; estrogen-like effect

[收稿日期] 20151029(013)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI07B00)

[第一作者] 杨珍, 硕士, 助理实验师, 从事中药信息学研究、中药有效成分筛选研究, Tel:022-59596225, E-mail: yzwygh@126.com

[通讯作者] *李遇伯, 博士, 副教授, 从事药物分析、代谢组学研究, Tel:022-59596230, E-mail: yuboli1@163.com

淫羊藿为小檗科植物,始载于《神农本草经》,是一种传统的补益中药,具有补肾壮阳、强筋骨之功效,常用于治疗男女性功能障碍、骨质疏松、风湿痹痛证^[1-3]。近年来,多项研究表明淫羊藿提取物具有雌激素样作用^[4-7],但对其雌激素样作用的物质基础研究尚欠深入^[8-9],需进一步有针对性地对其效应成分进行研究。

分子对接是研究分子(如配体药物分子与受体)之间相互作用,并预测其结合模式和亲和力的一种模拟方法,已成功应用于中药活性成分的筛选^[10-11]。但预测结果往往包含一些假阳性化合物,包括不能与细胞结合的成分。细胞萃取可以利用细胞的选择性筛选与细胞结合的成分,与细胞结合的成分同效应成分之间具有显著的相关性^[12-13],但与细胞结合的成分并不一定具有相关的药理作用。结合使用两种方法,可以大大提高筛选的准确性。

本文首次结合应用两种方法,望其提高筛选的准确性,为淫羊藿中雌激素作用成分研究提供理论依据。通过溶有淫羊藿提取物的培养液培养 T47D 细胞,筛选出可与之结合的成分,最后通过液质联用技术确认可结合的成分。为进一步筛选具有雌激素样作用的成分,采用分子对接研究其与雌激素- α 、雌激素- β 受体的相互作用,最终确定可能具有雌激素样作用的成分。

1 材料

人类乳腺癌细胞株 T47D(购于中国科学院细胞库,批号 CS0093),噻唑蓝(MTT,美国 Sigma,批号 MKBQ2167V),二甲基亚砜(DMSO,美国 Ameriseo,批号 DM0231),胎牛血清(美国 Hyclone,批号 SH30396.03),RPMI-1640 培养基,胰蛋白酶(美国 Gibco,批号分别为 31800-014,1227464),其他试剂购于北京鼎国昌盛生物科技责任有限公司。

淫羊藿药材(北京市鹤延龄中药饮片有限公司),由天津中医药大学李天祥副教授鉴定为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* 的干燥叶。

3111 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo),3-18K 型台式高速冷冻离心机(美国 Sigma),RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),FUD-2100 型冷冻干燥机(日本 Eyele),Xevo G2 型液质联用仪(美国 Waters, Q-ToF/MS 质谱仪),DM IL LED 型倒置显微镜(德国 Leica),MULTISKAN MK3 型酶标仪(美国 Thermo),Discovery Studio 4.5(美国 Accelrys)。

2 方法

2.1 淫羊藿成分提取与制备 称取药材粗粉 10 g

于圆底烧瓶中,回流提取 2 次,第 1 次加入 50% 乙醇 100 mL 提取 1 h,第 2 次加入 50% 乙醇 80 mL 提取 45 min,合并 2 次提取液浓缩后冷冻干燥,制备成冻干粉,冷藏备用。

2.2 细胞培养 在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 的培养基中培养 T47D 细胞,采用贴壁培养方式,培养条件为 37 °C,5% CO₂ 相对饱和湿度。

2.3 MTT 法确定给药浓度 将 2.1 项下制备的淫羊藿冻干粉溶于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中制成相应质量浓度备用。实验分为 2,4 h 组,每组再设空白组和 6 个质量浓度(1 000,500,250,125,62.5,31.25 mg·L⁻¹)组,每个质量浓度 5 个复孔。

