

牛蒡子中牛蒡子苷元的分离及结构表征

周渭渭^{1,2}, 刘振国³, 单 淇¹, 张新鑫¹, 周 鸿³, 辛 宁², 侯文彬^{1*}

1 天津药物研究院, 天津市中药质量控制技术工程实验室, 天津 300193;

2 广西中医学院, 广西 南宁 530001;

3 天津药物研究院药业有限责任公司, 天津 300193

摘 要 目的: 从牛蒡子中分离纯化出有效成分, 并对其分子结构进行鉴定与表征。方法: 采用醇提酸解法提取, 分离出粗品, 经过对粗品进行脱脂、结晶处理, 得到无色棱状晶体。采用紫外光谱 (UV)、红外光谱 (FTIR)、质谱 (MS)、氢谱 (¹H-NMR)、碳谱 (¹³C-NMR) 及单晶衍射对该有效成分进行组成和分子结构的鉴定与表征。结果: 从牛蒡子粗粉中经提取分离, 得到结晶, 提取率为 4.46%, 显色反应及波谱分析均显示为木脂素类化合物。结论: 该有效成分鉴定为牛蒡子苷元, 即 (3R,4R)-4-[(3,4-二甲氧基苯基) 甲基] 二氢-3-[(4-羟基-3-甲氧基苯基) 甲基]-2 (3H)-呋喃酮, 分子式为 C₂₁H₂₄O₆。

关键词 牛蒡子; 牛蒡子苷元; 分离; 结构表征

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 04-0279-05

Separation and structural characterization of arctigenin in *Arctii Fructus*

ZHOU Wei-wei^{1,2}, LIU Zhen-guo³, SHAN Qi¹, ZHANG Xin-xin¹, ZHOU Hong³, XIN Ning², HOU Wen-bin¹

1 Tianjin Engineering Laboratory of Quality Control Techniques for TCM, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin, 300193, China;

2 Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Guangxi 530001, China;

3 Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Pharmaceutical Responsible Co.Ltd, Tianjin, 300193, China

Abstract Objective: To isolate and purify active component from *Arctii Fructus* and identify and characterize. **Methods:** The crude product was separated from *Arctii Fructus* by alcohol extraction and acid hydrolysis. Using recrystallization its structure was method, colorless prismatic crystal was obtained. The composition and molecular structure were characterized by UV, FTIR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and X-ray analyses. **Results:** The extracting rate of the crystal gained from the powder of *Arctii Fructus* was 4.46%. Both color reactions and spectral analyses indicated that the compound was lignan. **Conclusion:** The active component is characterized as (3R, 4R)-4-[(3,4-dimethoxyphenyl) methyl] dihydro-3-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) methyl]-2(3H)-furanone (arctigenin, ARC-G) and the molecular formula is C₂₁H₂₄O₆.

Key words *Arctii Fructus*; arctigenin; separation; structural characterization

牛蒡子为牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实, 是著名的传统中药^[1]。全世界共有 10 种, 我国有 2 种。始载于《本草图经》^[2]。功能宣散风热、消肿利咽, 用于治疗风热感冒、咽喉肿痛、斑疹不透、痈肿疮毒等症。现代药理学证明牛蒡子还具有抗菌、抗肿瘤、降血糖等功效^[3-4]。值得注意的是, 牛蒡子在各药理研究中起作用的主要成分是牛蒡子苷元。牛蒡子苷在进行动物体内试验 (尤其是经口

给药) 时表现出活性, 主要是由于牛蒡子苷在消化道中, 在肠菌的作用下转变为苷元的脱甲基化物, 此脱甲基化物在肝脏中的儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 的作用下恢复为苷元, 苷元被血液输送到各个器官而发挥作用。所以, 可以认为牛蒡子苷元是牛蒡子中的直接有效成分, 而牛蒡子苷是前体物质^[5-7]。

本实验采用醇提酸解法, 提取分离出粗品, 经

收稿日期: 2010-04-15

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划资助项目 (2007BAI41B06)。

作者简介: 周渭渭 (1984—), 男, 陕西省渭南市人, 硕士研究生, 研究方向: 中药及天然产物的研究。Tel: 13702025637 E-mail: zww984716@126.com

