文章编号:1001-6880(2014)1-0015-05

高速逆流色谱法从斑唇马先蒿中分离两种黄酮类化合物

张 琳[1,2],赵晓辉[1,2*],岳会兰[1]

[1]中国科学院西北高原生物研究所,西宁 810008;[2]中国科学院大学,北京 100049

摘 要:建立了从斑唇马先蒿中分离木犀草素和麦黄酮的高速逆流色谱分离方法,即:采用两相溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(10:12:9:12,v/v/v/v),上相作固定相,下相作流动相,在流速 2 mL·min^{-1},转速 950 rpm,温度 25 ℃下实现了对上述两种化合物的分离。该方法稳定、高效、回收率高,分离出的化合物纯度均大于 99%,可以被用于体内体外活性试验。

关键词:斑唇马先蒿;高速逆流色谱;木犀草素;麦黄酮

中图分类号:R284.1 **文献标识码:**A

Separation and purification of two flavonoids from *Pedicularis longiflora* Rudolph. var. *tubiformis* (Klotz). Tsoong by high-speed counter-current chromatography

ZHANG Lin[1,2],ZHAO Xiao-hui[1,2*],YUE Hui-lan[1]

[1]*Northwest Institute of Plateau Biology,Chinese Academy of Sciences,Xining 810008,China*;

[2]*University of Chinese Academy of Sciences,Beijing 100049,China*

Abstract: Method for separation and purification of luteolin and tricin from *Pedicularis longiflora* Rudolph. var. *tubiformis* (Klotz). Tsoong by high-speed counter-current chromatography was established,i. e.: two-phase solvent system of n-hexane-ethyl acetate-methanol-water (10:12:9:12,v/v/v/v) was employed,the upper phase as stationary phase,the lower phase as mobile phase,at a flow-rate of 2 mL·min^{-1},the rotary speed and temperature were set at 950 rpm and 25 ℃ respectively. These two compounds were separated successfully using this method,which is quick,stable and efficiency,the separated compounds can be used for activity test in vitro and in vivo.

Key words: *Pedicularis longiflora* Rudolph. var. *tubiformis* (Klotz). Tsoong; high-speed counter-current chromatography; luteolin; tricin.

斑唇马先蒿[*Pedicularis longiflora* Rudolph. var. *tubiformis* (Klotz). Tsoong]是玄参科马先蒿属(*Pedicularis*)多年生草本植物。作为一种传统藏药材,其主要分布于我国青海、四川、甘肃等地的高海拔地区[1],具有清热解毒、强筋利水、固精等功效。可全草入药,用于风热症、肉食中毒、高烧神昏谵语、水肿、遗精等症具有较高的药用价值[2]。

黄酮类化合物广泛分布于天然植物体内,多数具有抗氧化作用,可以清除人体内自由基,保护人体脂质、蛋白质、染色体免受活性自由基攻击,防止细胞突变,增强人体免疫力,延缓衰老,同时可防止胆固醇在动脉上的沉积,对心脑血管疾病具有一定的防治作用[3]。木犀草素(Luteolin)和麦黄酮(Tricin)作为其中的两个代表,已经被证实具有抗肿瘤、抗血管内皮细胞损伤、抗炎、免疫调节等生物活性[4-8],因此需要大量的纯品用于体内体外活性试验。

高速逆流色谱(High-speed Countercurrent Chromatography,HSCCC)是一种较新型的无固体支撑的液-液分配色谱,由 Ito 博士最先研制开发[9]。与其它柱色谱相比较主要具有以下几个方面的优点[10-16]:①无需固体做固定相;②不存在固体对样品组分的吸附、玷污、变性、失活、拖尾等现象,能实现很高的回收率;③溶剂极性可调,无需更换不同极性的色谱柱即可实现流动相从弱极性到强极性或相反的转化;④色谱柱无填料,柱内空间全部是有效空间,容积大,样品负载能力强,制备量大,重现性好;⑤可以采用多种洗脱方式,如等比例洗脱、梯度洗

收稿日期:2013-07-29 接受日期:2013-10-12

基金项目:青海省科技厅自然基金项目(2012-Z920Q)

