

文章编号:1001-6880(2015)6-0979-07

辣木叶总黄酮响应面法微波萃取工艺 优化及其体外降糖效果观察

吉利莉¹, 汪开毓^{1*}, 罗晓波², 赵玲¹, 黄小丽¹, 周燕¹¹四川农业大学动物医学院动物疫病与人健康四川省重点实验室,雅安 625014;²四川省自然资源科学研究院,成都 610015

摘要:利用响应面法优化微波萃取辣木叶总黄酮工艺。选取乙醇浓度、微波功率、提取时间、液料比为影响因素,总黄酮得率为评价指标。在单因素实验的基础上,通过4因素3水平Box-Behnken中心组合试验建立黄酮得率的二次多项式回归方程,研究以上因素对总黄酮得率的影响。结果表明最佳提取工艺条件为:乙醇浓度58%,微波功率397 W,提取时间8 min,液料比59:1,该条件下,总黄酮得率为3.45%,与预期基本相符。采用HepG2细胞研究辣木叶总黄酮体外降糖效果,检测该细胞24 h的葡萄糖摄取量。结果表明:在高糖环境下,辣木叶总黄酮能促进HepG2细胞对葡萄糖的消耗;相同质量浓度下,经微波萃取的总黄酮降糖活性较回流提取得强。

关键词:辣木叶;总黄酮;微波萃取;响应面法;体外降糖

中图分类号:TQ460.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.06.007

Optimization of Extraction of Total Flavones from *Moringa oleifera* Leaves by Response Surface Methodology and Its *in vitro* Hypoglycemic Activity

JI Li-li¹, WANG Kai-yu^{1*}, LUO Xiao-bo², ZHAO Lin¹, HUANG Xiao-li¹, ZHOU Yan¹¹Sichuan Agricultural University Department of Veterinary Medicine, Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Ya'an 625014, China; ²Sichuan Province Natural Resources Science Academy, Chengdu 610015, China

Abstract: The conditions for microwave-assisted extraction of total flavones from leaves of *Moringa oleifera* were optimized by response surface analysis. On the basis of single-factor experiments, the relationship between main extraction conditions including ethanol concentration, microwave power, extraction time and liquid-solid ratio were modeled using a 4-factor, 3-level Box-Behnken experimental design. The established model was analyzed by response surface methodology to obtain the optimal extraction conditions. The optimal extraction conditions were as follows: ethanol concentration of 58%, microwave power of 397 W, extraction time of 8 min and liquid-solid ratio of 59:1 (mL/g). Under these conditions, the yields of total flavones were 3.45%, which was consistent with the predicted value. Total flavones from *M. oleifera* leaves were investigated for its hypoglycemic activity by measuring 24 hours glucose up take in cultured HepG2 cells. Overall, our results suggested that the total flavones can enhance the glucose consumption in HepG2 cells under high glucose condition; moreover, flavones extracted by microwave exhibited higher efficiency in glucose depletion than those extracted from reflux extraction.

Key words: *Moringa oleifera* leaves; total flavones; microwave-assisted extraction; response surface methodology; hypoglycemic activity *in vitro*

辣木(*Moringa oleifera* Lam.)为辣木科、辣木属植物,起源于印度北部的亚喜马拉雅山地带。印度和非洲国家常用于治疗糖尿病、高血压、心血管病、

肥胖症等疾病^[1,2]。近年来,辣木在我国广东、云南、海南等都有引种栽培。2012年辣木叶被中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会批准为新资源食品。目前国内外对辣木叶提取物的研究,证明了辣木叶黄酮类化合物有降低糖耐量、降血糖、降血脂等作用^[3-6]。

已报道的辣木叶黄酮提取有乙醇为溶剂的回流

收稿日期:2014-08-20 接受日期:2014-11-19

基金项目:教育部《长江学者和创新团队发展计划》创新团队项目(IWT0848);四川省科技计划(2015SZ0106)

