

川牛膝和怀牛膝化学成分提取分离及含量测定研究进展

梁林辉, 杜翠华, 梁大伟* (雅安职业技术学院, 四川雅安 625000)

摘要 川牛膝和怀牛膝为道地药材, 临床使用广泛, 疗效显著, 其成分三萜皂苷类、甾酮类、多糖类生物活性显著, 为其发挥药效的主要物质。总结国内外公开发表的相关文献, 对川牛膝和怀牛膝中三萜皂苷类、甾酮类、多糖类成分的提取分离及含量测定研究进行综述, 以期为其有效成分进一步研究及开发提供参考。

关键词 川牛膝; 怀牛膝; 化学成分; 提取分离; 含量测定

中图分类号 R 284 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)09-0012-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.09.004



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

The Research Progress on Extraction and Determination Methods of Chemical Constituents in *Cyathulae Radix* and *Achyranthis Bidentatae Radix* Polysaccharides

LIANG Lin-hui, DU Cui-hua, LIANG Da-wei (Ya'an Polytechnic College, Ya'an, Sichuan 625000)

Abstract *Cyathulae Radix* and *Achyranthis Bidentatae Radix* polysaccharides are genuine crude drugs. It's clinical application is extensive, and the activated ingredients are triterpenoid saponins, sterone compounds and polysaccharide. This paper summarizes the extraction and determination methods of chemical constituents in *Cyathulae Radix* and *Achyranthis Bidentatae Radix* polysaccharides, and provides a reference for its further development and utilization

Key words *Cyathulae Radix*; *Achyranthis Bidentatae Radix* polysaccharides; Chemical constituent; Extraction; Determination

川牛膝为苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 的干燥根, 是川产道地药材, 主要产自雅安市天全县、宝兴县、汉源县以及乐山的金河口区, 重庆、云南、贵州亦有分布; 怀牛膝为河南省焦作市特产, 是中国国家地理标志产品。它们具有逐瘀通经、通利关节、利尿通淋的功能, 用于经闭癥瘕、胞衣不下、跌扑损伤、风湿痹痛、足痿筋挛、尿血血淋治疗, 临床疗效显著。化学成分主要有三萜皂苷类^[1]、甾酮类^[2]及多糖类^[3], 有少量的生物碱、黄酮类等成分。近年来, 关于川牛膝和怀牛膝的研究主要集中于化学成分鉴定及药理学研究, 其有效成分的提取、分离纯化及含量测定研究较少, 该研究从主要有效成分三萜皂苷类、甾酮类、多糖类的提取分离及含量测定方面进行综述, 以期对牛膝的进一步开发利用提供借鉴。

1 三萜皂苷

1.1 提取分离方法 三萜皂苷类化合物是川牛膝主要成分之一。罗懿钜等^[4]综述了牛膝中有效成分, 发现 39 种三萜皂苷类化合物, 其中 7 种为川牛膝中含有, 主要为齐墩果酸型皂苷。王丽景^[5]采用正交试验考察了乙醇浓度、料液比、提前时间、提取次数等因素对牛膝中皂苷提取效果的影响, 最优工艺为乙醇浓度为 80%、料液比 1:8、回流提取 2 次, 每次 3 h, 牛膝总皂苷含量可达 1.889 mg/mL, 大孔树脂吸附处理, 含量可达 60%。王俊等^[6]分别以甲醇、乙醇为提取溶剂, 比较超声法、回流提取法和索氏提取法, 发现乙醇提取效率明显高于甲醇, 超声提取法与索氏提取法提取效率相当, 均高于回流提取法。程永杰等^[7]采用正交试验法筛选出牛膝中总皂苷的最佳提取工艺为药材 10 倍量的 80% 乙醇为溶

