

荔枝核多酚纯化工艺优化研究

周秋艳¹, 唐方华¹, 刘展梅², 彭涛¹, 施颖杰¹

(1. 纽斯葆广赛(广东)生物科技股份有限公司提取发酵实验室, 广东广州 510900; 2. 广州南洋理工职业学院, 广东广州 510925)

摘要 [目的]以荔枝核为原料,优化荔枝核多酚纯化工艺,提高荔枝多酚资源利用率。[方法]以多酚纯度以及收率为衡量指标,通过对比7种大孔树脂的静态吸附与解吸,确定纯化荔枝核多酚的最佳树脂;通过大孔树脂动态吸附与洗脱,考察吸附量、洗脱溶剂、洗脱溶剂用量、洗脱速度等因素,确定荔枝核多酚纯化的最佳工艺。[结果]筛选出大孔树脂 LSA-12 作为最佳纯化材料,LSA-12 纯化荔枝核多酚的最佳工艺为吸附量 1:4.61(g:mL)(总固形物:树脂体积)、洗脱溶剂 70% 乙醇、洗脱溶剂用量 1.5 BV、洗脱速度 1.0 BV/h。在该条件下,所得荔枝核多酚平均纯度为 71.98%,平均收率为 80.93%。[结论]大孔树脂 LSA-12 纯化荔枝核多酚效果良好,该工艺可在生产中推广应用。

关键词 荔枝核多酚;纯化;大孔树脂;静态吸附与解吸;动态吸附与洗脱

中图分类号 TQ 914.1 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)23-0196-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.23.057



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Purification Process of Polyphenols from Litchi Seed Polyphenols

ZHOU Qiu-yan¹, TANG Fang-hua¹, LIU Zhan-mei² et al (1. Extraction and Fermentation Laboratory of Nuspower Greatsun (Guangdong) Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510900; 2. Guangzhou Nanyang Polytechnic College, Guangzhou, Guangdong 510925)

Abstract [Objective] Using litchi seed as raw material, optimize the purification process of litchi seed polyphenols and improve the utilization rate of litchi polyphenols. [Method] Based on the purity and yield of polyphenols, the best resin for purifying litchi core polyphenols was determined by comparing the static adsorption and desorption of seven macroporous resins. Based on the dynamic adsorption and elution of macroporous resin, the adsorption process, elution solvent, elution solvent dosage and elution rate were investigated to determine the optimal process for purification of litchi seed polyphenols. [Result] The macroporous resin LSA-12 was selected as the best purification material. The optimal process for purifying litchi seed polyphenols by LSA-12 was: adsorption amount 1:4.61(g:mL) (total solids:resin volume), elution solvent 70% ethanol, elution solvent 1.5 BV, elution rate 1.0BV/h. Under this optimal condition, the average purity of litchi seed polyphenols was 71.98%, and the average yield was 80.93%. [Conclusion] The macroporous resin LSA-12 has a good effect in purifying litchi seed polyphenols, and the process can be applied in production.

Key words Litchi seed polyphenols; Purification; Macroporous resin; Static adsorption and desorption; Dynamic adsorption and elution

荔枝核是我国传统的中药材,为无患子科植物荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)的成熟种子,性甘、微苦、温,归肝、肾经。现代研究表明,荔枝核含有皂甙、植物多酚、淀粉、蛋白质、脂肪酸、挥发油及矿物元素等化学成分^[1],除了具有改善肝损伤作用之外^[2],还具有抑制肿瘤^[3-4]、抗氧化^[5]、抗病毒^[6]等作用,可用于治疗糖尿病及其并发症^[7],以及治疗乳腺增生^[8]、保护神经元^[9]。多酚类化合物广泛存在于植物中,具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抑菌、预防老年痴呆和心血管疾病等诸多生理活性^[2]。然而,目前国内研究荔枝多酚类物质主要是集中在荔枝皮部位,关于荔枝核活性物质的研究主要集中在具有抗血糖功效的皂苷类物质上。