*通讯作者 Tel:86-853-2885753;E-mail:kywang@scau.edu.cn

提取法,耗时长,效率较低,且仅采用正交法优化提取工艺^[7,8]。微波萃取法用于黄酮类化合物提取时,具有选择性高、节省时间、溶剂用量少,对环境安全无害,提取效率高等优点^[9]。响应面法与正交法相比,能研究几种因素的交互作用,越来越广泛地运用在解决多变量问题^[10]。为此,本文以响应面法优化辣木叶总黄酮提取工艺,并观察回流提取与微波萃取总黄酮的体外降糖效果差异,为辣木叶资源开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

辣木叶粉,购自云南景洪云南省热带作物科学研究所,石油醚8 h索氏回流去脂;芦丁,购自中国生物制品检定所;DMEM高糖培养基,购自Thermo生物化学制品(北京)有限公司;四甲基偶氮唑盐(MTT),购自Sigma公司;胎牛血清,购自Thermo生物化学制品(北京)有限公司;葡萄糖试剂盒,购自南京建成生物工程研究所有限公司;HepG2细胞株,中国科学院成都生物研究所天然产物中心惠赠。

电脑微波超声波紫外光组合催化合成仪,北京祥鹄科技发展有限公司XH-300UL型;紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司,UV-1100型;

酶标仪,BIO-RAD680型;旋转蒸发仪,德国IKA RV05型。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的建立

按照陈瑞娇^[7]的方法建立芦丁对照品标准曲线。

1.2.2 回流提取辣木叶总黄酮及含量测定

按上法,准确称取样品30 g,加入70%乙醇,液料比20:1,60℃回流提取3次,每次1 h。提取液滤过,合并滤液,即得回流提取总黄酮(Flavones extract by Reflux Extraction,FRE)。冷却至室温后,取滤液1 mL,测定总黄酮浓度。

1.2.3 微波萃取辣木叶总黄酮及含量测定

准确称取样品,按试验设计的条件加入溶剂,置微波提取仪中,仪器设定为微波功率恒定模式,磁力搅拌。反应完成后滤过,即得微波萃取总黄酮(Flavones extract by Microwave Extraction,FME)。冷却至室温后取滤液1 mL,按上法测定总黄酮浓度。

1.2.4 响应面法优化实验

在单因素实验的基础上,以乙醇浓度、微波功率、提取时间、液料比等因素为考察变量,以总黄酮得率F为响应值,应用Design-Expert8.0.6软件,优化微波提取辣木叶总黄酮的工艺条件。响应面分析因素与水平设计见表1。

表1 响应面分析因素水平

Table 1 Factors and levels of response surface design

水平 Levels	X ₁ 醇浓度 Ethanol concentration(%)	X ₂ 微波功率 Microwave power(W)	X ₃ 提取时间 Extraction time(min)	X ₄ 液料比 Liquid-to-solid ratio(mL/g)
-1	50	300	6	50:1
0	60	400	8	60:1
1	70	500	10	70:1

1.2.5 辣木叶总黄酮体外降糖实验^[11]

1.2.5.1 细胞培养

将HepG2细胞接种于培养瓶中,加入含10%热灭活胎牛血清、100 U/mL青霉素-链霉素双抗的DMEM高糖培养液,置37℃、5%CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱中培养。每隔2 d更换1次培养液,3 d后传代,传代数1:4。取对数生长期的细胞进行试验。

1.2.5.2 FRE和FME对HepG2细胞葡萄糖消耗作用及MTT毒性试验

将冷冻干燥的FRE和FME粉末配制成高浓度水溶液,微孔滤膜滤过后,用无血清DMEM培养液

稀释至所需浓度待用。将处于良好生长状态的HepG2细胞,用0.25%胰蛋白酶液消化后,以1×10⁵个/mL细胞接种于96孔培养板中,置于CO₂培养箱中培养,待细胞贴壁后,弃去原培养液,换无血清培养液饥饿12 h后,加入含样或不含样的高糖培养液。将96孔培养板中细胞分为空白对照组、样品组,每个组重复6孔,孵育24 h后用葡萄糖试剂盒(氧化酶法)测定各孔培养液中葡萄糖的浓度,采用式(2)计算葡萄糖的消耗量。

$$GC = G_0 - G_{24} \quad (2)$$

式(2)中,GC:葡萄糖的消耗量,mmol/L;G₀:0 h培养液中葡萄糖浓度,mmol/L;G₂₄:24 h培养液中

葡萄糖浓度, mmol/L;