剂, 提取 3 次, 每次 1 h。柳立新等^[8]比较了甲醇回流提取、乙醇回流提取、乙醚索氏提取除杂再用甲醇回流提取、水超声提取和乙醇超声提取 5 种方法, 发现 70% 乙醇超声提取和回流提取总皂苷的含量较高, 分别为 4.97% 和 4.75%。尚风琴^[9]以 70% 乙醇为提取溶剂, 料液比 1:10, 比较了超声法、回流法和浸渍法 3 种提取方法, 结果显示最佳提取方式顺序为回流提取>浸渍提取>超声提取, 进一步正交试验考察了乙醇浓度、料液比、提取次数和提取时间 4 个因素, 最优提取工艺为采用 90% 乙醇为提取溶剂, 料液比为 1:12, 提取 3 次, 每次 1 h, 川牛膝总皂苷含量达 10.97 mg/g。目前针对川牛膝皂苷类化合物提取分离研究较少, 通过上述文献研究可知, 川牛膝皂苷类化合物提取分离可采用乙醇回流提取法, 通过有机溶剂萃取去除脂溶性成分, 然后经大孔树脂进行分离纯化, 该方案简单易行, 且易于工业化。

1.2 含量测定方法 三萜皂苷类化合物含量检测主要为紫外分光光度法和液相色谱法。卫修来等^[10]利用三萜总皂苷可与高氯酸-香草醛试剂显色的原理, 建立了紫外分光光度法测量牛膝总皂苷, 以齐墩果酸为对照品, 最大吸收波长为 544 nm, 该方法测得怀牛膝中总皂苷平均含量为 6.24%; 利用同一比色法方法, 最大吸收波长为 547 nm, 柳立新等^[8]测得土牛膝中总皂苷含量最高为 4.97%。王丽景^[5]选取最大吸收波长为 527 nm, 测定牛膝提取纯化后总皂苷含量为 60%, 由于比色法所用的显色剂专属性较差, 可能是造成最大吸收波长差异较大的原因。

欧丽兰等^[11-12]采用高效液相色谱法(HPLC)测定土牛膝中齐墩果酸含量、比较怀牛膝与川牛膝中皂苷含量的不同。尚风琴^[9]建立了川牛膝总皂苷的 HPLC-MS 指纹图谱, 测得大孔树脂富集后的川牛膝皂苷总提取物含量为 52.5%。闫文静等^[13]采用 HPLC-ELSD 法较好地分离了两种皂苷, 并测定其含量。

基金项目 雅安市应用技术研究及开发项目(21KJH0080)。

作者简介 梁林辉(1986—), 男, 河南鄢陵人, 硕士, 从事天然药物化学研究。* 通信作者, 教授, 博士, 从事药物化学研究。

收稿日期 2021-08-17; 修回日期 2021-09-30

2 甾酮

2.1 提取分离方法 川牛膝中甾酮类化合物多达 13 种,主要为杯苋甾酮及其类似物,是川牛膝发挥药理作用的重要化学成分。2020 版《中国药典》规定,川牛膝中杯苋甾酮含量不得少于 0.03%。王龙等^[14]采用正交试验法考察了水量、提取温度、提取时间和次数 3 个因素对牛膝中甾酮的提取效率影响,最优工艺为料液比 1:50,温度 50~100 ℃,提取 2 次,每次 2 h,水煮提取物中蜕皮甾酮含量为 9.30%。同时,还以水为溶剂提取牛膝总甾酮^[15],分别按料液比 1:20、1:15 水煎煮 2 次,每次 2 h,提取液经 D 型大孔树脂处理,考察 pH、吸附流速、洗脱液种类及用量对牛膝总甾酮的影响,在最优分离条件下,D 型大孔树脂对牛膝甾酮的吸附量为 28.9 mg/g,纯化后的牛膝总甾酮含量达 60%,蜕皮甾酮含量达 10%。孟大利等^[16-17]以乙醇为提取溶剂,采用回流提取法,经大孔树脂脱糖纯化、系统溶剂萃取、硅胶色谱柱层析分离,得到漏芦甾酮 B、旌节花甾酮 D 和红苋甾酮;林大专等^[18]采用类似提取分离方法得到 3 种蜕皮甾酮。蒙汉富等^[19]以甲醇或水为提取溶剂,采用正交试验法考察了甲醇浓度、提取时间、提取次数、溶剂倍量 4 种因素,最佳提取工艺为 60 倍量 30% 甲醇超声提取 2 次,每次 1.5 h。孔飞飞等^[20]采用回流提取法考察了乙醇浓度、溶剂倍量及提取时间 3 个因素对杯苋甾酮的提取效率影响,最优提取工艺为用 70% 乙醇加热回流提取 2 次,料液比分别为 1:12 和 1:10,提取时间均为 2 h。孙亮亮等^[21]采用响应面分析法优化了超声法提取甾酮,以正丁醇水溶液为提取溶剂,考察了溶剂、料液比及提取时间对 β -蜕皮甾酮提取效率的影响,最优工艺为 45% 正丁醇溶液,料液比为 1:15,提取时间 1.7 h。欧阳文等^[22]采用甲醇回流提取 3 次,每次 2 h,提取液浓缩后经制备型 ODS 层析柱、硅胶柱层析分离得 β -蜕皮甾酮、牛膝甾酮、水龙骨甾酮 3 种单体化合物。朱婷婷等^[23]采用乙醇渗漉提取,浓缩液经系统溶剂萃取、柱层析分离得 25S-牛膝甾酮、25R-牛膝甾酮和 β -牛膝甾酮单体化合物。

