

酶辅助法提取透骨草中总黄酮及抗氧化性研究

李会端*, 乔爱平

楚雄师范学院化学与生命科学系, 楚雄 675000

摘要: 本文采用纤维素酶辅助法提取透骨草中总黄酮, 即先用纤维素酶酶解透骨草, 再用乙醇回流法提取透骨草中的总黄酮。分别固定提取剂乙醇浓度为 70%, 料液比为 1:20 g/mL, 初步探究了纤维素酶浓度、酶解 pH、酶解温度、酶解时间四个单因素对透骨草总黄酮提取率的影响。设计正交实验确定了酶辅助法提取透骨草中总黄酮的较佳条件: 纤维素酶浓度为 2 U/mL、酶解 pH = 4.5、酶解温度为 45 °C、酶解时间 2 h, 总黄酮提取率为 1.27%。本文初步探究了透骨草总黄酮提取液对羟自由基的清除活性, 对照实验结果表明透骨草提取液对羟自由基清除活性要高于相同浓度的芦丁与二丁基羟基甲苯。

关键词: 酶辅助法; 透骨草; 总黄酮; 提取率; 清除活性; 羟自由基

中图分类号: S131; S132

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.012

Enzyme-assisted Extraction of Total Flavonoids from *Speranskia* and Study on Antioxidant Effects

LI Hui-duan*, QIAO Ai-ping

Chuxiong Normal University, Department of Chemistry and Life Science, Chuxiong, 675000, China

Abstract: Enzyme-assisted extraction of total flavonoids from *Speranskia* was studied in this paper. First enzymatic hydrolysis by cellulase, and then reflux by ethanol to extract total flavonoids. Ethanol concentration of 70% and solid-liquid ratio of 1:20 g/mL were fixed. The preferred extraction conditions were determined by single factor experiment and orthogonal experiment. The experiment reveals that: cellulase concentration of 2 U/mL, enzymatic hydrolysis pH of 4.5, enzymatic hydrolysis temperature of 45 °C and enzymatic hydrolysis time of 2.0 h. The extraction ratio of total flavonoids reached up to 1.27% by using spectrophotometry. Antioxidant effects of flavonoids, rutin solution and BHT were measured to remove hydroxyl radicals by comparative experiments. Antioxidant experiments showed that flavonoids from *speranskia* showed a strong scavenging effect on hydroxyl radicals.

Key words: enzyme-assisted extraction; *speranskia*; flavonoids; extraction ratio; scavenging effect; hydroxyl radicals

黄酮类化合物泛指两个苯环中间通过三个碳原子连接形成的一系列化合物。黄酮类化合物具有显著地抗氧化、抗癌、消炎、杀菌、抗病毒和调节机体免疫力等功效, 是一类极具开发前景的天然药物^[1-5]。透骨草为大戟科地构叶属植物, 广泛分布于我国的东北和西北等省份。具有祛风、除湿、舒筋、活血等功效。李艳梅等报道了从地构叶中提取黄酮类化合物, 为透骨草化学成分的分析 and 药用价值的开发提供了实验参考^[6]。

目前从植物中提取黄酮类化合物方法主要有醇提法、碱提法、微波提取法、超声波振荡提取法、超临

界流体萃取法等^[7]。由于植物细胞壁的束缚作用, 使得总黄酮在提取过程中不易溶出。纤维素酶能降解植物细胞壁的纤维素骨架, 增加细胞内活性成分的溶出, 进而释放出黄酮。酶辅助法提取植物总黄酮, 具有实验条件温和、提取率高等特点, 已获得广泛关注^[8]。王丹等在文献中报道了使用乙醇回流法提取珍珠透骨草中的总黄酮, 紫外-分光光度法测得珍珠透骨草中总黄酮的含量为 1.42%^[9]。截止目前, 文献中尚没有酶辅助法提取透骨草中总黄酮的相关报道。本实验拟采用纤维素酶辅助法提取透骨草中总黄酮, 并探究总黄酮提取液对羟自由基的清除活性, 优化透骨草中总黄酮提取工艺, 为透骨草的药用价值的开发提供实验基础。

1 材料与amp;方法

收稿日期: 2013-10-08

接受日期: 2014-07-02

基金项目: 云南省应用基础研究项目(2012FD050); 楚雄师范学院科学研究基金(11YJGG01)

