

秦艽主要药性化学物质指纹图谱分析

郭鑫¹, 梁宗锁^{1,2*}, 解娟芳³, 马志科³

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 浙江理工大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310018;
3. 宁夏隆德西北药材科技有限公司, 宁夏 隆德 756300)

摘要:以 8 个不同地区秦艽的干燥根为试验材料, 以 Alltech Chrom BDS-C18 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)为色谱柱, 乙腈—0.1% 醋酸溶液(9:91)为流动相进行等度洗脱, 检测波长 254 nm; 柱温 30℃, 进样量 10 μL。通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会)进行相似度分析, 建立 8 个不同产地的秦艽指纹图谱。以宁夏六盘山区所产秦艽为例, 通过高效液相色谱法, 以龙胆苦苷、马钱苷酸 2 个主要成分为主要因素, 分析适宜秦艽有效成分积累的最佳立地条件, 为建立秦艽质量标准、选择最佳生长条件提供理论依据。结果表明:1)8 个不同产地秦艽指纹图谱共有 6 个主要共有峰, 可作为鉴别秦艽药材的主要依据。2)8 个不同地区秦艽药材聚类分析可分为 4 类:内蒙古海拉尔和山西阳泉的秦艽药材为一类, 青海同仁和内蒙古通辽的为为一类, 河北张家口和陕西太白的为一类, 云南洱源和宁夏六盘山的为一类。3)通过对宁夏六盘山区不同的秦艽生长立地条件的探究, 有效成分积累量最高为阳坡, 最低为半阴坡。

关键词:秦艽; HPLC; 指纹图谱; 龙胆苦苷; 马钱苷酸

中图分类号:S713 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2015)03-0197-04

HPLC Fingerprint Analysis of *Gentiana macrophylla*

GUO Xin¹, LIANG Zong-suo^{1,2*}, XIE Juan-fang³, MA Zhi-ke³

(1. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2. College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China;
3. The Northwest Medicine Science and Technology Limited, Longde, Ningxia 756300, China)

Abstract: In order to establish the chromatographic fingerprints, the dried *Gentiana macrophylla* roots collected from different regions were used as materials to carry out high performance liquid chromatography (HPLC). The related chromatographic conditions were as follows: column: Alltech Chrom BDS-C18(4.6 mm×150 mm, 5 μm, mobile phase: acetonitrile: 0.1% acetic acid (9:91) for isocratic elution; flow rate: 1.0 mL·min⁻¹; detection wavelength: 254 nm; column temperature: 30℃. Chromatographic fingerprints of *G. macrophylla* from 8 regions were established based on the analysis of their similarities. In order to establish the quality standard and provide theoretical basis for the selection of optimal growth conditions, taking the sample collected from Liupan Mountain of Ningxia as a specific case, and using two effective constituents, gentiopicrosin and loganin acid as the main factors, the optimal site conditions for the accumulation of the constituents were discussed. The result indicates that 1) a total of 6 main common peaks was found in the fingerprints of roots of *G. macrophylla* from 8 different regions, which could be used as the main basis for the identification of *G. straminea* Maxim. 2) According to the clustering analysis, the roots could be divided into 4 categories: those from Hailaer of Inner Mongolia and Yangquan of Shanxi, Ton-

收稿日期:2015-02-16 修回日期:2015-03-24

基金项目:宁夏自然科学基金(NZ13207)。

作者简介:郭鑫,男,在读硕士,研究方向:药用植物资源与利用。E-mail:guoxin_master_2013@yeah.net

* 通信作者:梁宗锁,教授,博士生导师,研究方向:药用植物资源与利用。E-mail:liangzs@ms.iswc.ac.cn

gren of Qinghai and Tongliao of Inner Mongolia, Zhangjiakou of Hebei and Taibai of Shaanxi, Eryuan of Yunnan and Liupan Mountain of Ningxia. 3) It was found that the sunny slope was favorable for the accumulation of effective constituents, while the half shady slope was the worst.