* 通讯作者 侯文彬 (1969—), 男, 研究员, 硕士生导师。Tel: 13802027519 E-mail: houwb@tjipr.com

过脱脂, 然后进行结晶处理, 得到牛蒡子苷元单晶。利用紫外光谱 (UV)、红外光谱 (IR) 推断牛蒡子苷元的母核结构及取代基位置; 利用质谱确定出相对分子质量, 推导出分子式; 对化合物的 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 核磁信号进行了归属; 测定化合物的单晶衍射图谱, 并对其空间结构进行了确定并进行结构验证。

1 实验部分

1.1 仪器及材料

熔点采用上海科学精密仪器有限公司产 SGW XT-4 型显微熔点仪测定, FTIR 光谱采用 Nicolet FT-IR 红外光谱仪测定, KBr 压片; UV 光谱采用日本岛津公司产 UV-3101 型紫外光谱仪测定; $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 谱采用 Bruker-AV400 型超导核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); ESI-MS 谱采用日本岛津公司产 LCMS-2010 型 LC-MS 联用仪测定; 单晶衍射谱由 APEXIICCD area detector 型单晶衍射仪测定。

实验原料为野生牛蒡子, 购于河北安国药市, 由天津药物研究院周福军副研究员鉴定为 *Arctium lappa* L., 实验所用试剂均为分析纯。

1.2 牛蒡子中牛蒡子苷元的提取、分离和纯化

将 5 kg 牛蒡子粗粉用 70% 乙醇溶液回流提取 3 次, 每次 2 h; 提取液加入硫酸调 pH 值至 1~2, 并保持温度 50℃ 下搅拌, 进行酸水解; 将水解液先用石油醚萃取 (脱脂) 3 次, 再用醋酸乙酯萃取 3 次; 醋酸乙酯萃取液用水进行反洗, 蒸干醋酸乙酯层, 甲醇溶解, 以硅藻土拌样; 用石油醚回流提取 3 次, 再用醋酸乙酯回流提取 3 次; 蒸干醋酸乙酯提取液, 得浸膏 0.63 kg; 浸膏以丙酮结晶, 再反复重结晶, 得牛蒡子苷元纯品 223 g, 收率 4.46%。牛蒡子苷元的结构式见图 1。

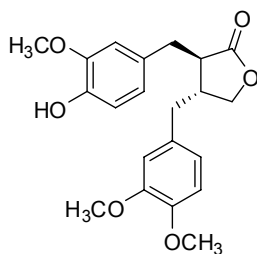


图 1 牛蒡子苷元的结构式
Fig.1 Structure of arctigenin

2 牛蒡子苷元的结构表征

2.1 性状及显色反应

牛蒡子苷元为无色透明棱状结晶, mp 89~91℃。易溶于氯仿、丙酮、甲醇等有机溶剂, 不溶于水。三氯化铁-铁氰化钾反应显阳性 (蓝色), 说明分子内存在酚羟基; Molish 反应呈阴性, 说明分子中不含糖; 碘化铋钾反应呈阴性, 说明分子中不含氮。

2.2 UV 光谱分析

UV λ_{max} (EtOH) nm (log ϵ): 208 (末端吸收), 230 (4.47), 280 (4.08)。UV 谱在 220 和 276 nm 处有吸收, 提示该化合物含有芳环结构。

2.3 IR 光谱分析

IR (KBr) cm^{-1} : 3 432 (OH), 3 000, 2 937, 2 915, 2 838 (芳环), 1 765 (C=O), 1 605, 1 516, 1 464, 1 452 (芳环), 1 156 (内酯), 1 266, 1 238, 1 027 (烷基芳香醚), 813, 735, 701 (芳环)。3 432 cm^{-1} 峰形强而宽大, 表明羟基存在着分子内或分子间的氢键缔合; 1 765 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$) 处强峰为分子中羰基的特征吸收峰, 由于木脂素母核中存在的内酯环, 氧原子有强的吸电子诱导效应, 使羰基氧上的电子云转向双键中间, 增加了 C=O 键的电子云密度, 导致 C=O 双键性增强, 因而与羰基的特征峰 (1 705~1 725 cm^{-1}) 相比, 向高波数方向移动了约 40 cm^{-1} ; 1 605、1 516、1 464、1 452 cm^{-1} (芳环骨架 C=C) 处出现了 4 个强弱不等的吸收峰, 为共轭芳环体系存在的重要标志; 3 000、2 937、2 915、2 838 cm^{-1} 为苯环的 ($\gamma\text{C-H}$) 伸缩振动峰; 813、735 cm^{-1} ($\gamma\text{C-H}$, 面外弯曲振动) 处出现较强峰及 701 cm^{-1} ($\gamma\text{C=C}$ 面外弯曲振动) 处出现弱峰, 表明分子结构中含有三取代苯环。1 266、1 238、1 027 cm^{-1} 为烷基芳香醚的特征峰。