笔者以干燥荔枝核为原料,采用大孔树脂对荔枝核多酚类物质分离纯化工艺进行研究,旨在为建立荔枝核多酚分离纯化工艺提供理论依据,同时为拓展荔枝深加工产品领域、综合利用荔枝资源提供有效途径。

1 材料与方法

1.1 原料和试剂 “淮枝”品种荔枝核,取自广州市从化区明珠市场的荔枝整果。

基金项目 广东省高校省级重大项目“荔枝废弃物多酚提取及产品微胶囊化和功能性研究”;广州市南博乡村振兴研究院“农业生物资源精细化生产与综合利用协同创新中心”项目。

作者简介 周秋艳(1988—),女,广西柳州人,工程师,硕士,从事天然产物研究。

收稿日期 2019-05-20

没食子酸:中国食品药品检定研究院;福林酚:中国食品药品检定研究院;大孔树脂:LSA-12、XDA-8、LX-T28、LX-8、D101,西安蓝晓科技新材料股份有限公司;大孔树脂:DM21、DM28,艾美科健(中国)生物医药有限公司;95%乙醇:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;甲醇:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;碳酸钠:分析纯,天津市大茂化学试剂厂。

1.2 主要仪器设备 DMF-10A 多功能摇摆式粉碎机(浙江省温岭市铭大药材机械设备有限公司);DMF-4B 手提式高速中药粉碎机(浙江省温岭市铭大药材机械设备有限公司);2WAJ 阿贝折射仪(上海仪电物理光学仪器有限公司);LT-1002 电子天平(常熟市天量仪器有限责任公司);ATX224 分析天平(岛津制作所);TD-5M 离心机(山东博科科学仪器有限公司);SP-752PC 紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司);5 L 旋转蒸发器(上海大颜仪器设备有限公司);EXRE-2002 旋转蒸发器(巩义市宇翔仪器有限公司);DHG-9240A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);DZF-6053 真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3 荔枝核提取浓缩液的制备 新鲜荔枝核 60 ℃ 烘 8 h,粉碎至粗粉,备用→荔枝核第 1 次提取:温度 60 ℃、70%乙醇、料液比 1:8,提取 60 min;药渣第 2 次提取:温度 60 ℃、70%乙醇、料液比 1:6,提取 60 min;合并提取液→60 ℃减压浓缩至无醇→浓缩液 4 000 r/min 离心 6 min,得荔枝核提取

浓缩液,冷藏保存,备用。

1.4 绘制没食子酸标准曲线 准确称取 (0.110 ± 0.010) g 没食子酸,用蒸馏水溶解,然后定容至 100 mL,即为没食子酸标准储备溶液。准确量取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 标准储备溶液于 100 mL 容量瓶中,定容,摇匀,得浓度分别为 10、20、30、40、50 $\mu\text{g/mL}$ 没食子酸工作液。准确量取 1.0 mL 没食子酸工作液于刻度试管中,分别加入 5.0 mL 10% 福林酚试剂,摇匀,反应 3~8 min 内,加入 4.0 mL 7.5% Na_2CO_3 溶液,加水定容、摇匀,室温下放置 60 min,于 765 nm 波长下,用紫外可见分光光度计测得吸光度,绘制标准曲线。空白用蒸馏水代替没食子酸标准溶液。

1.5 多酚的检测 称取待检测样品于 10 mL 离心管中,加入在 70 $^{\circ}\text{C}$ 中预热过的 70% 甲醇溶液 5 mL,搅拌均匀,立即移入 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,冷却至室温,于离心机 3 500 r/min 转速离心 10 min,将上清液转移至 10 mL 容量瓶中。沉淀再加入 5 mL 70% 甲醇溶液,重复以上操作。合并提取液定容至 10 mL,摇匀,再准确量取 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,摇匀,待测。从 100 mL 容量瓶中准确量取 1.0 mL 样品溶液于刻度试管中,分别加入 5.0 mL 10% 福林酚试剂,摇匀,反应 3~8 min,加入 4.0 mL 7.5% Na_2CO_3 溶液,摇匀,室温下放置 60 min,空白用水代替样品溶液。在 765 nm 波长下测得样品吸光度,记录并计算样品中多酚的含量。