同时进行 MTT 毒性试验, 在葡萄糖消耗试验孵育结束, 按文献^[11]方法测定细胞存活活性与数量。

1.3 统计学分析

数据以 SPSS19.0 软件分析, 各组间差异采用 LSD 分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

根据各浓度芦丁对应的吸光值, 计算得到标准曲线 $C = 0.0817A + 0.0018$, 相关系数 $R^2 = 0.9998$ 。

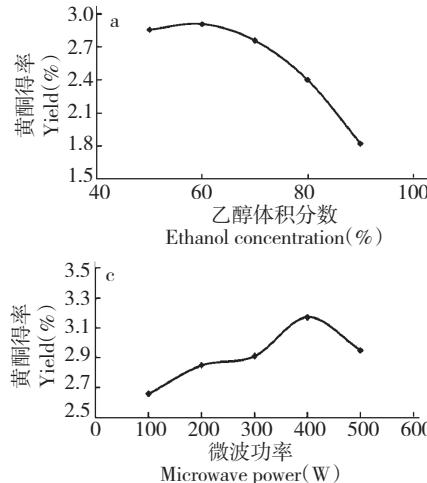
2.2 回流提取辣木叶黄酮得率

回流后的提取液滤过, 总黄酮得率为 2.05%, 与陈瑞娇的结果 3.59% 差异较大, 可能因种植地点、采摘时间、烘干方式不同等因素造成。

2.3 单因素实验

2.3.1 乙醇浓度的影响

称取 5 份辣木叶粉, 每份 1 g, 于微波萃取仪中提取。分别加入 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇, 微波功率 200 W, 提取时间 6 min, 液料比 50:1, 结果见图 1a。由图 1a 可见, 乙醇体积分数在 60% 时, 提



取率最大, 而乙醇浓度增加, 提取率降低, 这是因为黄酮糖苷是由甙元成分和糖组成, 甙元成分不易溶于水, 而糖又易溶于水, 乙醇与水达到最佳比例时, 提取量最大。所以选择体积分数为 60%。

2.3.2 提取时间的影响

称取 5 份辣木叶粉, 每份 1 g, 加入 60% 乙醇, 微波功率 200 W, 液料比 50:1, 分别按提取时间 6、8、10、12、14 min。结果见图 1b。由图 1b 可见, 随时间延长, 总黄酮得率升高, 当提取时间为 8 min 时, 达到最高, 低于 8 min 时, 提取不完全, 而高于 8 min 时, 由于温度随时间升高, 部分黄酮类化合物可能被破坏, 而导致得率下降。因此, 选择提取时间为 8 min。

2.3.3 微波功率的影响

称取 5 份辣木叶粉, 每份 1 g, 加入 60% 乙醇, 液料比 50:1, 分别于微波功率 100、200、300、400、500 W, 提取 8 min。结果见图 1c。由图 1c 可见, 随着提取功率增加, 总黄酮得率增加, 功率达到 400 W 时最高, 高于 400 W 时则下降。这可能是过高功率对黄酮类化合物活性成分产生破坏导致得率下降。因此, 选择提取功率为 400 W。

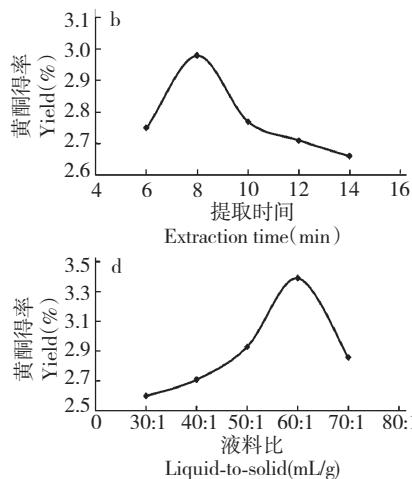


图 1 乙醇浓度(a)、提取时间(b)、微波功率(c)及液料比(d)对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effects of ethanol concentration (a), extraction time (b), microwave power (c) and liquid-to-solid ratio (d) on the extraction yield of flavones

