

# 聚酰胺色谱结合高速逆流色谱分离制备篇蓄黄酮类化合物

孙兆林<sup>1,2</sup>, 王 晓<sup>1,2</sup>, 王岱杰<sup>2</sup>, 李 佳<sup>1</sup>, 段文娟<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>山东中医药大学药学院, 济南 250355;

<sup>2</sup>山东省分析测试中心山东省大型精密分析仪器应用技术重点实验室, 济南 250014

**摘要:** 采用聚酰胺色谱结合高速逆流色谱法分离纯化了篇蓄中 3 种黄酮类化合物, 建立了快速分离制备篇蓄中 3 种黄酮类化合物的方法。通过聚酰胺柱色谱富集黄酮类成分, 再经过高速逆流色谱分离, 以乙酸酯-甲醇-水-甲酸(体积比为 4:1:5:0.1)组成的二相系统作为固定相与流动相, 在主机转速为 850 rpm, 流速为 2.0 mL/min, 检测波长为 254 nm 的条件下制备样品。从 150 mg 富集黄酮成分的馏分中, 一次性分离制备得到纯度为 94.86% 的杨梅树皮苷(myricitrin)7.5 mg, 94.28% 的黄芪苷(astragaloside)13.8 mg, 91.86% 的合欢草素 1(desmanthin-1)20.6 mg。所得馏分经高效液相色谱法(HPLC)检测纯度, 并经 MS 和 NMR 鉴定化合物的结构。该方法简便、快速, 所得产物纯度高, 适合于黄酮类化合物的制备分离。

**关键词:** 篇蓄; 高速逆流色谱; 聚酰胺色谱; 杨梅树皮苷; 黄芪苷; 合欢草素 1

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.020

## Isolation and Purification of Flavones from *Polygonum aviculare* L. by Polyamide Chromatography Combined with High-Speed Counter-Current Chromatography

SUN Zhao-lin<sup>1,2</sup>, WANG Xiao<sup>1,2</sup>, WANG Dai-jie<sup>2</sup>, LI Jia<sup>1</sup>, DUAN Wen-juan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; <sup>2</sup>Shandong Analysis and Test

Center, Key Laboratory for Applied Technology of Sophisticated Analytical Instrument of Shandong Province, Jinan 250014, China

**Abstract:** In this study, three flavones were isolated and purified from *Polygonum aviculare* L. by polyamide chromatography combined with high-speed counter-current chromatography (HSCCC). A rapid and efficient method was established for preparative isolation and purification of three flavonoids from *P. aviculare*. The crude extract of *P. aviculare* was objected to polyamide chromatography to afford the flavones-enriching fraction. After that, the fraction was further separated by HSCCC with two phase solvent systems composed of ethyl acetate-methyl alcohol-water-formic acid (4:1:5:0.1, v/v). The lower phase as the mobile phase was operated at a flow rate of 2.0 mL/min, while the apparatus rotated at 850 rpm and the detection wavelength was 254 nm. As a result, 7.5 mg of myricitrin, 13.8 mg of astragaloside, 20.6 mg of desmanthin-1 were purified from 150 mg of the flavones-enriching fraction and each with 94.86%, 94.28% and 91.86% purity as determined by HPLC. These compounds were identified by mass spectrometry (MS) and <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR). The method was simple, rapid and suitable for the preparative separation of flavonoids.

**Key words:** *Polygonum aviculare* L.; high-speed counter-current chromatography; polyamide chromatography; myricitrin; astragaloside; desmanthin-1

篇蓄为蓼科植物篇蓄 *Polygonum aviculare* L. 的干燥地上部分<sup>[1-3]</sup>。《本草纲目》中载, 用于“治霍乱, 黄疸, 利小便”。《滇南本草》载: “利小便。治五淋白浊、热淋、瘀精涩闭关窍, 并治妇人气郁, 胃中湿热, 或白带之症”等效用。现民间广泛用其治疗泌尿系统的感染, 结石及肾炎等疾病<sup>[4-6]</sup>。现代临床学报道: 篇蓄对非胰岛素依赖性糖尿病患者的治疗是