除了上述常规溶剂提取法外,郑义哲^[24]采用二氧化碳超临界流体萃取法提取蜕皮甾酮,首先探索夹带剂对提取蜕皮甾酮的影响,确定最优工艺条件是以二甲亚砜为夹带剂,压力 25 MPa、温度 70 ℃,夹带剂流速 0.5 mL/min,静态萃取时间 10 min,动态萃取时间 1 h,二氧化碳流量 2 L/min。

综上所述,鉴于试验条件及制备量的因素,川牛膝中甾酮类化合物可采用有机溶剂提取法,大孔树脂分离纯化,再结合有机溶剂(乙酸乙酯、正丁醇)萃取法可得到含量较高的甾酮类化合物,如分离单体化合物须经多次层析分离等方法来实现。

2.2 含量测定方法 甾酮类与三萜皂苷具有相似的结构母核,可以采用香草醛-高氯酸比色法测量甾酮含量。王龙等^[25]利用该方法,以 β -蜕皮甾酮为对照,在最大吸收峰 550 nm 处,紫外分光光度法测得大孔树脂富集后的牛膝提取物总甾酮含量为 53.3%。刘姣等^[26]以同样的方法,采用最大吸收波长 243 nm,测定怀牛膝中总甾酮含量为 2.089%。

显色法专属性较差,目前甾酮类化合物含量检测主要为高效液相色谱法。胡亮等^[27-28]采用反向色谱柱测定粗毛牛膝、野生牛膝和柳叶牛膝、杯苋甾酮含量。尚风琴^[9]利用 HPLC-MS 法构建怀牛膝和川牛膝总甾酮指纹图谱。川牛膝中甾酮类化合物主要为杯苋甾酮、羟基杯苋甾酮、森告甾酮等,2020 版中国药典规定了川牛膝中杯苋甾酮的检测方法,采用 HPLC 法,以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,甲醇-水为流动相进行梯度洗脱,检测波长为 243 nm。

综上所述,可利用 HPLC 法测定川牛膝甾酮类单体化合物的含量,该方法简单,结果可靠。

3 多糖

3.1 提取分离方法 最新研究表明,川牛膝多糖类成分具有很好药理活性。刘颖华等^[29]采用水提醇沉法得川牛膝多糖粗品,经阴离子交换树脂和凝胶分离,得多糖纯品,总收率为 22.5%。赵磊等^[30]以热水为提取溶剂,经氯仿萃取,浓缩后醇沉得到川牛膝粗多糖,考察提取时间、料液比、温度、提取次数 4 种因素对多川牛膝粗多糖提取效率的影响,最优工艺参数为料液比 1:15,提取温度 60 ℃,浸提时间 2 h,提取 1 次,醇沉浓度 85%,川牛膝多糖的收率为 49.18%。侯剑萍等^[31]采用水煎煮法提取粗多糖,经脱蛋白、脱盐和醇沉法纯化,最佳提取纯化工艺为料液比 1:10,提取 3 次,每次 2 h,采用三氯乙酸(TCA)法脱蛋白,分子筛法脱盐处理,80% 乙醇沉淀。梁歌等^[32]采用同样的水提醇沉法提取川牛膝粗多糖,通过正交试验考察了提取温度、提取时间、料液比、乙醇浓度对多糖得率的影响,最佳提取工艺为提取温度 100 ℃,提取时间 8 h,料液比 1:20,95% 乙醇溶液。黄志芳等^[33]采用 75% 乙醇回流提取,经水提取、浓缩、醇沉,收集沉淀,再用三氯乙酸除去蛋白、醇沉、有机溶剂洗涤等步骤得到牛膝多糖,收率为 7.2%,含量达 12.85%。