2.3.4 液料比的影响

称取 5 份辣木叶粉, 每份 1 g, 分别按照 30:1、40:1、50:1、60:1、70:1 加入 60% 乙醇, 微波功率 400 W, 提取 8 min, 结果见图 1d。由图 1d 可见, 当液料比为 60:1 时, 总黄酮得率最高。因为液料比不足时, 微波加热速度快, 温度过高, 破坏黄酮类化合物;

过高时, 微波加热时间增长, 未达到提取最佳温度或保持时间不足使提取不完全。因此选择液料比为 60:1。

2.4 响应面法对辣木叶总黄酮微波提取工艺参数的优化

试验方案及结果见表 2

将所得试验数据进行多元回归拟合,得到辣木叶黄酮得率 Y 与微波提取各因素变量的二次回归方程模型为:

$$Y = 3.48 - 0.087X_1 - 0.11X_2 + 0.039X_3 +$$

$$0.012X_4 - 0.05X_1X_2 + 0.027X_1X_3 + 0.057X_1X_4 - 0.14X_2X_3 - 0.1X_2X_4 + 0.006536X_3X_4 - 0.27X_1^2 - 0.25X_2^2 - 0.29X_3^2 - 0.26X_4^2$$

表 2 响应面试方案与结果

Table 2 Design and results of response surface analysis

试验号 No.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	黄酮得率 Extraction Yield (%)
1	1	0	0	-1	2.84
2	1	0	0	1	2.95
3	0	0	0	0	3.49
4	-1	0	0	-1	3.08
5	0	0	1	1	2.96
6	0	0	0	0	3.49
7	1	-1	0	0	2.90
8	0	-1	0	1	3.12
9	0	1	0	1	2.90
10	0	0	1	-1	2.98
11	-1	0	0	1	2.97
12	0	1	-1	0	3.00
13	1	0	-1	0	2.81
14	0	0	-1	-1	2.87
15	0	1	1	0	2.82
16	1	1	0	0	2.79
17	0	0	-1	1	2.83
18	-1	-1	0	0	3.00
19	0	1	0	-1	3.04
20	0	0	0	0	3.51
21	-1	0	1	0	3.01
22	0	-1	-1	0	2.79
23	-1	0	-1	0	3.05
24	1	0	1	0	2.87
25	0	0	0	0	3.48
26	-1	1	0	0	3.09
27	0	-1	1	0	3.18
28	0	0	0	0	3.45
29	0	-1	0	-1	2.82

各因素按影响大小排序为微波功率 X₂ > 醇浓度 X₁ > 提取时间 X₃ > 液料比 X₄。为了检验方程的有效性,对微波提取总黄酮的数学模型进行方差分析,并对各因子的偏向回归系数进行检验,结果见表

3。

由表 3 可见,该模型极显著($P < 0.0001$);方程一次项中醇浓度 X₁ 为影响极显著($P < 0.001$),提取时间 X₃ 为影响高度显著($P < 0.01$),其余为不显

著($P > 0.05$); 方程二次项因素均为影响极显著($P < 0.001$); 交互项 X_1X_2 、 X_1X_4 为影响显著($P < 0.05$), X_2X_3 、 X_2X_4 为影响高度显著($P < 0.01$), X_1X_3 、 X_3X_4 为不显著。模型失拟项($P = 0.1049$)

表示模型选择合适。同时回归方程相关系数 $R^2 = 0.9852$, 说明模型相关度很好。所以, 可以使用该模型来分析响应值的真实变化, 可以用其确定最佳提取工艺条件。

