

中试规模下 Box-Behnken 法优化延胡索微波提取工艺

王正宽^{1,2}, 刘圆^{1,2}, 周茹^{1,2}, 黄道省^{1,2}, 吴建雄^{1,2}, 毕宇安^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222047

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222047

摘要: 目的 中试规模下优化微波提取延胡索 *Corydalis Rhizoma* 中有效成分(延胡索乙素)的最佳工艺。方法 通过单因素试验考察药材炮制、微波功率、溶剂浓度、液固比、提取时间等因素对延胡索乙素提取率的影响,并在此基础上通过 Box-Behnken 法优化延胡索微波提取工艺。结果 延胡索微波提取的最佳工艺为以水为提取溶剂,微波功率 7 kW,液固比 10:1,提取 21 min,在此条件下延胡索乙素提取率预测值为 83.60%,验证值为 83.74%;且与煎煮提取相比,干浸膏得率降低 70%。结论 所建立的数学模型精度高 ($P < 0.01$),可对延胡索微波提取工艺进行分析和预测。

关键词: 中试规模;微波提取;延胡索;延胡索乙素;提取率;单因素试验;Box-Behnken 法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)16-2394-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.16.009

Optimization of microwave extraction process of *Corydalis Rhizoma* by Box-Behnken in condition of pilot scale

WANG Zheng-kuan^{1,2}, LIU Yuan^{1,2}, ZHOU Mao^{1,2}, HUANG Dao-xing^{1,2}, WU Jian-xiong^{1,2}, BI Yu-an^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222047, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222047, China

Abstract: Objective To optimize the conditions of microwave technique in extraction of effective ingredients in *Corydalis Rhizoma* in the condition of pilot scale. **Methods** Medicinal materials processing, microwave power, solvent concentration, liquid to solid ratio, extraction time and so on were investigated by single factor test on the extraction rate of tetrahydropalmatine, and on this basis, using the method of Box-Behnken the microwave extraction process of *Corydalis Rhizoma* was optimized. **Results** The optimum process of microwave extraction of *Corydalis Rhizoma* was as follows: using drinking water as the extraction solvent, microwave power of 7 kW, liquid to solid ratio of 10:1, and extraction for 21 min. Under these conditions, the extraction rate of tetrahydropalmatine predictive value was 83.60%, and the verified value was 83.74%; and compared with water extraction, dry extract rate decreased by 70%. **Conclusion** The mathematical model established is significant ($P < 0.01$) and can analyze and forecast the microwave extraction technology of *Corydalis Rhizoma*.

Key words: pilot scale; microwave extraction; *Corydalis Rhizoma*; tetrahydropalmatine; extraction rate; single factor; Box-Behnken method

延胡索又称元胡、玄胡等,始载于《本草拾遗》,为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎,具有活血、利气和止痛的功效,临床主治胸胁及脘腹疼痛、经闭痛经、产后瘀阻和跌打肿痛。延胡索乙素为其主要有效成分,具有镇

痛、镇静的作用。此外,研究表明延胡索还具有其他广泛的药理活性,如抗心肌缺血、抗实验性胃溃疡、抗肿瘤、抗氧化、保肝^[1]等。目前提取延胡索药材多采用乙醇回流提取方式^[2-4],该方法存在提取耗能大的缺点,特别是延胡索乙素提取率低的问题,

收稿日期: 2015-03-05

基金项目: 科学技术部国家“重大新药创制”项目(2013ZX09402203)

作者简介: 王正宽,男,高级工程师,主要从事中药新技术新工艺研究。Tel: 13511566160 (0518)81152363 E-mail: wangzk781@126.com

*通信作者 萧伟,男,研究员级高级工程师,博士,主要研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152367 E-mail: Kanionlunwen@163.com

一直未得到实质性解决。近几年，国内外开始研究应用微波技术提取中药中的有效成分，该技术是近年来发展较快的一种新型提取分离技术，它是利用微波能加热样品及溶媒，使样品中的目标组分从基体中分离出来并进入溶媒，从而达到分离的目的^[5-6]。与传统提取方法相比，微波技术提取中药有效成分具有选择性高、快速高效、质量稳定等优点^[7]。但是，目前文献报道的基本为采用微波炉进行小试实验，未见中试或产业化研究报道。因此，本实验尝试在中试条件下考察微波提取延胡索药材，采用单因素结合 Box-Behnken 法，以延胡索乙素提取率为考察指标，对延胡索药材的提取工艺进行研究，以期为延胡索的生产提供一项新的提取技术。