1.6 大孔树脂的预处理 用 95% 乙醇浸泡大孔树脂 24 h,使其充分溶胀,之后将大孔树脂装柱,用 95% 乙醇冲洗,直至洗出液加适量纯化水后无白色浑浊现象出现,再用纯化水洗至无醇,即可使用。

1.7 大孔树脂的静态吸附 称取荔枝核提取浓缩液,用纯化水稀释至固形物 $\leq 5\%$,得稀释液,备用;将预处理好的型号为 LSA-12、XDA-8、LX-T28、LX-8、D101、DM21、DM28 树脂分别各取 5 份,每份重量为 16.0 g,共计 35 份,分别置于 250 mL 锥形瓶中,然后分别加入 100 mL 荔枝核提取浓缩液的稀释液,于摇床中振荡吸附 12 h(振速为 150 r/min)后抽滤,并用纯化水冲洗树脂至抽滤液无色为止,合并同一树脂型号的抽滤液,分别向抽滤后树脂加入 200 mL 体积分数为 70% 的乙醇,振荡解吸 12 h 后分别收集抽滤液,检测,计算荔枝核多酚纯度和收率,确定分离纯化荔枝核多酚的大孔树脂。

1.8 大孔树脂的动态吸附 称取荔枝核提取浓缩液,用纯化水稀释至固形物 $\leq 5\%$,得稀释液,备用;采用大孔树脂法对荔枝核多酚进行纯化。通过静态吸附试验,将筛选出的树脂湿法装柱进行试验,确定大孔树脂吸附量,考察洗脱溶剂、洗脱溶剂用量、洗脱速度等因素对多酚纯度以及收率的影响。

2 结果与分析

2.1 没食子酸标准曲线 以没食子酸浓度($x, \mu\text{g/mL}$)为横坐标,以吸光度(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得标准曲线方程: $y=0.0115x+0.0054(R^2=0.9987)$,标准曲线见图 1。

2.2 大孔树脂的静态吸附和筛选 7 种大孔树脂对荔枝核

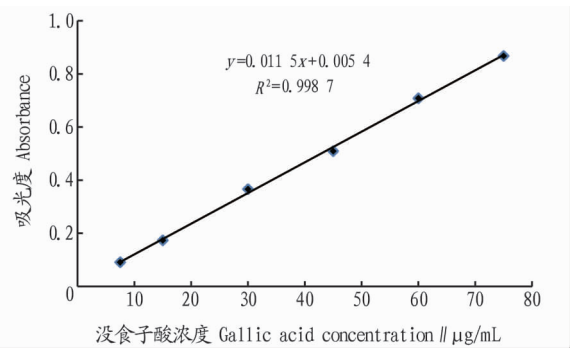


图 1 没食子酸标准曲线

Fig. 1 The standard curve of gallic acid

多酚含量的影响见图 2。由图 2 可以看出,LSA-12、LX-8、DM21、DM28 的荔枝核多酚纯度较高,分别为 73.00%、67.92%、60.69%、65.11%;LSA-12、XDA-8、D101、DM21、DM28 的荔枝核多酚收率较高,分别为 82.35%、88.59%、91.46%、92.55%。综合考虑,选择大孔树脂 LSA-12 进行下一步试验。

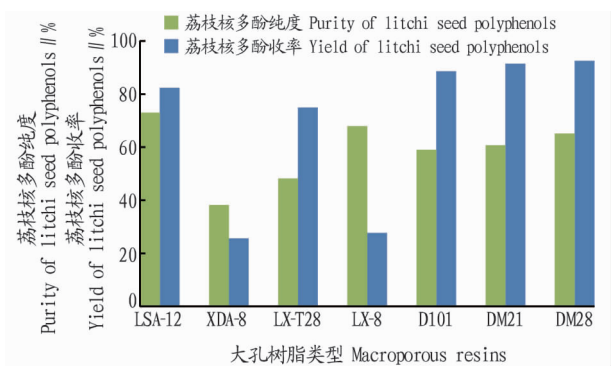


图 2 7 种大孔树脂对荔枝核多酚纯度和收率的影响

Fig. 2 Effects of 7 kinds of macroporous resins on the purity and yield of litchi seed polyphenols