表 3 回归模型参数检验

Table 3 Parameter estimate of regression model

来源 Sources	平方和 SS	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 significance
模型 mode	1.46	14	0.1	66.79	< 0.0001	* *
X_1	0.091	1	0.091	58.57	< 0.0001	* * *
X_2	2.575E-003	1	2.575E-003	1.65	0.2196	
X_3	0.015	1	0.015	9.66	0.0077	* *
X_4	1.637E-003	1	1.637E-003	1.05	0.3229	
X_1X_2	9.976E-003	1	9.976E-003	6.4	0.0240	*
X_1X_3	3.023E-003	1	3.023E-003	1.94	0.1855	
X_1X_4	0.013	1	0.013	8.33	0.0119	*
X_2X_3	0.081	1	0.081	51.73	< 0.0001	* *
X_2X_4	0.048	1	0.048	30.87	< 0.0001	* *
X_3X_4	4.796E-005	1	4.796E-005	0.031	0.8633	
X_1^2	0.47	1	0.47	300.56	< 0.0001	* *
X_2^2	0.42	1	0.42	272.08	< 0.0001	* *
X_3^2	0.53	1	0.53	339.62	< 0.0001	* *
X_4^2	0.44	1	0.44	284.76	< 0.0001	* *
残差 residual error	0.031	14	1.559E-003			
失拟项 lack of fit	0.02	10	1.975E-003	3.80	0.1049	
绝对误差 pure error	2.077E-003	4	5.192E-004			
总离差 total error	1.48	28				

注: * 差异显著($P < 0.05$); ** 差异高度显著($P < 0.01$); *** 差异极显著($P < 0.001$)。

Note: * means significant difference ($P < 0.05$); ** means highly significant difference ($P < 0.01$); *** means extremely significant difference ($P < 0.001$).

为了进一步研究相关变量交互作用以及确定最优点, 通过 Design Expert8.0.6 软件绘制响应面曲线图进行可视化分析。结果见图 2。由响应面立体图可知, 响应值存在最大值, 经软件分析计算, 得到辣木叶总黄酮的最佳提取条件: 醇浓度 58.45%, 微波功率 397.15 W, 提取时间 8.13 min, 液料比 59:1, 理论提取率为 3.49%。对该条件下进行 5 次验证试验, 结果表明, 总黄酮平均得率为 3.45%, 试验结果与模型基本相符, 说明该模型能较好地模拟和预测辣木叶总黄酮得率。微波萃取与回流提取相比, 总黄酮得率由 2.05% 升至 3.45%, 增加了 68.3%; 提取时间由 3 h 缩短至 8 min, 仅为回流提取的

4.44%。主要是因为微波萃取是利用微波使细胞内部的温度迅速升高, 压力增高使细胞破裂, 药材内有效成分流出, 并在较低的温度下溶于萃取液, 使提取时间更短, 提取率更高^[12]。

2.5 辣木叶总黄酮体外降糖试验

2.5.1 FRE 和 FME 对 HepG2 细胞增殖的影响

以空白对照为 100% 计算, 细胞存活率如图 3 所示。MTT 毒性试验表明, FME 与 FRE 浓度在 0.125 mg/mL 时, 对细胞增殖有一定影响, 存活率分别为 99.47% 及 99.90%, 其余浓度细胞存活率均大于 100%, 表现为促进细胞增殖。提取物冻干粉末相同质量浓度下, FRE 组细胞存活率均高于 FME 组。

