

参考文献:

- [1] Kalia Y N, Naik A, Garrison J, *et al.* Iontophoretic drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 619-658
- [2] Prausnitz M R. Microneedles for transdermal drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 581-587
- [3] Mitragotri S, Kost J. Low-frequency sonophoresis: a review [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 589-601
- [4] Doukas A G, Kollias N. Transdermal drug delivery with a pressure wave [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 559-579
- [5] 李凡, 郝保华, 李伟泽, 等. 电致孔条件下巴布剂中青藤碱透皮吸收的药动学研究[J]. 中草药, 2008, 29(9): 1096
- [6] 姜建芳, 高建青. 微针在经皮给药及经皮疫苗转运中的应用[J]. 医药导报, 2006, 25(10): 1083

大孔吸附树脂法对固公果根中鞣质的吸附解吸研究

朱珊^{1,2}, 刘岱琳¹, 王淑萍¹, 邱峰², 陈虹¹

(1 中国人民武装警察部队医学院 生药教研室, 天津市职业与环境危害生物标志物重点实验室 天津 300162;

2 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 探讨大孔吸附树脂富集、纯化固公果中总鞣质的工艺条件参数。方法 比较了 8 种大孔吸附树脂的静态吸附量、静态解吸率, 筛选出最佳的吸附树脂。以静态、动态吸附实验相结合, 确定了最佳的吸附分离工艺。采用干酪素法进行鞣质的测定。结果 在考察的 8 种树脂中, HP20 型树脂具有最佳的吸附参数, 并确定了工艺条件。结论 本实验筛选出 HP20 型树脂对固公果根中总鞣质类成分吸附解吸性能较好。

关键词: 固公果根; 鞣质; 大孔吸附树脂; 干酪素法

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)06-0896-05

Adsorption and desorption of total tannins from root of *Rosa odorata* var. *gigantea* by macroporous resin

ZHU Shan^{1,2}, LIU Dai-lin¹, WANG Shu-ping¹, QIU Feng², CHEN Hong¹

(1. Department of Pharmacognosy, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin Key Laboratory of Biomarkers of Occupational and Environmental Hazard, Tianjin 300162, China; 2. School of Chinese

Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To study the technological parameters in the purification process of total tannins from the root of *Rosa odorata* var. *gigantea* by macroporous resin. **Methods** Using adsorptive quantity as the guideline, the adsorptive capabilities and static desorption ratio of eight kinds of resins were compared, and the optimum macroporous resins were selected. The influence factors of total tannins purification from the root of *R. odorata* var. *gigantea* with the optimum macroporous resin were tested and screened by the adsorption and desorption ratio of total tannins. The content of tannins was determined by casein method. **Results** The HP20 type macroporous resin had the optimum adsorption and desorption parameters, and the optimum purification conditions were determined. **Conclusion** The HP20 type macroporous resin shows better comprehensive property and could be used to isolate and purify the total tannins from the root of *R. odorata* var. *gigantea*.

Key words: the root of *Rosa odorata* Sweet var. *gigantea* (Coll. et Hemsl.) Rehd. et Wils.; tannins; macroporous adsorption resin; casein method

固公果根是彝族民间用药, 为蔷薇科植物固公果 *Rosa odorata* Sweet var. *gigantea* (Coll. et

Hemsl.) Rehd. et Wils. 的根入药。固公果根性平、味酸, 具有涩肠止泻的功效, 常用于治疗腹泻、菌

①收稿日期: 2010-01-08

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(10JCYBJC14600); 武警医学院博士启动金项目(WBS200804)