2.4 质谱分析

EI-MS m/z : 在 ESI 负离子模式下, 化合物形成准分子离子峰 $[\text{M-H}]$ 为 m/z 371.07, 牛蒡子苷元的分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$, 计算值为 372.4, 二者基本一致。

2.5 $^{13}\text{C-NMR}$ 解析及 $^1\text{H-NMR}$ 解析

$^{13}\text{C-NMR}$ 谱显示含有 21 个碳原子, 在 δ 110~149 出现 12 个苯环的碳信号, 在碳谱中 δ 178.9、71.48、46.75、41.13, 这些碳信号说明该化合物存在五元内酯环结构。结合 2 个苯基中的亚甲基信号, 34.70 和 38.33 说明该化合物存在二苄基丁内酯型木脂素基本骨架的信号。该化合物的氢谱在 δ 3.78 出现 3 个甲氧基信号, 说明分子中含有 3 个和苯环相连的甲氧基。与牛蒡子苷元的光谱数据对照^[8], 二者完全一致, 数据见表 1。

表1 化合物的 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR数据(^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -MNR 100 MHz; 溶剂 CDCl_3)Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compounds (^1H -NMR 400 MHz, ^{13}C -MNR 100 MHz; CDCl_3)

序号	^1H 及J	序号	^{13}C	序号	^{13}C
2	6.63(d,2)	1	130.69	3'	149.23
5	6.81(d,7.6)	2	112.04	4'	148.03
6	6.60(dd,8,1.6)	3	146.90	5'	111.79
7	2.88, 2.88(m)	4	144.76	6'	120.79
8	2.57(m)	5	114.36	7'	38.33
2'	6.46(d,2)	6	122.26	8'	41.13
5'	6.74(d,8)	7	34.70	9'	71.48
6'	6.54(dd,8,2)	8	46.75	OCH_3	56.08
7'	2.57, 2.57(m)	9	178.94	OCH_3	56.03
8'	2.57(m)	1'	129.69	OCH_3	55.99
9'	3.85, 4.10 (dd)	2'	111.54		

2.6 单晶衍射图谱

2.6.1 晶体结构测定

选取尺寸为 $0.30\text{ mm} \times 0.26\text{ mm} \times 0.16\text{ mm}$ 的单晶, 用 APEXII CCD area detector 型单晶衍射仪进行检测。测量方法为 φ 扫描, 用 $A=0.071\ 073\text{ nm}$ 的石墨单色化的 MoKa 射线辐射, 在 $113\ (2)\text{ K}$ 温度下, 在 $\theta=2.04^\circ \sim 27.88^\circ$, $-12 \leq h \leq 12$, $-13 \leq k \leq 11$, $-26 \leq L \leq 23$ 。在 $\theta=2.04^\circ \sim 27.88^\circ$, 扫描范围内共收集到 16 214 个衍射点, 其中独立衍射点 2 595 个, 选择 $I > 2\sigma$ 的 2 286 个衍射点, 数据经吸收校正后 $R_{\text{int}}=0.044\ 2$, 这些衍射点用于结构测定和修正。氢原子采用各向同性热参数, 其它原子均采用各向异性热参数修正。