* 通讯作者 E-mail:foolplayer@163.com

脱，或者双向洗脱方式对样品进行有效的分离；⑥ HSCCC 的放大过程不会改变其分离原理，分离过程的可预测性好，可实现线性放大。

本研究建立了稳定、高效的木犀草素（Luteolin）和麦黄酮（Tricin）的 HSCCC 分离方法，并成功地从斑唇马先蒿中分离出了这两种化合物，且分离出的化合物纯度均大于 99%，可以用于活性试验和标准品。

1 实验部分

1.1 仪器

TBE-300B 高速逆流色谱仪（上海同田生物技术有限公司）配以 N2000 色谱工作站（浙江大学智达信息工程有限公司）；Bruker AV-400 型核磁共振仪；依利特 P230 型高效液相色谱仪（大连依利特分析仪器有限公司）配以 SinoChromODS-BP 分析柱（5 μm，4.6×250 mm）。

1.2 材料与试剂

D101 型大孔树脂（天津波鸿树脂科技有限公司生产）；反相 C_{18} 柱（成都科谱生物有限公司）；斑唇马先蒿全草采自青海省大通县，经中国科学院西北高原生物研究所高级工程师梅丽娟鉴定为斑唇马先蒿。

所用用于高速逆流色谱分离及样品制备的有机试剂均为分析纯级，购自天津化学试剂公司；用于 HPLC 分析的甲醇购自山东禹王化学试剂有限公司，为色谱级；实验用水通过 Milli-Qplus 纯水机自制。

1.3 粗样制备

斑唇马先蒿全草阴干后，取 500 g 粉碎，加入 5000 mL 70% 酒精热回流提取 3 次，每次 2 h，提取液减压浓缩得浸膏，然后使浸膏悬浮于适量纯水中，依次用石油醚、乙酸乙酯萃取。剩下水相部分上 D101 大孔树脂柱，依次用水、20% 乙醇、40% 乙醇、60% 乙醇洗脱，收集 40% 乙醇洗脱部分，减压浓缩至干（6 g）。然后上 C_{18} 反相色谱柱，依次用水、10% 乙醇、20% 乙醇、30% 乙醇洗脱，收集 30% 乙醇洗脱液，60 ℃下减压浓缩至干，得到 1.2 g 粗样（BCM-1）用于高速逆流色谱分离。

1.4 分配系数测定

分配系数（K）即目标化合物在固定相和流动相中的分配比例，其具体测定方法为：在事先达到平衡的两相溶剂系统中加入适量样品，充分混合溶解后，静置分层，分别取等体积的上下相溶液，分别在 60 ℃下减压浓缩至干，残留物溶于 2 mL 甲醇中用于 HPLC 检测。K 值即固定相峰面积除以流动相峰面积。

1.5 两相溶剂系统和样品溶液的制备

两相溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水（10∶12∶9∶12，v/v/v/v）最终被用于 HSCCC 分离。两相溶剂系统在使用前配制，其配制方法为：将各溶剂组分按照比例加入 5 L 分液漏斗中，充分混匀，待其完全分层，分别取上下相于广口瓶中，加盖，超声脱气 15 min。然后取 40 mg BCM-1 样品，溶解于 5 mL 两相溶剂中，制成样品溶液，用于 HSCCC 分离。

1.6 HSCCC 分离过程

首先，通过恒流泵往高速逆流色谱的多层盘绕柱里面泵入固定相（上相），调转速至 950 rpm，待其稳定后，以 2.0 mL/min 的流速泵入流动相（下相）。待流动相前沿出现，即达到动力学平衡后，通过进样阀注入 5 mL 样品溶液。紫外检测器设置波长为 254 nm，持续检测洗脱液。分离温度设定为 25 ℃。根据色谱图，手动收集每个色谱峰部分的洗脱液，分别在 55 ℃下减压浓缩至干，然后取适量残留物重新溶解于甲醇中，用于 HPLC 分析，以检测其纯度。HSCCC 分离色谱图如图 2 所示。

