

九味通窍汤及其不同萃取部位的体外药效学考察

臧元帅<sup>1</sup>, 吴梦莹<sup>1</sup>, 余黎<sup>2</sup>, 魏凯峰<sup>2</sup>, 樊宏伟<sup>1\*</sup>

(1. 南京医科大学 附属南京医院, 南京市第一医院, 南京 210006; 2. 南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] 目的:研究九味通窍汤醇提物经有机溶剂梯度萃取后不同萃取部位的化学成分变化,通过体外药效学筛选有效萃取部位,探索抗脑胶质瘤细胞增殖作用的最有效部位,为阐明该复方作用机制提供实验依据。方法:九味通窍汤经乙醇回流提取浓缩,采用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和水饱和正丁醇进行梯度萃取,得石油醚萃取物(部位Ⅰ)、三氯甲烷萃取物(部位Ⅱ)、乙酸乙酯萃取物(部位Ⅲ)、水饱和正丁醇萃取物(部位Ⅳ)、残留水层液(部位Ⅴ),选择毛蕊异黄酮葡萄糖苷(毛蕊异黄酮-7-O-β-D 葡萄糖苷)、芒柄花苷(芒柄花素-7-O-β-D 葡萄糖苷)、毛蕊异黄酮和芒柄花素指标成分,采用 HPLC 确定各萃取物中 4 种成分的含量,流动相(乙腈+0.05% 甲酸)(A)-(水+0.05% 甲酸)(B)梯度洗脱(0~50 min,5%~55% A;50~70 min,55%~60% A;70~90 min,60%~85% A;90~100 min,85%~100% A),检测波长 254 nm。选用人源脑神经胶质瘤 U251 细胞活性进行跟踪筛选,应用 MTT 比色法测定各萃取部位对细胞生存的影响。结果:部位Ⅲ中毛蕊异黄酮葡萄糖苷-芒柄花苷-毛蕊异黄酮的含量比 1.0:10.8:8.2,部位Ⅲ的半抑制率(IC<sub>50</sub>)46.89 g·L<sup>-1</sup>,与其他部位比较,含各指标性成分较多且含量较高,对 U251 细胞增殖抑制作用较为明显,且呈一定的浓度依赖性。结论:部位Ⅲ为九味通窍汤抗脑胶质瘤 U251 细胞增殖作用的最有效部位。

[关键词] 九味通窍汤;有效部位;U251 细胞;毛蕊异黄酮葡萄糖苷;芒柄花苷;毛蕊异黄酮;芒柄花素  
[中图分类号] R285.5;R284.1;R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)05-0168-04  
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050168  
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150112.1443.002.html>  
[网络出版时间] 2015-01-12 14:43

*In vitro* Pharmacodynamic Studies of Jiuwei Tongqiao Decoctions and Its Different Extracting Parts  
ZANG Yuan-shuai<sup>1</sup>, WU Meng-ying<sup>1</sup>, YU Li<sup>2</sup>, WEI Kai-feng<sup>2</sup>, FAN Hong-wei<sup>1\*</sup> (1. *Nanjing First Hospital, Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China*; 2. *Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

[Abstract] **Objective:** To study chemical compositions changes of different extracting parts of Jiuwei Tongqiao decoctions by gradient extraction with four kinds of organic solvents, screen effective extracting parts by *in vitro* pharmacodynamic, select the best effective parts on proliferation effect of anti-glioma cells, and provide experimental basis for further study on mechanism of Jiuwei Tongqiao decoctions. **Method:** After alcohol extract enrichment of Jiuwei Tongqiao decoctions, gradient extraction with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and water saturated *n*-butyl alcohol was to get petroleum ether extract (part I), chloroform extract (part II), ethyl acetate extract (part III), water saturated *n*-butyl alcohol extract (part IV) and the residual liquid water extract (part V). HPLC was employed to determined four index components, including calycosin-7-O-β-D-glucoside, formononetin-7-O-β-D-glucoside, calycosin and formononetin, mobile phase was consisted of (acetonitrile + 0.05% formic acid) (A) - (water + 0.05% formic acid) (B) for gradient elution (0-50 min, 5%-55% A; 50-70 min, 55%-60% A; 70-90 min, 60%-85% A; 90-100 min, 85%-100% A) and detection wavelength was 254 nm. U251 cells of anthropogenic brain glioma was selected for tracking, MTT was applied to determine effect of extraction parts for cell survival. **Result:** The content ratio of calycosin glucoside-ononin-calycosin in part III