刘传敏等^[34]采用酶解超声法提取川牛膝多糖,正交试验考察了酶解时间、酶用量、pH、酶解温度对酶解效果的影响和样品粒度、料液比、超声时间、超声次数对提取效果的影响。最佳工艺条件为酶解 1 h,酶用量 15 U/g,pH 5.0,酶解温度 50 ℃,粒度 20 目,料液比 1:40,超声时间 20 min。谷旭晗等^[35]采用同样的酶法提取川牛膝多糖,通过正交试验确定最佳工艺条件为药材粒径 550~830 μm 、酶用量 4 mg/g、酶解温度 50 ℃、酶解时间 90 min、溶剂 pH 为 5.0、料液比 1:60,提取时间 30 min,在此条件下,川牛膝多糖收率为 71.7%。叶秀娟等^[36]以复合酶解法进行提取,最佳提取工艺为料液比 1:20、复合酶用量 0.7%、pH 6.0、温度 45 ℃,该条件下提取的川牛膝多糖含量大于 52%。

魏涛等^[37]利用超声波辅助提取怀牛膝多糖,经石油醚和乙醇脱脂除杂,水为溶剂,正交试验确定最优提取条件为超声功率 1 000 W、提取温度 60 ℃、提取时间 60 min、料液比 1:30,怀牛膝多糖提取率为 6.1%。姜艳等^[38]采用同样方法提取牛膝多糖,最后经醇沉得到牛膝多糖,收率达到 11.7%。赵玥琪等^[39]以川牛膝为原料,比较了超声辅助提取法与煎煮法提取多糖的效率,发现在相同的提取温度、时间和料液

比情况下,超声波提取法比煎煮提取效率高9.8%。

除了上述超声波提取法,微波辅助法也应用于牛膝多糖的提取分离研究中^[40-41]。此外,蒸汽爆破预处理法有助于牛膝多糖的提取^[42]。多糖纯化工艺中,采用醇沉、萃取法除蛋白等方法较多,壳聚糖为絮凝剂有助于川牛膝的总多糖絮凝纯化^[43]。

3.2 含量测定方法 多糖测定方法主要为苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法比色法。丁淑彬等^[44-45]采用紫外分光光度法、苯酚-硫酸显色法,在490 nm波长处对川牛膝中多糖的含量进行了测定,该法简单快速、灵敏度高、重现性好。张纯等^[46]改良了蒽酮-硫酸比色法测牛膝多糖,经典的蒽酮-六十显色法反应条件为蒽酮试剂浓度为0.2%,反应温度100℃,反应时间10 min,波长620 nm,发现反应温度会改变最大吸收波长,优化后的反应条件更改为反应温度20℃,其他条件不变。李根林等^[47]比较了苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法2种方法对多糖含量检测的影响,发现苯酚-硫酸法显色灵敏度高于蒽酮-硫酸显色法。

除了上述比色法测量多糖外,多糖经水解为单糖后可利用高效液相色谱法进行测定,王小燕等^[48]利用牛膝多糖的柱前衍生化,建立怀牛膝多糖的柱前衍生化-HPLC指纹图谱及单糖含量测定方法,可为怀牛膝饮片质量评价提供参考。

4 小结

该研究主要对川牛膝和怀牛膝中三萜皂苷类、甾酮类及多糖3种主要成分的提取分离与含量测定进行综述,发现研究主要集中在化学成分和药理学研究,对3种主要成分的批量纯化工艺研究较少,对单体化合物的检测方法研究还不足。川牛膝做为川产道地药材,未来可进一步针对有效成分的分离及纯化进行深入研究,为进一步开发川牛膝的应用提供有力支撑。