1 仪器与试剂

WCD10S-03 型微波提取设备，南京三乐微波技术发展有限公司；Waters 2695 HPLC 色谱仪，沃特世 (Waters) 科技 (上海) 有限公司；H1650-W 台式高速离心机，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；AG-135 型电子分析天平，梅特勒-托利多上海有限公司。

延胡索饮片购自江苏省连云港市康缘医药商业有限公司，经萧伟教授鉴定为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎。延胡索乙素对照品，中国食品药品检定研究院，供定量分析用，批号为 110726-201213，质量分数 $\geq 99\%$ ；三乙胺、乙腈为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 延胡索乙素 HPLC 测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；以乙腈-0.05%三乙胺 (45:55) 为流动相；体积流量 1 mL/min；检测波长 280 nm；进样量 10 μL。理论板数按延胡索乙素峰计算，应不低于 4 000。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 取延胡索乙素对照品适量，精密称定，加甲醇制成含延胡索乙素 85 μg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 供试品的制备 精密吸取药液 1 mL 至 25 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，离心，取上清液，得供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液 1、2、4、6、8、10 mL 置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得对照品溶液，

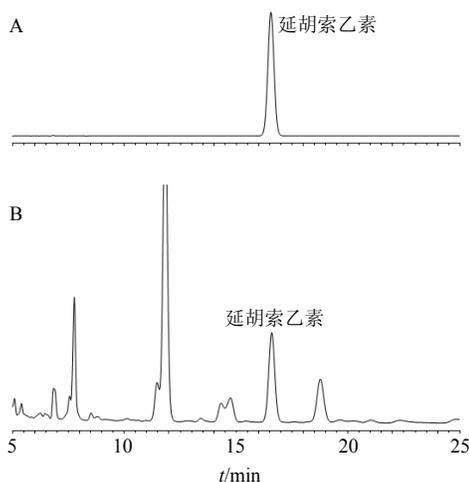


图 1 延胡索乙素对照品 (A) 和供试品 (B) HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC of tetrahydropalmatine contrast (A) and sample (B)

按“2.1.1”项下色谱条件分别进样 10 μL，以进样质量浓度为横坐标 (X)，延胡索乙素峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，得回归方程为 $Y=20.028X+1.1458$, $r=0.9999$ ；结果表明延胡索乙素在 8.50~85.0 μg/mL 呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液 10 μL，质量浓度 85 μg/mL，按“2.1.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，计算延胡索乙素峰面积的 RSD 值为 1.85%。

2.1.6 重复性试验 精密量取药液，按“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液，平行制备 6 份，按“2.1.1”项下色谱条件测定，计算延胡索乙素峰质量分数的 RSD 值为 2.08%。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取“2.1.6”项下 1 份供试品溶液 10 μL，按“2.1.1”项下色谱条件，分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 进样，共测定 7 次；计算延胡索乙素峰面积的 RSD 值为 2.15%。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取“2.1.6”项下重复性试验样品适量，共 6 份，分别加入一定量的延胡索乙素对照品，按“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件测定，结果延胡索乙素平均回收率为 99.75%，其 RSD 为 2.10%。

2.2 微波提取工艺考察及结果

根据微波技术的特点及药材的性质，所有实验均在中试规模下对延胡索粗粉 (5 目，下同) 进行微波提取研究，以延胡索乙素提取率为考察指标。首先，对药材炮制、微波功率、液固比、溶媒、溶媒的 pH 值、提取时间及提取次数等可能影响延胡

索乙素提取效果的因素进行考察,得到各因素影响趋势及大致范围;其次,通过 Box-Behnken 法优化试验;最后,优化微波提取工艺再与常规煎煮优化提取工艺进行优劣性比较。测定药液中延胡索乙素的量并计算其提取率,以延胡索乙素提取率为评价提取效果的主要指标,药液固含量为参考指标。

2.2.1 单因素考察

(1) 药材醋制:称取延胡索原药材粗粉、醋延胡索(炮制方法参照《中国药典》2010年版一部附录 II D)粗粉各 5.0 kg,以水为提取溶媒,设定微波功率 4 kW,液固比为 12:1,提取时间 20 min,考察延胡索药材醋制情况对延胡索乙素提取率和药液固含量的影响,延胡索乙素提取率分别为 78.20% 和 77.85%,药液固含量分别为 0.85% 和 0.83%。延胡索药材醋制与否对微波提取结果没有明显影响,不作为后续优化试验考察项。

