

紫萼玉簪花总皂苷的纯化及抗肿瘤活性研究

曲中原¹, 李雪¹, 邹翔^{2*}, 张天雷¹, 赵世成¹, 姜雪¹, 邹晓祺², 李文兰¹¹哈尔滨商业大学药学院;²哈尔滨商业大学国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 哈尔滨 150076

摘要: 本文旨在研究紫萼玉簪花总皂苷的纯化工艺及抗肿瘤活性。以比吸附量和比洗脱量为指标, 筛选大孔树脂型号, 进一步优化工艺条件。通过体外实验(MTT法)对紫萼玉簪花总皂苷进行抗肿瘤活性研究。实验结果显示 AB-8 型大孔树脂适合富集纯化紫萼玉簪花总皂苷, 最佳纯化条件为药材量与树脂用量比小于 1:15, 分别用 4 BV 水和 20% 乙醇除杂, 6 BV 70% 乙醇在 2 BV·h⁻¹ 流速下洗脱, 在此条件下得到的紫萼玉簪花总皂苷(纯度 57.49%) 对 SGC-7901、MCF-7、HepG-2 肿瘤细胞有较强的抑制作用, IC₅₀ 分别为 15.47 μg·L⁻¹、28.08 μg·L⁻¹、17.37 μg·L⁻¹, 表明具有良好的抗肿瘤活性。

关键词: 紫萼玉簪花; 总皂苷; 大孔吸附树脂; 抗肿瘤活性; 纯化

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.8.025

Purification and Antitumor Activity of Total Saponins of *Hosta ventricosa*QU Zhong-yuan¹, LI Xue¹, ZOU Xiang^{2*}, ZHANG Tian-lei¹,ZHAO Shi-cheng¹, JIANG Xue¹, ZOU Xiao-qi², LI Wen-lan¹¹College of Pharmacy, Harbin University of Commerce; ²Engineering Research

Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: The aim of this paper was to study the purification process of total saponins of *H. ventricosa* (TSHV) and their anti-tumor activities. Filtrate macroporous resin models and further optimize the process conditions with the adsorption ratio and elution ratio as an indicator. The purified TSHV were screened for antitumor activity *in vitro* by MTT assay. The results showed that AB-8 macroporous resin was suitable for the purification of TSHV. The optimal purification conditions were as follows: the ratio of *H. ventricosa* dosage to the amount of macroporous resin was less than 1:15; 4 BV water and 20% ethanol were used to remove impurities, and 6 BV 70% ethanol was eluted at 2 BV·h⁻¹ flow rate. Under these conditions, the purity of TSHV obtained was 57.49%. The prepared TSHV could effectively inhibit the proliferations of SGC-7901, MCF-7 and HepG-2 tumor cells *in vitro*, the IC₅₀ values of which were 15.47 μg·L⁻¹, 28.08 μg·L⁻¹ and 17.37 μg·L⁻¹ respectively, which showed brilliant anti-tumor effects.

Key words: *Hosta ventricosa*; total saponins; macroreticular resin; antitumor activity; purification

百合科玉簪属植物为多年生宿根草本植物, 主要分布于亚洲温带和亚热带地区, 包括中国、日本、朝鲜以及俄罗斯的远东地区, 多为栽培品。该属共有 43 个原始种, 我国有 4 个原始种, 分别为玉簪 (*Hosta plantaginea*)、紫萼玉簪 (*H. ventricosa*)、东北玉簪 (*H. ensata*) 和白粉玉簪 (*H. albofarinosa*)。该属植物除具有较高的观赏价值还具有一定的药用价值^[1]。近年研究发现玉簪属植物主要含有生物碱