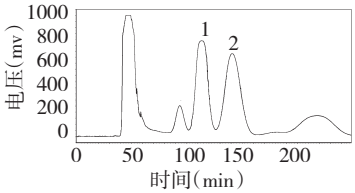

图 2 BCM-1 的 HSCCC 色谱图

Fig. 2 The HSCCC chromatogram of BCM-1

注：两相溶剂系统：正己烷：乙酸乙酯：甲醇：水（10∶12∶9∶12，v/v/v/v）；固定相：上相；流动相：下相；流速 2 mL·min^{-1}；检测波长 254 nm；转速：950 rpm；上样量：40 mg BCM-1 溶解于 5 mL 两相溶液；分离温度：25 ℃。

1.7 HPLC 分析及各峰组分鉴定

HSCCC 分离出的各峰组分通过 HPLC 测定其纯度。HPLC 为依利特 P230 型高效液相色谱仪配以 SinoChromODS-BP 分析柱。采用甲醇-0.1% 磷酸水作为流动相，梯度洗脱，即甲醇：0～40 min，41%～45%。检测温度、流速、波长分别设定为 25 ℃、1 mL·min^{-1} 和 254 nm。HPLC 分析结果见图 3 所示。^{1}H 和 ^{13}C NMR 被用来鉴定各峰组分。

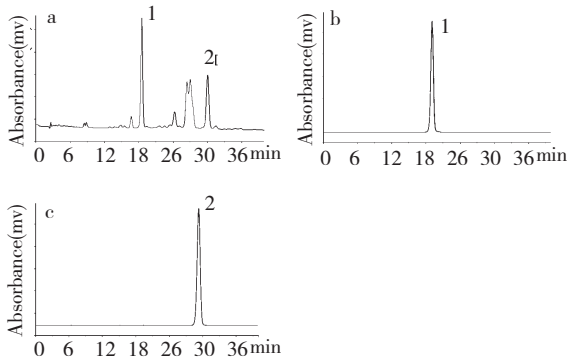

图 3　BCM-1 及目标化合物高效液相色谱分析图

Fig. 3　HPLC chromatograms of BCM-1 and the target compounds

注: a: BCM-1 HPLC 分析图; b: 木犀草素(Luteolin) HPLC 纯度检测图; c. 麦黄酮(Tricin) HPLC 纯度检测图。

2　结果与讨论

2.1　两相溶剂系统及 HSCCC 其它条件的选择

两相溶剂系统对于 HSCCC 分离至关重要,一个合适的溶剂系统通常要满足如下条件[17,18]: (1) 分层时间应小于 30 s; (2) 目标化合物的 K 值应落在适合的范围内(通常是 0.2 ~ 5) ; (3) 目标化合物的分离度 α($\alpha = K_1/K_2, K_1 > K_2$) 应大于 1.5。

根据目标化合物的极性大小及相似相容原理,我们首先尝试了两个经典的溶剂系统: 氯仿-甲醇-水(2∶1∶1,1∶1∶1,v/v/v) 用于分配系数测定,结果显示两个目标化合物的 K 值均在 0.2 ~ 5 之间,然而它们的分离度小于 1.5,不能实现分离。随后,尝试了溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水来进行分离。当采用体积比 2∶5∶2∶5 时,两个目标化合物的分配系数均为 0,而采用体积比 1∶6∶1∶6 时,分配系数均为 ∞。在找到两个极端体系后,筛选这两个体系的"中间地带",最终幸运地找到了溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(10∶12∶9∶12,v/v/v/v) 使目标化合物的 K 值和分离度均满足要求。具体结果如表 1 所示。

在选定了溶剂系统后,我们对其它分离条件进行了考察,以获得较好的分离效果。首先是流速,它对分离过程的影响主要体现在较高的流速往往会导致溶剂系统的固定相保留率降低,分离时间缩短,化合物纯度下降。在本实验中,流速 1.8、2.0 和 2.5 mL/min 分别被应用于分离过程,通过测定化合物纯度、分离时间和固定相保留率来确定最终流速。测定结果列于表 2。当流速为 2.0 mL/min 时,分离过程可以在 4 小时内完成,且目标化合物纯度均达到 99% 以上,可以满足标准品和活性试验的要求,因此最终选择在流速 2.0 mL/min 下进行分离。在选择分离温度时,分别考察了 25、30、35、40 ℃ 下的固定相保留率和化合物纯度,发现温度的改变并未造成分离结果的明显改变。考虑到较高温度影响溶剂系统的稳定性,因此选定在室温(25 ℃) 下进行分离。在进行 HSCCC 分离时,一般而言,转速越高,固定相保留率越高,分离效果越好,然而,过高的转速可能导致溶剂系统产生乳化现象,影响分离效果。基于此,我们选择在 950 rmp 下进行分离,效果良好。