T47D 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养 4 d 后,选取处于对数生长期的细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化、传代,以 6 × 10⁴ 个/孔的密度接种于 96 孔板中,培养 24 h 待细胞贴壁后,各组加入相应药物浓度的培养基培养,分别于 2,4 h 时,进行 MTT 检测。选择与空白组相比不影响细胞活力的最大剂量作为 T47D 细胞萃取的给药浓度。

2.4 T47D 细胞萃取淫羊藿成分 取对数生长期的 T47D 细胞,PBS(pH 7.4)冲洗 2 次后,用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化,加含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 15 mL 混匀后,分装于 3 个 15 mm × 60 mm 培养皿,待生长至对数生长期对其进行消化。传代于 6 个培养皿中进行培养。待培养皿中细胞生长至对数生长期,将其分为 3 组(空白组、加药 2 h 组、加药 4 h 组),弃去培养基,加入含药质量浓度 250 mg·L⁻¹ 的培养基 5 mL,置于培养箱中继续培养,分别于 2,4 h 后取出,弃去含药培养基,培养皿中的细胞以 PBS 缓冲液每次 1 mL 冲洗 4 次,并收集第 4 次 PBS 缓冲液的洗脱液冻干备用。最后,加入 PBS 缓冲液 2 mL,用细胞刮刀将贴壁的 T47D 细胞刮下,收集各组细胞悬液,转移至 10 mL 离心管中。将收集的细胞置于液氮中 10 min 急速冷冻,随后取出立即置于 37 °C 水浴中融化,重复上述操作 3 次,使细胞破碎。将细胞液冻干后,加入甲醇 1 mL(-80 °C)进一步萃取药物,1 200 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,用氮吹仪将甲醇挥干,备用。

2.5 萃取成分的检测

2.5.1 液相及质谱条件 Acquity 超高效液相色谱仪,配有 DAD 检测器。样品用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.7 μm)分离。流动相 A 为 0.1% 甲酸-水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸-乙腈

溶液,洗脱梯度如下:0 ~ 0.5 min,2% B;0.5 ~ 1.5 min,2% ~ 10% B;1.5 ~ 3.5 min,20% B;3.5 ~ 6.5 min,20% ~ 35% B;6.5 ~ 12 min,35% ~ 40% B;12 ~ 13 min,40% ~ 50% B;13 ~ 15 min,50% ~ 75% B;15 ~ 16 min,75% ~ 95%;16 ~ 17 min,95% B。流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 35 ℃,进样量 5 μL。

Waters XevoG2 Q-ToF 质谱仪,通过 ESI 电离源与液相色谱仪连接。质谱仪在负离子模式下采集数据,扫描范围 m/z 50 ~ 1 000;喷雾电压 3.0 kV,干燥气流速 800 L·h⁻¹,温度 350 ℃;雾化室电压,35 psi;选取 $[M - H]^-$ m/z 554.261 5 的亮氨酸-脑啡肽进行精确质量数校正。

2.5.2 样品分析 精密称取 0.187 1 g(相当于 1 g 生药)的冻干粉,加 50% 乙腈溶解,配置成浓度为 0.01 g·mL⁻¹ 样品溶液,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取滤液按照 2.5.1 项液质条件进样检测。

取加药细胞样品、空白细胞样品、第 4 次 PBS 缓冲液的洗脱液,分别加入 50% 甲醇 200 μL 溶解,涡旋,高速离心(12 000 r·min⁻¹,15 min)后,取上清液按照 2.5.1 项液质条件进样检测。

液质检测所得数据通过 MassLynx v4.1 (Waters Corporation, MA, USA) 工作站处理,根据文献报道的分子离子和碎片离子确定化合物,通过对比淫羊藿提取物和第 4 次 PBS 缓冲液的洗脱液的检测情况确定细胞培养液是否清洗干净,对比淫羊藿提取物、空白细胞液及加药细胞液中化学成分的情况,筛选出淫羊藿中可能具有雌激素样作用的成分。

2.6 分子对接 从 PDB 数据库中选择雌激素-α 受体与雌二醇、雌激素-β 受体及其磺酰胺类激动剂复合物的晶体结构,PDB 编号分别为 1A52 和 2YLY。