类、甾体皂苷类、黄酮类、有机酸、酯类、微量元素等化学成分, 具有抗肿瘤、镇痛、抗炎等作用^[2-4]。其中玉簪 (*H. plantaginea*) 的干燥花作为蒙药收载于《中华本草·蒙药卷》, 具有消肿利尿、清热解毒和止血消炎的功效^[5], 作为蒙药玉簪清咽十五味散的君药应用于临床, 主要用于咽喉肿痛、气喘、音哑、胸肋刺痛等症^[6]。紫萼玉簪 (*H. ventricosa*) 又称紫萼, 别名白背三七, 生于山坡林下的阴湿地区。《中华本草》记载其味甘微苦, 性温平, 具有凉血止血, 解毒。主崩漏、湿热带下、咽喉肿痛等症。全草皆可入药^[7]。目前已有学者对紫萼玉簪的根、叶的化学成分进行了一定的研究^[8,9], 而对紫萼玉簪花的化学成分及药理活性研究较少。前期研究表明紫萼玉簪花中含

收稿日期: 2017-12-27 接受日期: 2018-03-21

基金项目: 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划 (UNPYSCT-2015070); 黑龙江省博士后科研启动基金 (LBH-Q16130, LBH-Q16133); 哈尔滨商业大学一般项目 (17XN062); 哈尔滨商业大学博士科研启动项目 (12DL017)

* 通信作者 E-mail: zou8663202@163.com

有大量皂苷类成分。在此基础上,本文对紫萼玉簪花进行提取,采用大孔树脂对花中总皂苷进行纯化,优化工艺,确定最佳的工艺参数,以期获得较高纯度的紫萼玉簪花总皂苷。进一步对紫萼玉簪花总皂苷的抗肿瘤活性进行研究,为其有效部位开发及药效物质基础研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

紫萼玉簪花为百合科紫萼玉簪 [*Hosta ventricosa* (*Salisb.*) Stearn] 的干燥花,夏秋季花期采收,40 ℃ 烘干,由哈尔滨商业大学药学院张德连副教授鉴定。大孔吸附树脂 (AB-8、D101、HPD100、H103、HPD826、NKA-9,沧州宝恩吸附材料有限公司)、薯蓣皂苷标准品 (天津一方科技有限公司,批号 130121)、胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司)、RPMI 1640 培养液 (Gibco 公司)、胰蛋白酶 (Sigma 公司)、MTT (Sigma 公司)。化学试剂均为国产分析纯。人胃癌细胞株 SGC-7901、人肝癌细胞株 HepG-2、乳腺癌细胞株 MCF-7 由哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心提供。

1.2 实验仪器

UV-5200PC 紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); GZX-9240MBE 电热鼓风干燥箱 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); N-1000 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); BS110 型分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); CO-150 型二氧化碳培养箱 (美国 NBS 公司); CKX-41-32 型倒置显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); DL-CJ-1N 超净工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司); CX21 光学显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); SpectraMax Plus384 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); P 型移液器 (法国 Gilson 公司) 等。

2 实验方法

2.1 紫萼玉簪花粗皂苷提取液的制备

称取紫萼玉簪花 100 g, 提取条件料液比 1:25, 乙醇体积分数 70%, 提取温度 80 ℃, 提取时间 4 h, 提取 3 次。正丁醇萃取 8 次, 舍弃水相, 保留醇相, 合并 8 次醇相, 减压浓缩, 挥干, 蒸馏水定容至 1 000 mL 容量瓶 (每 1 mL 含生药 0.1 g, 皂苷含量为 6.057 5%), 备用。

2.2 对照品溶液的制备

精密称量薯蓣皂苷标准品 7.5 mg, 用甲醇溶解于 50 mL 容量瓶中并定容至刻度, 摇匀备用。

2.3 大孔树脂预处理

取大孔树脂适量, 加入高于树脂层 10 cm 的 95% 乙醇浸泡过夜, 装柱, 用蒸馏水淋洗至流出液在试管中用水稀释不浑浊时为止。用水反复洗涤至无醇味, 备用。