分析结果表明, 晶体属斜方晶系, 空间群: $P2_1(1)2(1)2(1)$, 晶胞参数: $a=0.949\ 08\ (19)\text{ nm}$; $b=0.100\ 71\ (2)\text{ nm}$; $c=0.199\ 37\ (4)\text{ nm}$; $V=1.905\ 7\ (7)\text{ nm}^3$; 晶胞内所含分子数 $Z=4$; 密度计算值 $D_c=1.298\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, 吸收系数 $\mu=0.095\text{ mm}^{-1}$ 。最终收敛偏差因子 $R_1=0.040\ 3$, $wR_2=0.085\ 1$, 拟合优度 $s=1.048$, 最终差值 Fourier 图上最高峰值为: $\Delta\rho_{\text{max}}=0.246 \times 10^3\text{ e}/\text{nm}^3$, 最高峰值为 $\Delta\rho_{\text{min}}=-0.270 \times 10\text{ e}/\text{nm}^3$, $W=1/[\sigma^2(F_o^2)+(0.054\ 4P)^2+0.000\ 0P]$, 其中 $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$ 。用 SHEIXS97 (sheldrick, 1990) 和 SHELXL97 (sheldrick, 1997) 程序完成晶体结构的解析和结构修正。

2.6.2 结构分析

牛蒡子苷元单晶的分子结构图见图 2, 键长和键角数据列于表 2, 氢键的键长和键角列于表 3, 晶

胞三维堆积图见图 3。

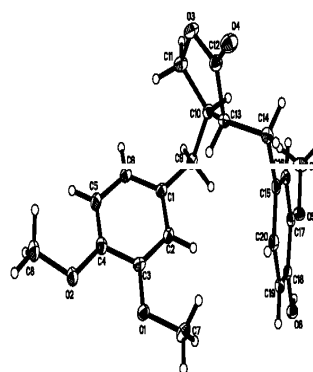


图2 牛蒡子苷元的X射线单晶衍射图

Fig.2 Single-crystal X-ray diffraction analysis of arctigenin

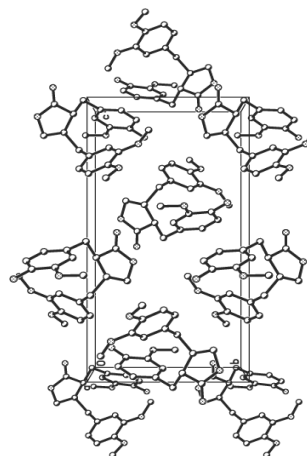


图3 牛蒡子苷元的晶胞三维堆积图

Fig.3 Three-dimensional packing diagram of arctigenin

表 2 牛蒡子苷元的键长

Table 2 Bond distances for arctigenin

键	L/nm	键	L/nm	键	L/nm
O(1)-C(3)	1.371(2)	C(5)-C(6)	1.398(3)	C(13)-C(14)	1.536(2)
O(1)-C(7)	1.431(2)	C(5)-H(5)	0.950 0	C(13)-H(13)	1.000 0
O(2)-C(4)	1.369(2)	C(6)-H(6A)	0.950 0	C(14)-C(15)	1.506(3)
O(2)-C(8)	1.427(2)	C(7)-H(7A)	0.980 0	C(14)-H(14A)	0.990 0
O(3)-C(12)	1.357(2)	C(7)-H(7B)	0.980 0	C(14)-H(14B)	0.990 0
O(3)-C(11)	1.458(2)	C(7)-H(7C)	0.980 0	C(15)-C(20)	1.388(3)
O(4)-C(12)	1.205(2)	C(8)-H(8A)	0.980 0	C(15)-C(16)	1.401(2)
O(5)-C(17)	1.372(2)	C(8)-H(8B)	0.980 0	C(16)-C(17)	1.381(3)
O(5)-C(21)	1.422(2)	C(8)-H(8C)	0.980 0	C(16)-H(16)	0.950 0
O(6)-C(18)	1.366(2)	C(9)-C(10)	1.547(2)	C(17)-C(18)	1.397(3)
O(6)-H(6)	0.89(2)	C(9)-H(9A)	0.990 0	C(18)-C(19)	1.385(2)
C(1)-C(6)	1.387(2)	C(9)-H(9B)	0.990 0	C(19)-C(20)	1.400(3)
C(1)-C(2)	1.402(3)	C(10)-C(11)	1.527(3)	C(19)-H(19)	0.950 0
C(1)-C(9)	1.510(3)	C(10)-C(13)	1.541(2)	C(20)-H(20)	0.950 0
C(2)-C(3)	1.386(3)	C(10)-H(10)	1.000 0	C(21)-H(21A)	0.980 0
C(2)-H(2)	0.950 0	C(11)-H(11A)	0.990 0	C(21)-H(21B)	0.980 0
C(3)-C(4)	1.404(3)	C(11)-H(11B)	0.990 0	C(21)-H(21C)	0.980 0
C(4)-C(5)	1.377(3)	C(12)-C(13)	1.507(3)		