* 通讯作者 Tel: 86-15891861593; E-mail: lhd08@cxtc.edu.cn

1.1 材料、试剂与仪器

透骨草(产地甘肃):干燥,粉碎,备用。

芦丁标准品、纤维素酶、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、盐酸、锌粉、氨水、二丁基羟甲苯(BHT)等,以上药品均为分析纯,蒸馏水。

500 g 摇摆式高速中药粉碎机型号 DFY-500(温岭市林大机械有限公司),HH-S2s 恒温水浴锅(金坛市大地自动仪器厂),CP214c 电子天平(奥豪仪器上海有限公司),722 型光栅分光光度计(山东高密彩虹分析仪器有限公司),J1050 型托盘天平(浙江省岱山中学天平仪器厂),电热鼓风恒温干燥箱(上海市崇明实验仪器厂),回流装置。

1.2 实验方法

1.2.1 总黄酮提取率的计算方法

以芦丁标准液为对照,测定透骨草中总黄酮含量,加入 5% 亚硝酸钠溶液、10% 硝酸铝溶液、4% 氢氧化钠溶液,在碱性条件下使总黄酮与铝盐形成络合物,在可见光区能获得稳定的特征吸收峰,吸光度值与总黄酮浓度服从朗伯-比尔定律。

根据标准曲线计算透骨草中总黄酮含量。将吸光度值代入线性回归方程,求出所测提取液中总黄酮浓度,按下式计算提取率:

设样品中总黄酮类含量为 x , 稀释后提取液浓度为 C ; 原提取液浓度为 C_0 。

$$C_0 = \frac{C \times 50 \text{ mL}}{0.5 \text{ mL}} \quad x = \frac{C_0 \times 50 \text{ mL} \times 10^{-3} \text{ L/mL}}{2.000 \text{ g}} \times 100\%$$

1.2.2 总黄酮对羟基自由基的清除作用

参照 Fenton 反应体系。利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合后产生存活时间短、反应活性高的羟自由基($\cdot\text{OH}$)的性质,在反应体系中加入能有效地捕捉 $\cdot\text{OH}$ 的水杨酸,并与其反应产生有色络合物,该络合物在 510 nm 波长处有较强吸收峰。若体系中加入对 $\cdot\text{OH}$ 具有清除功能的黄酮类化合物时,便会与水杨酸竞争 $\cdot\text{OH}$,使有色络合物生成量减少。采用固定反应时间法,在 510 nm 波长处测量含被测物反应液的吸光度,与空白液对照,测定被测物对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用。

清除率计算公式:

$$\cdot\text{OH} \text{ 清除率}(\%) = [A_0 - (A_x - A_{x0})] / A_0 \times 100\%$$

A_0 为空白对照溶液吸光度; A_x 为提取液吸光度; A_{x0} 为不加 H_2O_2 提取液的本底吸光度。

1.3 芦丁标准曲线绘制

1.3.1 溶液配制

芦丁标准品于 105 °C 干燥箱中至恒重,准确称取 0.0100 mg,用 70% 乙醇在烧杯中溶解,转移至 50 mL 容量瓶中并定容至相应刻度,即得 0.20 mg · mL⁻¹ 芦丁标准溶液,备用。

1.3.2 最大吸收波长的选择

准确吸取 0.50 mL 的芦丁标准溶液于 50 mL 容量瓶中,用浓度为 70% 的乙醇溶液稀释至 10 mL,加入 5% 的亚硝酸钠溶液 0.40 mL,混匀,静置;加入 10% 硝酸铝溶液 0.40 mL,混匀,静置 6 min;再加入 4% 的氢氧化钠溶液 5.00 mL,混匀,静置;加 70% 乙醇溶液定容至 50 mL 刻度,混匀,静置。以试剂空白作参比,在 460 ~ 540 nm 波长区间每 10 nm 扫描测定吸光度。

1.3.3 绘制芦丁标准曲线

准确移取浓度为 0.20 mg/mL 芦丁标准溶液 0、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 mL 分别置于 50 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇溶液稀释至 10 mL 处,显色反应步骤如前,最后用 70% 乙醇定容至 50 mL 刻度,混匀,静置。在最大吸收波长处测量吸光度。

2 结果和讨论

2.1 芦丁标准曲线的绘制

2.1.1 最大吸收波长的选择

以试剂空白作参比,将芦丁标准液在 460 ~ 540 nm 波长区间每 10 nm 扫描测定吸光度值,以波长为横坐标,吸光度为纵坐标作图(如图 1 所示),确定最大吸收波长。图 1 为芦丁标准液的吸收光谱,结果显示随着测定波长的增大,吸光度值越来越大,在 510 nm 处有最大吸收峰,而后随着波长增加,吸光度值反而逐渐减小,根据实验结果确定 510 nm 为黄酮类物质的最大吸收波长,此后的吸光度值均在此最大吸收波长下测定。