2.3 大孔树脂的动态吸附

2.3.1 大孔树脂吸附量的确定。将大孔树脂 LSA-12 装柱,5% 固形物稀释液过柱,流速 1.0 BV/h,以流出液固形物为衡量指标,确定吸附量。大孔树脂 LSA-12 上柱流出液固形物动态见图 3。由图 3 可知,大孔树脂 LSA-12 流出液固形物均在 0~8.5 h 逐渐增加,8.5~9.5 h 流出液固形物基本保持不变,这是因为大孔树脂对物质的吸附量是有限的,达到其吸附量时,则不再吸附物质,即为其吸附饱和,8.5 h 后树脂的吸附量达到饱和,此时树脂的吸附量为 108.53 g,又大孔树脂装柱体积分别为 500 mL,表明 LSA-12 的吸附量分别为 1:4.61(总固形物:树脂体积=g:mL)。

2.3.2 洗脱溶剂乙醇浓度的确定。在确定吸附量的基础上,分别用浓度 10%、30%、50%、70%、90% 乙醇进行分段洗脱,洗脱速度 1.0 BV/h,每段洗脱溶剂用量 0.75 BV,收集洗脱液,以不同乙醇浓度洗脱液多酚累积百分比为衡量指标,确定洗脱溶剂乙醇浓度。不同乙醇浓度对大孔树脂 LSA-12 洗脱液多酚收率累积百分比见图 4。由图 4 可知,70% 乙醇能洗脱 LSA-12 大孔树脂吸附累计多酚收率的 96.69%,故该试验选择 70% 乙醇为最佳洗脱溶剂。

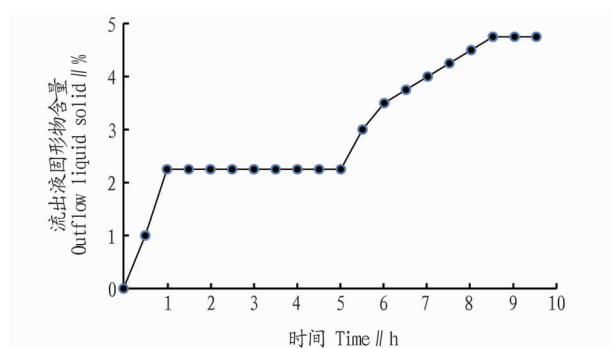


图3 大孔树脂 LSA-12 上柱流出液固形物的动态曲线

Fig.3 Dynamic curve of solids discharged from the column of macroporous resin LSA-12

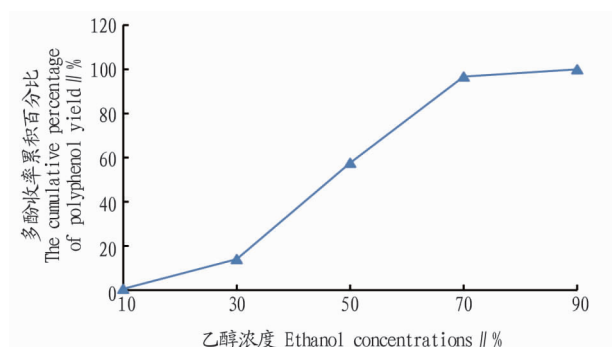


图4 不同乙醇浓度对大孔树脂 LSA-12 多酚收率累积百分比的影响

Fig.4 Effect of different ethanol concentrations on the cumulative percentage of polyphenol yield from macroporous resin LSA-12