2.6.1 蛋白结构及配体分子的预处理 对选择的蛋白结构利用 clean protein 模块进行加氢处理,补充不完整的残基,对相应的氨基酸进行质子化处理,赋予所需的力场。删除水分子,B 链及其他配体分子。利用 Discovery Studio 4.5 构建细胞萃取/液质联用得到的可与细胞结合成分的结构,并对其加氢、添加 CHARMM 力场处理。

2.6.2 分子对接与虚拟筛选 将上述处理的 1A52 和 2YLY 作为分子对接与虚拟筛选的靶酶,根据原有配体分子定义活性口袋,其球半径设为 9.0×10^{-10} m,将复合物中配体分子抽取出来,利用 CDOCKER 重新对接回原蛋白中,计算对接构象与晶体中构象的 RMSD 值,确定对接结果的可信性。根据上述条件,筛选可与细胞结合的成分,根据

“-CDOCKER_INTERACTION ENERGY”最终确定可能具有雌激素样作用的化合物。

3 结果及讨论

3.1 MTT 法确定给药浓度的影响 含药质量浓度为 1 000,500 mg·L⁻¹ 的培养基培养 2,4 h 组与同期空白组比较,细胞活力受影响较大 ($P < 0.05, P < 0.01$)。在进行细胞萃取试验时采用不影响细胞活力的最大剂量 250 mg·L⁻¹ 给药。见表 1。

表 1 中药不同质量浓度含药培养基培养 T47D 细胞 2,4 h 对细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 T47D cells cultured by medium with Epimedium Folium extract for 2,4 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	质量浓度 /mg·L ⁻¹	2 h	4 h
空白	-	0.64 ± 0.054	0.56 ± 0.056
淫羊藿	1 000	0.46 ± 0.076 ²⁾	0.24 ± 0.012 ²⁾
	500	0.54 ± 0.087 ¹⁾	0.46 ± 0.029 ²⁾
	250	0.68 ± 0.073	0.56 ± 0.02
	125	0.65 ± 0.098	0.60 ± 0.034
	62.5	0.67 ± 0.110	0.57 ± 0.035
	31.25	0.62 ± 0.127	0.57 ± 0.059

注:与空白组同期比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 T47D 细胞萃取淫羊藿成分的检测 空白细胞液及第 4 次 PBS 缓冲液的洗脱液中均未检测出淫羊藿中成分,说明 PBS 冲洗 4 次可以将细胞外培养基清洗干净。在此情况下,加药细胞液中检测出的淫羊藿成分则为与 T47D 细胞结合的成分,提示可能具有雌激素样作用。

含药质量浓度 250 mg·L⁻¹ 的培养基培养 T47D 细胞 2,4 h 后,经洗涤、破碎,利用液相质谱检测其中的成分。通过与淫羊藿提取物及空白细胞液的液相质谱检测结果进行比较,均得到 7 个与细胞结合的成分。通过查阅相关文献^[14-19],根据报道的化合物分子离子及主要碎片离子,初步确定化合物为淫羊藿苷,朝藿定 B,宝藿苷-II,淫羊藿次苷-I,宝藿苷-I,朝藿苷甲,脱水淫羊藿素,其结果见表 2,中药含药培养基培养 T47D 细胞 2,4 h,及空白细胞液、淫羊藿提取物的质谱图见图 1。

3.3 分子对接与虚拟筛选 分别将雌激素-α 受体(1A52)中配体分子 ES,雌激素-β 受体(2YLY)中配体分子 SU4 抽取出来,利用 CDOCKER 对接回原蛋白后,其对接较好的构象与晶体中构象的 RMSD 值分别为 0.300 9 和 1.230 9,说明其对接结果可以重现试验结果。因此,利用其对细胞萃取得到的化合物进行筛选。ES,SU4 对接构象与晶体中构象的比较分别见图 2,其中蓝色的为晶体中构象,另一个为对接构象。