Key words:*Gentiana macrophylla*; HPLC; fingerprint; gentiopicrin; loganin acid

秦艽为龙胆科植物秦艽(*Gentiana macrophylla*)、麻花秦艽(*Gentiana straminea*)、粗茎秦艽(*Gentiana crassicaulis*)或小秦艽(*Gentiana dahurica*)的干燥根^[1]。主产山西、甘肃、四川、青海、陕西、宁夏等地^[2]。秦艽的活性成分主要是龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、马钱苷酸^[3]。中医认为秦艽性平。味苦、辛。用于风湿关节痛、结核病潮热等症。其化学成分为环烯醚萜类,主要是龙胆苦苷、马钱苷酸^[4]。其主要功效为抗感染、祛风湿,调节免疫,抗胃溃疡等^[5-7]。

近年来,由于市场需求逐年增加,加之乱采滥挖,致使野生资源遭到极大破坏,早在1987年秦艽就被国家列为三级重点保护的野生药材^[8]。在长期的栽培利用历史中,形成了很多栽培品种,表现出丰富的物种多样性^[9]。关于秦艽指纹图谱的文章虽有很多,但多为单一地区或者单一品种的指纹图谱分析,无综合不同地区的比较类指纹图谱分析。

六盘山地区中药材资源种类多,分布广,资源丰富,种质资源优势明显,是宁夏乃至西北地区重要的

中药材产地之一,同时也是国内药学界公认的“具有显著特色的天然药库”^[10]。宁夏秦艽主要分布于六盘山地区,且宁夏六盘山区产3种秦艽,即秦艽、麻花艽和小秦艽,均属于2010年版《中华人民共和国药典》收录的秦艽品种^[11]。本研究对宁夏六盘山中的6个不同群落中生长的秦艽药材进行了采集,并根据立地坡向的区别,分析在不同坡向下,秦艽主要成分的含量差异,为进一步加快六盘山区药用植物保护,林下资源开发利用以及六盘山区人工油松林间作秦艽等中药材提供依据和支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料:8种不同产地秦艽以及宁夏六盘山区6个不同立地条件下的群落中所产秦艽均为野生品。所有供试秦艽样品经西北农林科技大学张跃进教授鉴定为龙胆科(*Gentianaceae*)龙胆属(*Gentiana*)秦艽组植物秦艽(*Gentiana macrophylla*)^[12](表1、表2)。

表 1 不同产地秦艽材料基本信息
Table 1 Origin of different *G. macrophylla*

序号	产地来源	采集时间/(年-月)	经纬度	海拔/m	年有效积温/℃
S1	青海同仁	2013-10	N35°30′、E102°01′	2 631	2 871.1
S2	内蒙古通辽	2013-11	N43°37′、E122°14′	426	2 747.5
S3	内蒙古海拉尔	2013-12	N49°16′、E120°01′	718	2 712.1
S4	山西阳泉	2013-10	N37°50′、E113°45′	785	3 743.5
S5	河北张家口	2013-11	N41°35′、E115°42′	1 538	3 779.6
S6	陕西太白	2013-10	N34°07′、E107°53′	1 845	4 700.3
S7	云南洱源	2013-11	N26°04′、E99°54′	2 186	4 714.7
S8	宁夏六盘山	2013-12	N35°45′、E106°11′	2 894	2 698.6

注:年有效积温参考条件为0℃以上,记录时间为2014年1月1日至2014年12月31日,海拔为采集区域平均海拔。

表 2 宁夏六盘山 6 种不同群落基本信息
Table 2 Community of different *G. macrophylla*

序号	坡向	坡度/(°)	群落密度/(棵·m ⁻²)
1	阳坡	34	3
2	半阳坡	47	4
3	半阴坡	41	6
4	阴坡	38	4
5	峁顶	0	3
6	沟底	0	2

注:采集区域经纬度为N35°45′、E106°11′,平均海拔2 900 m,年有效积温2698.6℃。

试剂:甲醇(分析纯),乙腈(色谱纯),冰醋酸(分析纯)。

仪器:SSI-1500 高效液相色谱仪(美国科学系

统公司),KH-250DE 型超声波仪(昆山市超声仪器有限公司),0.45 μm 微孔滤膜(天津津腾实验设备有限公司),CSChrom Plus 色谱工作站。

1.2 方法

1.2.1 供试样品溶液的制备 将秦艽样品粉碎,精密称取0.5 g,置于50 mL离心管,精密加入20 mL甲醇,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)30 min,放冷,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜过滤,得滤液。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:Alltech Chrom BDS-C18 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);