2.3.3 洗脱溶剂用量的确定。在确定洗脱乙醇浓度的基础上,采用 3.0 BV 洗脱溶剂进行分段洗脱,每 0.5 BV 体积收集 1 次,以洗脱液中的多酚收率累积百分比为衡量指标,确定洗脱溶剂用量。不同洗脱溶剂用量对大孔树脂 LSA-12 洗脱液多酚收率累积百分比的影响见图 5。由图 5 可知,随着洗脱溶剂的增加,多酚收率累积百分比呈现上升趋势,洗脱溶剂为 0.5~1.5 BV 时,多酚收率累积百分比的上升趋势急剧加快,在洗脱溶剂为 1.5 BV 时多酚收率累积百分比已达到 99.41%。这是因为随着洗脱溶剂的增加,多酚被逐渐洗脱下来,当达到一定量时,多酚基本洗脱完全。在多酚被充分洗脱的前提下,出于经济考虑,应尽量节省洗脱剂的用量,因此,当使用大孔树脂 LSA-12 进行荔枝核多酚纯化时,选择 1.5 BV 为最佳洗脱溶剂用量。

2.3.4 洗脱速度的确定。在前期确定大孔树脂 LSA-12 洗脱乙醇浓度 70%和洗脱溶剂用量 1.5 BV 的基础上,分别以洗脱速度 0.5、1.0、1.5 BV/h 进行洗脱,以洗脱液中的多酚收率为衡量指标,确定洗脱速度。不同洗脱速度对洗脱液多酚收率的影响见图 6。由图 6 可知,随着洗脱速度的增加,多酚收率逐渐降低,但均在 80%以上。在实际应用中,洗脱流速过快,洗脱剂不能与样液充分置换,洗脱不完全,造成浪费,而洗脱流速过慢则耗费工时,生产效率低,成本增加,因此,选择 1.0 BV/h 为最佳洗脱速度。

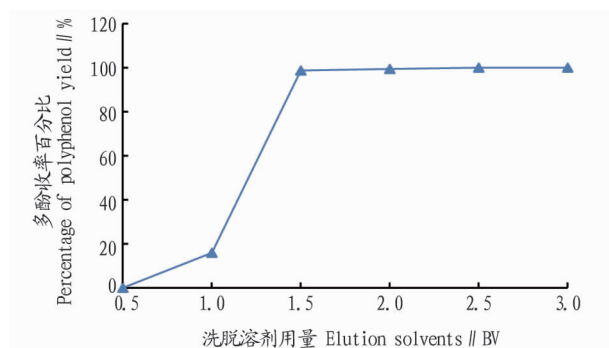


图5 不同洗脱溶剂用量对大孔树脂 LSA-12 多酚收率百分比的影响

Fig.5 Effect of different elution solvents on the cumulative percentage of polyphenol yield from macroporous resin LSA-12

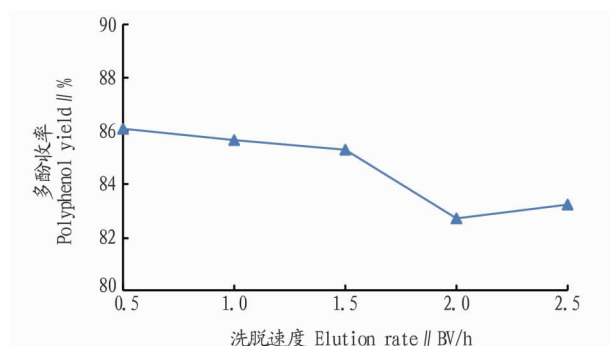


图6 不同洗脱速度对大孔树脂 LSA-12 多酚收率的影响

Fig.6 Effect of different elution rate on polyphenol yield of macroporous resin LSA-12

2.4 验证试验 按照大孔树脂动态吸附试验确定的大孔树脂 LSA-12、洗脱溶剂 70%乙醇、洗脱溶剂 1.5 BV、洗脱速度 1.0 BV/h,进行 3 个平行试验,得荔枝核多酚纯度分别为 70.69%、72.05%、73.19%,平均值为 71.98%,相对标准偏差 RSD 为 1.74%;荔枝核多酚收率分别为 80.08%、81.16%、81.55%,平均值为 80.93%,相对标准偏差 RSD 为 0.94%。结果表明该纯化工艺稳定、可行。