2.4 紫萼玉簪花总皂苷含量测定方法的建立

2.4.1 薯蓣皂苷标准曲线的制备

精密量取 0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 薯蓣皂苷对照品溶液分别置于 10 mL 具塞试管中, 80 ℃ 水浴挥干溶液。然后向试管中分别加入 0.2 mL 5% 香草醛-冰醋酸溶液, 轻度振摇, 再加 0.8 mL 高氯酸, 充分振摇后密封, 在 60 ℃ 水浴中保温 15 min 后立即放入冰水中冷却, 加入冰醋酸 5 mL 稀释, 于 454 nm 测吸光度值。以薯蓣皂苷的质量为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程为 $y = 4.3533x - 0.0126$ ($r = 0.9998$), 表明薯蓣皂苷在 0.06 ~ 0.18 mg 范围和吸光度值呈良好的线性关系^[10]。

2.4.2 方法学考察

精密吸取对照品溶液 0.1 mL 于具塞试管中, 用“2.4.1”项下的方法显色处理后, 在 454 nm 处测定吸光度值, 连续测量 6 次, RSD 为 0.125% ($n = 6$), 表明本实验精密度良好。取同一供试品溶液, 用“2.4.1”项下的方法显色处理后, 于 10、20、30、40、50、60 min 测量吸光度, RSD 为 0.140% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 60 min 内稳定。取 5 g 紫萼玉簪花 6 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 显色同“2.4.1”项下方法, 进行测定, RSD 为 0.107% ($n = 6$), 表明本实验重复性良好。取紫萼玉簪药材花 (5 g, 总皂苷含量为 2.96%) 6 份, 按照 1:1 比例加入薯蓣皂苷对照品, 按“2.1”项下制备供试品溶液, 显色同“2.4.1”项下方法, 测定吸光度值, 经计算薯蓣皂苷平均回收率 99.01%, RSD = 2.16% ($n = 6$)。

2.4.3 供试品总皂苷含量测定

精密称取供试品溶液置具塞试管中, 显色步骤同“2.4.1”项下方法, 于 454 nm 测定吸光度, 根据标准曲线计算紫萼玉簪花总皂苷的含量。

2.5 大孔树脂的筛选

称取预处理好的 6 种型号大孔树脂 (AB-8、D101、HPD100、H103、HPD826、NKA-9) 各 15 g ($M_{\text{树}}$), 放于 100 mL 锥形瓶中, 分别加入 40 mL 紫

萼玉簪花粗皂苷样品溶液,测定上样液中皂苷含量为 242.3 mg($M_{上}$),振摇均匀(30 min/次),静态吸附 8 h,然后装入树脂柱(内径为 1.5 cm、高 20 cm)中,收集流出残液,测定皂苷量($M_{残}$),用 4 BV 蒸馏水除杂,收集水液,测定皂苷质量($M_{水}$)。用 100 mL 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,定容于 100 mL 容量瓶中,测定皂苷质量($M_{洗脱}$),精密量取 50 mL 洗脱液减压浓缩干燥至恒重,干膏重量 2 倍为 $M_{干膏}$ 。计算 6 种大孔吸附树脂对总皂苷的吸附量即 $M_{吸}$ ($M_{上} - M_{残} - M_{水}$)、比吸附量($M_{吸}/M_{树}$)、比洗脱量($M_{洗脱}/M_{树}$)、吸附率($M_{吸}/M_{上}$)和解吸率($M_{洗脱}/M_{吸}$),选择最优型号^[11]。

2.6 AB-8 型大孔吸附树脂纯化紫萼玉簪花总皂苷工艺优化

2.6.1 药材量与树脂用量比例考察

取约 15 g 预处理好的 AB-8 型大孔吸附树脂,装入树脂柱中,径高比为 1:9。100 mL 紫萼玉簪花粗皂苷溶液以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度上样,收集 10 份(10 mL/份),测定每份收集液中紫萼玉簪花总皂苷含量。以上样体积为横坐标,样液泄漏量为纵坐标绘制泄漏曲线。