[收稿日期] 20140618(011)  
[基金项目] 江苏省中医药局科技项目(LZ11117)  
[第一作者] 臧元帅,在读硕士,从事临床药理学研究,Tel:18262639511,E-mail:zys559@126.com  
[通讯作者] \* 樊宏伟,副教授,硕士生导师,从事临床药理学研究,Tel:025-52887031,E-mail:fanhongwei178@sina.com

was 1.0:10.8:8.2, its half inhibition rate ( $IC_{50}$ ) was  $46.89\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . In comparison with other parts, index ingredients in part Ⅲ were more comprehensive and concentration of them were higher, inhibitory effect on U251 cells was more obvious and appeared a certain concentration-dependent manner. **Conclusion:** Part Ⅲ is the most effective parts in Jiuwei Tongqiao decoctions for anti-proliferative effect of U251 glioma cells.

[ **Key words** ] Jiuwei Tongqiao decoctions; effective parts; U251 cells; calycosin-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside; ononin; calycosin; formononetin

九味通窍汤是在通窍活血汤的基础上,根据临床应用情况,经加减组方而成,由黄芪、白花蛇舌草、川芎、制天南星、蜈蚣、党参等 9 味中药组成。通窍活血汤源于《医林改错》<sup>[1]</sup>,具有活血通窍之功效,临床用于治疗头面部疾病(如脑梗死、出血性脑卒中等)<sup>[2]</sup>。黄芪中含有黄酮类、苷类、氨基酸、微量元素等物质,具有抗肿瘤、抗衰老、抗应激、抗氧化、抗病毒等药理作用,临床治疗中常配合化疗治疗多种恶性肿瘤,疗效较好<sup>[3-5]</sup>;白花蛇舌草具有清热解毒、抗癌、消肿止痛等功效,治疗肿瘤、炎症等疗效确切<sup>[6]</sup>;天南星具有燥湿化痰、祛风止疼、散结消肿等功效,在抗肿瘤、抗心血管疾病等方面均有很好疗效<sup>[7]</sup>;蜈蚣具有熄风止痉、解毒散结、通络止痛之功效,临床常用于治疗肿瘤、糖尿病及并发症、原发性高血压等<sup>[8]</sup>;党参具有补气生津、润肺化痰、消肿解毒的功效,明党参根皮中 5 种呋喃香豆素类成分具有明显的抗肿瘤活性<sup>[9]</sup>。

通窍活血汤的传统制剂为汤剂,放置后易产生大量沉淀<sup>[10]</sup>。利用 75% 乙醇回流提取该复方,得到的醇提物对大鼠脑损伤有保护作用<sup>[2]</sup>。复方药液成分复杂,提取方法和细胞作用时间均会影响治疗效果,为提取工艺优选和筛选对细胞作用的有效成分增加了难度<sup>[11]</sup>。黄连解毒汤水提液经有机溶剂梯度萃取后,应用 MTT 比色法筛选出了改善脑缺血、益智作用的有效部位<sup>[12]</sup>。在确定九味通窍汤醇提物体外抗脑胶质瘤作用的基础上<sup>[13]</sup>,本实验选择不同溶剂萃取九味通窍汤醇提物,应用 MTT 比色法筛选具有明显脑胶质瘤 U251 细胞增殖抑制作用的有效部位,为该复方抗肿瘤作用机制和效应成分研究提供实验依据。

### 1 材料

Model 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),倒置相差 IX51 型显微镜(日本 Olympus 公司),Scientific Forma 3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司),TDL80-2B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),2695 Alliance-ZQ2000 型液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司,Masslynx 4.0 高级色谱工作站),

AL204-IC 型电子分析天平(瑞典 Mettler Toledo 公司),Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

