

HPLC 特征指纹图谱结合化学计量学比较不同生长年限川牛膝化学成分差异

施崇精¹, 刘小妹¹, 程中琴¹, 王姗姗¹, 袁强华², 刘莉², 宋英^{2*}

1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075

2. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610075

摘要: 目的 采用 HPLC 特征指纹图谱结合化学计量学方法比较 1~6 年生川牛膝的化学成分特征差异。方法 采用 HPLC 法测定 1~6 年生川牛膝的色谱图, 建立 6×54 峰面积数据矩阵并进行特征峰差异分析, 运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)对样品进行相似度分析, 运用 SPSS 22.0 软件进行聚类分析和主成分分析。结果 特征峰差异分析得出, 1 年生川牛膝在 4 个色谱峰处和 6 年生川牛膝在 5 个色谱峰处表现出组分专属性差异, 1 年生样品在 4 个色谱峰处峰面积明显高于其他年限样品, 表现出较大的组分累积量差异。相似度分析得出 3、4、5 年生川牛膝相似度均大于 0.98, 1、2、6 年生川牛膝相似度均小于 0.85, 聚类分析的树状图和主成分分析的得分三维图均将 3、4、5 年生川牛膝样品聚为一类。结论 不同生长年限川牛膝间化学组分存有一定的差异, 其中 3、4、5 年生川牛膝化学组分趋于一致, 为川牛膝采收时期提供科学的参考依据。

关键词: 川牛膝; HPLC; 特征指纹图谱; 化学计量学; 生长年限; 化学成分差异

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)22-5404-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.027

Comparison of chemical composition of *Cyathula officinalis* between different growth years by HPLC characteristic fingerprint combined with chemometrics

SHI Chong-jing¹, LIU Xiao-mei¹, CHENG Zhong-qin¹, WANG Shan-shan¹, YUAN Qiang-hua², LIU Li², SONG Ying²

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

2. Teaching Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: Objective HPLC characteristic fingerprint and chemometrics method were used to compare the chemical characteristics difference between 1—6 years old *Cyathula officinalis*. **Methods** The peak area data matrix of 6 × 54 and the difference of characteristic peak of 1—6 years old *C. officinalis* were analyzed by HPLC. Similarity analysis the samples was investigated with “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica 2004A”. Hierarchical clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were carried out with SPSS 22.0 software. **Results** According to the analysis of characteristic peak difference, 1 and 6 years old *C. officinalis* showed exclusive difference in four chromatographic peaks and five chromatographic peaks, respectively. The peak area of 1 year old sample was significantly higher than other years in four chromatographic peaks, which showed obvious differences in components cumulant. The similarity degree analysis showed that the similarity degree of the 3, 4, and 5 years old *C. officinalis* were more than 0.98, but the 1, 2 and 6 years old were less than 0.85. Dendrogram of HCA and 3D scatter plot of PCA showed that the 3, 4, and 5 years old *C. officinalis* were clustered into one class. **Conclusion** There are certain differences in the chemical components among different growth years of *C. officinalis*. The chemical components of the 3, 4, and 5 years old *C. officinalis* tend to be uniform, which provides a scientific reference for the harvest time of *C. officinalis*.

Key words: *Cyathula officinalis* Kuan; HPLC; characteristic fingerprint; chemometrics; growth years; chemical composition differences

收稿日期: 2018-05-20

基金项目: 国家中医药管理局国家中药标准化项目“川牛膝等 4 种中药饮片标准化建设”(ZYBZH-Y-SC-41); 四川省中医药管理局项目“川产地药材综合开发与区域发展—川牛膝”(2017ZY001)

作者简介: 施崇精(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂与炮制。E-mail: 1124758663@qq.com