作者简介: 朱珊(1983—), 女(满族), 辽宁兴城人, 沈阳药科大学硕士在读, 研究方向为天然药物化学。

* 通讯作者 刘岱琳 Tel: (022) 60578194 E-mail: dailinlch@163.com

痢等疾病^[1]。固公果根中富含大量的鞣质类成分^[2]。研究表明鞣质类成分对胃肠道蠕动具有抑制作用,阻碍胃内容物向肠道移行^[3~5],达到收敛止泻的药理作用,是固公果根治疗腹泻、菌痢的活性成分。固公果根的药用加工工艺一般采用水提浓缩入药^[2],此加工工艺获得的鞣质有效成分相对较低,且产品质量不稳定。固公果根中的鞣质类成分具有较好的水溶性和一定的极性,因此采用大孔吸附树脂法分离纯化具有可行性。树脂纯化中药中有效成分的报道较多^[6,7]。本实验考察了多种树脂对固公果根中总鞣质的吸附情况,确定最优树脂,并系统研究其对固公果根中总鞣质的吸附和洗脱条件,旨在优化固公果根中总鞣质的提取纯化工艺,为进一步综合利用固公果根提供参考。实验中鞣质的含量测定方法采用《中国药典》2005年版一部附录XB所采用的方法,即以磷钼钨酸为显色剂,没食子酸为对照品,以干酪素为吸附剂的鞣质量测定法(以下简称干酪素法)。

1 仪器与材料

1.1 仪器:岛津1601分光光度计;HZQ-QX型电动振荡机(东联电子技术开发有限公司)。

1.2 标准品与试剂:没食子酸对照品(质量分数为98%,由天津尖峰天然产物研究开发有限公司提供);干酪素(化学纯,北京奥博星生物技术有限公司);碳酸钠、钨酸钠、钼酸钠、硫酸锂均为分析纯)。

磷钼钨酸试剂的配制:取钨酸钠100 g,钼酸钠25 g,加水700 mL使溶解,加盐酸100 mL,磷酸50 mL,加热回流10 h,放冷,再加硫酸锂150 g,水50 mL和溴0.2 mL,煮沸除去残留的溴(约15 min),冷却,加水稀释至1 000 mL,滤过,即得。

1.3 药材:购自云南曲靖,经沈阳药科大学中药学院孙启时教授鉴定为蔷薇科蔷薇属植物固公果根 *R. odorata* Sweet var. *gigantea* (Coll. et Hemsl.) Rehd. et Wils.。

1.4 树脂:YWD06B、YWD03F₁、YWD02D和YWD04B₁购自沧州远威化工有限公司;AB-8购自沧州宝恩化工有限公司;D101购自天津农药厂;ADS-8购自天津南开大学树脂厂;HP20购自日本三菱化学株式会社。

2 方法与结果

2.1 干酪素法测定鞣质

2.1.1 对照品溶液的配制:精密称取没食子酸对照品0.050 g,置于100 mL棕色量瓶中,加水溶解,定容,混匀后,精密吸取5.0 mL置于100 mL棕色量瓶中,定

容,混匀,备用(每毫升含没食子酸0.025 mg)。

2.1.2 标准曲线的绘制:精密量取对照品溶液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL分别置于25 mL棕色量瓶中,各加入磷钼钨酸试液1 mL,再分别加入水11.5、11、10、9、8、7 mL,用29%碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,放置30 min,以相应试剂为空白,按照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2005年版二部附录IVA),在760 nm的波长处测定吸光度。以质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程 $Y = 4.0662X - 0.0434$ ($r = 0.9997$)。

2.1.3 总酚的测定:取粗提液1.0 mL,稀释400倍后,精密量取2.0 mL置于25 mL棕色量瓶中,照标准曲线的绘制项下的方法,自“加入磷钼钨酸试液1 mL”起,再分别加入水10 mL,依法测定吸光度,代入线性回归方程,计算,即得。

2.1.4 不被吸附的多酚的测定:精密量取供试品溶液25 mL,加至已盛有干酪素0.6 g的100 mL具塞锥形瓶中,密塞,置于30℃水浴中保温1 h,时时振摇,取出,放冷,摇匀,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液2.0 mL,置于25 mL棕色量瓶中,照标准曲线的绘制项下的方法,自“加入磷钼钨酸试液1 mL”起,再分别加入水10 mL,依法测定吸光度,代入线性回归方程,计算,即得。

2.1.5 鞣质的测定:按下式计算鞣质的质量:鞣质质量 = 总酚质量 - 不被吸附的多酚质量。

2.2 固公果根药材粗提液的制备:称取固公果根500 g,用6倍量60%乙醇水溶液回流提取2 h,提取两次,合并提取液。减压浓缩至无醇后将提取液用水分散并定容至1 000 mL,即质量浓度为1:2 (g/mL),作为固公果根粗提液,备用(鞣质的质量浓度为11.4 mg/mL)。