参考文献

- [1] LIU Y H, HE K Z, YANG M, et al. Structure of a bioactive fructan from the root of *Cyatula officinalis* [J]. *Acta botanica sinica*, 2004, 46(9): 1128-1134.
- [2] 马英, 毕开顺, 王玺, 等. HPLC法测定川牛膝中杯萜甾酮的含量[J]. *中草药*, 2000, 31(6): 427-428.
- [3] 李祖伦, 石圣洪, 陈红, 等. 川牛膝多糖的免疫活性研究[J]. *中药材*, 1998, 21(2): 90-92.
- [4] 罗懿钊, 欧阳文, 唐代凤, 等. 牛膝中皂苷和甾酮类物质基础及药理活性研究进展[J]. *中国现代中药*, 2020, 22(12): 2122-2136.
- [5] 王丽景. 牛膝指纹图谱和牛膝皂苷的提取及其药理作用的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2009.
- [6] 王俊, 王芳, 唐灿. 川牛膝中齐墩果酸提取工艺研究[J]. *泸州医学院学报*, 2010, 33(4): 389-391.
- [7] 程永杰, 杨兴鑫, 张艳利, 等. 正交试验法优选牛膝的提取工艺[J]. *山西医科大学学报*, 2010, 41(1): 42-44.
- [8] 柳立新, 张毅. 不同提取方法对土牛膝总皂苷含量测定的影响[J]. *安徽医药*, 2013, 17(8): 1296-1297.
- [9] 尚凤琴. 怀牛膝与川牛膝功能活性成分的比较研究[D]. 武汉: 中国科学院大学(中国科学院武汉植物园), 2016.
- [10] 卫修来, 高昌琨, 高建, 等. 怀牛膝中总皂苷含量测定[J]. *安徽医药*, 2007, 11(5): 424-425.
- [11] 欧丽兰, 余昕, 张椿, 等. 土牛膝的生药学鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(9): 5204-5206, 5290.
- [12] 刘伟华. 高效液相色谱法比较怀牛膝与川牛膝中三萜皂苷含量[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(24): 2725-2726, 2736.