一种理想的药物, 疗效显著而持久, 且无毒副作用<sup>[7]</sup>。因此建立相关成分的高效分离纯化方法具有重要意义。

目前, 篇蓄中化学成分分离纯化主要采用薄层色谱、硅胶柱色谱、聚酰胺柱色谱等传统的分离纯化方法<sup>[8]</sup>。这些方法存在耗时长、容易造成样品的不可逆吸附变性及样品回收率低等缺点。高速逆流色谱技术 (high-speed counter-current chromatography, HSCCC) 是不使用固态载体的液-液分配色

谱<sup>[9,10]</sup>,根据样品在两相溶剂中分配系数的不同实现样品的分离,避免了固相载体对样品的不可逆吸附、变性等缺点,已广泛应用于天然产物的分离纯化领域<sup>[11-16]</sup>。本研究首先采用聚酰胺色谱法对篇蓄中的黄酮类化合物进行富集,然后采用 HSCCC 对富集了黄酮类成分的馏分进行分离纯化,通过两种色

谱方法的结合,实现了对篇蓄中黄酮类化合物快速、有效的分离纯化,得到了 3 个高纯度的黄酮类化合物,分别为杨梅树皮苷,黄芪苷和合欢草素 1 (图 1),为篇蓄资源的进一步开发应用提供了一定的参考依据。

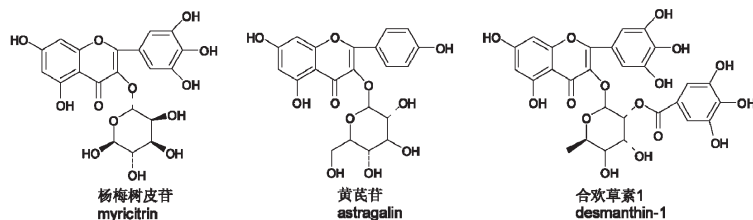


图 1 杨梅树皮苷、黄芪苷、合欢草素 1 化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of myricitrin, astragalgin and desmanthin-1

## 1 仪器与材料

高速逆流色谱仪(上海同田生物技术有限公司)、TBP5002 泵(上海同田生物技术有限公司)、8823-B 紫外检测器(北京宾达英创科技有限公司)、3057-11 记录仪(重庆川仪总厂有限公司)、旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限公司)、KDM 型调温电热套(山东光明仪器有限公司)、超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、SHB-B95 型循环水式多用真空泵(郑州长城科技工贸有限公司)、恒温循环器(郑州长城科技工贸有限公司)。Waters 600-996 高效液相色谱系统(配有光电二极管阵列检测器(PDA),美国 Waters 公司)、Varian INOVA-600 核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司)、Agilent 1100 Series 6320 ion-trap 质谱仪(美国 Agilent 公司)、Agilent 6890N-5973N 气相色谱/质谱联用仪(美国 Agilent 公司)。

甲醇、石油醚和乙酸乙酯均为分析纯(中国医药集团上海化学试剂公司);甲醇为色谱纯(美国天地公司);实验用水为过滤蒸馏水及娃哈哈纯净水;柱层析用聚酰胺粉(台州市路桥四甲生化塑料厂)。篇蓄药材购自山东中医药大学中鲁医院,经山东中医药大学李佳教授鉴定为蓼科植物篇蓄的全草。

## 2 实验方法

### 2.1 篇蓄粗提物的制备

将购买的 2 kg 篇蓄药材,经粉碎机粉碎,过 40 目筛。将 2 kg 药材粉末平均置于两个 10 L 的圆底

烧瓶中,加入 6 倍量药材的 95% 乙醇,加热回流提取 3 次,每次 2 h,合并滤液,减压蒸馏浓缩至无醇味。浓缩液用适量水混悬后,依次用等体积的石油醚、乙酸乙酯萃取三次,得到乙酸乙酯层样品 38.4 g。