2.6.2 药材量与树脂用量比例考察

取 3 根树脂柱(内径为 1.5 cm、高 20 cm),15 g AB-8 型大孔树脂装柱。根据泄漏曲线,选择 30、20 和 10 mL 确定适合的上样量,即药材用量与树脂用量比分别为 3:15、2:15 和 1:15。流速为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,上样后用 4 BV 蒸馏水洗脱,收集洗脱液。测定水洗脱液中总皂苷含量,计算总皂苷的泄漏量和泄漏率,得出最佳药材量与树脂用量比例。

2.6.3 洗脱剂浓度考察

取预处理好的树脂按药材用量与树脂量比 1:15 装柱,上紫萼玉簪花提取液 120 mL,以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度上样,过夜后 4 BV 蒸馏水洗脱除杂,分别再用 6 BV 10%、20%、30%、50%、70%、95% 的乙醇溶液洗脱皂苷,流速为 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,分别收集洗脱液,减压回收溶剂,测定各部分紫萼玉簪花总皂苷的含量。

2.6.4 验证试验

取 3 根树脂柱(内径为 1.5 cm、高 20 cm),选用 15 g AB-8 型大孔树脂装柱,上样用量与树脂用量比例为 1:15,4 BV 蒸馏水和 20% 乙醇除杂,洗脱溶液为 6 BV 70% 体积分数乙醇溶液,洗脱流速控制在 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,将洗脱液减压浓缩干燥至恒重,测定皂苷的

纯度。

2.7 紫萼玉簪花总皂苷抗肿瘤活性研究

2.7.1 紫萼玉簪花总皂苷母液配制

采用 RPMI1640 将紫萼玉簪花总皂苷原液配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液,封口膜封口,4 ℃ 避光保存。

2.7.2 MTT 法检测紫萼玉簪花总皂苷对肿瘤细胞的增殖抑制作用

用 0.25% 胰蛋白酶分别消化对数生长期的 SGC-7901、MCF-7、HepG-2 细胞后,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液将其稀释成为 5×10^4 个/ml 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板中以每孔 100 μL 的体积,置于 CO_2 培养箱中(5% CO_2 37 ℃)培养 24 h 后,每孔加入药液 100 μL 使总液量为 200 μL ,每个剂量设 6 个平行孔,纯化紫萼玉簪花总皂苷的浓度分别为 3、125、6、25、12、5、25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,空白对照组加入相同体积的 RPMI 1640 培养液,培养 48 h 后弃去上清液,每孔再加入 MTT 液($0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)100 μL ,培养 4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,在微型振荡器上振荡 5 min 后,用酶标仪在检测波长 570 nm 测定吸光度 OD 值,并计算 IC_{50} 。

细胞抑制率% =

$$\frac{\text{空白对照组平均 OD 值} - \text{给药组平均 OD 值}}{\text{空白对照组平均 OD 值}} \times 100\%$$

3 实验结果

3.1 大孔吸附树脂纯化紫萼玉簪花总皂苷工艺优化的实验结果

3.1.1 大孔吸附树脂型号筛选结果

通过对 6 种不同型号的大孔吸附树脂进行筛选,表明 AB-8 型大孔吸附树脂较其他 5 种树脂对皂苷的吸附率和解吸率高,因此选择 AB-8 型大孔吸附树脂对紫萼玉簪花总皂苷进行纯化(见表 1)。

3.1.2 泄漏曲线考察结果

泄露曲线考察结果如表 2,图 1 所示,当上样 20 mL 时开始明显泄漏,上样 90 mL 时树脂达到吸附饱和而完全泄露。

3.1.3 药材量与树脂用量比例考察结果

药材量与树脂用量比例考察结果见表 3,上样量与树脂用量比例为 3:15 和 2:15 时紫萼玉簪花总皂苷损失较大,因此药材用量与树脂用量比例是 1:15 最佳。

表1 不同型号大孔吸附树脂筛选结果

Table 1 Different types of macroporous resin screening results

	树脂类型 Resin type					
	D101	AB-8	NAK-9	HPD826	HPD100	H103
比吸附量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Specific absorption capacity	12.95	12.64	12.41	11.17	12.6	12.31
比洗脱量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Specific elution capacity	11.16	10.52	10.47	10.04	9.92	9.84
吸附率 Adsorption rate(%)	80.14%	78.25%	76.85%	69.17%	78.01%	76.19%
解吸率 Desorption rate(%)	69.08%	65.10%	64.81%	62.18%	61.39%	60.92%