表 2 含药 250 mg·L⁻¹ 的培养基培养 T47D 细胞 2,4 h 萃取检测结果

Table 2 Test results for T47D cells cultured by medium with Epimedii Folium extract at concentration of 250 mg·L⁻¹ for 2,4 h

化合物名称	2 h					
	t _R /min	实测值[M-H] ⁻	理论值[M-H] ⁻	误差/ppm	分子式	碎片离子
朝藿定 B	6.44	807.272 8	807.271 2	1.98	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	807, 645, 513
淫羊藿苷	6.45	721.231 6	721.234 4	3.88	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	721, 659, 529, 513, 514, 367
宝藿苷-II	8.10	499.160 6	499.160 4	0.40	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	499, 500, 353, 354, 352
淫羊藿次苷-I	10.05	529.171 2	529.171 0	0.38	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	529, 367
宝藿苷-I	11.39	513.176 4	513.176 1	0.58	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	513, 514, 366, 367
朝藿苷甲	13.64	759.249 6	759.250 0	0.53	C ₃₇ H ₄₄ O ₁₇	759, 367
脱水淫羊藿素	15.46	367.117 8	367.118 2	1.09	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	367, 295, 271, 116

化合物名称	4 h					
	t _R /min	实测值[M-H] ⁻	理论值[M-H] ⁻	误差/ppm	分子式	碎片离子
朝藿定 B	6.52	807.271 3	807.271 2	0.62	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	807, 645, 513, 366
淫羊藿苷	6.53	721.234 4	721.234 4	0.00	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	721, 659, 529, 513, 514, 367, 366
宝藿苷-II	8.23	499.160 6	499.160 4	0.40	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	499, 500, 353, 354, 352
淫羊藿次苷-I	10.23	529.171 0	529.171 0	0.00	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	529, 367, 299
宝藿苷-I	11.64	513.176 1	513.176 1	0.00	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	513, 514, 366, 367
朝藿苷甲	13.74	759.250 2	759.250 0	0.26	C ₃₇ H ₄₄ O ₁₇	759, 367
脱水淫羊藿素	15.63	367.117 9	367.118 4	1.36	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	367, 295, 271, 116

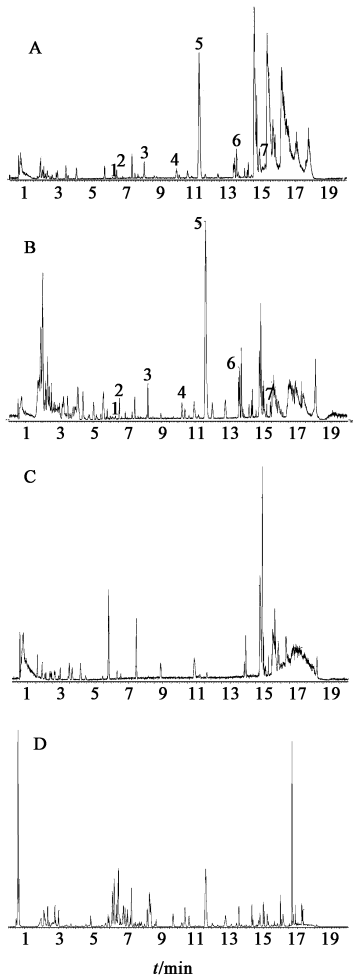
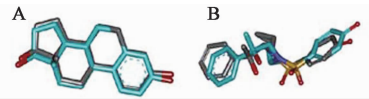


图 1 中药含药培养基及淫羊藿提取物 HPLC-TOF/MS
A. 中药含药培养基培养 T47D 细胞 2 h; B. 中药含药培养基培养 T47D 细胞 4 h; C. 空白细胞液; D. 淫羊藿提取物。1. 朝藿定 B; 2. 淫羊藿苷; 3. 宝藿苷 II; 4. 淫羊藿次苷 I; 5. 宝藿苷 I; 6. 朝藿苷甲; 7. 脱水淫羊藿素