*通信作者 宋英, 男, 主任中药师, 教授, 硕士研究生导师。Tel: (028)87783735 E-mail: songying624@163.com

川牛膝为苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 的干燥根, 现主产于四川省的金口河区永胜乡、宝兴县, 湖北省的宣恩县椿木营乡、恩施市板桥镇, 重庆市的奉节县、巫山县等地, 为著名川产道地药材^[1]。目前, 川牛膝野生来源极少, 多为规模化栽培种植, 于每年3~4月栽培在海拔1500 m以上的高山, 多于栽培后3~4年的冬季采挖, 但川牛膝采收易受冬季恶劣气候和市场价格波动影响, 实际采挖期在1~6年不等^[2]。关于川牛膝采收时期中不同生长年限的文献研究报道较少, 而采收时期中生长年限的不统一、不规范给道地药材的临床使用和资源开发带来一定的影响。本实验采用HPLC法测定1~6年生的川牛膝样品, 通过整合不同生长年限川牛膝的全部化学组分信息, 运用相似度分析、聚类分析、主成分分析等化学计量学方法, 分析不同生长年限川牛膝在生长过程中化学组分种类和积累存在的差异, 以期为川牛膝的最佳采收时期提供一定的参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); BP-211D 型十万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(中国)有限公司]; LE204E 型万分之一电子天平(梅特勒托利多仪器公司); 111B 型高速中药粉碎机(瑞安市永厉制药机械有限公司); KH-250B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 材料

杯苋甾酮对照品(批号 111804-201303, 质量分数 93.5%, 购自中国食品药品检定研究院); 甲醇、乙腈、磷酸(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 水为自制超纯水; 6批川牛膝均于2017年12月采集自乐山市金口河区永胜乡和平村川牛膝种植基地, 生长年限分别为1、2、3、4、5、6年, 鲜品洗净后于(50±5)℃的鼓式干燥箱中干燥备用。经成都中医药大学附属医院药剂科主任中药师盛蓉鉴定, 6批川牛膝样品均为苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 的干燥根, 符合《中国药典》2015年版的要求。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相为乙腈(A)和0.2%磷酸溶液(B), 梯度洗脱程序为0~8 min, 1% A; 8~15 min,

1%~4% A; 15~53 min, 4%~9% A; 53~70 min, 9%~15% A; 70~100 min, 15%~16% A; 100~110 min, 16%~22% A; 110~130 min, 22%~33% A; 130~145 min, 33%~42% A; 145~160 min, 42% A; 后运行10 min。检测波长为多波长切换: 0~15 min, 220 nm; 15~20 min, 200 nm; 20~25 min, 250 nm; 25~90 min, 220 nm; 90~109 min, 250 nm; 109~116 min, 200 nm; 116~160 min, 220 nm。体积流量1.0 mL/min; 进样量20 μL; 柱温20℃。

2.2 对照品溶液制备

取对照品杯苋甾酮适量, 精密称定, 置10 mL量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度线, 摇匀, 得质量分数为99.484 μg/mL的杯苋甾酮对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

取6批不同生长年限的川牛膝, 粉碎(过3号筛)。取各批次川牛膝粉末约1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入45%甲醇20 mL, 密闭, 称定质量, 超声处理(功率500 W, 频率25 kHz)1 h, 放冷, 再称定质量, 用45%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 经0.45 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取3年生川牛膝供试品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样6次, 结果显示, 以杯苋甾酮(29号色谱峰)为参照峰, 各共有色谱峰相对保留时间、相对峰面积RSD值均在3.0%以内, 表明该仪器精密度良好。

2.4.2 重复性考察 取3年生川牛膝, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液6份, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 结果显示, 以杯苋甾酮(29号色谱峰)为参照峰, 各共有色谱峰相对保留时间、相对峰面积RSD值均在3.0%以内。

2.4.3 稳定性考察 取3年生川牛膝供试品溶液适量, 在0、3、6、9、12、15、18、21、24、48 h后按“2.1”项下色谱条件测定, 记录共有峰保留时间和峰面积。结果显示, 以杯苋甾酮(29号色谱峰)为参照峰, 各共有色谱峰相对保留时间、相对峰面积RSD值均在3.0%以内, 表明该样品在48 h内稳定性良好。

2.5 HPLC 图谱测定

取6批样品的供试品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录各样品色谱图, 色谱图见图1。以色谱峰保留时间在±0.2 min内且DAD光