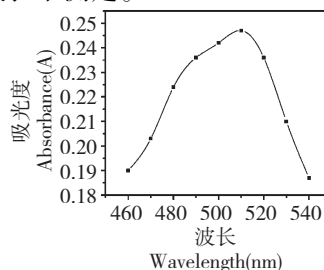


图 1 芦丁标准溶液的吸收光谱

Fig. 1 The absorption spectrum of diagram of rutin solution

2.1.2 芦丁标准曲线的绘制

将不同浓度的芦丁标准液在最大吸收波长 510 nm 处测定吸光度(以第一瓶为空白溶液)。以芦丁标准液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标作图,绘制芦丁标准曲线(如图 2 所示),得线性回归方程 $A = -0.0083 + 9.2625C, R^2 = 0.99993$ 。

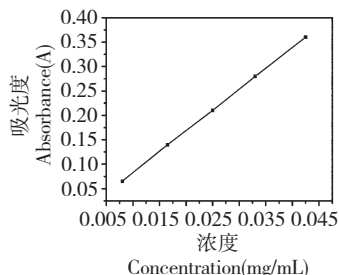


图 2 芦丁溶液标准曲线

Fig. 2 The standard curve of rutin solution

2.2 透骨草中总黄酮提取及定性实验

透骨草中总黄酮提取液的制备及总黄酮提取液定性实验参考文献^[9],显色反应现象如表 1 所示。通过显色结果对比:透骨草提取液显色反应现象与黄酮类化合物的显色一致,说明提取液中含有黄酮类化合物。

表 1 透骨草总黄酮提取液与芦丁标准液的显色反应

Table 1 Chromogenic reaction of flavonoids extracts and rutin solution

试剂 Solvent	透骨草提取液 <i>P. leptostachya</i> extract	芦丁标准溶液 Rutin
$Al(NO_3)_3$	淡黄色 Light yellow	黄色 Yellow
Fe^{3+}	深绿色 Dark green	墨绿色 Blackish green
HCl-Zn	粉红色 Pink	橙红色 Orange

2.3 单因素实验及结果分析

2.3.1 纤维素酶浓度对总黄酮提取率的影响

分别准确称取 2.0000 g 透骨草粉末于六支 100 mL 蒸馏烧瓶中,分别加入纤维素酶浓度为 0.5、1、2、3、4、5、6 U/mL 的 70% 乙醇溶液 40 mL,用盐酸调节 pH 为 4.5,在 45 °C 恒温水浴中酶解 1.5 h。之后水浴回流 2 h。抽滤、洗涤,合并滤液和洗涤液,用 70% 乙醇定容至 50 mL 容量瓶。提取液显色反应和吸光度的测定方法如前。将吸光度值代入线性回归方程,计算提取液中总黄酮浓度和透骨草中总黄酮提取率,选择较佳的纤维素酶浓度。

图 3 给出了不同纤维素酶浓度条件下的总黄酮

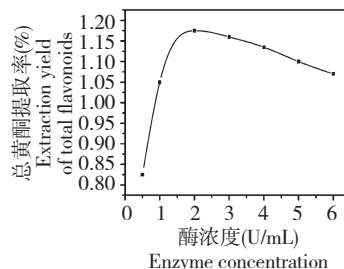


图 3 酶浓度对总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of enzyme concentration on the extraction ratio of total flavonoids

提取率。实验结果表明:随着纤维素酶浓度增大,总黄酮提取率明显提高,当酶浓度为 2 U/mL 时,总黄酮提取率最大,此后随酶浓度增加,总黄酮提取率缓慢下降。当酶浓度达到 6 U/mL 时,总黄酮提取率几乎不变。分析原因可能为 6 U/mL 为纤维素酶的最佳酶解浓度,酶解效率最大,再继续增加酶浓度酶解效率趋于平衡。

2.3.2 酶解 pH 值对总黄酮提取率的影响

分别准确称取 2.0000 g 透骨草粉末于六支 100 mL 蒸馏烧瓶中,加入纤维素酶浓度为 2 U/mL 的 70% 乙醇溶液 40 mL,用盐酸或氨水分别调节 pH 为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0,在 45 °C 恒温水浴中酶解 1.5 h。之后水浴回流 2 h。抽滤、洗涤,合并滤液和洗涤液,用 70% 乙醇定容至 50 mL 容量瓶中。提取液显色反应和吸光度的测定方法如前。将吸光度代入线性回归方程,计算提取液中总黄酮浓度和透骨草中总黄酮提取率,选择较佳酶解 pH。