3 结论与讨论

通过大孔树脂的静态试验和动态试验,得到了荔枝核多酚纯化的最优树脂为 LSA-12,最优工艺参数是吸附量 1:4.61(总固形物:树脂体积=1:4.61)、洗脱溶剂 70%乙醇、洗脱溶剂用量 1.5 BV、洗脱速度 1.0 BV/h。在此最优条件下,可以很好的分离纯化荔枝核多酚。

大孔树脂具有生产效率高、成本低且操作简便易行、选择性好、吸附容量大、树脂可再生重复利用等优点,已被广泛用于分离天然产物中的活性物质^[10]。不同极性大孔树脂对酚类物质的分离效果比较已有研究^[11-13],但关于荔枝核多酚分离纯化的工艺研究未见报道。该试验结果表明,LSA-12 大孔树脂是纯化荔枝核多酚的理想吸附树脂,具有纯化效果良好、解吸率高的特点,荔枝核多酚的动态平均多酚纯度为 71.98%,平均多酚收率为 80.93%。该纯化工艺操作简单,大

(下转第 218 页)

基于水解探针法的实时荧光 PCR 原理,通过将具体检测方法中所使用的引物探针序列进行顺序拼接重组而构成的阳性重组质粒能够以几十至数百元的成本,在十几天的周期内就获得任一检测方法所需要的阳性物质。且这种阳性物质具有高度的方法专一性,对于不同检测方法间不会产生污染,并且能够通过序列设计在每种阳性质粒中插入独立标记序列,实现阳性结果的可识别可追溯。此外,通过对特定检测标准方法建立对应的阳性质粒,可以有效帮助标准方法的实施,促进检测工作标准化的进行。

3.2 存在的问题及改进方向 首先,实际工作应用中,应当先进行重组序列的构造设计,每一个阳性序列可以按照上游引物序列、探针序列、下游引物反向互补序列的顺序拼接在一起。当需要设计多个序列时可以直接拼接,还可以对不同重组序列片段进行比较,将序列末端相同的若干基因序列进行压缩碱基拼接,以达到减小片段长度的目的。

其次,在序列合成时,可以根据检测的需求,对于阳性序列的获得采用不同的方式:对于 70 bp 以下可以考虑直接化学合成,对于 70~200 bp 可以考虑通过搭桥 PCR 的方式多次拼接,对于 200 bp 以上的多元阳性重组可以采用全基因合成的方式。但由于 100 bp 以下的 oligoDNA 片段在试验操作中较容易产生气溶胶,对于试验空间、试验条件、试验操作较为有限的实验室会有较大的风险形成阳性气溶胶污染^[9],通过将阳性序列分解为不具备完整扩增产物的片段进行搭桥 PCR 连接能够更好地避免污染。如果出于操作流程和防污染的角度出发,将 5~12 个阳性重组序列进行拼接构建一个长片段进行全基因合成能够更加方便快捷,成本也更低。

第三,在 3 类阳性对照组中,阳性对照的主要功能是确保扩增体系溶液配制正确,溶液中不含抑制扩增反应的成分,重组阳性质粒能完全胜任阳性目标 DNA 对照、PCR 抑制对照组的功能。但是阳性提取对照仅能使用阳性样品或阳性基体标准物质作为阳性对照品。设立阳性提取对照的目的是确保在 DNA 提取过程中保障模板 DNA 提取的质量,确

保被测目标基因序列不因提取方法的不当导致假阴性结果的产生。但一般的实时荧光 PCR 检测方法中都会加入内源基因的检测组,通过内源基因 Ct 值的大小限制确保样品 DNA 模板提取的浓度满足检测需求,这在很大程度上就足以代替阳性提取对照组的功能。

第四,由于引物探针序列重组阳性质粒本身并不是目标扩增的全长片段,通常情况下会略短于全长片段,因此与标准物质相比可能存在影响扩增效率的潜在因素。但出于常规实时荧光 PCR 引物探针设计原则^[10],其扩增片段长度与引物探针区间序列不应影响扩增结果产生较大影响,因此重组序列应当能满足大多数定性检测方法的需求。

