

基于灰色关联度分析的荆芥抗 Caco-2 细胞总黄酮纯化工艺研究

马 聪¹, 王 帅^{1,2,3}, 孟宪生^{1,2,3*}, 包永睿^{1,2,3}

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

2. 辽宁省组分中药工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600

3. 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁 大连 116600

摘 要: **目的** 通过灰色关联度分析及对 Caco-2 肠癌细胞增殖情况的影响来评价荆芥总黄酮大孔吸附树脂纯化工艺。

方法 以总黄酮静态吸附量和解吸率为考察指标筛选大孔吸附树脂型号, 采用单因素试验, 优化其纯化总黄酮的工艺条件, 并采用 MTT 法测定 Caco-2 细胞抑制率, 同时应用灰色关联度分析技术, 计算总黄酮质量分数与对肿瘤细胞增殖抑制率的关联度。**结果** HPD-400 型大孔吸附树脂对荆芥总黄酮有较好的吸附分离性能, 荆芥药材以 0.1 g/mL 的生药质量浓度、0.8 g/mL (药材/湿树脂) 的上柱量上柱, 用 2 倍柱体积 (BV) 水洗除杂, 用 8 BV、70%乙醇进行洗脱, 体积流量均为 4 BV/h, 收集洗脱液, 挥干, 同法进行第 2 次纯化, 总黄酮质量分数为 92.15%, 对 Caco-2 细胞增殖抑制率为 86.17%, 总黄酮质量分数与抑制率灰色关联系数为 0.950 2。**结论** 此工艺条件稳定可行, 体外抗 Caco-2 肿瘤细胞药效明确, 为开发以荆芥总黄酮纯化物为主成分的抗癌新药奠定基础。

关键词: 荆芥总黄酮; HPD-400 型大孔吸附树脂; 纯化工艺; Caco-2 细胞; 灰色关联度

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)11-1615-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.11.009

Study on purification technology of total flavonoids from *Schizonepetae Herba* with resistance of Caco-2 cells based on grey correlation degree analysis

MA Cong¹, WANG Shuai^{1,2,3}, MENG Xian-sheng^{1,2,3}, BAO Yong-rui^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

2. Liaoning Province Engineering Research Center of Component in Chinese Materia Medica, Dalian 116600, China

3. Liaoning Province Research and Engineering Laboratory of Modern Chinese Materia Medica, Dalian 116600, China

Abstract: Objective Through the grey correlation analysis technology and the effect of Caco-2 colon cancer cell proliferation to evaluate the optimization of purification process in total flavonoids of *Schizonepetae Herba* by macroporous adsorption resin.

Methods By static adsorption and desorption rate of total flavonoids as examining indexes to screen the ratios of macroporous adsorption resin, using single factor experiment to optimize its purification process conditions of total flavonoids; The Caco-2 cell inhibition rate was determined by MTT method; At the same time, using the grey correlation degree analysis technology, the correlation between the purity of total flavonoids and proliferation inhibition rate of the tumor cell was calculated. **Results** HPD-400 macroporous adsorption resin has the good adsorption separation performance of the total flavonoids from *Schizonepetae Herba*, *Schizonepetae Herba* at the concentration of 0.1 g/mL, 0.8 g/mL (medicine/wet resin) on the amount of column, using 2 BV water to remove impurity, eluting by 9 BV 70% ethanol and all of the flow rate are 4 BV/h, collecting the eluent and dry it; With the same method to do the secondary purification, the purity of total flavonoids is 92.15%, the inhibitory rate of Caco-2 cell proliferation is 86.17%, the grey correlation coefficient of flavonoids purity and inhibition is 0.950 2. **Conclusion** This optimization process and the conditions are feasible and stable, the inhibitory efficacy of the *in vitro* Caco-2 cells is clearly. It lays the foundation of the new anti-cancer drugs based on the purification of total flavonoids in *Schizonepetae Herba*.