2.3 树脂的预处理:取不同型号的大孔吸附树脂,用水充分浸泡后装于开放柱中,用95%食用乙醇洗至加水不混浊,然后用蒸馏水洗至无醇,将流动相置换成5% NaOH水溶液,至流出液碱性,浸泡5 h。水洗脱至中性,再用将流动相置换成5% HCl水溶液至流出液酸性,浸泡5 h,水洗脱至中性。滤纸吸干预处理后备用。

2.4 静态吸附解吸试验

2.4.1 静态吸附量的测定:准确称取用预处理的湿树脂2.0 g,装入100 mL具塞磨口三角瓶中,精密加入鞣质质量浓度为2.3 mg/mL的粗提液50 mL,置于25℃恒温摇床中振荡24 h(转速120 r/min),

充分吸附后, 滤过, 测定滤液(吸附液) 中剩余的鞣质质量浓度, 计算静态吸附量[吸附量= 吸附液体积× (吸附液初始质量浓度- 吸附液剩余质量浓度) / 树脂质量], 结果见表 1。结果表明, 8 种树脂中 D-101、YWD04B₁ 型树脂对鞣质的吸附量相对较小, 其他 6 种树脂的吸附量相近, 因此需要进一步考察这 6 种树脂的解吸率。

表 1 8 种大孔树脂对总鞣质的吸附
Table 1 Adsorption of total tannins on eight types of macroporous resins

树脂类型	吸附量/(mg·g ⁻¹)	树脂类型	吸附量/(mg·g ⁻¹)
HP20	46.4	YWD02D	26.7
YWD06B	36.9	D-101	12.5
YWD03F ₁	37.2	YWD04B ₁	15.1
ADS8	37.3	AB8	34.1

2.4.2 静态解吸率的测定: 取静态吸附试验后, 吸附已知量鞣质的树脂各 1.0 mg, 50 mL 具塞磨口三角瓶中, 精密加入 95% 乙醇水溶液 30 mL, 摇床中振摇 24 h, 测定解吸液中的鞣质质量浓度, 计算鞣质的解吸率[解吸率= (解吸液体积× 解吸液中鞣质的质量浓度) / 树脂吸附的总鞣质质量× 100%], 结果见表 2。结果表明, HP20 型树脂和 YWD02D 型树脂具有较高的解吸率, 同时考察这两种树脂的吸附量, 显然, HP20 型树脂对于固公果根中鞣质具有较好的吸附解吸性能。

表 2 6 种大孔吸附树脂对鞣质的解吸
Table 2 Desorption of total tannins on six types of macroporous resins

树脂类型	吸附量/(mg·g ⁻¹)	树脂类型	吸附量/(mg·g ⁻¹)
HP20	74.6	ADS8	62.3
YWD06B	62.5	YD02D	84.5
YWD03F ₁	41.1	AB8	59.4

2.4.3 洗脱液的选择: 从解吸效率、易于回收、节能、价廉和毒性角度来选择解吸剂, 其中以醇类较佳, 所以选用乙醇作为争吸剂。分别研究了 20%、40%、60%、80%、95% 乙醇水溶液对树脂解吸率的影响, 选择解吸效果最佳的洗脱液。称取吸附定量鞣质的树脂 1 g, 精密加入 30 mL 5 种乙醇水溶液, 振摇 12 h, 测定解吸液中的鞣质质量浓度, 计算 5 种洗脱液的解吸率, 见表 3。结果表明, 40% 乙醇水溶液的洗脱能力最强, 鞣质的解吸率达到 92.1%。大孔吸附树脂的吸附效果一般情况下随着乙醇水溶液体积分数增大而降低, 但是本实验结果表明, 对于 HP20 树脂, 鞣质的吸附并不是随乙醇体积分数增加降低, 而是在较低的 40% 乙醇水溶液中最低, 同时此体积分数下其他杂质不易被解吸附, 由此达到

了纯化的效果。

表 3 不同体积分数乙醇对解吸率的考察
Table 3 Effects of different concentration of ethanol on desorption rate