### 2.2 聚酰胺色谱初步分离

聚酰胺的前处理:将聚酰胺放在 95% 的优质工业乙醇中煮沸 0.5 h,取出晾干,换上新的乙醇再煮,重复 3~4 次,直至乙醇液无白色为止,取出晾干备用。

乙酸乙酯萃取物用甲醇溶解,均匀的拌样于 100 g 聚酰胺中,置 70 °C 水浴锅上蒸干上柱,依次用 30%、60%、95% 的乙醇洗脱,分别冲洗三个柱体积,减压蒸干洗脱液分别得到馏分 1(4.2 g)、馏分 2(8.4 g)、馏分 3(2.2 g)三个馏分,经 HPLC 检测,馏分 2(60% 乙醇洗脱液)中具有黄酮类成分特征紫外吸收色谱峰(253 nm 和 361 nm)的成分较多。

### 2.3 分配系数 $K_D$ 的测定

取少量样品置于 1.5 mL 试管中,加入等量的上下相各 0.5 mL,剧烈震荡 0.5 min,使样品充分溶解,静置分层,取上下相各 5  $\mu$ L 分别用高效液相色谱(HPLC)进行检测,上相峰面积为  $A_1$ ,下相峰面积为  $A_2$ ,分配系数  $K_D = A_1 / A_2$ 。

### 2.4 两相溶剂体系及样品溶液的制备

本实验所用溶剂体系为乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸(体积比 4:1:5:0.1),按比例配制于分液漏斗中,剧烈振荡使溶液充分混合,室温下静置过夜,分出上下相,使用前超声脱气 30 min 备用。

称取馏分 2 样品 150 mg, 加入上下相各 10 mL, 振荡使其完全溶解, 用于 HSCCC 分离。

### 2.5 HSCCC 法分离制备过程

将两相溶剂体系中已超声脱气的上相(固定相), 以 20 mL/min 的流速泵入 HSCCC 螺旋管中, 待上相充满整个螺旋管后, 缓慢调节主机转速至 850 rpm, 顺时针旋转, 待转速稳定后, 自 HSCCC 首端以 2.0 mL/min 流速泵入下相, 同时开启紫外检测器, 检测波长为 254 nm; 待上下相平衡后, 将 20 mL 样品溶液通过六通进样阀注入 HSCCC 色谱仪, 根据色谱图收集各色谱峰馏分。

### 2.6 HPLC 条件

藜蒿馏分 2 样品和 HSCCC 分离后各色谱峰用 HPLC 分析。色谱柱: Inertsil ODS-SP(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 25°C; 检测波长: 254 nm; 流动相: 甲醇(A), 0.2% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱程序: 0 ~ 20 min, 30% ~ 70% A; 20 ~ 30 min, 70% ~ 100% A; 30 ~ 35 min, 100% A。流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。

## 3 结果与讨论

表 1 藜蒿 60% 乙醇粗提物中 3 种化合物在不同比例溶剂体系中的  $K_D$  值

Table 1 Partition coefficients ( $K_D$ ) of the 3 flavones from *P. aviculare* crude extract under different two-phase solve systems

溶剂体系 Solvent system	1	2	3
乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸(4:1:5:0.1, v/v) Ethyl acetate-methyl alcohol- water-formic acid (4:1:5:0.1, v/v)	1.67	1.60	3.03
乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸(3:1:6:0.1, v/v) Ethyl acetate-methyl alcohol- water-formic acid (3:1:6:0.1, v/v)	5.75	5.66	6.08
乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸(3:2:5:0.1, v/v) Ethyl acetate-methyl alcohol- water-formic acid (3:2:5:0.1, v/v)	2.57	5.47	15.00

### 3.2 HSCCC 分离纯化的结果

以乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸(4:1:5:0.1, v/v) 为两相溶剂体系, 按照 1.6 节所述的方法对藜蒿馏分 2 进行分离纯化。将 150 mg 样品溶于 20 mL 等体积上相和下相混合溶液中进行 HSCCC 分离(分离谱图见图 2), 根据图 2 进行手动分段收集, 得到化合物 I、II, 在尾吹液中得到化合物 III。将各馏分减压浓缩干燥, 其质量依次为 7.5、13.8、20.6 mg。经过 HPLC 分析并应用面积归一法测定 1、2、3, 3 个化合物的纯度分别为 94.86%、94.28% 和 91.86% (分析结果见图 3)。