图 1 中药含药培养基及淫羊藿提取物 HPLC-TOF/MS

Fig. 1 Figure of HPLC-TOF/MS



A. ES; B. SU4

图 2 配体对接构象与晶体构象的比较

Fig. 2 Comparison between docked and crystal conformations of ligands

利用上述研究体系,对细胞萃取得到的 7 个化合物进行筛选,宝藿苷-II,脱水淫羊藿素均可与雌激素- α 受体,雌激素- β 受体发生相互作用,脱水淫羊藿素与 2 种雌激素受体的结合得更好。宝藿苷-II,脱水淫羊藿素与雌激素- α 受体(1A52)的相互作用(32.514 8,46.653 7),雌激素- β 受体(2YLY)的相互作用(39.785 3,49.386 0),见图 3。

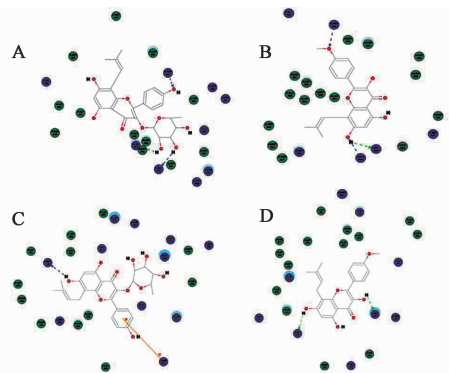


图 3 宝藿苷-II,脱水淫羊藿素与受体相互作用
A. 宝藿苷-II 与雌激素- α 受体; B. 脱水淫羊藿素与雌激素- α 受体;
C. 宝藿苷-II 与雌激素- β 受体; D. 脱水淫羊藿素与雌激素- β 受体

图 3 Interaction between baohuoside-II, anhydroicaritin and receptors

4 结论

蒙延娟等^[20]利用分子动力学方法研究植物激

素与雌激素- α 受体的相互作用,发现 Glu353, Arg394, His524 氨基酸残基与之会形成关键氢键相互作用,此外关键氨基酸残基还有 Phe404, Leu391, Leu387, Leu349, Thr347, His524 等。分子对接结果表明,宝藜苣-Ⅱ 可与 Glu353, Thr347 形成氢键相互作用;Phe404, Leu391, Leu387, Leu349 形成疏水作用;脱水淫羊藜素可与 Arg394, His524 形成氢键相互作用,与 Phe404, Leu391, Leu387, Leu349 发生相互作用。有研究报道 Met336, Glu305, Leu339, Phe356, Ile373, Val485 等氨基酸残基对配体分子与雌激素- β 受体的结合有一定作用^[21-22]。宝藜苣-Ⅱ,脱水淫羊藜素均可与该 6 个氨基酸残基发生相互作用。实验结果与文献报道一致,说明分子对接结果具有一定的可信性。

采用溶有淫羊藜提取物的培养基培养 T47D 细胞,具有雌激素样作用的成分选择性地与 T47D 细胞结合。利用液相质谱的方法检测淫羊藜提取物、空白细胞液、第 4 次 PBS 缓冲液的洗脱液及加药细胞液中化学成分,通过 4 者的比较,得出与 T47D 细胞结合的成分。最终通过质谱离子峰及碎片离子初步鉴定了 7 种与 T47D 细胞结合的成分,分别为朝藜定 B,淫羊藜苷,宝藜苣-Ⅱ,淫羊藜次苷-I,宝藜苣-Ⅰ,朝藜苷甲,脱水淫羊藜素。但可与细胞结合的成分并不一定为生物效应成分,为进一步筛选具有雌激素样作用的成分,对于确认的可与细胞结合的成分采用分子对接的方法研究其与雌激素- α 、雌激素- β 受体的相互作用,结果表明宝藜苣-Ⅱ、脱水淫羊藜素均可与 2 种雌激素受体发生相互作用,提示该 2 种化合物可能具有雌激素样作用。此试验也提示采用细胞萃取和分子对接的方法可以快速筛选中药有效成分。