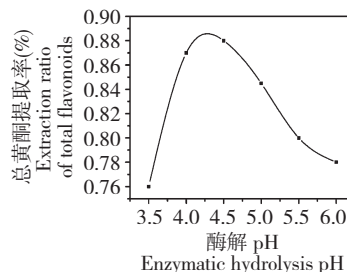


图 4 酶解 pH 对总黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effect of enzymatic hydrolysis pH on the extraction ratio of total flavonoids

图 4 给出了不同酶解 pH 实验条件下的总黄酮提取率,实验结果表明:随着酶解 pH 增大,总黄酮提取率明显增加,酶解 pH 为 4.5 时,总黄酮提取率最大,之后随着酶解 pH 增大,总黄酮提取率显著降低,酶解 pH 为 5.5 时,总黄酮提取率趋于平缓。分

析原因可能是纤维素酶在过酸或过碱条件下失去部分活性,酶解效率降低。

2.3.3 酶解温度对总黄酮提取率的影响

分别准确称取 2.0000 g 透骨草粉末于七支 100 mL 蒸馏烧瓶中,加入纤维素酶浓度为 2 U/mL 的 70% 乙醇溶液 40 mL,用盐酸调节 pH 为 4.5,分别在 30、35、40、45、50、55、60 °C 恒温水浴中酶解 1.5 h。之后水浴回流 2 h。抽滤、洗涤,合并滤液和洗涤液,用 70% 乙醇定容至 50 mL 容量瓶中。提取液显色反应和吸光度测定方法如前。将吸光度代入线性回归方程,计算提取液中总黄酮浓度和透骨草中总黄酮提取率,选择较佳酶解温度。

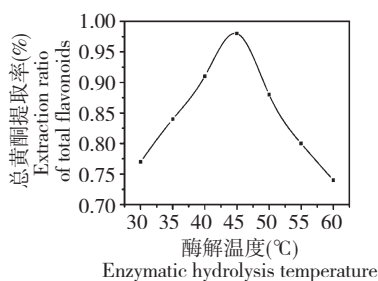


图 5 酶解温度对总黄酮提取率的影响

Fig. 5 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on the extraction ratio of total flavonoids

图 5 给出了总黄酮提取率随酶解温度的变化曲线,实验结果表明:随着酶解温度升高黄酮提取率显著增加,当温度达到 45 °C 时总黄酮提取率最大,此后随着酶解温度升高总黄酮提取率显著降低。温度太高,酶失去活性而不能起到酶解作用,温度升高还可能导致黄酮类化合物部分分解,从而使总黄酮提取率降低。

2.3.4 酶解时间对总黄酮提取率的影响

分别准确称取 2.0000 g 透骨草粉末于六支 100 mL 蒸馏烧瓶中,加入纤维素酶浓度为 2 U/mL 的 70% 乙醇溶液 40 mL,用盐酸调节 pH 为 4.5,在 45 °C 的恒温水浴中分别酶解 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、

3.0 h。之后水浴回流 2 h。抽滤、洗涤,合并滤液和洗涤液,用 70% 乙醇定容至 50 mL 容量瓶中。提取液显色反应和吸光度测定方法如前。将吸光度代入线性回归方程,计算提取液中总黄酮浓度和透骨草中总黄酮提取率,选择较佳酶解时间。

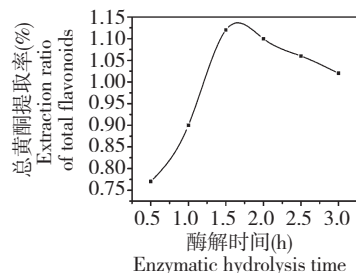


图 6 酶解时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 6 Effect of enzymatic hydrolysis time on the extraction ratio of total flavonoids

图 6 给出了总黄酮提取率随酶解时间的变化曲线,随着酶解时间延长总黄酮提取率显著增加,酶解时间为 1.5 h 时,总黄酮提取率最高,此后随着酶解时间延长,总黄酮提取率开始降低。分析原因是酶解时间太短,酶解不充分,总黄酮提取不完全;酶解时间过长,部分黄酮类化合物会分解,从而使总黄酮提取率降低。