(2) 微波功率:称取延胡索粗粉 5.0 kg,共 5 份,以水为提取溶媒,设定提取时间 20 min,液固比为 12:1,考察微波功率 2、4、6、8、10 kW 对延胡索乙素提取率和药液固含量的影响,结果延胡索乙素提取率分别为 68.35%、76.58%、82.64%、78.92%、68.78%,药液固含量分别为 0.75%、0.80%、0.87%、0.89%、1.17%。随着微波功率的增大延胡索乙素提取率先增高后降低,因为当微波功率达到一定值时,导致指标成分分解,因而提取率下降^[8],另外,随着微波功率的增大,药液固含量亦有明显的增加趋势。因此,选择 4、6、8 kW 为后续优化试验的水平条件。

(3) 溶媒浓度:称取延胡索药材 5.0 kg,共 5 份,设定微波功率 6 kW,提取时间 20 min,液固比 12:1,考察水及 30%、50%、70%、90%乙醇对延胡索乙素提取率和药液固含量的影响,结果延胡索乙素提取率分别为 81.36%、80.85%、72.64%、68.87%、58.78%,药液固含量分别为 0.93%、0.84%、0.78%、0.73%、0.70%。溶剂极性越强,吸收微波能越强,从而在内部产生热效应,加速目标产物由胞内转移至萃取剂中,从而强化有效成分的提取^[9]。选择水为提取溶媒,不作后续优化试验考察项。

(4) 液固比:称取延胡索药材 5.0 kg,共 5 份,以水为提取溶媒,设定微波功率 6 kW,提取时间 20 min,考察液固比 6:1、8:1、10:1、12:1、14:1 对延胡索乙素提取率和药液固含量的影响,结果延胡索乙素提取率分别为 68.83%、76.52%、

82.74%、82.51%、79.36%,药液固含量分别为 1.35%、1.20%、1.04%、0.85%、0.71%。因此,选择液固比为 8:1、10:1、12:1 为后续优化试验的水平条件。

(5) 溶媒 pH 值:称取延胡索药材 5.0 kg,以水为提取溶媒,设定微波功率 6 kW,提取时间 20 min,液固比 10:1,考察溶媒 pH 3、4、5、6、未调 pH (pH 值为 7.12) 对延胡索乙素提取率和药液固含量的影响,结果延胡索乙素提取率分别为 80.83%、79.52%、80.91%、81.36%、81.52%,药液固含量分别为 0.98%、0.97%、1.03%、0.99%、1.04%。溶媒 pH 值对微波提取效果没有明显的影响,不作为后续优化试验考察项。

(6) 提取时间:称取延胡索药材 5.0 kg,共 5 份,以水为提取溶媒,设定微波功率 6 kW,液固比为 10:1,考察不同提取时间 10、20、30、40、50 min 对延胡索乙素提取率和药液固含量的影响,结果延胡索乙素提取率分别为 73.78%、82.52%、78.83%、72.23%、50.36%,药液固含量分别为 0.88%、1.03%、1.18%、1.29%、1.40%。选择提取时间 10、20、30 min 为后续优化试验的水平条件。

(7) 提取次数:称取延胡索药材 5.0 kg,共 4 份,以水为提取溶媒,设定微波功率 6 kW,液固比 10:1,提取时间 20 min,考察提取次数 1、2、3、4 对延胡索乙素提取率和药液固含量的影响,结果延胡索乙素提取率分别为 83.62%、85.78%、86.63%、87.06%,药液固含量分别为 1.01%、0.59%、0.34%、0.26%。从生产周期及成本考虑,确定提取次数为 1 次,不作为后续优化试验考察项。

2.2.2 Box-Behnken 法优化延胡索微波提取工艺^[10]

(1) 响应面试验设计:在单因素试验的基础上以微波功率(A)、液固比(B)、提取时间(C)为考察因素,根据 Box-Behnken 效应面法设计原理,每因素设 3 个水平,用代码值-1、0、1 表示,对延胡索微波提取工艺进行优化试验。测定药液中延胡索乙素的量,计算其提取率并作为主要评价指标,因素水平见表 1。