### 3.3 化合物的结构鉴定

化合物 1 黄色粉末; FAB-MS ( $m/z$ ): 465 ( $[M + H]^+$ , 100); EI-MS  $m/s$  (rel. int. %): 318 (100),

### 3.1 HSCCC 分离条件优化

溶剂体系的选择是 HSCCC 分离中的首要和关键环节, 溶剂体系合适与否是由目标化合物在两相溶剂中的分配系数 ( $K_D$ ) 来衡量的。一般而言, 对 HSCCC 最合适的  $K_D$  值范围是 0.5 ~ 2.0<sup>[17]</sup>。本实验测定了目标化合物在不同体积比的乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸溶剂体系中的  $K_D$  值。实验结果表明, 当采用乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸(体积比为 4:1:5:0.1) 两相溶剂体系时, 可实现目标化合物的分离。目标化合物在不同比例的乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸体系中的  $K_D$  见表 1。由表 1 可看出乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸的体积比为 3:1:6:0.1、3:2:5:0.1 时, 3 种化合物的  $K_D$  差异较大, 能保证各组分间具有较好的分离度, 但同时各物质在固定相中的分配较多且黄酮类化合物在固定相中的  $K_D$  偏大, 若采用这 2 种溶剂体系会使整体的分离时间过长, 分离效率低, 难以实现藜蒿中黄酮类成分的快速高效分离纯化。如图 2 所示, 应用乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸(体积比为 4:1:5:0.1) 为两相溶剂体系时, 3 种黄酮类成分能够在 3h 之内实现分离且分离效果良好。

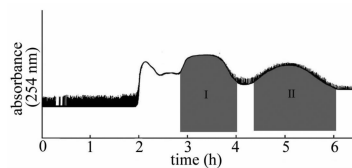


图 2 藜蒿中黄酮类化合物的高速逆流图谱

Fig. 2 HSCCC chromatogram of flavone compounds from *P. aviculare*

289 (6), 149 (6), 128 (75), 113 (28), 102 (6), 85 (14), 71 (33), 58 (82)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ : 6.88 (2H, s, H-2', H-6'), 6.37 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 6.19 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 5.19 (1H, br, s, H-1''), 0.84 (3H, d,  $J = 5.4$  Hz, H-6'')。化合物 1 的 FAB-MS 和 <sup>1</sup>H NMR 数据与文献<sup>[18]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 1 为杨梅树皮苷。

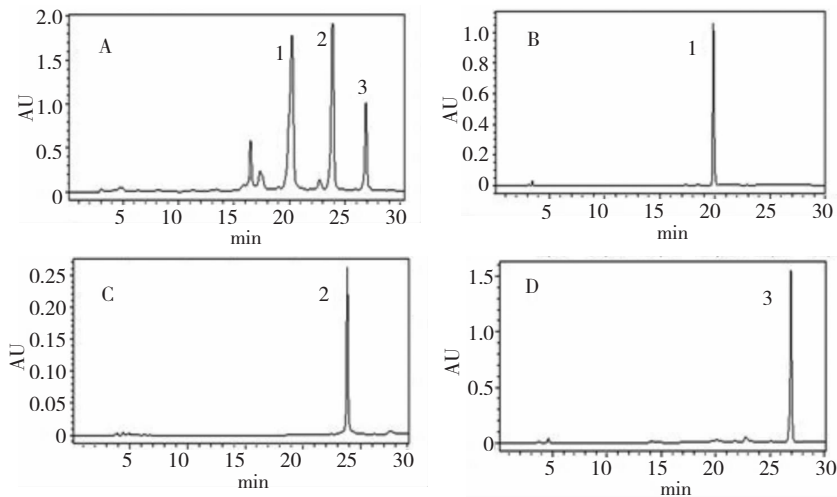


图3 篇蓄中黄酮类化合物组分总样(A)、杨梅树皮苷(1)(B)、黄芪苷(2)(C)、desmanthin-1(3)(D)的HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of *P. aviculare* crude extract (A), myricitrin (1) (B), astragalol (2) (C) and desmanthin-1 (3) (D)