九味通窍汤药材均购自南京医药股份有限公司,经南京中医药大学王春根教授鉴定为黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根(产地黑龙江,批号 20130706),白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* 干燥全草(产地安徽,批号 20130706),天南星 *Arisaema heterophyllum* 的干燥块茎(产地安徽,批号 20130706)等,均符合 2010 年版《中国药典》(一部)相关项下规定;芒柄花素、芒柄花苷对照品(批号分别为 PCM-AA-006-20120405,PCM-AA-006-20120406,天津马克生物技术有限公司),毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号 111920-201001,中国食品药品检定研究院),毛蕊异黄酮对照品(批号 05-2027,上海中药标准化研究中心),乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

培养基[高糖达尔伯克必需基本培养基(DMEM)-胎牛血清(9:1),双抗  $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ],DMEM 高糖培养基(批号 20131010),细胞株(U251 人源脑神经胶质瘤细胞),胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液,噻唑蓝(MTT)细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(批号 20130728)均购自南京凯基生物科技发展有限公司;胎牛血清(批号 130126,浙江天杭生物科技有限公司),替尼泊苷注射液(批号 2B01213,美国百时美施贵宝公司)。

### 2 方法与结果

**2.1 药液的制备和组分分离** 在前期研究基础上,称取处方量药材,粉碎成粗粉,按剂量比例混合的九味通窍汤药材粗粉共 115 g,加 10 倍量 85% 乙醇浸泡 0.5 h,回流提取 2 h,热过滤,滤渣加 8 倍量 85% 乙醇回流提取 2 h,热过滤,合并滤液,减压浓缩并定容成  $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  溶液,经  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,得药液。药液分别加 3 倍量石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、水饱和正丁醇梯度萃取 3 次,合并萃取液,减压浓缩至适宜体积,氮气吹干仪于  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  挥发完全,得石油醚萃取物(部位 I),三氯甲烷萃取物(部位 II),乙酸乙酯萃取物(部位 III),水饱和正丁醇萃取

物(部位Ⅳ),残留水层液(部位Ⅴ)。同法制备黄芪药液。

**2.2 各部位指标成分的测定** Agilent HC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相(乙腈+0.05%甲酸)(A)-(水+0.05%甲酸)(B)梯度洗脱(0~50 min,5%~55% A;50~70 min,55%~60% A;70~90 min,60%~85% A;90~100 min,85%~100% A),柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL,检测波长 254 nm。理论塔板数以毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素计均不低于 5 000。九味通窍汤、黄芪及各萃取部位中指标性成分的含量见表 1 和图 1。

表 1 九味通窍汤、黄芪及各萃取部位中指标成分的含量  
Table 1 Contents of index components from Jiuwei Tongqiao decoctions,Astragali Radix and each extracting parts

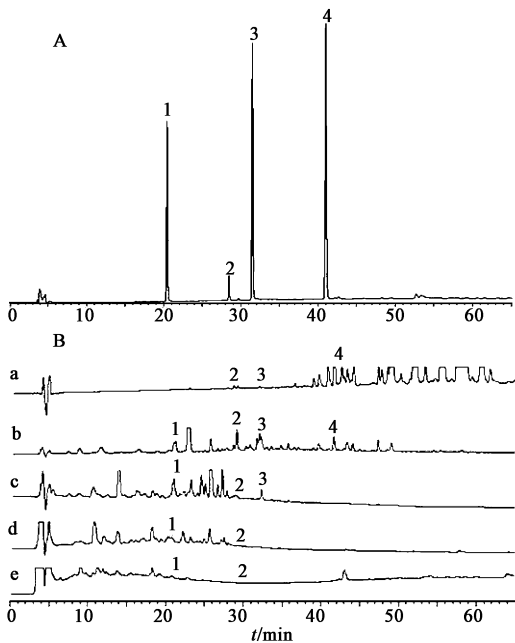
| 提取液 | 生药                         | 毛蕊异黄酮                       | 芒柄花苷                       | 毛蕊                        | 芒柄     |
|-----|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------|
|     | 质量浓度<br>/g·L <sup>-1</sup> | 葡萄糖苷<br>/μg·g <sup>-1</sup> | 异黄酮<br>/μg·g <sup>-1</sup> | 花素<br>/μg·g <sup>-1</sup> |        |
| 全方  | 2 000                      | 62.72                       | 3 329.08                   | 404.16                    | 186.12 |
| 黄芪  | 400                        | 44.02                       | 433.03                     | 306.27                    | 113.72 |
| 部位Ⅰ | 400                        | 0.00                        | 27.80                      | 0.72                      | 39.08  |
| 部位Ⅱ | 400                        | 2.68                        | 29.60                      | 2.00                      | 6.16   |
| 部位Ⅲ | 400                        | 7.04                        | 76.36                      | 43.47                     | 0.00   |
| 部位Ⅳ | 400                        | 5.12                        | 122.36                     | 0.00                      | 0.00   |
| 部位Ⅴ | 400                        | 1.64                        | 10.52                      | 0.00                      | 0.00   |