- [13] 闫文静, 仲彦颖, 汪豪, 等. HPLC-ELSD法测定川牛膝中两种三萜皂苷的含量[J]. *药学与临床研究*, 2014, 22(4): 336-338.
- [14] 王龙, 胥秀英, 郑一敏, 等. 正交实验法研究牛膝中甾酮的水煮提取工艺[J]. *时珍国医国药*, 2005, 16(11): 1116-1117.
- [15] 王龙, 胥秀英, 郑一敏, 等. 大孔吸附树脂提取分离牛膝总甾酮[J]. *精细化工*, 2004, 21(S1): 130-132, 139.
- [16] 孟大利, 侯彬玲, 汪毅, 等. 中药牛膝中的植物甾酮类成分[J]. *沈阳药科大学学报*, 2006, 23(9): 562-564, 576.
- [17] 赵婉婷. 中药牛膝化学成分的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [18] 林大专, 王广树, 杨晓虹, 等. 牛膝中新甾皮甾酮类成分的研究[J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(17): 1295-1297.
- [19] 蒙汉富, 银胜高, 蒋娟, 等. 土牛膝中甾皮甾酮的正交提取工艺研究[J]. *企业科技与发展*, 2018(6): 49-51.
- [20] 孔飞飞, 郭良君, 谭兴起. 川牛膝中杯萜甾酮的提取、分离及纯化工艺研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2013, 22(18): 2023-2026.
- [21] 孙亮亮, 吴剑, 张叶, 等. 响应面分析方法优化怀牛膝药材超声提取工艺研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2017, 31(6): 48-51.
- [22] 欧阳文, 罗懿钊, 李震, 等. 土牛膝抗炎成分分离、鉴定与含量测定研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(7): 1171-1181.
- [23] 朱婷婷, 梁鸿, 赵玉英, 等. 牛膝甾酮25位差向异构体的分离与鉴定[J]. *药学学报*, 2004, 39(11): 913-916.
- [24] 郑义哲. 牛膝中甾酮类成分的提取分离[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [25] 王龙, 胥秀英, 郑一敏, 等. 紫外分光光度法测定牛膝总甾酮含量[J]. *时珍国医国药*, 2005, 16(1): 18-19.
- [26] 刘姣, 李清, 曹秀莲, 等. 怀牛膝药材中牛膝总甾酮的含量测定[J]. *河北中医药学报*, 2007, 22(2): 34-35.
- [27] 胡亮, 方磊, 李瑞莲, 等. 特色民族药土牛膝中 β -甾皮甾酮的含量测定[J]. *中国药师*, 2020, 23(8): 1625-1627.
- [28] 陈幸, 黎万寿, 朱久武, 等. RP-HPLC法测定川牛膝中杯萜甾酮的含量[J]. *药物分析杂志*, 2000, 20(4): 234-237.
- [29] 刘颖华, 何开泽, 张军峰, 等. 川牛膝多糖的分离、纯化及单糖组成[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(2): 141-145.
- [30] 赵磊, 王书林, 杨慧, 等. 川牛膝多糖提取工艺研究[J]. *科技资讯*, 2008(25): 5-6.
- [31] 侯剑萍, 王春霞. 牛膝多糖的提取纯化工艺研究[J]. *中国药房*, 2008, 19(36): 2822-2824.
- [32] 梁歌, 曾富强, 殷中琼, 等. 川牛膝多糖的提取及含量测定[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(14): 6423-6424.
- [33] 黄志芳, 黄志红, 胡吉林, 等. 土牛膝中齐墩果酸、牛膝多糖的提取与鉴定[J]. *中国实用医药*, 2010, 5(17): 6-7.
- [34] 刘传敏, 邵乐, 李金贵. 酶解超声法提取川牛膝多糖的正交试验研究[J]. *中兽医医药杂志*, 2009, 28(5): 52-54.
- [35] 谷旭晗, 刘傲霞, 成悦, 等. 纤维素酶法提取川牛膝多糖[J]. *生物加工过程*, 2015, 13(6): 75-80.
- [36] 叶秀娟, 黄颖贤, 李少凤. 复合酶法优化川牛膝多糖提取工艺研究[J]. *中国药物经济学*, 2018, 13(7): 24-26.
- [37] 魏涛, 何培新, 封盛雪, 等. 怀牛膝多糖的超声波辅助提取工艺及其抗氧化活性[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(2): 191-194.
- [38] 姜艳, 许海丹. 超声波辅助提取牛膝多糖的工艺研究[J]. *广州化工*, 2015, 43(13): 109-110, 147.
- [39] 赵玥琪, 郝婧玮, 王镜哲. 单因素法考察川牛膝多糖提取工艺[J]. *中国林副特产*, 2019(4): 17-20.
- [40] 陈艾萌, 潘洁, 胡博, 等. 川牛膝多糖抗氧化活性测定和微波提取工艺优化[J]. *中成药*, 2017, 39(1): 80-84.
- [41] 郭婕, 李季平, 刘中华. 怀牛膝多糖的微波提取工艺研究[J]. *中国果菜*, 2017, 37(4): 16-19.
- [42] 易军鹏, 王赛, 李欣, 等. 蒸汽爆破提取牛膝多糖工艺优化及抗氧化性研究[J]. *食品与机械*, 2018, 34(6): 145-151.
- [43] 成悦, 刘傲霞, 夏玉婷, 等. 壳聚糖絮凝法精制川牛膝总多糖酶提取液的工艺研究[J]. *机电信息*, 2015(29): 31-36.
- [44] 丁淑彬, 鲁洪, 纪耀华. 牛膝中总多糖的含量测定[J]. *时珍国医国药*, 2001, 12(12): 1062.
- [45] 彭宏宇. 紫外分光光度法测定川牛膝中多糖的含量[J]. *西华师范大学学报(自然科学版)*, 2005, 26(2): 203-204.
- [46] 张纯, 郭文彪, 王雯倩, 等. 改良硫酸蒽酮比色法测定牛膝多糖的含量[J]. *中华临床医药杂志*, 2003, 4(19): 17-18.
- [47] 李根林, 杜天信, 梁生旺. 怀牛膝中多糖的含量测定[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2002, 8(5): 6-7.
- [48] 王小燕, 郭常润, 常军民, 等. 怀牛膝多糖的柱前衍生化-HPLC指纹图谱建立及单糖成分含量测定[J]. *中国药房*, 2021, 32(3): 294-300.