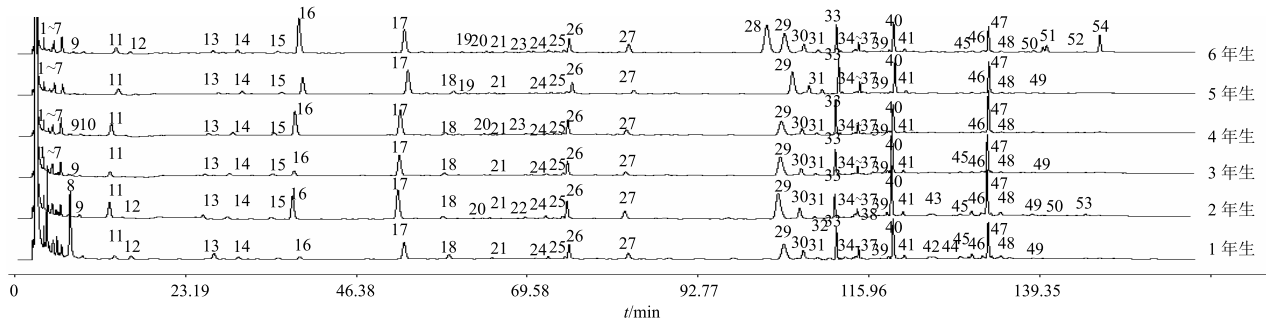


图 1 不同生长年限川牛膝 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of different growth years of *C. officinalis*

谱吸收曲线图一致的情况下视为同一化学组分，其中峰面积小于 10 的视为低响应噪音峰，通过安捷伦化学工作站自动积分得出 6 个样品中共检出的 54 个不同成分色谱峰，按保留时间顺序依次编号为 1~54，得出 6×54 的峰面积数据矩阵，其中指认了色谱峰 29 为杯苋甾酮。

2.6 特征峰差异分析

通过对 6×54 峰面积数据矩阵进行统计分析得出，不同生长年限的川牛膝在化学组分上存有一定规律性差异，其差异分为组分专属性差异和组分累积量差异。其中组分专属性差异主要体现在以下 9 个色谱峰位置：2、8、42 号色谱峰处，1 年生川牛膝检出色谱峰的峰面积分别为 817.9、1 446.1、188.8，而其他生长年限样品在该 3 处均未检出色谱峰；28、51、52、54 号色谱峰处，6 年生川牛膝检出色谱峰的峰面积为 1 682.5、112.7、160.3、380.7，而其他生长年限样品在该 4 处均未检出色谱峰。15 号色谱峰处，1 年生川牛膝未检出色谱峰，其他生长年限检出色谱峰的峰面积在 70.2~87.6。18 号色谱峰处，6 年生川牛膝未检出色谱峰，其他生长年限检出色谱峰的峰面积为 100.7~168.3。组分累积量差异主要体现在以下 4 个色谱峰位置：1、4、5、13 号色谱峰，1 年生样品峰面积明显高于其他年限样品，其他年限样品在 1、4 号色谱峰处峰面积趋于稳定，在 5、13 号色谱峰处峰面积随生长年限延长而降低，其 1~6 年生样品在 1 号色谱峰处峰面积依次为 189.4、95.6、79.4、92.0、59.3、81.9，在 4 号色谱峰处峰面积依次为 255.0、169.3、178.0、151.8、149.2、145.7，在 5 号色谱峰处峰面积依次为 242.4、59.4、18.3、0、0、0，在 13 号色谱峰处峰面积依次为 203.9、101.7、57.4、63.6、36.1、78.0。综上所述，组分专属性差异方面，1 年生川牛膝在 2、8、42、15 号色谱峰处和 6 年生

川牛膝在 28、51、52、54、18 号色谱峰处表现出专属性差异，且专属性特征峰峰面积响应差异较大；组分累积量差异方面，1 年生样品在 1、4、5、13 号色谱峰处明显高于其他年限样品，表现出较大的组分累积量差异。

2.7 相似度评价

将 1~6 年生川牛膝样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版)”软件中，在保留时间窗口设定为 0.1 min 的中位数法下采用多点校正后进行自动匹配，软件计算得出各样品间及与对照图谱的相似度，结果见表 1。由结果可知，一方面，以对照图谱 (R) 为参照，3~5 年生川牛膝相似度均大于 0.98，而 1、2、6 年生川牛膝相似度均小于 0.85，表现出明显的差异性；另一方面，以 6 个不同生长年限样品间的相似度可知，3~5 年生川牛膝样品间相似度均大于 0.97，表现出较强的一致性。综上所述可知，不同生长年限川牛膝之间组分存有一定的差异，其中 3~5 年生川牛膝组分较为一致，1、2、6 年生川牛膝组分上存有一定的差异，与特征峰差异分析结果部分趋于一致。