(2) 响应面试验结果及方差分析:根据 Box-Behnken 响应面试验设计方案,进行延胡索微波提取试验,药液按照“2.1.1”项下色谱条件进行检测,响应面试验结果见表 1,采用 Design-Expert 8.0.6 软件对延胡索乙素提取率数据进行回归方差分析,结果见表 2。

表 1 显示,试验 1~12 号为析因试验,13~15

表 1 Box-Behnken 响应试验设计及结果
Table 1 Box-Behnken response test and results

| 实验号 | 因素 | | | 提取率/% | 固含量/% |
|-----|-------|---------|--------|-------|-------|
| | A/kW | B | C/min | | |
| 1 | 4(-1) | 8:1(-1) | 20(0) | 76.23 | 1.08 |
| 2 | 4(-1) | 10:1(0) | 30(1) | 79.58 | 0.83 |
| 3 | 8(1) | 10:1(0) | 10(-1) | 81.42 | 0.91 |
| 4 | 4(-1) | 10:1(0) | 10(-1) | 75.36 | 0.95 |
| 5 | 8(1) | 12:1(1) | 20(0) | 81.36 | 1.01 |
| 6 | 6(0) | 8:1(-1) | 10(-1) | 79.68 | 0.86 |
| 7 | 6(0) | 12:1(1) | 30(1) | 81.42 | 1.00 |
| 8 | 6(0) | 8:1(-1) | 30(1) | 79.26 | 1.13 |
| 9 | 8(1) | 10:1(0) | 30(1) | 81.31 | 1.10 |
| 10 | 8(1) | 8:1(-1) | 20(0) | 80.12 | 1.15 |
| 11 | 4(-1) | 12:1(1) | 20(0) | 75.38 | 0.83 |
| 12 | 6(0) | 12:1(1) | 10(-1) | 80.25 | 0.81 |
| 13 | 6(0) | 10:1(0) | 20(0) | 83.35 | 1.06 |
| 14 | 6(0) | 10:1(0) | 20(0) | 83.38 | 1.07 |
| 15 | 6(0) | 10:1(0) | 20(0) | 83.37 | 1.05 |

表 2 回归模型方差分析

Table 2 Analysis of variance of regression model

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | F 值 | P 值 |
|----------------|-------|-----|-------|-----------|
| 模型 | 92.25 | 9 | 15.41 | 0.003 9** |
| A | 41.22 | 1 | 61.96 | 0.000 5** |
| B | 1.64 | 1 | 61.96 | 0.177 4 |
| C | 2.95 | 1 | 2.46 | 0.089 0 |
| AB | 1.68 | 1 | 4.44 | 0.173 2 |
| AC | 4.69 | 1 | 2.52 | 0.045 2* |
| BC | 0.63 | 1 | 7.05 | 0.374 5 |
| A ² | 26.73 | 1 | 0.95 | 0.001 4** |
| B ² | 14.12 | 1 | 40.17 | 0.005 8** |
| C ² | 3.23 | 1 | 21.22 | 0.078 7 |
| 残差 | 3.33 | 5 | 4.86 | |
| 失拟误差 | 2.67 | 3 | | 0.282 3 |
| 纯误差 | 0.66 | 2 | 2.69 | |
| 总和 | 95.58 | 14 | | |

**P<0.01 为极显著; *P<0.05 为显著

**P<0.01 is extremely significant; *P<0.05 is significant

号为中心验证试验,以估计试验误差。由 Design-Expert 8.0.6 软件对延胡索乙素提取率数据进行二次多元回归拟合,延胡索乙素提取率以 Y 表示,得回归方程: $Y=3.107\ 50+8.670\ 00\ A+8.634\ 58\ B+0.560\ 92\ C+0.161\ 88\ AB-0.054\ 125\ AC+0.0198\ 75$

$$BC-0.672\ 60\ A^2-0.488\ 85\ B^2-9.354\ 17\times 10^{-3}\ C^2。$$

由表 2 分析可知,一次项 A 对延胡索乙素提取率具有极显著性影响,二次项 A²、B² 对延胡索乙素提取率具有极显著影响,交互项 AC 间有显著性交互影响,其他项没有显著性影响,因此,各具体实验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。本实验模型的 P 值小于 0.01,说明响应面的模型显著性较高;而失拟误差项的 P 值大于 0.05,说明响应面模型对试验拟合的情况较好,试验误差小,可以很好地对延胡索乙素提取率进行分析和预测。