洗脱液乙醇/ %	解吸率/ %	洗脱液乙醇/ %	解吸率/ %
20	75.9	80	82.3
40	92.1	95	74.6
60	87.2		

2.4.4 粗提液质量浓度对吸附的影响: 粗提液的质量浓度与大孔树脂的吸附量有直接的关系, 确定粗提液的质量浓度是提高树脂利用率的关键。取粗提液分别稀释 1、2、4、10、20 倍, 进行静态吸附试验, 分别计算吸附量, 见表 4。结果表明, 吸附效果最好的为稀释 2 倍的提取液, 即鞣质浓度为 5.7 mg/mL 的粗提液。

表 4 提取液浓度对吸附量的影响
Table 4 Effects of extract solution concentration on adsorption

稀释倍数/ 倍	吸附量/(mg·g ⁻¹)	稀释倍数/ 倍	吸附量/(mg·g ⁻¹)
1	62.1	10	17.9
2	73.4	20	0.6
4	27.3		

2.4.5 温度对吸附的影响: 鞣质的结构属于多羟基酚类, 温度高于 50 ℃, 其结果的稳定性就会变差。取树脂 4 组, 每组 8 份, 分别测定在 20、30、40、50 ℃ 的条件下 10 min 测定树脂的吸附量, 结果见图 1。结果表明, 随着温度的升高, 可以缩短树脂达到吸附平衡状态的时间, 但是在 20~ 50 ℃, 相差不大, 在工业生产中可采用相对较高的温度, 提高树脂的吸附效率。

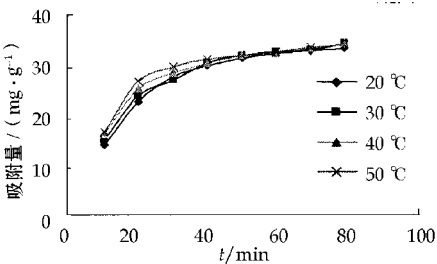


图 1 不同吸附温度的吸附量比较
Fig. 1 Comparison of different temperatures on adsorption

2.4.6 粗提液 pH 值对吸附的影响: 鞣质为多羟基酚类, 呈现弱酸性, 选择适宜的 pH 值可以提高鞣质的吸附量。采用 NaH₂PO₄-柠檬酸缓冲系统调节粗提液的 pH 值为 1、3、5、8 进行静态吸附试验, 计算树脂在不同 pH 值药液中的吸附量, 结果见表 5。结果表明, 当药液 pH 值为 1 时, 树脂的吸附量最高。为了便于工业化生产, 减少杂质的引入, 以下动

态试验的上样药液采用盐酸调节 pH 值。

表 5 药液 pH 值对吸附的影响

Table 5 Effect of different pH values on adsorption

pH 值	吸附量/(mg·g ⁻¹)	pH 值	吸附量/(mg·g ⁻¹)
1	106.5	5	69.6
3	82.3	8	48.0

2.5 动态吸附解吸试验

2.5.1 吸附体积流量及树脂吸附容量的确定: 分别取预处理好的 HP20 大孔树脂 30 g, 湿法装入径高比 1:10 色谱柱中(保留体积约 20 mL)。上样液鞣质质量浓度为 5.7 mg/mL, 调节 pH 值等于 1, 室温。控制体积流量分别为 1、2、3、5 BV/h 进行动态吸附, 每 20 mL(即一个保留体积)为一个流份, 以流份份数为横坐标, 流出液鞣质质量浓度为纵坐标作图, 见图 2。

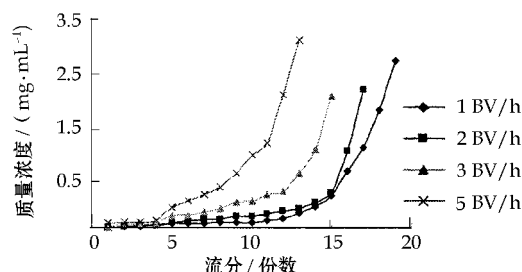


图 2 不同上样流速对吸附的比较

Fig. 2 Comparison of different current velocity on adsorption

随着体积流量的增大, 鞣质在树脂间停留的时间减少, 扩散率降低, 树脂对鞣质的吸附会逐渐变差, 大量泄漏的时间提前。由图 1 可知, 对于 HP20 树脂, 体积流量 1 BV/h 和 2 BV/h 时鞣质泄漏时间、泄漏量相差不大, 采用 3、5 BV/h 体积流量时泄漏过早。综合考虑时间周期等因素, 选择体积流量为 2 BV/h 进行上样, 总上样体积为 15 个保留体积。按树脂吸附容量=泄露点前上柱体积×样品中鞣质质量浓度/树脂质量, 得出该树脂对固公果根中总鞣质的吸附容量为 55.7 mg/g。