表 3 牛蒡子苷元的键角

Table 3 Bond angles for arctigenin

键	$\theta/ (^{\circ})$	键	$\theta/ (^{\circ})$	键	$\theta/ (^{\circ})$
C(3)-O(1)-C(7)	116.93(15)	H(8A)-C(8)-H(8B)	109.5	C(15)-C(14)-C(13)	112.63(13)
C(4)-O(2)-C(8)	116.38(17)	O(2)-C(8)-H(8C)	109.5	C(15)-C(14)-H(14A)	109.1
C(12)-O(3)-C(11)	109.98(15)	H(8A)-C(8)-H(8C)	109.5	C(13)-C(14)-H(14A)	109.1
C(17)-O(5)-C(21)	116.78(15)	H(8B)-C(8)-H(8C)	109.5	C(15)-C(14)-H(14B)	109.1
C(18)-O(6)-H(6)	111.6(17)	C(1)-C(9)-C(10)	114.84(14)	C(13)-C(14)-H(14B)	109.1
C(6)-C(1)-C(2)	117.92(18)	C(1)-C(9)-H(9A)	108.6	H(14A)-C(14)-H(14B)	107.8
C(6)-C(1)-C(9)	122.30(18)	C(10)-C(9)-H(9A)	108.6	C(20)-C(15)-C(16)	118.61(17)
C(2)-C(1)-C(9)	119.76(16)	C(1)-C(9)-H(9B)	108.6	C(20)-C(15)-C(14)	122.18(17)
C(3)-C(2)-C(1)	121.15(17)	C(10)-C(9)-H(9B)	108.6	C(16)-C(15)-C(14)	119.19(17)
C(3)-C(2)-H(2)	119.4	H(9A)-C(9)-H(9B)	107.5	C(17)-C(16)-C(15)	120.55(18)
C(1)-C(2)-H(2)	119.4	C(11)-C(10)-C(13)	102.80(15)	C(17)-C(16)-H(16)	119.7
O(1)-C(3)-C(2)	125.05(16)	C(11)-C(10)-C(9)	113.17(14)	C(15)-C(16)-H(16)	119.7
O(1)-C(3)-C(4)	114.97(17)	C(13)-C(10)-C(9)	116.55(16)	O(5)-C(17)-C(16)	125.04(18)
C(2)-C(3)-C(4)	119.97(18)	C(11)-C(10)-H(10)	108	O(5)-C(17)-C(18)	114.47(16)
O(2)-C(4)-C(5)	125.10(17)	C(13)-C(10)-H(10)	108	C(16)-C(17)-C(18)	120.49(17)
O(2)-C(4)-C(3)	115.53(18)	C(9)-C(10)-H(10)	108	O(6)-C(18)-C(19)	118.98(18)
C(5)-C(4)-C(3)	119.36(18)	O(3)-C(11)-C(10)	106.54(14)	O(6)-C(18)-C(17)	121.50(17)
C(4)-C(5)-C(6)	120.18(18)	O(3)-C(11)-H(11A)	110.4	C(19)-C(18)-C(17)	119.50(17)
C(4)-C(5)-H(5)	119.9	C(10)-C(11)-H(11A)	110.4	C(18)-C(19)-C(20)	119.78(18)

(续表3)