表 1　目标化合物 1 和 2 在不同溶剂系统中的 K 值

Table 1　The K values of the target compounds **1** and **2** in different solvent systems

溶剂系统 Solvent systems	比例 (v/v) Ratio	K 值 K value	
		Ⅰ	Ⅱ
氯仿-甲醇-水 Chloroform-methanol-water	2∶1∶1	0.68	0.78
氯仿-甲醇-水 chloroform-methanol-water	1∶1∶1	2.67	3.18
正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水 n-hexane-ethyl acetate-methanol-water	2∶5∶2∶5	0	0
正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水 n-hexane-ethyl acetate-methanol-water	1∶6∶1∶6	∞	∞
正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水 n-hexane-ethyl acetate-methanol-water	4∶4∶3∶4	0.58	0.84
正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水 n-hexane-ethyl acetate-methanol-water	10∶12∶9∶12	0.60	0.95

表 2　流速对分离时间、固定相保留率和目标化合物纯度的影响

Table 2　Comparison of separation time, stationary phase retention, and purities of target compounds under different flow-rates

流速 Flow-rate (mL · min^{-1})	分离时间 Separation time (min)	保留率 Retention rate (%)	纯度 Purity(%)	
			1	2
1.8	270	69	99.5	99.8
2	240	67	99.5	99.6
2.5	190	64	96.6	97.8

2.2　HSCCC 各峰组分结构鉴定

化合物 1　黄色粉末, ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ = 12.99 (1H, s, 5-OH) , 7.41 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-6′) , 7.40 (1H, s, H-2′) , 6.88 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5′) , 6.68 (1H, s, H-3) , 6.44 (1H, s, H-6) , 6.19 (1H, s, H-8) ; ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 400

MHz) δ = 182.3 (C-4), 165.0 (C-2), 164.6 (C-7), 162.1 (C-5), 158.0 (C-9), 150.5 (C-4′), 146.4 (C-3′), 122.1 (C-1′), 118.6 (C-6′), 116.7 (C-5′), 114.0 (C-2′), 104.3 (C-10), 103.5 (C-3), 99.5 (C-6), 94.5 (C-8)。以上核磁数据与参考文献[19]中报道的木犀草素(Luteolin)的核磁数据基本一致,因此确定该化合物为木犀草素(Luteolin)。

化合物2 黄色粉末,^{1}H NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ = 7.29 (s, 2H, H-2′, H-6′), 6.90 (s, 1H, H-3), 6.47 (s, 1H, H-8), 6.13 (s, 1H, H-6), 3.86 (s, 6H, 3′, 5′-OCH3); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) (= 181.4 (C-2), 163.4 (C-3), 162.0 (C-7), 161.3 (C-5), 157.4 (C-9), 148.3 (C-3′, C-5′), 139.0 (C-4′), 120.2 (C-1′), 104.3 (C-2′, C-6′), 99.3 (C-6), 94.0 (C-8), 56.3 (-OCH3)。以上数据与参考文献[20]中麦黄酮(Tricin)的核磁数据基本一致,因此确定该化合物为麦黄酮(Tricin)。

3 结论

本研究建立了从斑唇马先蒿中分离木犀草素(Luteolin)和麦黄酮(Tricin)的HSCCC方法,即:采用两相溶剂系统正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(10:12:9:12, v/v/v/v),上相作固定相,下相作流动相,在流速2 mL/min,转速950 rpm,温度25 ℃下实现了对上述两种化合物的分离。该方法稳定、高效、回收率高,分离出的化合物可以被用于体内体外活性试验。

参考文献

1 Wu ZY(吴征镒). Flora of Tibet(西藏植物志). Beijing; Science Press, 1983. 374.

2 Ministry of Health of the People's Republic of China Pharmacopoeia Committee. Pharmaceutical standards of the Ministry of Health of the People's Republic of China, Tibetan Traditional Medicine, Vol. 1(中华人民共和国卫生部药品标准,藏药第一册). Beijing; People's Health Publishing House, 1995. 100.