2.8 聚类分析

系统聚类法亦称阶梯或层次聚类法，是聚类分析诸方法中最为常见的一种，其基本思想是将多个样品各自作为一类，将相关系数距离最近的 2 类合并成一新类，得到的新类再和其他类进行相关系数的距离分析，直至所有的样品合为一大类，形成聚类图，最后根据聚类实际情况进行适当的分类^[3-4]。本实验将得到的 6×54 峰面积数据矩阵导入 SPSS 22.0 软件，以平方 Euclidean 距离为度量标准，采用组间连接聚类的系统聚类法绘制 6 个样品的聚类树状图，结果见图 2。由图 2 可知，不同生长年限样品按相关系数距离大小依次列为 4、5、3、2、1、6，结合研究问题的实际情况，以标尺值 3 为界点，

表 1 相似度分析结果

Table 1 Results of similarity analysis

样品	1 年生	2 年生	3 年生	4 年生	5 年生	6 年生	对照
1 年生	1.000						
2 年生	0.014	1.000					
3 年生	0.081	0.806	1.000				
4 年生	0.171	0.817	0.985	1.000			
5 年生	0.006	0.811	0.996	0.978	1.000		
6 年生	0.016	0.904	0.711	0.742	0.721	1.000	
对照	0.013	0.834	0.981	0.984	0.986	0.763	1.000

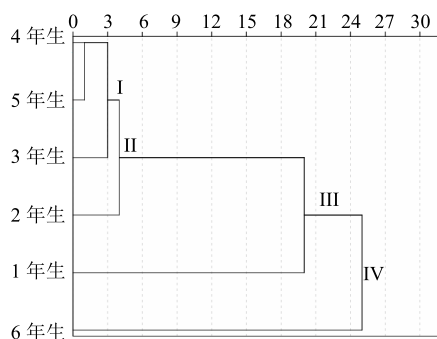


图 2 样品聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of samples

可将样品分为 4 类：第 I 类为 3~5 年生川牛膝，第 II 类为 2 年生川牛膝，第 III 类为 1 年生川牛膝，第 IV 类为 6 年生川牛膝。结果表明 4、5、3 年生川牛膝在化学组分种类和含量上趋于一致，而 2、1、6 年生川牛膝在化学组分上较 4、5、3 年生川牛膝差

异较大，聚类分析结果与特征峰差异分析、相似度分析趋于一致。

2.9 主成分分析

运用 SPSS 22.0 软件对 6×54 峰面积数据矩阵进行主成分分析，以初始特征值大于 1 为标准进行因子抽取，共得到 5 个主成分并计算主成分得分，初始特征值和方差贡献率结果见表 2，主成分和主成分得分结果见表 3。由表 2 可知，前 3 个主成分累积方差贡献率达 81.97%，选择可代表样品 81.97% 组分信息的前 3 个主成分得分绘制主成分得分三维图，结果见图 3。由图 3 可知，3~5 年生川牛膝分布上聚为一类，1、2、6 分布较散，各自为一类，表明 3~5 年生川牛膝化学组分的种类和含量上趋于稳定，而 1、2、6 生较 3~5 年生川牛膝在化学组分的种类和含量上存有一定的差异，主成分分析结果与特征峰差异分析、相似度分析、聚类分析趋于一致。

表 2 特征值和方差贡献率

Table 2 Characteristic value and variance contribution rate

主成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	21.413	39.655	39.655	21.413	39.655	39.655
2	14.411	26.686	66.341	14.411	26.686	66.341
3	8.437	15.624	81.965	8.437	15.624	81.965
4	5.611	10.391	92.356	5.611	10.391	92.356
5	4.128	7.644	100.000	4.128	7.644	100.000