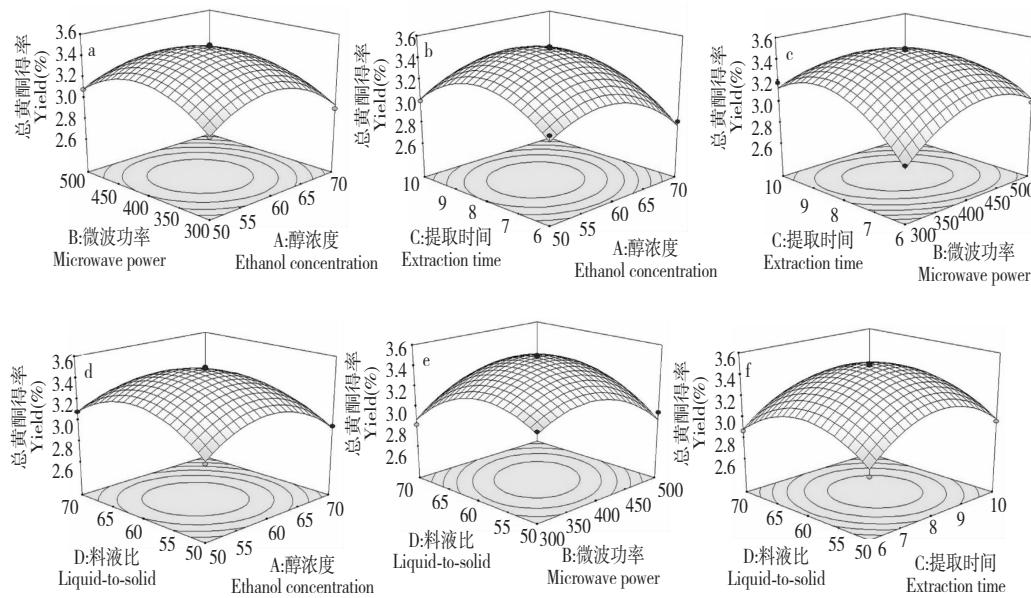


图 2 不同变量交互作用对总黄酮得率影响的响应面和等高线图

Fig. 2 Response surface plot and contour line of factors interaction on extraction yield of total flavones

注: a. 醇浓度和微波功率; b. 醇浓度和提取时间; c. 醇浓度和液料比; d. 提取时间和微波功率; e. 液料比和微波功率; f. 提取时间和液料比

Note: a. Ethanol concentration and microwave power; b. Ethanol concentration and extraction time; c. Ethanol concentration and liquid-to-solid ratio; d.

Extraction time and microwave power; e. Liquid-to-solid ratio and microwave power; f. Extraction time and liquid-to-solid ratio

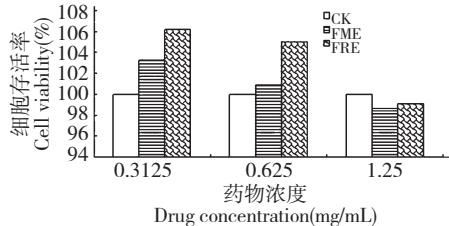


图 3 FME 及 FRE 的细胞毒性

Fig. 3 Toxicity of FME and FRE

表 4 FRE 和 FME 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗作用

Table 4 The effect of FRE and FME on the glucose consumption of HepG2 cell

组别 Group	剂量 Dose (mg/mL)	葡萄糖消耗量 GC Glucose consumption (mmol/L)	葡萄糖消耗量校正值 Glucose consumption correction GC/MTT (mmol/L)
CK	-	1.902 ± 0.094	1.886 ± 0.095
FRE	0.31	2.179 ± 0.169	2.036 ± 0.152 *
	0.62	2.558 ± 0.112	2.415 ± 0.107
	1.25	2.730 ± 0.126	2.733 ± 0.126
FME	0.31	2.457 ± 0.054	2.359 ± 0.065
	0.62	2.756 ± 0.058	2.712 ± 0.056 *
	1.25	2.999 ± 0.082	3.016 ± 0.10 *

* 表示与对照组有显著差异 ($P < 0.05$)。

* means significant difference with the control group ($P < 0.05$).

2.5.2 FRE 和 FME 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗的作用

由表 4 可见,三个浓度的辣木叶黄酮提取物均有增加细胞对葡萄糖的消耗作用,并且与空白对照组相比,用药组的葡萄糖消耗量显著增加 ($P < 0.05$)。用 MTT 校正,扣除细胞增殖抑制对培养液中葡萄糖消耗的影响后,均显著增加单位细胞的葡萄糖消耗量。相同质量浓度时,由 FME 比 FRE 表现出更强的降糖活性,说明了微波萃取方法可能提取的降糖有效成分含量更高。

3 结论

本研究采用微波萃取法提取辣木叶总黄酮,对提高辣木叶总黄酮的综合利用以及黄酮类化合物的产业化具有理论指导意义。通过响应面分析对其提取工艺进行优化,微波萃取的最优提取工艺为:乙醇浓度 58%,微波功率 397 W,提取时间 8 min,液料比 59:1 (mL/g)。在此条件下,辣木叶总黄酮得率为 3.45%。该方法传统的回流提取相比,具有耗时短,提取率高的优势。