2.5.2 水洗终点的确定: 取湿树脂 20 g 装于径高比 1:10 的柱中, 用 pH 值等于 1, 鞣质质量浓度 5.7 mg/mL 的粗提液以 2 BV/h 进行吸附, 饱和吸附后用蒸馏水洗脱除去树脂柱床中大量的杂质, 洗脱体积流量控制为 1/2 倍的上样体积流量, 即 1 BV/h, 以 2 个保留体积为一份, 测定每流分中固形物的质量, 同时由于上样液 pH 值的改变, 流分的 pH 值也需要同时进行考察。共收集 5 份, 质量分别为 312、120、26、13、10 mg, 至第 3 份结束累积固体物质量已达到总流出液固体物质量的 94.5%, 并

且 pH 值测定结果显示流出液已呈中性, 故确定水洗终点为 6 倍保留体积。

2.5.3 洗脱体积流量对洗脱的影响及 40% 乙醇水溶液洗脱终点的确定: 取吸附饱和的树脂, 40% 乙醇水溶液为洗脱液, 1、2、3、5 BV/h 进行洗脱, 以一个保留体积为一个流分, 测定每个流分的鞣质质量浓度。以流份份数为横坐标, 流分中的鞣质质量浓度为纵坐标, 绘制洗脱曲线, 结果见图 3。

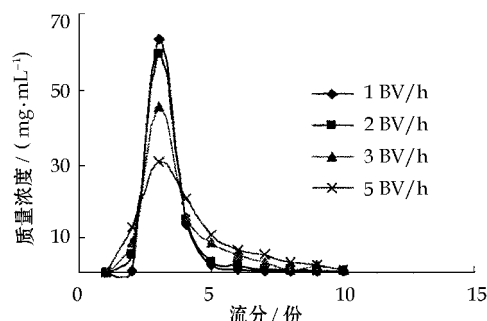


图 3 体积流量对洗脱的影响

Fig. 3 Effect of flow rate on elution

结果表明, 体积流量的增加使洗脱的效率降低, 3、5 BV/h 时间生拖尾现象, 并且浪费溶剂, 采用 1、2 BV/h 的体积流量进行洗脱时效果相差并不明显, 但在工业生产中洗脱体积流量控制在 1/2~1/3 上样体积流量为宜, 所以确定的工艺采用 1 BV/h 洗脱体积流量。

同时, 由测定结果可知, 采用 1 BV/h 洗脱时, 洗脱至第 6 个流分, 洗脱下的鞣质质量分数已经达到 98%, 确定了洗脱终点即为 6 BV。

2.6 最佳工艺验证: 选用 HP20 型大孔吸附树脂; 固公果根提取液上样质量浓度 1:4 (g/mL); pH 值等于 1; 上样流量为 2 BV/h; 径高比为 1:10; 洗脱剂由水、40% 乙醇两部分组成, 洗脱体积流量为 1 BV/h; 水洗脱体积 6 BV、40% 乙醇洗脱体积 6 BV; 收集 40% 乙醇部位, 备用。通过 HP20 树脂的分离纯化, 根据总鞣质测得量计算转移率(转移率=过柱流出液中总鞣质量/上柱前药液总鞣质质量×100%), 得 84.3%。鞣质的质量分数由富集前的 22.8% 提高到 67.3%。

2.7 树脂使用次数对吸附性能的影响: 用装有 HP20 树脂的色谱柱对固公果根提取物反复进行吸附洗脱 10 次, 测定产品的质量分数及回收率, 衡量树脂的重复吸附能力。洗脱液浓缩干燥后得精制产品, 称量并计算质量分数及转移率。

质量分数=最终产物中的鞣质质量/最终产物的总质量×100%

转移率= 过柱流出液中总鞣质质量/ 上柱前药液总鞣质质量× 100%

结果表明, 随 HP20 型树脂使用次数的增多, 其对固公果根中鞣质的吸附纯化能力逐渐降低, 但降低程度不明显, 鞣质的质量分数下降了 3.6%, 回收率下降了 3.5%, 可见 HP20 树脂的吸附-解吸性能是较为稳定的, 故认为 HP20 型大孔吸附树脂对固公果根中鞣质的精制具有很好的重复使用性能。