表 3 主成分和主成分得分

Table 3 Principal component and scores of principal component

样品	主成分					主成分得分				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1 年生	1.58	-1.07	0.66	0.29	0.05	7.33	-4.05	1.91	0.68	0.10
2 年生	0.69	1.83	0.13	-0.28	0.49	3.18	6.96	0.39	-0.66	0.99
3 年生	-0.02	0.04	-0.86	-0.37	-1.81	-0.09	0.15	-2.49	-0.87	-3.69
4 年生	-0.61	-0.01	-0.64	1.80	0.40	-2.81	-0.05	-1.86	4.26	0.82
5 年生	-0.44	-0.70	-0.90	-1.19	1.12	-2.04	-2.66	-2.63	-2.82	2.27
6 年生	-1.21	-0.09	1.61	-0.25	-0.24	-5.58	-0.36	4.67	-0.58	-0.49

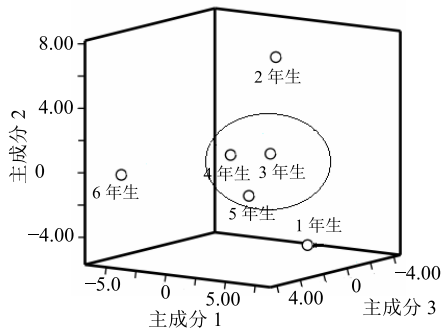


图 3 样品主成分得分三维图

Fig. 3 3D Scatter plot of principal component scores of samples

3 讨论

药材的采收是否科学、合理是保证中药饮片质量优质性和均一性的关键因素之一，更是中药饮片临床使用和制剂生产的重要保证^[5]。中药材来源广泛，主要有植物药、动物药、矿物药及其他加工品，传统上有对中药材的采收作出相应的规定，如根及根茎类、茎木类多于秋冬或初春采收，叶类和全草类多于植株旺盛时期采收，花类多于含苞待放时采收，两栖和爬行类多于夏秋两季捕捉，矿物药可全年采收等。《中国药典》2015年版对中药材的采收作出明确规定，如茎木类的大血藤规定为秋冬二季采收，全草类的鱼腥草可全年采割，花类的金银花规定为夏初花开放前采收，乌梢蛇多于夏秋二季捕捉，矿物药芒硝、矾石未作规定等。虽药典对各品种药材采收季节做出一定的规定，但均未对生长年限作出要求。中药在治疗疾病时发挥的药效学成分多为大类成分的总体效应，而来自自然资源的药材在生长过程中，物质的转化可能会新增或减少，累积的量也可能发生变化。通过探索不同生长年限药材的整体化学组分差异，可为药材的采收时期提供更为确切的参考依据^[6-9]。

本实验研究的中药材川牛膝，药用部位来源于苋科植物川牛膝 *C.offinalis* Kuan 的干燥根，根类植物多采收于秋冬季或初春时，此时植株地上部分枯萎或仅发芽露苗，物质营养多贮藏于地下部分，根的物质含量及种类最多^[10]。川牛膝含有多个化学组分群，主要有甾体类、多糖类、黄酮类，其中甾体类为主要成分，包括杯苋甾酮、异杯苋甾酮、5-表杯苋甾酮、羟基杯苋甾酮、前杯苋甾酮、头花杯苋甾酮、苋菜甾酮 A、苋菜甾酮 B 等 10 余种，该类成分易溶于稀醇溶液，多具有改善血液微循

环、抗肿瘤和降糖等药理活性^[11]。文献报道了 4 种由果糖和葡萄糖组成的多糖类组分，并命名为 CoPS1、CoPS2、CoPS3、CoPSH^[12]，该类成分易溶于水，无挥发性且缺少紫外特征吸收基团，并报道采用分光光度法、凝胶色谱、离子色谱和柱前衍生化的 HPLC 或 GC 法测定分析^[13]，多具有抗肿瘤、增强免疫功能和调理代谢等药理活性^[14]。黄酮类成分方面，文献报道有葛根素、5,2-二羟基-6,7-二甲氧基异黄酮、2-羟基-6,7-亚甲二氧基-5-甲氧基异黄酮等，还报道有其他成分阿魏酸、齐墩果酸等，药理活性方面报道较少^[11]。在药材品质鉴定中多成分测定分析更能全面地反映药材整体质量，尤其是采用 HPLC 法，不仅精密度高、重复性好，还具有成本低、时耗短等优势，为中药材化学成分鉴别和质量评价提供科学依据。本实验以川牛膝 45% 甲醇超声提取液进行多波长切换技术下的 HPLC-DAD 分析，以杯苋甾酮为参照峰，测定了川牛膝中多种甾体类成分。运用多波长切换技术可在不同时间段下切换成相应组分的较佳光谱吸收波长，从而能在同一色谱图中有效整合多种组分色谱峰信息，解决了单一波长下难以同时有效地反映多种甾体类成分的色谱峰信息，多波长切换技术广泛应用于中药材品质鉴定和中药制剂质量分析，方法较为成熟^[15]。