(3) 响应面分析:利用 Design-Expert 8.0.6 软件,根据回归方程绘制不同影响因素对延胡索乙素提取率的三维曲线图,响应面分析图形是特定的响应值对应自变量构成的一个三维空间图,可以直观地反映出各自变量对响应值的影响。由图 2 可知,液固比一定时延胡索乙素提取率随微波功率的增加先快速升高后快速降低,微波功率一定时延胡索乙素提取率随液固比的增加先升高后降低;提取时间一定时延胡索乙素提取率随微波功率的增加先快速升高后缓慢降低,微波功率一定时延胡索乙素提取率随提取时间的增加先缓慢升高后缓慢降低;液固比一定时延胡索乙素提取率随提取时间的增加先缓慢升高后缓慢降低,提取时间一定时延胡索乙素提取率随液固比的增加先快速升高后快速降低。

2.2.3 工艺验证 根据 Design-Expert 8.0.6 软件及回归方程求解得延胡索最佳微波提取工艺为微波功率 6.78 kW,液固比 10.38:1,提取时间 21.3 min,此时延胡索乙素提取率的预测值为 83.60%。但是从设备及生产实际可操作性考虑,对最佳工艺进行适当修正,修正工艺为微波功率 7 kW,液固比 10:1,提取 21 min。按修正工艺进行 3 批中试再验证试验,结果延胡索乙素提取率分别为 84.23%、83.84%、83.16%,药液固含量分别为 1.03%、1.05%、1.04%。结果显示,延胡索乙素提取率平均值为 83.74%,RSD<2.0%,与响应面预测值结果一致;说明建立的延胡索乙素提取率与微波功率、液固比和提取时间之间关系的回归模型是科学、合理的。故本研究所得延胡索微波提取的最佳工艺为以水为提取溶剂,设定微波功率 7 kW,液固比 10:1,提取 21 min。

2.2.4 微波提取与煎煮提取比较 为了进一步验证延胡索微波提取工艺的优劣性,过程中对延胡索煎煮提取工艺亦进行正交优化试验研究,得到优化后的延胡索煎煮提取最佳工艺,在此基础上对延胡索

微波提取工艺、煎煮提取工艺进行横向比较, 结果见表 3。由表 3 可知, 微波提取所用时间是煎煮提取的 1/9, 溶剂用量下降 50%, 干浸膏得率降低 70%,

且延胡索乙素一次提取率达 80% 以上, 明显优于煎煮提取^[11]。可见, 微波技术提取延胡索中主要指标成分具有节能、省时、高效的优势。

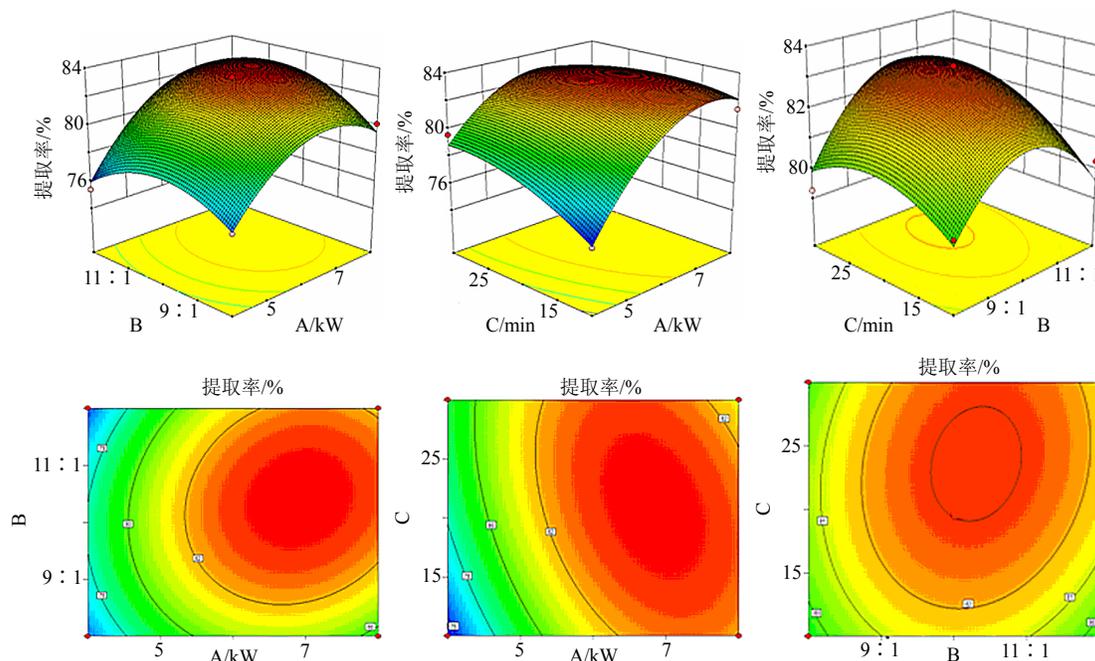


图 2 因变量相对各自变量效应面三维图

Fig. 2 Response surfaces of A and B and C to any two significant influential factors