3 Cook NC, Samman S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem*, 1996, 7, 2; 66-67.

4 Richard D, Verschoyle, Peter G, *et al*. Preliminary safety evaluation of the putative cancer chemopreventive agent tricin, a naturally occurring flavone. *Cancer Chemoth Pharm*, 2006, 57, 1: 1-6.

5 Wang HY(王洪燕), Quan K(全康), Jiang YL(蒋燕灵), *et al*. Effect of luteolin and its combination with chemotherapeutic drugs on cytotoxicity of cancer cells. *J Zhejiang Univ, Med Sci*(浙江大学学报,医学版), 2010, 39, 1: 30-36.

6 Zhang FF(张芳芳), Shen HM(沈汉明), Zhu XQ(朱心强). Research progress on anti-tumor effects of luteolin. *J Zhejiang Univ, Med Sci*(浙江大学学报,医学版), 2006, 35: 573-578.

7 He YZ(何煜舟), Ding MP(丁美萍). Effects of luteolin on endothelial cell injury induced by H_2O_2. *Chin J Pathophys*(中国病理生理学杂志), 2007, 23: 1285-1288.

8 Han W(韩炜), Xing Y(刑燕), Kang TG(康廷国). Research progress on the bioactivity of luteolin. *Yunnan J Trad Chin Med Mater Med*(云南中医中药杂志), 2010, 31(4): 60-61.

9 Knight M, Mandava N, Ito Y. Countercurrent chromatography; theory and practice. *Chromatogr Sci Series*, 1988, 44: 583-586.

10 Han X, Zhang T, Wei Y. Separation of salidroside from Rhodiola crenulata by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2002, 971: 237-241.

11 Dai DS(戴德舜), Wang YM(王义明), Luo GA(罗国安). Research progress on high-speed counter-current chromatography. *Chin J of Analyt Chem*(分析化学), 2001, 29: 586-591.

12 Yao S(姚舜), Liu RM(柳仁民), Huang XF(黄雪峰). Methodology research of high-speed counter-current chromatography in separation of natural products. *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2008, 6: 13-19.

13 Hostettmann K, Marston A. Countercurrent chromatography in the preparative separation of plant-derived natural products. *J of Liquid Chromatogr Related Technol*, 2001, 24: 1711-1721.

14 Ye H, Chen L, Li Y. Preparative isolation and purification of three rotenoids and one isoflavone from the seeds of *Millettia pachycarpa Benth* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2008, 1178: 101-107.

15 Ouyang XK, Jin MC, He CH. Preparative separation of four major alkaloids from medicinal plant of *Tripterygium Wilfordii* Hook F using high-speed counter-current chromatography. *Sep Purif Technol*, 2007, 56: 319-324.

16 Hou Z, Luo J, Wang J. Separation of minor coumarins from *Peucedanum praeruptorum* using HSCCC and preparative HPLC guided by HPLC/MS. *Sep Purif Technol*, 2010, 75: 132-137.

17 Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 2005, 1065: 145-168.

(下转第37页)

NMR and MS data were in accordance with those reported in the literature [15], and identified **14** as 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid.

***p*-Hydroxybenzoic acid (15)** $C_7H_6O_3$, white amorphous powder, ESI-MS (negative) *m/z* 137 $[M-H]^-$; ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ: 7.86 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2,6), 6.80 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3,5); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ: 170.8 (1-COOH), 163.6 (C-4), 133.3 (C-2,6), 123.5 (C-1), 116.3 (C-3,5). The NMR and MS data were in accordance with those reported in the literature [16], and identified **15** as *p*-hydroxybenzoic acid.