键	$\theta / (^{\circ})$	键	$\theta / (^{\circ})$	键	$\theta / (^{\circ})$
C(6)-C(5)-H(5)	119.9	O(3)-C(11)-H(11B)	110.4	C(18)-C(19)-H(19)	120.1
C(1)-C(6)-C(5)	121.38(19)	C(10)-C(11)-H(11B)	110.4	C(20)-C(19)-H(19)	120.1
C(1)-C(6)-H(6A)	119.3	H(11A)-C(11)-H(11B)	108.6	C(15)-C(20)-C(19)	120.99(17)
C(5)-C(6)-H(6A)	119.3	O(4)-C(12)-O(3)	120.98(19)	C(15)-C(20)-H(20)	119.5
O(1)-C(7)-H(7A)	109.5	O(4)-C(12)-C(13)	127.98(19)	C(19)-C(20)-H(20)	119.5
O(1)-C(7)-H(7B)	109.5	O(3)-C(12)-C(13)	111.04(15)	O(5)-C(21)-H(21A)	109.5
H(7A)-C(7)-H(7B)	109.5	C(12)-C(13)-C(14)	110.17(14)	O(5)-C(21)-H(21B)	109.5
O(1)-C(7)-H(7C)	109.5	C(12)-C(13)-C(10)	103.86(15)	H(21A)-C(21)-H(21B)	109.5
H(7A)-C(7)-H(7C)	109.5	C(14)-C(13)-C(10)	116.43(15)	O(5)-C(21)-H(21C)	109.5
H(7B)-C(7)-H(7C)	109.5	C(12)-C(13)-H(13)	108.7	H(21A)-C(21)-H(21C)	109.5
O(2)-C(8)-H(8A)	109.5	C(14)-C(13)-H(13)	108.7	H(21B)-C(21)-H(21C)	109.5
O(2)-C(8)-H(8B)	109.5	C(10)-C(13)-H(13)	108.7		

表4 牛蒡子苷元中的氢键键长和键角

Table 4 Hydrogen bond distances and angles for arctigenin

D-H...A	$d(D-H)/nm$	$d(H...A)/nm$	$d(D...A)/nm$	$\angle(DHA)/(^{\circ})$
O(6)-H(6)...O(1)#1	0.89(2)	2.04(2)	2.830 1(19)	148(2)
O(6)-H(6)...O(5)	0.89(2)	2.25(3)	2.681(2)	109.7(18)
O(6)-H(6)...O(2)#1	0.89(2)	2.58(2)	3.243 3(19)	132.2(17)

3 讨论

3.1 本实验旨在克服现有技术使用易燃易爆的麻醉剂乙醚,有害的重金属铅盐的不足^[9],同时又考虑到经济成本方面,因而没有选择采用蜗牛酶对牛蒡子苷粗品进行酶解^[10],而是采用了最简单且方便的方法——酸解,利用硫酸对牛蒡子乙醇提取液调酸后,进行酸水解,从而实现制备抗病毒与抗肿瘤天然药物牛蒡子苷元。

3.2 本实验的实用性在于,酸水解反应将高含量的牛蒡子苷高效率地转化为牛蒡子苷元,大大增加了从单位质量药材中获得牛蒡子苷元的量,此方法获得的纯品牛蒡子苷元得率至少比药材中原有量提高了20倍。

3.3 单晶结构分析不是“万能的”确定分子结构的手段,尤其是对于天然物等结构比较复杂、主要由C、H、N和O等轻原子所组成的有机分子。本试验通过紫外、红外、质谱和核磁等手段来确定分子可靠结构,然后通过单晶结构分析进行了空间结构验证。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 第二卷, 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [3] 王 璐, 赵 烽, 刘 珂. 牛蒡子苷及牛蒡子苷元的药理作用研究进展[J]. 中草药, 2008, 39 (3): 467-470.
- [4] 徐朝晖, 李 婷, 邓 毅, 等. 牛蒡子提取物的降血糖作用[J]. 中草药, 2005, 36 (7): 1043-1045.
- [5] Nose M, Fujimoto T, Takeda T, *et al.* Structural transformation of lignan compounds in rat gastrointestinal tract [J]. *Planta Med*, 1992, 58: 520-523.
- [6] Nose M, Fujimoto T, Nishibe S, *et al.* Structural transformation of lignan compounds in rat gastrointestinal tract II Serum concentration of lignans and their metabolites [J]. *Planta Med*, 1993, 59: 131-134.
- [7] 刘德茂, 史德胜. HPLC 法测定降糖益肾片中牛蒡苷[J]. 现代药物与临床, 2009, 24 (3): 171-172.
- [8] Kaoru U, Ariko S, Massanori K, *et al.* Studies on differentiation-inducers from *Arctium Fructus* (1) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41 (10): 1774-1779.
- [9] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1987.
- [10] 胡英杰, 樊蕴华, 肖敏勋. 蜗牛酶水解牛蒡子苷制备苷元的研究[J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21 (6): 473-476.