**2.3 体外药效学研究** 将 5×MTT 用 Dilution Buffer 稀释成 1×MTT。取 2.1 项下药液用 1% 二甲亚砜(DMSO)-DMEM 溶液配制成 400 g·L<sup>-1</sup>,依次稀释 5 倍,得 80,16,3.2 g·L<sup>-1</sup> 的溶液。取各部位萃取物分别用 1% DMSO-DMEM 溶液 2 mL 复溶并定容至含生药 400 g·L<sup>-1</sup>,依次稀释 5 倍,得 80,16,3.2 g·L<sup>-1</sup> 的溶液。取对数生长期的 U251 细胞,将

表 2 九味通窍汤对 U251 细胞的抑制作用( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Table 2 Inhibition of Jiuwei Tongqiao decoctions on U251 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别    | 剂量                 | 24 h        |                    | 48 h        |                    | 72 h        |                    |
|-------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|
|       | /g·L <sup>-1</sup> | A           | 抑制率/%              | A           | 抑制率/%              | A           | 抑制率/%              |
| 空白    | -                  | 0.142±0.011 | -                  | 0.112±0.006 | -                  | 0.094±0.016 | -                  |
| 阴性    | -                  | 2.166±0.172 | -                  | 1.930±0.163 | -                  | 1.830±0.127 | -                  |
| 黄芪    | 10                 | 1.124±0.008 | 48.1               | 1.013±0.034 | 47.5               | 0.787±0.204 | 57.0               |
| 九味通窍汤 | 400                | 0.351±0.021 | 83.8 <sup>2)</sup> | 0.216±0.016 | 88.8 <sup>2)</sup> | 0.101±0.015 | 94.5 <sup>2)</sup> |
|       | 80                 | 1.791±0.082 | 17.3 <sup>1)</sup> | 1.517±0.019 | 21.4 <sup>1)</sup> | 1.151±0.017 | 37.1 <sup>1)</sup> |
|       | 16                 | 2.103±0.011 | 2.9 <sup>2)</sup>  | 1.859±0.058 | 3.7 <sup>2)</sup>  | 1.757±0.061 | 4.0 <sup>2)</sup>  |
|       | 3.2                | 2.131±0.034 | 1.6 <sup>2)</sup>  | 1.886±0.063 | 2.3 <sup>2)</sup>  | 1.792±0.042 | 2.1 <sup>2)</sup>  |

注:与黄芪组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01(表 3 同)。



A. 对照品;B. 不同萃取部位样品;a. 部位Ⅰ;b. 部位Ⅱ;c. 部位Ⅲ;d. 部位Ⅳ;e. 部位Ⅴ;1. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷;2. 芒柄花苷;3. 毛蕊异黄酮;4. 芒柄花素;