表2 紫萼玉簪花总皂苷泄漏量考察结果

Table 2 *H. ventricosa* total saponin leakage results

上样药液体积 Sample liquid volume (mL)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
总皂苷泄露量 Total saponin leakage (mg)	0	5	14	14.2	14.1	16	16.5	16.7	16.8	17.5	17

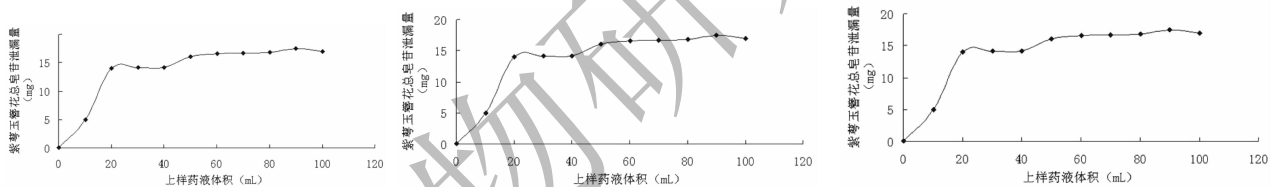


图1 紫萼玉簪花总皂苷泄漏曲线

Fig. 1 *H. ventricosa* total saponin leakage curve

表3 药材量与树脂量比例考察

Table 3 Amount of medicine and the amount of resin investigation

药材量:树脂量 Amount of herbs: amount of resin (g:g)	上样体积 Sample volume (mL)	紫萼玉簪花总皂苷量 Total saponin amount (mg)	泄漏量 Leakage (mg)	泄漏率 Leak rate (%)
3:15	30	181.73	40.55	22.31
2:15	20	121.15	20.34	16.79
1:15	10	60.58	5.4	8.91

3.1.4 洗脱剂浓度考察

从表4可知,在10%、20%乙醇体积分数的洗脱液含少量紫玉簪花总皂苷,从30%开始,随着乙醇浓度的增加,洗脱液中的皂苷含量上升,到70%达到最高,随后下降。因此,最佳洗脱工艺是先用蒸馏水、20%乙醇除杂,然后用70%乙醇洗脱。

3.2 验证试验

按最佳工艺条件进行验证,得紫萼玉簪花提取液中的总皂苷纯度为57.49%。

3.3 紫萼玉簪花总皂苷抗肿瘤活性结果

MTT法分别检测了不同浓度紫玉簪花总皂苷对SGC-7901、MCF-7、HepG-2的增殖抑制作用,结果

表4 洗脱剂浓度考察

Table 4 Eluant concentration investigation

	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)					
	10	20	30	50	70	95
干膏重 Dry cream weight (mg)	0.092 3	0.052 9	0.221	0.437 5	0.365 1	0.110 9
纯度 Purity (%)	15.32	21.63	39.81	58.26	60.72	21.23

如表5所示。紫玉簪花总皂苷作用于SGC-7901细胞48 h后,3.125~200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下OD值显著降低,随着紫玉簪花总皂苷浓度的增加,细胞的增殖抑