流动相:乙腈:0.1%醋酸溶液(9:91);检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

1.2.3 指纹图谱评价方法 采用国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A)。该软件利用夹角余弦法,具有生成对照图谱的功能,通过多点矫正生成指纹图谱,参考王龙星^[13]等方法。

1.2.4 聚类分析方法 应用 SPSS 统计分析软件采用欧氏距离测量,样品间用 ward 法联接,以 5 个共有峰的峰面积为变量的标准化数据对结果进行聚类分析。

1.2.5 方法学考察 重现性试验:取 1 号样品制备 5 份供试品溶液,进行高效液相指纹图谱分析,结果表明,各色谱峰的相对保留时间与相对峰面积基本一致,RSD 值<3%,符合指纹图谱研究的技术要求。

精密度试验:取 1 号样品制备供试品溶液,连续进样 5 次,分析结果表明各色谱峰的相对保留时间与相对峰面积基本一致,RSD 值<3%,符合指纹图谱研究的技术要求。

稳定性试验:取 1 号样品制备供试品溶液,分别在室温放置 0、4、8、12 h 和 24 h 后进行测定,结果表明,各色谱峰的相对保留时间与相对峰面积基本一致,RSD 值<3%,符合指纹图谱研究的技术要求。

表 3 不同产地秦艽指纹图谱分析

Table 3 Relative retention time of common peaks of HPLC fingerprints

峰号	相对保留时间	相对峰面积							
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
1	0.404	0.050 8	0.176 8	0.119 5	0.131 2	0.065 1	0.156 1	0.089 7	0.071 1
2	0.518	0.012 2	0.005 4	0.021 2	0.130 4	0.037 7	0.021 2	0.050 7	0.010 3
3	0.696	0.027 6	0.108 7	0.090 3	0.258 7	0.074 7	0.067 0	0.054 3	0.258 1
4	0.860	0.001 6	0.002 6	0.005 2	0.003 3	0.004 4	0.016 0	0.010 3	0.010 1
5	1.000	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
6	1.283	0.005 5	0.004 7	0.005 1	0.004 8	0.008 6	0.012 5	0.012 7	0.007 1

2.1.2 指纹图谱技术参数及相似度计算 8 个样品的 6 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积(表 3)可以看出,各样品中的相对保留时间非常接近,RSD 在 2.3%~3.7%,表明各共有峰选择的准确性。采用夹角余弦法,以 8 号样品的峰图为对照峰,对各样品进行整体相似度评价,8 个样品相似度最高为 0.996,最小为 0.94,平均相似度为 0.983(表 4),表明 8 个样品整体差异不大。

2.2 含量差异分析

通过对龙胆苦苷与马钱苷酸对照品的比较,确定了 1 号峰与 5 号峰分别为马钱苷酸和龙胆苦苷。根据龙胆苦苷与马钱苷酸含量(峰面积)对 8 组数据进行分析。

不同产地的秦艽样品有效成分差异性很大,龙胆

2 结果与分析

2.1 指纹图谱的建立与分析

2.1.1 共有峰的确定 将得到的 8 个不同地区的样品的高效液相色谱导入“中药指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”进行指纹图谱分析。选择稳定性好,吸收峰强,特征明显的色谱峰为共有峰,共标定了 6 个峰,进行谱峰校对(图 1),8 个样品共有峰总面积比例均>90%,符合指纹图谱研究的规定。其中,5 号峰分离度好,峰面积最大,较稳定。因此,以 5 号峰为参照峰,分别计算各特征峰的相对峰面积和相对保留时间(表 3)。