图 1 九味通窍汤 HPLC  
Fig. 1 HPLC chromatogram of Jiuwei Tongqiao decoctions

平均每孔 1×10<sup>4</sup> 个细胞种于 96 孔板中,每组设 3 个复孔,用培养基 100 μL 在 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 24 h,依次加入各质量浓度受试化合物 50 μL,将 96 孔板在 37 ℃,5% CO<sub>2</sub>,100% 湿度的细胞培养箱中孵育 24,48,72 h,采用 MTT 检测细胞活力,于 550 nm 处测定吸光度(A),以替尼泊苷为阳性组。计算各组的细胞抑制率(B),并与阴性组进行 t 检验比较,见表 2。采用线性回归法计算半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别为 173.64,130.34,82.34 g·L<sup>-1</sup>,说明九味通窍汤对 U251 细胞的抑制作用具有明显的时间-剂量效应关系,72 h 时该复方对细胞的抑制作用明显。在 t 检验中,利用 IC<sub>50</sub> 比较各组对细胞抑制作用的强弱。

九味通窍汤 5 个萃取部位对 U251 细胞的抑制作用见表 3,计算部位 I ~ V 的 IC<sub>50</sub>分别为 182. 76, 81. 52,46. 89,97. 82,93. 52 g·L<sup>-1</sup>,说明部位Ⅲ对细胞具有显著抑制作用。

表 3 九味通窍汤 5 个萃取部位给药后 72 h 对 U251 细胞的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Inhibition of five extracting parts from Jiuwei Tongqiao decoctions on U251 cells at 72 h after dosing( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别    | 剂量<br>/g·L <sup>-1</sup> | 部位 I            |                     | 部位 II           |                     | 部位 III          |                     | 部位 IV           |                     | 部位 V            |                     |
|-------|--------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
|       |                          | A               | 抑制率<br>/%           | A               | 抑制率<br>/%           | A               | 抑制率<br>/%           | A               | 抑制率<br>/%           | A               | 抑制率<br>/%           |
| 空白    | -                        | 0. 091 ± 0. 013 | -                   | 0. 091 ± 0. 013 | -                   | 0. 091 ± 0. 013 | -                   | 0. 091 ± 0. 013 | -                   | 0. 091 ± 0. 013 | -                   |
| 阴性    | -                        | 1. 811 ± 0. 072 | -                   | 1. 811 ± 0. 072 | -                   | 1. 811 ± 0. 072 | -                   | 1. 811 ± 0. 072 | -                   | 1. 811 ± 0. 072 | -                   |
| 黄芪    | 10                       | 0. 742 ± 0. 175 | 59. 0               | 0. 742 ± 0. 175 | 59. 0               | 0. 742 ± 0. 175 | 59. 0               | 0. 742 ± 0. 175 | 59. 0               | 0. 742 ± 0. 175 | 59. 0               |
| 九味通窍汤 | 400                      | 0. 478 ± 0. 017 | 73. 6               | 0. 146 ± 0. 018 | 91. 9 <sup>2)</sup> | 0. 043 ± 0. 005 | 97. 6 <sup>2)</sup> | 0. 226 ± 0. 027 | 87. 5 <sup>2)</sup> | 0. 116 ± 0. 011 | 93. 6 <sup>2)</sup> |
|       | 80                       | 1. 454 ± 0. 064 | 19. 7 <sup>2)</sup> | 1. 275 ± 0. 072 | 29. 6 <sup>2)</sup> | 0. 900 ± 0. 046 | 50. 3 <sup>2)</sup> | 1. 344 ± 0. 115 | 25. 8 <sup>2)</sup> | 1. 568 ± 0. 032 | 13. 3 <sup>2)</sup> |
|       | 16                       | 1. 537 ± 0. 031 | 15. 1 <sup>1)</sup> | 1. 616 ± 0. 069 | 10. 8 <sup>1)</sup> | 1. 501 ± 0. 086 | 17. 1 <sup>2)</sup> | 1. 592 ± 0. 026 | 12. 1 <sup>2)</sup> | 1. 584 ± 0. 041 | 12. 5 <sup>2)</sup> |
|       | 3. 2                     | 1. 751 ± 0. 021 | 3. 3 <sup>2)</sup>  | 1. 734 ± 0. 076 | 4. 3 <sup>2)</sup>  | 1. 770 ± 0. 046 | 2. 3 <sup>2)</sup>  | 1. 658 ± 0. 071 | 8. 4 <sup>1)</sup>  | 1. 710 ± 0. 032 | 5. 6 <sup>2)</sup>  |