制率逐渐升高,与空白对照组比较具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),经计算其 IC_{50} 分别为15.47 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、28.08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、17.37 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表5 MTT法测定紫玉簪花总皂苷对SGC-7901、MCF-7、HepG-2细胞生长抑制率($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5 MTT assay of *H. ventricosa* total saponin SGC-7901, MCF-7, HepG-2 cell growth inhibition rate ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	浓度 Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	SGC-7901		MCF-7		HepG-2	
		OD	抑制率 Inhibition rate (%)	OD	抑制率 Inhibition rate (%)	OD	抑制率 Inhibition rate (%)
Control		1.0921 \pm 0.067		1.099 7 \pm 0.084		1.013 4 \pm 0.078 8	
Total saponin	3.125	0.787 \pm 0.104 * *	27.38	1.062 \pm 0.055	3.43	0.922 \pm 0.036	9.12
	6.25	0.771 \pm 0.080 * *	27.93	0.934 \pm 0.032 *	15.07	0.811 \pm 0.080 *	19.97
	12.5	0.695 \pm 0.089 * *	36.36	0.889 \pm 0.068 * *	19.16	0.539 \pm 0.066 * *	46.91
	25	0.466 \pm 0.067 * *	57.32	0.732 \pm 0.051 * *	33.44	0.471 \pm 0.061 * *	53.52
	50	0.182 \pm 0.057 * *	83.33	0.134 \pm 0.046 * *	87.81	0.156 \pm 0.064 * *	84.61
	100	0.103 \pm 0.070 * *	91.39	0.118 \pm 0.059 * *	89.27	0.112 \pm 0.008 * *	88.95
	200	0.066 \pm 0.058 * *	94.59	0.109 \pm 0.043 * *	90.09	0.111 \pm 0.012 * *	89.05
IC_{50}		15.47 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		28.08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		17.37 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

4 结论

本文对紫萼玉簪花的皂苷类成分进行富集,运用乙醇热回流法提取,正丁醇萃取,并利用大孔树脂进行纯化,制备高纯度的紫萼玉簪花总皂苷。通过筛选大孔树脂型号,确定AB-8型大孔树脂是一种比较理想的纯化紫萼玉簪总皂苷的树脂。最佳工艺条件为径高比1:9,药材量与树脂用量比1:15。分别用4 BV水和20%乙醇除杂,6 BV70%乙醇洗脱,流速2 BV $\cdot\text{h}^{-1}$,最终优选工艺得到的紫萼玉簪总皂苷纯度为57.49%。采用MTT法对不同浓度的紫玉簪花总皂苷进行抗肿瘤活性初步研究,研究结果表明紫玉簪花总皂苷对SGC-7901、MCF-7、HepG-2 3种肿瘤细胞的 IC_{50} 分别为15.47、28.08、17.37 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,具有良好的抗肿瘤活性,为紫萼玉簪皂苷进一步抗肿瘤药效物质基础及作用机制研究奠定了基础,为紫萼玉簪药用资源的开发利用提供一定的理论依据。

参考文献

- 1 Fu LG(傅立国),Chen TQ(陈潭清). Chinese higher plants (中国高等植物),Vol 13[M]. Qingdao:Qingdao Publishing

House,2002:91-92.

- 2 Yang L(杨丽),Wang YQ(王雅琪),He JW(何军伟), et al. Research progress on the chemical components and bioactivities of Hosta[J]. *J Chin Med Mater*(中药材),2016,39:216-222.
- 3 Yoshihiro M,Aiko K,Minpei K. Steroidal glycosides form the underground parts of Hosta plantaginea var. Japonica and their cytostatic activity on leukaemia HL-60 cells[J]. *Tokyo Uni Pharma Life Sci*,1996,44:305-310.
- 4 Xue PF(薛培凤),Zhang JH(张金花),Xie HX(解红霞), et al. Research progress on the chemical components and pharmacological effects of hosta[J]. *J Chin Med Mater*(中药材),2011,34:647-651.
- 5 National Chinese Medicine Authority "Chinese Materia Medica" Editorial Board(国家中医药管理局《中华本草》编委会). Chinese Materia Medica(中华本草·蒙药卷)[M]. Shanghai:Shanghai Science and Technology Press,2004:142.
- 6 People's Republic of China pharmacopoeia commission of the ministry of health. People's Republic of China ministry of health drug standards;Mongolian medicine volumes(中华人民共和国卫生部药品标准:蒙药分册)[S]. Beijing: People's medical publishing house,1998:81.

(下转第1443页)