**化合物 2** 黄色粉末; FAB-MS ( $m/z$ ): 447 ( $[M-H]^-$ , 100); EI-MS  $m/z$  (rel. int. %): 286 (100), 258 (16), 213 (9), 184 (3), 121 (25), 105 (4), 93 (8), 65 (15)。 $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ : 12.61 (s, 5-OH), 8.03 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 6.87 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 6.42 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 6.19 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-6), 5.45 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1'')。化合物 2 的 FAB-MS 和  $^1H$  NMR 数据与文献<sup>[18]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 2 为黄芪苷。

**化合物 3** 黄色粉末; FAB-MS ( $m/z$ ): 615 ( $[M-H]^-$ ); EI-MS  $m/z$  (rel. int. %): 318 (65), 194 (6), 170 (29), 153 (23), 126 (100), 108 (21), 97 (9), 80 (31)。 $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ), 6.93 (2H, s, H-2', 6'), 6.38 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 6.20 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-6), 5.48 (1H, s, H-2''), 5.47 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz, H-1''), 0.84 (3H, d,  $J = 3.6$  Hz, H-6'')。化合物 3 的 FAB-MS 和  $^1H$  NMR 数据与文献<sup>[18]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 3 为合欢草素 1。

## 4 结论

篇蓄中的黄酮类化合物在结构和性质方面非常相似, 采用传统的硅胶柱色谱、高效制备液相、聚酰胺柱色谱分离纯化十分困难。本实验首先应用聚酰胺柱色谱法对篇蓄中的黄酮类化合物进行富集, 然后采用 HSCCC 对富集的黄酮类化合物进行分离纯化, 得到 3 个高纯度的黄酮类化合物杨梅树皮苷、黄

芪苷、合欢草素 1。该方法简便、快速、节省溶剂, 具有较好的实用价值, 为进一步开发利用篇蓄资源提供了一定的技术支撑。

## 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中国药典). Beijing: China Medical Science Press (北京化学工业出版社), 2005, 235.
- 2 Jiangsu New Medical College (江苏新医学院). Chinese Medicine Dictionary [中药大辞典(下册)]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House (上海人民出版社), 1977, 2330-2330.
- 3 Dai RC (代容春), He WJ (何文锦), Chen PQ (陈培泉), et al. Determination of flavones in *Polygonum aviculare* L. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2003, 22(6): 67-69.
- 4 Yan JM (严健民). The history status of the Bladder meridians of Foot-Taiyang in the theory of meridian. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2003, 9(11): 57-59.
- 5 Meng ZW (孟昭威). The origin of formation and outlooks of the theory of meridian. *Chin Acupunc* (中国针灸), 1982, 5: 25-28.
- 6 Zhao RF (赵荣芳). Clinical observation of *Polygonum aviculare* L. on treatment of in 25 diabetic patients. *Acta Acad Med Nantong* (南通医学院学报), 1995, 15: 247-275.
- 7 Jiang CE (姜彩娥), Hao R (郝睿), Li CP (李春平). Distribution and drug resistance analysis of pathogenic bacteria