【参考文献】

[1] 谢娟平,孙文基.淫羊藜属植物化学成分及药理研究进展[J].海峡药学,2006,18(5):17-20.
[2] 刘玉萍,丁学芳,黄萌萌,等.淫羊藜苷在不同骨质疏松大鼠模型中肠道吸收代谢研究[J].中国中药杂志,2016,41(13):2532-2537.
[3] 蒋俊,崔莉,孙娥,等.基于淫羊藜黄酮类化合物的体内代谢阐述其抗骨质疏松药效物质基础[J].中草药,2014,45(5):721-729.
[4] 朱瑞清,李志忠,周建,等.淫羊藜苷及其拟代谢物的雌激素样作用研究[J].中医药学报,2012,40(3):15-20.
[5] 王洁,陈花,买迪娜,等.淫羊藜苷和淫羊藜素对乳腺癌 T47D 细胞增殖的影响[J].中草药,2013,44(11):1470-1475.

[6] 杨利娟,黄君梅,王飞.何首乌、骨碎补和淫羊藜的植物雌激素作用研究[J].中药与临床,2012,3(3):37-40.
[7] 胡蕾蕾,段小群,卢曦,等.淫羊藜素对雌激素依赖性乳腺癌 MCF-7 细胞作用的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(14):155-158.
[8] 王大伟,邓秀兰,牛建昭,等.淫羊藜及淫羊藜苷在小鼠体内雌激素样作用的实验研究[J].北京中医药大学学报,2009,32(3):164-166.
[9] 于燕,颜虹,胡森科,等.淫羊藜提取物的雌激素样作用研究[J].西安交通大学学报,2009,30(3):373-376.
[10] 乔连生,张燕玲.计算机辅助药物设计在天然产物多靶点药物研发中的应用[J].中国中药杂志,2014,39(11):1951-1955.
[11] 王星,张燕玲,王耘,等. TRPV1 离子通道与中药辛味药性的关系研究[J].中国中药杂志,2014,39(13):2422-2427.
[12] 洪敏,马宏宇,朱荃.肝细胞萃取-HPLC 分析法的建立及其在栀子保肝效应物质初步分析中的应用[J].中国中药杂志,2009,34(4):451-453.
[13] 脾细胞生物色谱法和液质联用分析鹿茸-山药药对的补虚活性成分[J].吉林中医药,2013,33(9):920-924.
[14] 王斌.朝鲜淫羊藜化学成分研究[D].长春:吉林农业大学,2007:15-33.
[15] Zhao H Y, Sun J H, Fan M X, et al. Analysis of phenolic compounds in Epimedium plants using liquid chromatography coupled with electrospray [J]. J Chromatography A, 2008,1190(1/2):157-181.
[16] 袁航,曹树萍,陈抒云,等. RRLC-DAD-ESI-MS² 分析天平山淫羊藜中的 11 个化学成分[J].药物分析杂志,2014,34(7):1156-1160.
[17] 甘井山,马艳,王宗艳,等.淫羊藜中化学成分的 UPLC/Q-TOF-MS 分析[J].现代药物与临床,2014,29(4):349-352.
[18] 朱靖博,李凤丹,邱焕杰,等. HPLC/ESI-MS 分析淫羊藜黄酮苷类化合物[J].大连工业大学学报,2009,28(5):321-325.
[19] 朱粉霞,赵永刚,贾晓斌,等.淫羊藜炮制前后 UPLC-PDA-MS 的指纹图谱研究[J].化学学报,2012,70(5):635-642.
[20] 蒙延娟,易忠胜,艾芳婷,等.基于对接的植物激素 3D-QSAR 和分子动力学模拟[J].环境化学,2014,33(6):880-890.
[21] Salum L B, Polikarpov I, Andricopulo A D. Structure-based approach for the study of estrogen receptor binding affinity and subtype selectivity [J]. J Chem Inf Model, 2008,48(11):2243-2253.
[22] 杨旭曙,王晓栋,罗斯,等.基于雌激素 β 受体结构雌激素类化合物的三维定量结构-活性关系与分子对接研究[J].中国科学,2009,39(5):459-468.

【责任编辑 邹晓翠】