Key words: total flavonoids of *Schizonepetae Herba*; HPD-400 macroporous adsorption resin; purification process; Caco-2 cells; grey correlation degree

收稿日期: 2015-01-30

基金项目: “十二五”重大新药创制科技重大专项 (2013ZX09507005)

作者简介: 马 聪 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物分析。Tel: 18640820302 E-mail: macong0822@163.com

*通信作者 孟宪生, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药组分配伍、代谢组学及药品质量分析。Tel: (0411)85890185

荆芥 *Schizonepetae Herba* 为唇形科(Labiatae)植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥地上部分, 为传统的发散解表药, 具有解表散风, 透疹消疮等功效, 用于感冒、头痛、麻疹、风疹、疮疡初起^[1]。据文献报道^[2], 荆芥含有挥发油、黄酮、三萜酸、有机酸等多种成分, 其中黄酮类为其发挥药效的有效成分之一, 但现有工艺技术制备荆芥总黄酮存在纯度不高、工艺稳定性差等问题^[3], 这必然影响荆芥总黄酮的成分组成的阐明及药效活性的检测, 也不利于大规模工业生产及临床应用, 因此有必要对荆芥总黄酮纯化方法进行研究。同时, 对荆芥总黄酮药效的研究主要以其抗流感病毒作用居多^[4], 而其抗肿瘤作用研究尚未见报道。故本实验通过对荆芥总黄酮富集物的二次纯化, 及研究其对体外 Caco-2 细胞增殖情况的影响, 不仅将总黄酮的质量分数从 30%提高到 90%以上, 而且证明了总黄酮有明显的抗肿瘤作用, 这可为应用到大规模工业生产提供有利基础, 更为以后投入抗肿瘤新药的开发奠定基础。此外, 本实验通过计算荆芥总黄酮粗提物、第 1 次和第 2 次纯化产物的质量分数与其对 Caco-2 细胞增殖抑制率的相关系数, 进一步阐明荆芥黄酮类成分是其抗肿瘤的有效成分。

1 仪器与材料

HD2-BCN-1360B 型生物洁净工作台, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; Sunrise 型酶标仪, 奥地利 Tecan 公司; UAIRETM US Autoflow 型 CO₂ 培养箱, 德国 Nuair 公司; UV-1750 型紫外-可见分光光度计, 北京瑞利分析仪器公司; LC-10Avp 高效液相色谱仪, 日本岛津。

聚酰胺、AB-8、D-101、HPD-100、HPD-300、HPD-400、HPD-600、NKA-9、X-5 大孔吸附树脂, 沧州宝恩有限公司; 荆芥, 大连民大中药饮片有限公司, 批号 C130442, 经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥地上部分; 橙皮苷对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号 110721-200512, 质量分数≥98%; 人克隆结肠腺癌 Caco-2 细胞, 上海复蒙生物有限公司; 胎牛血清、噻唑蓝 (MTT)、DMEM 高糖培养基, 美国 Gibco 公司。

2 方法与结果

2.1 荆芥总黄酮的测定^[5]

2.1.1 标准曲线的绘制 精密称取橙皮苷对照品 10.0 mg 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容即得对照

品溶液。精密吸取质量浓度为 0.4 mg/mL 的橙皮苷对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 各加入甲醇至 10 mL, 加入 5%亚硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 10%硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 4%氢氧化钠溶液 10 mL, 再加甲醇至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以甲醇同法制备空白溶液, 于 338 nm 处依法测定对照品溶液吸光度 (*A*) 值^[6]。以 *A* 值为纵坐标, 质量浓度 (*C*) 为横坐标, 得线性回归方程为 $A = 55.938C - 0.0215$, $r = 0.9997$, 表明荆芥总黄酮以橙皮苷计在 3.2~19.2 μg/mL 具有良好线性关系。

2.1.2 供试品溶液的制备 荆芥纯化工艺优化过程各组药液, 浓缩, 加 70%乙醇定容于 50 mL 量瓶中, 即得。

2.1.3 样品测定 精密吸取各组药液各 0.2 mL 于 25 mL 量瓶中, 自“各加入甲醇至 10 mL”起, 同“2.1.1”项下方法进行测定。

2.2 纯化工艺优化

2.2.1 上柱溶液的制备 精密称取荆芥粗粉 5.0 g, 加 15 倍量的 75%乙醇, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并 3 次提取液, 回收乙醇至无醇味, 加水稀释成相应质量浓度的药液, 超声使溶解, 即得。

2.2.2 大孔树脂的预处理 取一定量待处理的 9 种树脂, 先用 95%乙醇浸泡 24 h, 使其充分溶胀, 采用湿法装柱, 再用 95%乙醇洗至乙醇洗脱液加水不出现白色混浊即可, 最后用水洗脱至洗脱液无醇味, 取出树脂, 分别置于锥形瓶中, 标记备用^[7]。