- causing urinary system infections. *Chin Pharm Aff*(中国药事),2006,20:311.
- 8 Yu S, Yu ZY, Duan WJ, *et al.* Isolation and purification of seven lignans from *Magnolia sprengeri* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr B*, 2011, 879: 3775-3779.
  - 9 Wang DJ(王岱杰), Liu JH(刘建华), Geng YL(耿岩玲), *et al.* The high-speed counter-current chromatography separation and purification of alkaloids *Corydalis Decumbens* (Thunb.) Pers. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2010, 38: 783-788.
  - 10 Sun YS(孙印石), Liu ZB(刘政波), Wang JH(王建华), *et al.* Preparative isolation and purification of flavones from *pericarpium citriReticulatae* by high-Speed counter current chromatography. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2009, 27: 244-247.
  - 11 Wang X, Shi XG, Li FW, *et al.* Application of analytical and preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of z-ligustilide from a crude extract of *Angelica sinensis*. *Phytochem Anal*, 2008, 19: 193-197.
  - 12 Zhao AH(赵爱华), Zhao QS(赵勤实), Lin ZW(林中文), *et al.* The chemical composition of *Polygonum aviculare* L. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 14(5): 29-32.
  - 13 Zhao HL(赵会礼). Determination of quercetin in *Polygonum aviculare* L. and *P. plebeium* R. Br. by HPLC. *J Chin Med Pharmacol* (中医学报), 2004, 32: 17-20.
  - 14 Xu XY(胥秀英), Zheng YM(郑一敏), Fu SQ(傅善权), *et al.* Quantitative determination of hyperoside and quercitrin and luteolin in *Polygonum aviculare* by HPLC. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2006, 17: 563-564.
  - 15 Zheng XD(郑旭东), Hu HB(胡浩斌), Zheng SZ(郑尚珍), *et al.* Studies on the volatile constituents of *Polygonum aviculare* L. *J Northwest Norm Univ, Nat Sci* (西北师范大学学报, 自科版), 1999, 35(3): 68-70.
  - 16 Shu XK, Duan WJ, Liu F, *et al.* Preparative separation of polyphenols from the flowers of *Paeonia lactiflora* Pall. by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr B*, 2014, 947-948: 62-67.
  - 17 Guan RJ(管仁军), Wang DJ(王岱杰), Yu ZY(于宗渊), *et al.* Preparative isolation and purification of the active components from *Vitidis Fructus* by high-speed counter-current chromatography. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2010, 28: 1043-1047.
  - 18 Chen XH(陈晓虎), Chen DF(陈道峰). The study on chemical constituents of *Polygonum aviculare* L. *China J Chin Materia Med* (中国中药杂志), 2004, 29: 918-919.
- 
- (上接第 836 页)
- 6 Tang DF(檀东飞), Huang RZ(黄儒珠), Lu Z(卢真), *et al.* Chemical compositions and antimicrobial activity of the volatile oil and petroleum ether extract from the fresh carpophore of *Dictyophora echinvolvata*. *J Fujian Norm Univ, Nat Sci* (福建师范大学学报, 自科版), 2010, 26: 100-105.
  - 7 Liang M(梁鸣), Tang DF(檀东飞). Chemical compositions in *Dictyophora echinvolvata* extracted with acetone and the antibacterial activity extracted with acetone, ethanol and water. *Mycosystema* (菌物学报), 2005, 24: 197-201.
  - 8 Lu HN(卢惠妮), Pan YJ(潘迎捷), Sun XH(孙晓红), *et al.* Antibacterial activity of water extract of *Dictyophora echinvolvata* Fruitbod. *Food Sci* (食品科学), 2009, 30: 120-123.
  - 9 Al-Burtamani SK, Fatope MO, Marwah RG *et al.* Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96: 107-112.
  - 10 Zhang QP(张庆平). Study on the flavone in *Sophora flavescens* with supercritical CO<sub>2</sub> extraction and its antimicrobial effect. *Strait Pharm J* (海峡药物), 2009 21(7): 46-48.
  - 11 Luo JM(骆健美), Wang M(王敏), Liu F(刘峰), *et al.* A method that micro plate bioassay method for rapidly detecting the antibacterial activity, China, invention, 200810153179. 9, 2009. 4. 22
  - 12 Luo SL(罗胜莲), You X(游霞), Ding CC(丁聪聪), *et al.* Antimicrobial activities and chemical compositions of *Dictyophora indusia* fischer and *Dictyophora echinvolvata*. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2012, 21: 70-73.
  - 13 Yang W(杨威), Wu SR(吴素蕊), Fan J(樊建), *et al.* Study on the antimicrobial effect of *Dictyophora echinvolvata* Mycelium. *Edible Fungi China* (中国食用菌), 2008, 27(6): 34-37.
  - 14 Fan QN(范巧宁), Zhang WG(张伟刚), Zhao P(赵珮), *et al.* Extraction and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from Pileus of *Dictyophora echinvolvata*. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2013, 23: 112-117.
  - 15 Tian T(田甜). Separation preparation and biological activity research of polysaccharide from *Dicyophora echinvolvata* volva. Xi'an: Shaanxi Normal University (陕西师范大学), MSc. 2012.