王奎鹏等^[16]以杯苋甾酮和葛根素含量为指标对 1~3 年生川牛膝进行比较分析，得出以 3 年生的川牛膝入药为佳，给川牛膝的采收提供一定的参考依据，但一方面其采集不同年限生川牛膝样本量较少，仅对 1~3 年生川牛膝进行比较，而实际川牛膝的采收可在 1~6 年，另一方面其分析比较的指标较少，仅纳入杯苋甾酮和葛根素含量，而本实验测定的杯苋甾酮含量不随生长年限显现出规律性差异，仅通过单一组分的测定难以体现药材的整体化学信息，存在一定的局限性。而本研究以 1~6 年生川牛膝为对象，采用 HPLC 法测得 54 个不同色谱峰组分，以此进行特征峰差异分析、相似度分析、聚类分析和主成分分析，通过多指标、多角度、多化学计量学方法对不同生长年限川牛膝进行整体信息分析，得出的结论趋于一致，为川牛膝采收时期提供一定的科学依据和参考。

参考文献

- [1] 施崇精, 王姗姗, 刘小妹, 等. 川产道地药材川牛膝现状探讨 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(22): 55-58.

- [2] 刘 维, 裴 瑾, 杨 梅, 等. 川产道地药材川牛膝产地变迁探讨 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1625-1628.
- [3] 聂 鞞, 朱培林, 房海灵, 等. HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地广东紫珠药材的质量 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 185-191.
- [4] 苏静华, 张 超, 孙 磊, 等. 指纹图谱结合化学计量学用于香橼品种鉴别的可行性分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2318-2324.
- [5] 王明喜. 浅谈中药的采收与质量的关系 [J]. 中医临床研究, 2016, 8(13): 116-117.
- [6] 刘 刚, 俞年军, 韩荣春, 等. 不同生长年限霍山石斛高效液相指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1424-1429.
- [7] 赵飞亚, 陶爱恩, 董 洪, 等. 不同生长年限南重楼主要次生代谢产物积累与其质量的关联性研究 [J]. 时珍国医国药, 2018(3): 694-697.
- [8] 郭念欣, 李颖春, 蔡佳良, 等. 不同生长年限的巴戟天化学成分的指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 65-68.
- [9] 郭玲玲, 刘 毅, 禄梦杰, 等. HPLC 法同时测定陕西产不同生长年限野生和栽培黄芩中 9 种化学成分的含量 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 935-940.
- [10] 赵华杰, 舒光明, 周先健, 等. 我国川牛膝资源分布及生产状况调查 [J]. 资源开发与市场, 2012, 28(5): 414-415.
- [11] 田会萍, 董亚琳. 川牛膝的药学研究进展 [J]. 国际中医中药杂志, 2013, 35(3): 270-273.
- [12] 陈晓明. 川牛膝多糖的结构研究 [A] // 第八届全国复合糖生物化学与分子生物学学术会议论文摘要论文集 [C]. 上海: 中国生物化学与分子生物学会复合糖专业委员会, 2004.
- [13] 李俊丽, 韩兴发, 刘铁秋, 等. 川牛膝多糖对衰老小鼠模型的体内抗氧化作用 [J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(7): 553-559.
- [14] 万 强, 吴学昊, 范华均, 等. HPLC 衍生化法分析决明子多糖水解产物中单糖组分及其多糖组成特征的研究 [J]. 分析测试学报, 2014, 33(11): 1231-1236.
- [15] 施崇精, 王姗姗, 程中琴, 等. HPLC 特征指纹图谱结合化学计量学比较川牛膝及其混淆品、掺混品化学成分差异 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2313-2320.
- [16] 王奎鹏, 余海滨. 不同生长年限川牛膝中葛根素和杯菟甾酮含量比较与分析研究 [J]. 食品与药品, 2017, 19(2): 84-88.