3 讨论

经 MTT 体外药效学筛选,九味通窍汤各给药组对 U251 细胞抑制作用 72 h 明显强于 48 h,说明该方作用于细胞 72 h 时,呈现的剂量效应好,但随着时间增加,时间-剂量效应关系不是呈线性趋势,故本文选取 72 h 为作用细胞时间。该方经石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和水饱和正丁醇萃取后,部位Ⅲ对细胞的作用最强,推测部位Ⅲ为抗肿瘤细胞 U251 增殖作用的最有效部位。

采用 HPLC 同时检测九味通窍汤醇提液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素 4 种指标性成分,结果发现该方法分离效果较好,可为该方的质量控制和机制研究提供条件。九味通窍汤醇提液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷-芒柄花苷-毛蕊异黄酮-芒柄花素(1.0:53.1:6.4:3.0),黄芪提取液中四者比例则为 1.0:9.8:7.0:2.6,部位Ⅱ中四者比例 1.3:14.8:1.0:3.1,部位Ⅲ中毛蕊异黄酮葡萄糖苷-芒柄花苷-毛蕊异黄酮(1.0:10.8:8.2)。部位Ⅱ中指标性成分的含量比例最接近九味通窍汤醇提液并包含测定的所有指标性成分,部位Ⅲ中指标性成分含量比例最接近黄芪提取液<sup>[14]</sup>,但缺失芒柄花素。因此,为探讨九味通窍汤药液的提取方法,乙酸乙酯和三氯甲烷联用较有利于化学成分提取,但三氯甲烷毒性较大,结合药效筛选比较,部位Ⅲ中含有较多抗肿瘤作用的有效成分,说明乙酸乙酯提取九味通窍汤较为可行。

[参考文献]

[ 1 ] 王清任. 医林改错[M]. 北京:中国中医药出版社, 1995:16.  
[ 2 ] 汪宁,刘青云,彭代银,等. 通窍活血汤对脑缺血大鼠

脑组织中 CGRP,ET,IL-1β,TNF-α 的影响[J]. 中成药,2005,27(11):1295-1297.  
[ 3 ] 陈华国,周欣,杨世林,等. 黄芪颗粒的 HPLC 特征图谱研究及 4 个成分含量测定[J]. 药物分析杂志, 2013,33(10):1756-1763.  
[ 4 ] 孙芳,宋波,王燕虎,等. 黄芪多糖联合碘-125 治疗中晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(1):189-192.  
[ 5 ] Liu Z Z, Chen S Y, Cai J, et al. Traditional Chinese Medicine syndrome-related herbal prescriptions in treatment of malignant tumors[J]. J Tradit Chin Med, 2013,33(1):19-26.  
[ 6 ] 罗金强,刘宏斌. 半枝莲、白花蛇舌草抗肿瘤的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(2):481-484.  
[ 7 ] 李杨,罗延顺,代欣桃,等. 天南星提取物的抑菌作用研究[J]. 大理学院学报,2014,13(2):9-11.  
[ 8 ] 姜建伟,何福根,章红燕. 中药蜈蚣抗肿瘤作用机制及临床应用研究进展[J]. 海峡药学,2012,24(9):28-29.  
[ 9 ] 王萌,陈建伟,李祥. 明党参根皮中 5 种呋喃香豆素类成分的体外抗肿瘤活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):203-205.  
[10] 沈贤发. 通窍活血汤加减治疗急性脑梗死临床观察[J]. 四川中医,2013,31(12):95-96.  
[11] 宋芳娇,曾克武,王学美. 中药复方有效成分组相关研究方法的研究进展[J]. 环球中医药,2012,5(12):951-955.  
[12] 李欢,朱华旭,潘林梅,等. 黄连解毒汤全方和不同极性部位的活性筛选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):124-127.  
[13] 吴梦莹,臧元帅,樊宏伟. 九味通窍汤的体外抗脑胶质瘤作用及化学成分分析[J]. 现代中药研究与实践,2014,28(3):33-37.  
[14] 沈小钟,杨帆,于荣敏. 响应面法优选黄芪提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):34-37.

[责任编辑 刘德文]