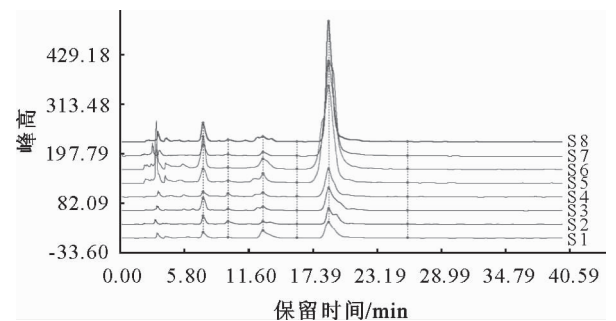


图 1 8 种秦艽样品 HPLC 特征图谱重叠图

Fig. 1 HPLC chromatogram of the samples of *G. macrophylla*

苦苷含量最高产地的是宁夏隆德,马钱苷酸含量最高的产地是云南洱源,有效成分总含量最高的是宁夏隆德所产秦艽,最低为青海同仁所产秦艽(表 5);不同立地条件下,秦艽有效成分含量差异也比较明显,有效成分总含量最高的立地条件为阳坡,最低为半阴坡生长的秦艽(表 6)。综合可见,有效成分总含量最高的是宁夏六盘山区中阳坡所采集的秦艽。

表 4 8 种秦艽样品相似度

Table 4 The similarity of *G. macrophylla*

样品序号	相似度	样品序号	相似度
S1	0.940	S5	0.996
S2	0.994	S6	1.000
S3	0.994	S7	0.983
S4	0.985	S8	0.978

表 5 不同产地的秦艽样品共有峰面积

Table 5 Common peak areas of main components between the samples from different origins

共有峰编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
1	290 475	390 187	799 125	353 523	1 003 697	1 031 375	2 232 998	730 200
2	41 946	220 712	108 696	204 804	997 789	183 234	68 704	174 933
3	1 054 159	236 503	342 915	405 637	1 979 303	779 366	1 373 067	397 554
4	41 205	44 953	81 857	23 898	25018	44 612	32 954	22 948
5	4 084 357	4 351 914	5 118 756	5 427 561	7 651 775	8 632 759	12 631 400	14 377 193
6	29 111	55 441	64 044	46 534	36395	43 883	58 956	78 513

表 6 不同立地条件的秦艽样品共有峰面积

Table 6 Common peak areas of main components between the samples from different site conditions

峰号	半阳坡	半阴坡	沟底	山顶	阳坡	阴坡
1	242 489	103 394	445 486	473 047	1 320 537	292 494
2	89 473	111 580	145 057	62 972	133 807	106 810
3	444 890	219 165	455 556	313 099	630 281	288 407
4	113 871	28 809	109 890	143 425	60 221	69 252
5	12 210 028	7 297 287	11 288 665	8 905 354	14 817 363	8 941 190
6	62 969	19 959	1 555 325	57 562	81 579	79 067

2.3 不同产地秦艽样品聚类分析

以秦艽中主要成分龙胆苦苷和马钱苷酸的峰面积为变量,对 8 个不同产地的秦艽样品数据进行系统聚类分析结果(图 2)可知,3 号(内蒙古海拉尔)样品与 4 号(山西阳泉)样品最先聚为一类,1 号(青海同仁)样品和 2 号(内蒙古通辽)样品聚为一类,7 号(云南洱源)样品和 8 号(宁夏隆德)样品聚为一类,说明各地区成分差异较大。宁夏隆德和云南洱源所产的秦艽由于主要成分含量较高,与其他地区差异性明显。

同仁)样品和 2 号(内蒙古通辽)样品聚为一类,7 号(云南洱源)样品和 8 号(宁夏隆德)样品聚为一类,说明各地区成分差异较大。宁夏隆德和云南洱源所产的秦艽由于主要成分含量较高,与其他地区差异性明显。