2.2.3 大孔吸附树脂型号的选择 根据荆芥总黄酮的理化性质和树脂的吸附性能, 选用 9 种不同型号的树脂进行筛选。准确称取经预处理过的湿树脂各 2.0 g, 分别置于 50 mL 具塞磨口锥形瓶中, 每瓶加入质量浓度为含生药 0.1 g/mL 的样品溶液 20 mL, 于室温下振荡 (120 r/min) 吸附 24 h, 充分吸附后, 取 1 mL 上清液, 以紫外分光光度法, 测定总黄酮的量, 计算树脂饱和吸附量 [饱和吸附量 = (吸附前药液质量浓度 - 吸附后药液质量浓度) × 药液体积 / 树脂干质量] 和吸附率 [吸附率 = (吸附前药液质量浓度 - 吸附后药液质量浓度) / 吸附前药液质量浓度]^[8]。

取已饱和吸附荆芥总黄酮的树脂分别滤过除去水液后, 精密加入 30 mL 70%乙醇, 室温下振荡 (120 r/min) 解吸 24 h, 充分解吸后, 吸取 1 mL 解吸液, 测定总黄酮的量, 计算解吸量 (解吸量 = 解吸液质量浓度 × 解吸液体积 / 树脂质量) 及解吸率 (解吸率 = 解

吸液质量浓度×解吸液体积/吸附总量)^[8]。以 9 种大孔吸附树脂的吸附量、吸附率、解吸量和解吸率作为考察指标进行比较,结果见表 1。综合考虑各树脂的吸附与解吸性能,最终选择 HPD-400 树脂进行纯化。

表 1 9 种大孔树脂对荊芥黄酮类化合物吸附及解析特征

Table 1 Adsorption and desorption of nine kinds of macroporous adsorption resins to flavonoids in *Schizonepetae Herba*

树脂型号	粒径/mm	比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	平均孔径/nm	极性	吸附量/(mg·g ⁻¹)	吸附率/%	解吸量/(mg·g ⁻¹)	解吸率/%
HPD-100	0.30~1.25	650~700	8.5~9.0	非极性	29.50	78.85	21.03	71.31
HPD-300	0.30~1.20	800~870	5.0~5.5	非极性	29.36	78.50	19.62	66.81
HPD-400	0.30~1.20	500~550	7.5~8.0	弱极性	30.27	79.58	25.67	84.81
HPD-600	0.30~1.20	550~600	8.0	极性	27.52	73.58	19.57	71.12
NKA-9	0.30~1.25	250~290	15.5~16.5	极性	29.28	78.28	20.04	68.44
AB-8	0.30~1.25	480~520	13.0~14.0	弱极性	29.55	79.00	24.21	81.93
X-5	0.30~1.25	500~600	29.0~30.0	非极性	29.41	78.63	22.72	77.24
D-101	0.20~0.60	400~600	10.0~12.0	弱极性	28.50	76.20	21.28	74.67
聚酰胺	0.17~0.21	5~10	1.5~3.5	极性	21.92	58.60	13.43	61.27

2.2.4 上样液质量浓度的考察 分别取质量浓度为含生药 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/mL 的药液,加入量为 100、50、33、25、20 mL,固定 4 BV/h 的体积流量进行动态吸附后,用 2 倍柱体积(BV)蒸馏水以 4 BV/h 体积流量冲洗,至冲洗液 Molish 反应为阴性,再用 70%乙醇以 4 BV/h 的体积流量进行洗脱至洗脱液近无色,收集洗脱液,分别于 50 mL 量瓶中定容,依法测定总黄酮吸附量,结果总黄酮吸附量分别为 80.05、48.78、25.08、20.96、14.75 mg/g,最终确定上样液质量浓度为含生药 0.1 g/mL。

2.2.5 上样液 pH 值的考察 分别取质量浓度为含生药 0.1 g/mL (pH 5.0) 的药液 6 份,每份 50 mL,按上述方法进行动态吸附,分别考察 pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 时的吸附情况,依法测定总黄酮吸附量,结果总黄酮吸附量分别为 39.02、40.34、40.16、41.57、30.58、27.08 mg/g,可见 pH 值为 5.0 时总黄酮的吸附量最大,故以下实验中样品溶液均选择原液直接上柱。