表 6 使用次数对质量分数和转移率的影响

Table 6 Using times of resin on content and transferring rate

使用次数	质量分数/ %	转移率/ %
1	67.2	83.0
3	65.9	82.1
7	64.1	81.7
10	62.6	79.5

2.8 树脂的再生: 可选用 75% ~ 85% 乙醇对大孔吸附树脂再生。大孔吸附树脂每使用一次, 比上柱量约下降 5%。

3 讨论

固公果根是彝族民间常用药材, 疗效显著, 虽然

作为临床中药药剂的历史悠久, 但是其工艺方法依旧是传统的水提法, 此方法虽然简单, 但是存在较大缺点。本实验利用树脂法对固公果根中鞣质进行了分离纯化, 实验中使用试剂为乙醇和水, 安全无毒, 采用此方法具有简单, 适合大工业生产的特点, 并且所得干浸膏鞣质的质量分数达到 67.3%, 并且具有转移率高, 所得产品质量稳定等优点, 为固公果根有效活性部位的研究开发提供了参考。

参考文献:

- [1] 任 洁, 何广新. 苗药一回公果阿江制剂: “肠康胶囊” 的质量标准研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 1998(2): 41-42
- [2] 国家中成药标准汇编内科脾胃分册[S]. 肠舒片. WS 10615 (ZD 0615)-2002
- [3] 刘卫华. 谈中药鞣质成分在临床中的应用[J]. 黑龙江中医药, 2005(4): 55-56
- [4] 王丽敏, 卢春风, 路雅真, 等. 老鹳草鞣质类化合物的抗腹泻作用研究[J]. 黑龙江医药科学, 2003, 26(5): 28-29
- [5] 钟华玉, 张 勉, 戴 岳, 等. 大黄和生首乌鞣质含量对小鼠小肠推进的影响[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12): 2478-2479
- [6] 王春民, 刘 刚, 费 艳, 等. 大孔吸附树脂法纯化黄芩总黄酮工艺的研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 58-60
- [7] 刘岱琳, 董晋泉, 孙华庚, 等. 加纳籽中 5 羟基色氨酸的树脂纯化研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 60-63

丹参醇沉过程中丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 的回收率预测研究

俞 翔¹, 莫必琪², 王 治², 瞿海斌¹

(1 浙江大学 药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058; 2 正大青春宝药业有限公司, 浙江 杭州 310023)

摘 要: 目的 建立丹参醇沉过程丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 回收率的预测模型。方法 采集 15 批丹参醇沉正常生产的操作参数, 测定浓缩液和醇沉液中的 5 种有效成分, 计算丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 的回收率。采用将醇沉操作参数和浓缩液有效成分的量相结合的方法建立 Stepwise MLR 回收率预测模型, 分析模型中各变量的重要性。结果 丹参素、丹酚酸 B 和丹酚酸 D 的回收率预测模型相关系数均大于 0.95。结论 建立的丹参醇沉过程中有效成分回收率预测模型具有较好的预测能力, 有助于进一步了解醇沉过程, 提高丹参醇沉过程质量控制水平。

关键词: 丹参; 回收率; 醇沉; 丹参素; 丹酚酸 B; 丹酚酸 D

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)06-0900-04

Recovery prediction of danshensu, salvianolic acid B, and salvianolic acid D in danshen ethanol precipitation

YU Xiang¹, MO Biqi², WANG Zhi², QU Haibin¹

(1 Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2 Chiatai Qingchunbao Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310023, China)

Abstract: Objective To develop recovery prediction models for danshensu, salvianolic acid B, and salvianolic acid D in danshen ethanol precipitation. **Methods** Recorded the operation parameters of 15 normal batches of danshen ethanol precipitation in one Chinese medicine plant and measured five active compo-

①收稿日期: 2009-04-12

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划(NCET 06 0515); 浙江省重大科技专项重点项目(200813004-1)

作者简介: 俞 翔, 男, 硕士研究生。

* 通讯作者 瞿海斌 E-mail: quhb@zju.edu.cn