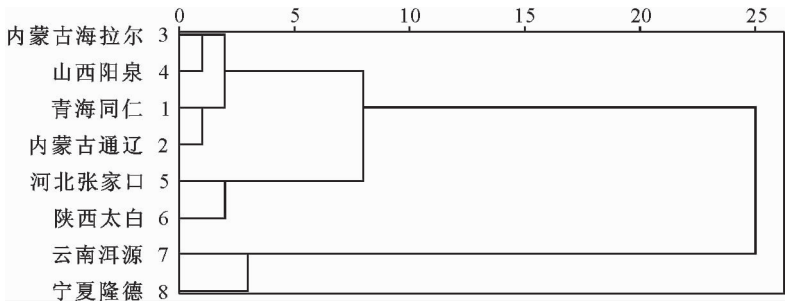


图 2 8 个产地的聚类分析树状图

Fig.2 Dendrogram of 8 origins by clustering analysis

3 结论与讨论

通过对不同产地、不同立地条件的秦艽样品的分析,以龙胆苦苷和马钱苷酸的总含量为标准判定,宁夏隆德的样品主要成分含量最高,而青海同仁所产秦艽含量最低;阳坡群落中生长的秦艽有效成分含量最高,而半阴坡群落中生长的秦艽有效成分含量最低。中药材指纹图谱是采用现代光谱、色谱技术,运用色谱测定标示某一种中药材独特性特征的共有峰参数,构建特征明显、专属性强、重现性好的特征图谱,以其作为鉴别与控制中药材基源真实性、形状稳定性、品质一致性的质量管理手段^[14]。

已报道过的有关秦艽指纹图谱的文章多为单一省份不同地区的比较,吴启勋^[2]等用青海省 12 个不同地区的秦艽样品建立了青海秦艽指纹图谱,标记了 13 个共有峰;陈千良^[3]等用陕西省 10 个不同地

区的秦艽样品建立了陕西秦艽指纹图谱,标记了 5 个共有峰。本研究采用高效液相色谱进行分析,比较研究了全国 8 个不同产地的秦艽样品的主要成分差异,跨越了 23 个纬度,海拔差异达 2 000 m,建立了全国秦艽指纹图谱,图谱充分显示了不同地区秦艽的有效成分差异以及主要成分分布情况,依照药典记录的色谱条件,分离标定出 6 个共有峰,峰形良好,分离度高,可作为秦艽药材的特征指纹。宁夏六盘山地区海拔跨度较大,种群多样,但高海拔地区群落环境构成单一^[15],是野生药用资源的天然宝库,为了更好地利用六盘山地区的天然环境优势,迫切需要探求各类六盘山道地药材的最佳生长环境和立地条件。对六盘山区 6 个不同坡向秦艽的对比分析,可为六盘山地区药用植物资源栽培以及林药间作模式的推广提供理论依据。

CSAE, 2004, 20 (4):172-175. (in Chinese)

[7] ARIAHU C C, ABASHI D K, CHINMA C E. kinetics of ascorbic acid loss during hot water blanching of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*) leaves[J]. Journal of Food Science and Technology, 2011, 48(4):454-459.

[8] 池明, 鲁周民, 刘驰旻, 等. 水杨酸处理对板栗贮藏品质的影响[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(6):117-120.

CHI M, LU Z M, LIU C M, *et al.* Effects of salicylic acid treatment on storage quality of *Castanea mollissima* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(6):117-120. (in Chinese)

[9] 种培芳, 杨江山. 4 种金色叶树木叶绿素荧光动力学参数对 SO₂ 胁迫的响应[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(6):14-19.

CHONG P F, YANG J S. Responses of the chlorophyll fluorescence parameters to SO₂ in stress in four golden-leaf trees [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(6):14-19. (in Chinese)

[10] HORWITZ W, LATIMER G W. Official methods of analysis of AOAC International[M]. 16th ed. Washington DC :Association of Official Analytical Chemist, 2006.

[11] 张静, 曹炜, 曹艳萍, 等. 红枣汁中维生素 C 热降解的动力学研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24 (6):295-298.

ZHANG J, CAO W, CAO Y P, *et al.* Thermal degradation kinetics of vitamin C in jujube juice[J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24 (6):295-298. (in Chinese)

[12] 黄晓杰, 张俏, 石国英等. 草莓漂烫过程中过氧化物酶和 Vc 的失活动力学[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(11):77-80.

[13] 王梦泽, 薛少平, 王佳. 草莓浑浊汁维生素 C 降解动力学模型[J]. 农业工程学报, 2010, 26 (3):353-356.