2.4 正交实验及结果分析

在单因素实验结果基础上,以黄酮提取率为综合考察指标,选定纤维素酶浓度、酶解 pH、酶解温度、酶解时间四因素,每个因素三个水平,设计 $L_9(3^4)$ 表进行正交实验,优化透骨草中总黄酮提取工艺条件。因素水平见表 2,正交实验结果见表 3。

由表 3 可知:正交实验结果显示,以总黄酮提取率为考察指标,酶辅助法提取透骨草中黄酮最优实验条件组合是 $A_2B_1C_2D_3$ 。即纤维素酶浓度为 2 U/mL,酶解 pH 为 4.0,酶解温度为 45 °C,酶解时间为 2.0 h。四个单因素主次关系为 $B > C > A > D$,即 B(酶解 pH)对透骨草中总黄酮提取率影响最大,其

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验因素与水平设计

Table 2 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平 Level	A 酶浓度 Enzyme concentration (U/mL)	B 酶解 pH Enzymatic hydrolysis pH	C 酶解温度 Enzymatic hydrolysis temperature(°C)	D 酶解时间 Enzymatic hydrolysis time(h)
1	1.0	4.0	40	1.0
2	2.0	4.5	45	1.5
3	3.0	5.0	50	2.0

表3 正交实验结果

Table 3 the result of orthogonal experiment

试验序号 No.	因素				黄酮类化合物 提取率 Extraction rate of flavanoids (%)
	A 酶浓度 Enzyme concentration (U/mL)	B 酶解 pH Enzymatic hydrolysis pH	C 酶解温度 Enzymatic hydrolysis temperature (°C)	D 酶解时间 Enzymatic hydrolysis time (h)	
1	1	1	1	1	1.12
2	1	2	2	2	0.96
3	1	3	3	3	0.88
4	2	1	2	3	1.25
5	2	2	3	1	0.89
6	2	3	1	2	0.98
7	3	1	3	2	1.05
8	3	2	1	3	0.94
9	3	3	2	1	1.16
K1	0.987	1.140	1.013	1.057	较优组合
K2	1.040	0.930	1.123	0.997	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃
K3	1.050	1.007	0.940	1.023	主次关系
R	0.063	0.210	0.183	0.060	B > C > A > D

次是 C(酶解温度),再次是 A(酶浓度),D(酶解时间)对总黄酮提取率影响最小。

按正交实验确定的最佳提取条件进行验证性实验,做三组平行实验,结果如表 4。计算得到透骨草中总黄酮提取率为 1.27%。

表 4 透骨草中总黄酮提取率

Table 4 Extraction ratio of total flavonoids from Speranskia

实验序号 No.	黄酮提取率 Extraction rate of flavanoids (%)	黄酮平均提取率 Average extraction rate of flavanoids (%)
1	1.25	
2	1.27	1.27
3	1.28	

2.5 透骨草中总黄酮对羟自由基的清除活性研究

Fenton 反应体系为:在 10 mL 比色管中加入 2.00 mL 浓度为 9 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液,2.00 mL 浓度为 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液,分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的总黄酮提取液,最后加入 2.00 mL 浓度为 8.8 mmol/L 的 H₂O₂,启动反应,加蒸馏水稀释定容,让在 37 °C 恒温水浴中反应 30 min。以试剂空白作参比,在 510 nm 波长处测定吸光度。在 10 mL 比色管中加入 9 mmol/L FeSO₄ 溶液 2.00 mL,9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 2.00 mL,分

别加入 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的总黄酮提取液,加蒸馏水稀释定容,在 37 °C 的恒温水浴中反应 30 min,作为提取液的本底吸收。重复实验三次,计算提取液中总黄酮对羟自由基的清除率:·OH 清除率(%) = [A₀ - (A_x - A_{x0})] / A₀ × 100%

式中:A₀ 为空白对照溶液吸光度;A_x 为提取液吸光度;A_{x0} 为不加 H₂O₂ 提取液的本底吸光度。

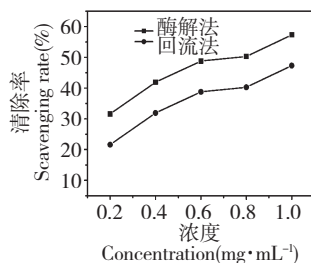


图 7 酶解法与回流法总黄酮提取液对羟自由基清除活性比较

Fig. 7 Scavenging activity comparison of total flavonoids extracts from enzyme-assisted and reflux