2.2.6 泄露曲线考察 取药液 150 mL,按上述方法上柱,每 10 毫升收集 1 份流分,测定各流分中荊芥总黄酮的量,以流分累计总体积为横坐标,各流分总黄酮的量为纵坐标,绘制吸附泄漏曲线。结果见图 1,当上样体积为 90 mL 时,总黄酮开始泄露,因此,确定最大上样量为第 8 份,即树脂比上柱量为 0.8 g/mL (药材/湿树脂)。

2.2.7 洗脱剂乙醇体积分数的考察 取药液 80 mL,按上述条件上柱,分别用 50 mL 体积分数为 30%、50%、60%、70%、80%、90%乙醇进行洗脱,

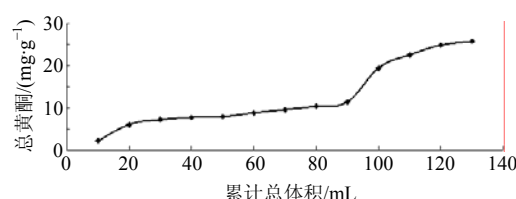


图 1 泄露曲线

Fig. 1 Leak curve

收集洗脱液,定容于 50 mL 量瓶中,依法测定总黄酮的量。结果总黄酮的量分别为 38.25、57.73、65.31、84.67、84.34、84.11 mg/g,70%、80%、90%乙醇洗脱的总黄酮的量分别为 84.67、84.34、84.11 mg/g,相差不大,因此,考虑到节省溶剂,确定以 70%乙醇为洗脱溶剂。

2.2.8 70%乙醇洗脱醇用量考察 取药液 80 mL,按上述条件上柱,再用 150 mL 的 70%乙醇进行洗脱,分段收集洗脱液(10 mL/份),测定洗脱液总黄酮的量,以洗脱剂用量为横坐标,总黄酮的量为纵坐标,绘制解吸曲线。结果见图 2,8 号流分(80 mL)洗脱下来的总黄酮的量几乎为 0,表明此时总黄酮基本洗脱完全,故选择 8 BV 的洗脱液为最佳用量。

2.2.9 工艺验证试验 准确量取 3 份 HPD-400 大孔吸附树脂 10 mL,分别装柱,将 80 mL 药液按上述优选的工艺条件进行吸附、洗脱,即荊芥药材以 0.1 g/mL 的质量浓度、0.8 g/mL (药材/湿树脂)的上柱量上柱,用 2 BV 水洗除杂,用 8 BV 70%乙醇进行洗脱,体积流量均为 4 BV/h,收集洗脱液,按“2.1”项下操作测定总黄酮的量,计算质量分数及收率。结果总黄酮质量分数分别为 79.80%、79.52%、79.37%,

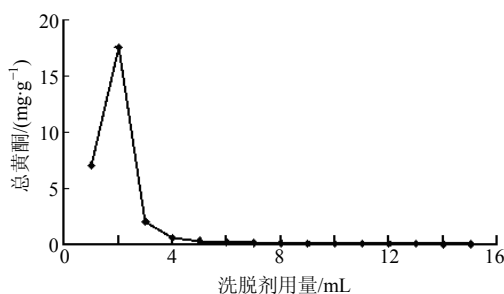


图2 70%乙醇洗脱醇用量考察

Fig. 2 Curve of alcohol consumption in 70% ethanol elution

平均值为 79.56%，RSD 为 1.03%；总黄酮收率分别为 88.69%、88.37%、88.90%，平均值为 88.65%，RSD 为 1.26%。结果表明该工艺稳定。

2.2.10 再次纯化实验 第 1 次纯化后荆芥总黄酮平均收率为 88.65%，总黄酮质量分数为 79.56%，适合进行再次纯化，故采用上述最佳纯化方法进行第 2 次大孔吸附树脂纯化，同样平行做 3 份，按“2.1”项下操作测定总黄酮的量，计算质量分数及收率，结果总黄酮质量分数分别为 91.67%、93.32%、91.44%，平均值为 92.15%，RSD 为 1.03%；总黄酮收率分别为 84.36%、83.85%、84.35%，平均值为 84.17%，RSD 为 0.35%。