WANG M Z, XUE S P, WANG J. Thermal degradation dynamic model of vitamin C in cloudy strawberry juice during storage[J]. Transactions of the CSAE, 2010, 26 (3):353-356. (in Chinese)

[14] 高愿军, 熊卫东, 许克勇, 等. 草莓汁加工过程中 Vc 变化及其控制的研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2004, 32 (6):90-94.

GAO Y J, XIONG W D, XU K Y, *et al.* Study on the change and the control of vitamin C during strawberry juice processing [J]. Jour. of Northwest Sci-Tech Univ. of Agri. and For. :Nat. Sci. Ed. , 2004, 32 (6):90-94. (in Chinese)

[15] 董月菊, 张玉刚, 戴洪义. 苹果汁中维生素 C 热降解动力学研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12 (4):84-89.

DONG Y J, ZHANG Y G, DAI H Y. Thermal degradation kinetics of Vitamin C in apple juice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12 (4):84-89. (in Chinese)

[16] 詹耀轩, 高晗, 高愿军. 山楂汁贮藏中 Vc 降解规律研究[J]. 河南农业科学, 2007(3):82-84.

(上接第 200 页)

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010

[2] 吴启勋, 安燕, 张明锦, 等. 青海秦艽高效液相色谱指纹图谱的研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(1):174-178.

WU Q X, AN Y, ZHANG M J, *et al.* HPLC fingerprinting of *Gentiana straminea*, a traditional Chinese medicine from Qinghai Province [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(1):174-178. (in Chinese)

[3] 陈千良, 石张燕, 涂光忠, 等. 陕西产秦艽的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 30(19):1519-1522.

[4] 徐泽红. 中药秦艽的研究进展[J]. 中国医药导报, 2008, 5 (6):29-30.

[5] 陈长勋, 刘占文, 孙峥嵘, 等. 龙胆苦苷抗炎药理作用研究[J]. 中草药, 2003, 34(9):814-816.

[6] 董建勇, 李广远, 李长天. 大叶秦艽抗炎, 调节免疫有效部位的初步研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2006, 23(1):17.

[7] 孙芳云, 张斌, 刘庆山, 等. 西藏地产藏药大叶秦艽的抗溃疡病作用研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3):312-313.

[8] 吴玉泓, 吴迪, 崔治家, 等. 不同产地秦艽的质量和遗传多样性研究[J]. 中药材, 2011, 34(4):517-519.

[9] 吴靳荣, 吴立宏, 赵志礼, 等. 中药秦艽和习用品中 5 种环烯醚萜类成分的 HPLC 含量测定[J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (04):715-720.

[10] 郝彩琴, 郭鸿雁, 冷晓红, 等. 正交优选动态回流法提取秦艽中龙胆苦苷工艺[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(1):123-125.

HAO C Q, GUO H Y, LENG X H, *et al.* Optimization of the dynamic reflux extraction technology of gentio -picroside from the roots of *Gentiana macrophylla* by orthogonal experiment[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(1):123-125. (in Chinese)

[11] 朱强, 王俊, 郑紫燕, 等. 宁夏六盘山地区药用植物资源及其多样性研究[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(1):23-27.

ZHU Q, WANG J, ZHENG Z Y, *et al.* Medicinal plant resources and their diversity in Liupanshan of Ningxia [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2008, 23(1):23-27. (in Chinese)

[12] 徐蕾, 梁宗锁, 王琬, 等. 不同产地秦艽药材的质量差异性研究[J]. 北方园艺, 2014 (15):173-176.

[13] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫森, 等. 1 种评价中药色谱指纹谱相似性的新方法:向量夹角法[J]. 药学学报, 2002, 37(9):713-717.

WANG L X, XIAO H B, LIANG X M, *et al.* Vectorial angle method for evaluating the similarity between two chromatographic fingerprints of Chinese herb [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2002, 37(9):713-717. (in Chinese)

[14] 谢青. 现代色谱技术在中药指纹图谱研究中的应用[J]. 海峡药学, 2008, 19(11):95-98.

[15] 何小琴, 吴小舟, 王刚. 六盘山自然保护区森林群落物种多样性研究[J]. 甘肃林业科技, 2013, 38(2):7-10.