辣木叶黄酮能促进 HepG2 细胞对葡萄糖的消耗,与空白组相比具有明显降糖效果,而微波萃取得到的总黄酮比回流提取得到的总黄酮表现出更强的

降糖活性。提示微波萃取法能不仅缩短提取时间,且能提高辣木叶中降糖活性成分的提取率。

致谢:非常感谢中国科学院成都生物研究所天然产物中心张国林老师课题组赠与 HepG2 细胞。

参考文献

- 1 Ampa Luangpiom WKTJ. Anti-hyperglycemic properties of *Moringa oleifera* Lam. aqueous leaf extract in normal and mildly diabetic mice. *Br J Pharmacol*, 2013;106-109.
- 2 Zhang YP(张燕平), Duan QF(段琼芬), Su JR(苏建荣). Horseradish and its utilization: review. *Chin J Ropical Agric* (热带农业科学), 2004,24:42-48.
- 3 Edoga C, Njoku O, Amadi E, et al. Blood sugar lowering effect of *Moringa oleifera* Lam in albino rats. *Int J Sci Tech*, 2013,3:88-90.
- 4 Jaiswal D, Kumar Rai P, Kumar A, et al. Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *J Ethnopharmacol*, 2009,123:392-396.
- 5 Ara N, Rashid M, Amran MS. Comparison of *Moringa oleifera* leaves extract with atenolol on serum triglyceride, serum cholesterol, blood glucose, heart weight, body weight in Adrenalin induced rats. *Saudi J Biol Sci*, 2008,15:253-258.
- 6 Chen RJ(陈瑞娇,)Zhu BF(朱必凤), Wang YZ(王玉珍), et al. Extraction and hypoglycemic effect of the total flavonoid from leaves of *Moringa oleifera*. *J Food Sci Biol* (食品与生物技术学报), 2007,26:42-45.
- 7 Chen RJ(陈瑞娇), Peng SS(彭珊珊), Wang YZ(王玉珍), et al. Study on extraction technology of total flavones from leaves of *Moringa oleifera* by ethanol. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2007,28:29-31.
- 8 Sun MY(孙鸣燕), Wang YM(王羽梅). The optimization of extraction method of total flavonoids from the leaves of *Moringa oleifera*. *J Shaoguan Univ* (韶关学院学报), 2008, 12:88-92.
- 9 Chen Y(陈源), Yang DF(杨道富), Fan LH(范丽华), et al. Studies on optimization of the technology for extracting total flavonoids from *Murcott* peel by reaponse surface methodology. *J Chin Ins Food Sci Tech* (中国食品学报), 2013,4: 80-86.
- 10 Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. *Wires Comput Mol Sci*, 2010,2:128-149.
- 11 Xu T(徐婷), Wu Q(吴青), Gao JW(高骏伟). Hypoglycemic effect *in vitro* of *Litchi* seed extract and its fraction by cation exchange resin. *Food Machinery* (食品与机械), 2012.4;113-116.
- 12 Sparr Eskilsson C, Björklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J Chromatogr A*, 2000,902:227-250.

(上接第 978 页)

- 14 Guo Y(郭钰), Zeng L(曾玲), Liang GW(梁广文). Study on the repellent activity of plant essential oils against *Latheticus oryzae* Waterhouse. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), 2013,28(5):57-62.
- 15 Tang PA(唐培安), Song W(宋伟), Zhang T(张婷). Fumigation activity of ethyl formate against *Oryzaephilus surinamensis* (L.). *J Grain Stor* (粮食储藏), 2010,39(6):3-5.
- 16 Hou HM(侯华民), Feng JT(冯俊涛), Chen AL(陈安良), et al. Studies on the bioactivity of essential oils against insects. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究和开发), 2002,14 (6):27-30.
- 17 Bai XG(白旭光). Stock Pest and Control (储藏物害虫与防治). Beijing: Science Press, 2002.