2.3 体外药效学实验

2.3.1 供试品溶液的制备 精密称定荆芥药材粗提物、第 1 次纯化产物及第 2 次纯化产物各 5 mg，分别溶于 2 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中，再各吸取 0.1、0.2、0.4 mL 不同药液，置于 5 mL 量瓶中，加含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液稀释定容，配制成高、中、低不同给药剂量组，使终质量浓度分别为 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ ，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.3.2 MTT 法测定细胞抑制率 取处于对数生长期、状态良好的 Caco-2 细胞，用 0.25% 胰蛋白酶消化，以 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液接种于 96 孔培养板中，每孔 100 μL ，常规培养细胞 24 h 后，弃去培养液，重新加入 100 μL 新鲜培养液，设组并分别加入 100 μL “2.3.1”项下所述药液，各组均设 5 个复孔，同时设置对照孔（加入等量培养液）继续培养，24 h 后培养板每孔加入 MTT (200 ng/mL) 20 μL ，同样条件继续孵育 4 h，小心吸去上清液，每孔加入二甲基亚砜 (DMSO) 150 μL ，在振荡器上轻轻振荡 5 min 后，用酶标仪于 492 nm 处测 A 值，取 5 孔平均值，计算抑制率^[9]。实验重复 3 次，结果见表 2。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}$$

表2 不同组别药液对 Caco-2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Effects of solution in different groups on Caco-2 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	A_{492}	MTT 抑制率/%
模型组	0.905 ± 0.005	—
粗提物低剂量组	$0.575 \pm 0.005^{**}$	36.51
粗提物中剂量组	$0.523 \pm 0.002^{**}$	42.19
粗提物高剂量组	$0.455 \pm 0.006^{**}$	49.75
第 1 次纯化产物低剂量组	$0.416 \pm 0.003^{**}$	54.05
第 1 次纯化产物中剂量组	$0.315 \pm 0.009^{**}$	65.21
第 1 次纯化产物高剂量组	$0.264 \pm 0.008^{**}$	70.84
第 2 次纯化产物低剂量组	$0.255 \pm 0.011^{**}$	71.84
第 2 次纯化产物中剂量组	$0.205 \pm 0.007^{**}$	77.40
第 2 次纯化产物高剂量组	$0.125 \pm 0.009^{**}$	86.17

与模型组比较： $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs model group

由表 2 可以看出，第 1 次纯化产物的抑制率优于粗提物，第 2 次纯化产物的抑制率优于第 1 次纯化产物，且随着质量分数、剂量的提高，抑制率也显著增加 ($P < 0.01$)，呈质量分数、剂量依赖关系。

2.4 灰色关联度分析

应用 GTMS3.0 灰色系统理论建模软件，以粗提物、第 1 次纯化产物、第 2 次纯化产物的质量分数及其对 Caco-2 肿瘤细胞增殖抑制率为指标，分别计算绝对灰色关联度、相对灰色关联度、综合灰色关联度，结果见表 3、4，其中以综合灰关联度最具有参考价值^[10-11]。

经灰色关联度软件分析，可以看出不同纯度的荆芥总黄酮对抗肿瘤作用贡献的大小顺序为第 2 次纯化产物 > 第 1 次纯化产物 > 粗提物，证明纯度越高，荆芥总黄酮的药效越明确。

3 讨论

本实验在筛选树脂时综合考虑到树脂的极性、比表面积和孔径等因素，并最终结合各树脂的吸附与解吸性能，选用 HPD-400 树脂来分离纯化荆芥总黄酮。在此基础上，本实验考虑上样液质量浓度、上样 pH 值、洗脱溶剂等，对利用 HPD-400 型树脂对荆芥总黄酮的工艺条件进行优化，使荆芥总黄酮经大孔树脂纯化后质量分数从 29.81% (粗提物中荆芥总黄酮质量分数) 提高到了 92.15%，纯化效果明显，这在国内文献中尚无报道。同时，荆芥总黄酮经 1 次纯化后纯化物的平均质量分数和收率分别为 79.56% 和 88.65%。由于 80% 的质量分数仍不能达到

表 3 粗提物、第 1 次纯化产物、第 2 次纯化产物总黄酮质量分数及抑制率

Table 3 Purity and inhibitory rate of total flavonoids in crude extract, first, and secondary purification product