Vanillin (16) $C_8H_8O_3$, white needle crystal, ESI-MS (negative) *m/z* 151 $[M-H]^-$; ^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ: 9.63 (1H, s, 1-CHO), 7.38 (2H, brs, H-2,6), 6.83 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 3.87 (3H, s, 3-OCH_3); ^{13}C NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ: 190.7 (1-CHO), 151.7 (C-4), 147.2 (C-3), 129.9 (C-1), 127.3 (C-6), 114.4 (C-5), 108.9 (C-2), 56.1 (3-OCH_3). The NMR and MS data were in accordance with those reported in the literature [17], and identified **16** as vanillin.

References

1 Flora of China Editorial Committee. Chinese Academy of Sciences. Flora of China, Beijing: Science Press, 2005. 75: 272-273.

2 Liang YH, Ye M, Han J, *et al*. Lignans and flavonoids from rhizome of *Drynaria fortuner*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2011, 42: 25-30.

3 Mu LH, Zhang DM. Studies on chemical constituents of *Cercis Chinensis*. *China J Chin Mater Med*, 2006, 31: 1795-1797.

4 Liu BL, Zhang T, Zhang XQ, *et al*. Chemical constituents of *Laggera pterodont*. *China J Chin Mater Med*, 2010, 35: 602-606.

5 Song WX, Ji TF, Si YK, *et al*. Studies on chemical constituents in herb from *Artemisia rupestris*. *China J Chin Mater Med*, 2006, 31: 1790-1792.

6 Wu ZY, Li RT. Chemical constituents from the roots of *Rhododendron spiciferum*. *Nat Prod Res Dev*, 2011, 23: 253-257.

7 Liang WJ, Ma QY, Jiang HZ, *et al*. Chemical constituents from hulls of *Nephelium lappaceum*. *China J Chin Mater Med*, 2011, 42: 1271-1275.

8 Zhang HY, Wei XY, Huang L. Study on four phenolic acids in Kouyanqing Liquid extraction. *Modern Chin Med*, 2012, 14: 20-32.

9 Li J, Yu DQ. Chemical constituents from herbs of *Erigeron breviscapus*. *China J Chin Mater Med*, 2011, 36: 1458-1462.

10 Li LY, Seeram NP. Maple syrup phytochemicals include lignans, coumarins, a stilbene, and other previously unreported antioxidant phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 11673-11679.

11 Lee TH, Kuo YC, Wang GJ, *et al*. Five new phenolics from the roots of *Ficus beecheyane*. *J Nat Prod*, 2002, 65: 1497-1500

12 Qin LH, Guo XY, Fan M, *et al*. Anti-anoxic constituents from *Mesona chinensis* Benth. *J Shenyang Pharm Univer*, 2006, 23: 633-636.

13 Qu XY, Gu QQ, Cui CB, *et al*. Structural identification and antitumor activity of secondary metabolites of marine-derived actinomycete. *China J Mar Drugs*, 2004, 23: 1-4.

14 Qiu YK, Dou DQ, Pei YP, *et al*. Chemical constituents of *Opuntia dillenii*. *J China Pharm Univer*, 2005, 36: 213-215.

15 Duan YH, Dai Y, Gao H, *et al*. Studies on chemical constituents of *Sarcandra glabra*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2010, 41: 29-32.

16 Chen YS, Lin XY, Zhong LJ, *et al*. Chemical constituents of *Vitex trifolia* L.. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23: 1011-1013, 1048.

17 Fu CH, Zhang YM, Tang NH, *et al*. Chemical constituents of *Keteleeria evelyniana*. *Nat Prod Res Dev*, 2008, 20: 257-261, 277.

(上接第 18 页)

18 Oka F, Oka H, Ito Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*. 1991, 538: 99-108.

19 Kim JH, Cho YH, Park SM. Antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of *Zostera marina* L.. *Arch Pharmac Resear*, 2004, 27: 177-183.

20 Xu DH, Li BJ, Liu Y, *et al*. Identification of rice (*Oryza sativa* L) signal factors capable of inducing Agrobacterium vir gene expression. *Sci Chin* (中国科学), 1996, 39: 8-16.