第五,对于实时荧光定量 PCR 而言,重组质粒与目标扩增的全长片段在扩增效率上的影响需要更进一步的定量分析,未经验证的重组质粒可能不应直接用于定量检测结果的分析,以避免重组序列构建对定量结果的不确定性影响。

参考文献

- [1] 董莲华,赵正宜,李亮,等.转基因植物标准物质研究进展[J]. 农业生物技术学报,2012,20(2):203-210.
 - [2] 苏长青. 适合转基因抗虫水稻和棉花 PCR 检测标准质粒的构建及试用[D]. 北京:中国农业科学院,2011.
 - [3] MACKAY I M, ARDEN K E, NITSCHKE A. Real-time PCR in virology[J]. Nucleic acids research, 2002, 30(6): 1292-1305.
 - [4] 杨宇,吴元华,郑雅楠. 利用重叠延伸 PCR 技术进行 DNA 的人工合成[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(9): 1810-1811.
 - [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 转基因成分检测 马铃薯检测方法: SN/T 1198-2013[S]. 北京:中国标准出版社, 2013.
 - [6] 欧阳松应,杨冬,欧阳红生,等. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 74-76.
 - [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 转基因产品检测 通用要求和定义: GB/T 19495. 1—2004[S]. 北京:中国标准出版社, 2007.
 - [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 转基因产品检测 实验室技术要求: GB/T 19495. 2—2004[S]. 北京:中国标准出版社, 2007.
 - [9] 彭志领,王建华. RT-PCR 技术常见问题的分析[J]. 河南畜牧兽医, 2002(1): 38.
 - [10] GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression[J]. Methods, 2001, 25(4): 386-401.
- +++++
- (上接第 198 页)
- 孔树脂以及用于洗脱的乙醇溶液可重复利用,既节约了成本,也减少了对环境的污染,可用于工业化生产。
- 参考文献**
- [1] 熊何健,庞杰,林琳. 荔枝核中活性成分的提取及抗氧化活力研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(3): 134-139.
 - [2] 黄玉影,李常青,陈斯泰,等. 荔枝核有效部位群对实验性非酒精性脂肪肝的治疗作用及机制[J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(3): 346-352.
 - [3] 葛如意. 荔枝核抗肿瘤有效成分的筛选及机制初步研究[D]. 广州:广东药学院, 2014.
 - [4] 刘 森,潘志,南征,等. 荔枝核总黄酮对高糖联合肿瘤坏死因子诱导大鼠肾小球系膜细胞纤维粘连蛋白、IV 型胶原蛋白表达的影响[J]. 吉林中医药, 2016, 36(2): 181-183.
 - [5] 黄晓兵,李积华,彭芍丹,等. 五个产地荔枝核中药饮片抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(22): 91-94.
 - [6] 王娟,任冬冬,贾合磊,等. 荔枝核黄酮类化合物对小鼠 I 型单纯疱疹病毒性脑炎的作用及机制[J]. 广东医学, 2017, 38(19): 2934-2939.
 - [7] 徐婷,吴青,高骏伟. 荔枝核提取物及其阳离子树脂分离物体外降血糖作用[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 113-116.
 - [8] 程文辉,张宏,肖柳英. 荔枝核颗粒对治疗乳腺增生病的临床观察[J]. 临床医学工程, 2013, 20(1): 25-26.
 - [9] 叶红梅,钟春燕,吕俊华. 荔枝核皂苷对小鼠学习记忆障碍的改善[J]. 广州医科大学学报, 2015, 43(2): 10-14.
 - [10] 刘春憬. 大孔吸附树脂在中药分离纯化中的研究进展[J]. 农产品加工, 2015(2): 54-57.
 - [11] 李建新,张晓宇. D280 大孔树脂对苹果多酚的动态解吸工艺优化[J]. 北方园艺, 2015(11): 116-118.
 - [12] 季红,贾荣,郭鑫. 大孔树脂对山葡萄籽多酚提取物的纯化工艺优选[J]. 吉林大学学报(医学版), 2017, 43(6): 1272-1277.
 - [13] 王雅,樊明涛,赵萍,等. 大孔树脂对沙枣多酚的动态吸附解析性能研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(12): 215-220.