组别	粗提物		第 1 次纯化产物		第 2 次纯化产物	
	质量分数/%	抑制率/%	质量分数/%	抑制率/%	质量分数/%	抑制率/%
1	29.93	49.75	79.39	70.84	91.44	86.17
2	29.64	48.34	78.93	71.32	92.32	87.45
3	30.48	50.56	79.87	69.56	91.78	85.98
4	29.77	47.98	80.23	70.56	91.56	86.74
5	28.24	48.76	80.52	69.98	92.14	87.23
平均值	29.81	49.08	79.79	70.45	91.85	86.71
RSD/%	2.78	2.16	0.80	0.99	0.41	0.74

表 4 灰色关联度计算结果

Table 4 Calculation results of grey correlation

组别	绝对灰关联度	相对灰关联度	综合灰关联度
粗提物	0.685 0	0.970 7	0.827 8
1 次纯化产物	0.843 6	0.991 4	0.917 5
2 次纯化产物	0.907 1	0.993 3	0.950 2

进行荆芥总黄酮组分解析、作用机制等下一步实验研究的要求,且其收率较高,故进行第 2 次纯化。实验证明经 2 次纯化后纯化产物平均质量分数和收率分别达到了 92.15%和 84.17%,不仅质量分数得到了显著提高,而且收率基本没有减少,这不仅利于进一步阐明其总黄酮成分组成,而且为开发以荆芥总黄酮为主成分的新药奠定实验基础。

本实验采用 MTT 法研究荆芥总黄酮纯化物体外抗肿瘤活性,通过比较粗提物、第 1 次纯化产物和第 2 次纯化产物对 Caco-2 肿瘤细胞的抑制作用,发现随着质量分数及给药剂量的增加,细胞活性明显降低,细胞数量明显减少,并且在总黄酮用量保持相等的前提下,2 次纯化产物的药效高于 1 次纯化产物的药效,由此说明本实验优选出的纯化工艺不仅使纯度提高到 90%以上,还大大提高了药效,减小了用药剂量。此外,灰色关联度分析技术可分析系统中各因素的相关性,故本实验采用该分析技术,以综合关联度为测度,确定了不同纯度的荆芥总黄酮对肿瘤细胞抑制作用贡献的大小程度来推测其抗肿瘤作用,进而可确定不同纯度的荆芥总黄酮对药效贡献的大小,进一步证明荆芥总黄酮纯化物可抑制肿瘤细胞增长,这不仅表明荆芥总黄酮具有较为显著的抗肿瘤活性,也为把荆芥总黄酮作为

潜在的抗肿瘤药用资源提供了前期实验基础和药理依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Chun M H, Kim E K, Lee J Y, *et al.* Quality control of *Schizonepeta tenuifolia* Briq by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry and principal component analysis [J]. *Microchem J*, 2010, 95(1): 25-31.
- [3] 陈 静, 杨 明. 大孔树脂分离纯化荆芥中的总黄酮 [J]. 中国药业, 2011, 20(3): 30-31.
- [4] 苟 玲, 何 婷, 曾 南, 等. 荆芥、桂枝挥发油含药血清体外抗病毒的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 19-21.
- [5] 胡 峻. 荆芥穗有效部位化学成分及其质量标准研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2005.
- [6] 陈 静, 杨 明. 大孔树脂分离纯化荆芥中的总黄酮 [J]. 中国药业, 2011, 20(3): 30-31.
- [7] 杨欣欣, 包永睿, 王 帅, 等. 防己生物碱类成分提取纯化工艺研究 [J]. 中成药, 2014, 36(6): 1306-1309.
- [8] 孙君凯, 王 帅, 包永睿, 等. 山楂叶黄酮类成分提取纯化工艺研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(6): 70-72.
- [9] 李 爽, 王 帅, 孟宪生, 等. 基于 GSE-1 细胞相关活性评价体系的延胡索总生物碱萃取纯化工艺研究 [J]. 中成药, 2014, 36(1): 56-61.
- [10] 陈南迪, 方妙玉, 于超凡, 等. 毛橘红总黄酮指纹图谱与其抗氧化活性的谱效关系研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(6): 702-706.
- [11] 吴龙火, 温慧玲, 金 奇, 等. 九里香指纹图谱与其抗炎活性的灰关联度分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 338-342.