对照实验比较了分别采用酶辅助法和乙醇回流法得到的透骨草总黄酮提取液对羟自由基的清除活性,如图 7 所示。实验结果显示,酶辅助法对透骨草中总黄酮提取率高于传统乙醇回流法,对羟自由基清除活性提高了 30%。

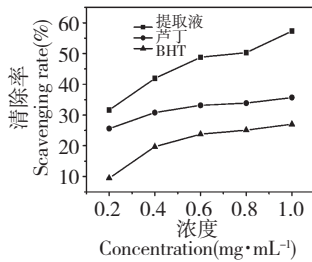


图8 总黄酮提取液、芦丁溶液和二丁基羟基甲苯对羟基清除活性比较

Fig. 8 Scavenging activity comparison of total flavonoids, rutin solution and BHT

以芦丁标准溶液和 BHT(二丁基羟基甲苯)为对照,比较三种抗氧化剂对 $\cdot\text{OH}$ 的清除活性。对照实验结果如图8所示。透骨草中的总黄酮提取液对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)有清除能力,随着提取液体积增加,清除率也逐渐增加。由图可知:当加入与提取液相同体积的芦丁标准溶液和 BHT,提取液中的总黄酮对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除活性高于芦丁标准溶液和 BHT。

3 结论

本文选用酶辅助法提取透骨草中的总黄酮,设计单因素实验和 $L_9(3^4)$ 正交实验初步确定了透骨草中的总黄酮提取的较佳实验条件为:纤维素酶浓度为 2 U/mL 、酶解 pH 为 4.5 、酶解温度为 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 、酶解时间为 2 h ,之后用 40 mL 浓度为 70% 乙醇水浴回流 2 h 。在此条件下,总黄酮的提取率高达 1.27% 。由于透骨草中生物碱、色素等的存在,在进行显色时会产生少量沉淀,而这些沉淀通过静置逐渐消失。

本文还初步探究了透骨草中的总黄酮提取液对羟基自由基的清除活性,比较了酶解法和传统回流法得到的透骨草提取液对羟基自由基的清除活性,酶解法提取液的清除活性提高了 30% ;与芦丁标准溶液和 BHT 对照实验结果显示:透骨草提取液对羟基自

由基($\cdot\text{OH}$)的清除活性高于相同浓度的芦丁溶液和 BHT。

对透骨草提取液中黄酮类化合物进一步通过高效液相色谱法进行分离和鉴定,及每种单体的抗氧化活性和其他生物活性实验有待继续深入研究。

参考文献

- Zhang Y(张岩), *et al.* 黄酮类化合物的提取以及检测方法的研究进展. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2008, 29:154-157.
- Chen XG(陈孝刚), *et al.* 花生壳总黄酮提取及其对自由基清除作用的研究. *J Liaoning Univ Trad Chin Med* (辽宁中医药大学学报), 2010, 4:35-38.
- Tian XL(田新玲), Yan PX(晏佩霞), Tong DR(仝殿荣). 分光光度计测定天然植物中黄酮含量. *Instrumentation Analysis Monitoring* (仪器仪表与分析监测), 2003, 3:25-26.
- Xie QF(解庆范), Ji Y(纪艳), Lin YQ(林瑶琴). 橡皮树中总黄酮提取工艺及清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基能力的研究. *Strait Pharmaceutical J* (海峡药学杂志), 2011, 23:205-208.
- Zhu H(朱慧), Ma RJ(马瑞君), Wu S(吴双), *et al.* 薇甘菊总黄酮的提取及清除羟基自由基活性的测定. *Food Science* (食品科学), 2010, 6:70-73.
- Fan YB(范云柏), Zhao YY(赵玉英), Li YM(李艳梅), *et al.* 地构叶化学成分的研究. *Nat Prod Res Dev* (天然产物的研究与开发), 1996, 8(4):20-23.
- Zhang JN(张纪宁), Yang J(杨洁). 黄酮类化合物的生物活性研究进展. *J Yili Normal Univ, Nat Sci* (伊犁师范学院学报, 自科版), 2009, 2:29-31.
- Liu QD(刘全德), Li C(李超). 纤维素酶辅助提取野马追总黄酮的工艺研究. *China Food Additives* (中国食品添加剂), 2011, 5:78-81.
- Wang D(王丹), Sun JM(孙佳明), Wang GJ(王贵金), *et al.* 紫外分光光度法测定珍珠透骨草中总黄酮的含量. *World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica* (世界科学技术—中医药现代化★基础研究), 2006, 6(9):61-63.