表 3 微波提取与煎煮提取比较

Table 3 Comparison on microwave extraction and decocting extraction

| 提取方法 | 微波功率/kW | 提取次数 | 液固比 | 提取时间/min | 延胡索乙素提取率/% | 药液固含量/% | 干浸膏得率/% |
|------|---------|------|--------|----------|------------|---------|---------|
| 微波 | 7 | 1 | 10 : 1 | 20 | 83.57 | 1.01 | 9.50 |
| 煎煮 | — | 2 | 10 : 1 | 90 | 65.32 | 0.85 | 16.15 |

3 讨论

以往对延胡索提取工艺的研究往往采用单因素或正交设计等方法来优选出最佳的工艺参数组合, 但无法找到整个区域内因素的最优组合与相应的最佳值。而 Box-Behnken 法是实验设计与统计软件有效结合的工具, 将各因素与实验结果的关系函数化, 解决了目前正交试验只能给出最佳因素水平组合却无法找出整体因素中的最佳组合和响应值的缺点, 由于其具有设计方法简单, 回归方程精度高等优点, 对实验结果可进行实际预测, 在中药领域的应用愈加广泛^[12-13]。

微波提取新技术具有简便快速、节能高效、重复性好等优点^[14], 越来越多地应用于天然植物的化学成分及中药有效成分的研究。但目前该技术研究也有一定的局限性, 大多研究尚处在实验室阶段, 中试及产业化研究报道较少, 且无线性放大关系。

因此, 本实验尝试利用中试规模微波提取设备进行延胡索有效成分的提取研究, 结果较为理想且明显优于常规煎煮提取, 本研究为解决延胡索中延胡索乙素提取率较低的问题提供了一种新的提取技术。为微波提取技术向产业化应用过度提供了技术支持, 具有实际的指导意义。

参考文献

[1] 贺 凯, 高建莉, 赵光树. 延胡索化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1909-1912.
 [2] 张 莉, 付 敏, 韩建伟, 等. 复方元胡止痛贴中延胡索、白芷乙醇回流提取工艺研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(1): 57-58.
 [3] 杜茂波, 刘淑芝, 刘树杨, 等. 元胡止痛软胶囊中延胡索提取工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 50-52.

- [4] 黄山, 陈峰, 郭立玮. 延胡索提取工艺的优选 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(1): 47-48.
- [5] 张成, 贾绍义. 微波提取技术及其应用 [J]. 化学工业与工程, 2004, 21(6): 444-447.
- [6] 骆健美, 卢学英, 张敏卿. 微波萃取技术及其应用 [J]. 化工进展, 2001, 20(12): 46-49.
- [7] 张丽平, 余晓琴. 微波萃取技术在提取黄酮类化合物上的应用 [J]. 成都纺织高等专科学校学报, 2006, 23(3): 13-16.
- [8] 王志祥. 制药工程学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [9] 苏佳华. 微波萃取技术在中药有效成分提取中的应用 [J]. 海峡药学, 2008, 20(7): 123-125.
- [10] 陈莉, 王盛, 魏良兵, 等. 响应面分析法优化复方补乌糖浆微波提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 25-28.
- [11] 施婷婷, 王建新, 李希. 延胡索总生物碱提取工艺的实验研究 [J]. 中药与临床, 2014, 5(3): 14-16.
- [12] 蒋剑平, 许海顺, 卢烨琳, 等. 响应面分析法优化白花蛇舌草水溶性多糖的提取工艺 [J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(2): 187-191.
- [13] 黄元红, 卫天喜, 张发生, 等. 星点设计-效应面法优选丹参提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 28-31.
- [14] 王庆志, 孙平. 微波技术在食品工业中的应用 [J]. 河北农业科学, 2008, 12(12): 54-55.