

三七醇回流法与超声法提取工艺比较研究

陈光宇¹ 何群^{1,2} 何永恒³ (1. 湖南中医药大学药学院 长沙 410004; 2. 湖南中医药大学中药药剂学重点学科; 3. 湖南中医药大学第二临床医学院)

摘要 目的: 优选三七药粉醇回流法提取与醇超声法提取最优工艺参数; 探讨三七药粉超声提取的可行性, 为工业化生产提供依据。**方法:** 以三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 及三种皂苷总和的含量为评价指标, 首先采用正交设计试验法筛选三七药粉醇超声提取与醇回流提取各自的最优工艺条件, 再用配对 t 检验法对比分析试验数据。**结果:** 三七醇超声提取最优工艺参数为: 三七药材超微粉加入 30% 的乙醇浸泡 30 min, 30% 乙醇体积为药材量的 6 倍, 超声时间 30 min。三七醇回流提取最优工艺参数为: 三七药材超微粉加入 50% 的乙醇浸泡 30 min, 50% 乙醇体积为药材量的 10 倍, 水浴回流时间 30 min。三七药粉醇回流与超声提取差别有统计意义, 比较均值回流提取优于超声提取。**结论:** 三七采用回流提取为佳, 按最优工艺条件提取, 三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 及三种皂苷总和的含量较高。

关键词 三七; 醇回流提取法; 醇超声提取法; 三七皂苷; 配对 t 检验法

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2013)07-0975-05

Comparative Analysis on Reflux and Ultrasonic Extraction for Pseudo-ginseng

Chen Guangyu¹, He Qun^{1,2}, He Yongheng³ (1. Pharmaceutical College of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410004, China; 2. Key Discipline of Chinese Drugs Pharmaceutics of Hunan University of Chinese Medicine; 3. The Second Clinical Medical School of Hunan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective: To optimize the extraction process of alcohol refluxing method and ultrasonic method for pseudo-ginseng powders and investigate the feasibility of ultrasonic extraction to provide the basis for the industrial production. **Method:** The content of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g_1} and R_{b_1} , and the total content of the three saponins as the indices, the technique parameters of reflux and ultrasonic extraction process for pseudo-ginseng were optimized with orthogonal design, and the experimental data were analyzed using paired samples test. **Result:** The optimal ultrasonic extraction process parameters were as follows: adding 6 times of 30% ethanol in pseudo-ginseng powders, soaking for 30 minute, and the ultrasound time was 30 min. The optimal reflux extraction process parameters were as follows: adding 10 times of 50% ethanol in pseudo-ginseng powder, soaking for 30 minute, and the reflux time was 30 min. The difference between reflux and ultrasonic method was statistically significant, and the reflux method was better than the ultrasonic method. **Conclusion:** The reflux extraction is better, and the total amount of notoginsenoside R_1 , R_{g_1} and R_{b_1} is higher in the optimal extraction process.

KEY WORDS Pseudo-ginseng; Alcohol reflux extraction; Ultrasonic extraction; Panax notoginseng saponins; Paired t-test

三七具有化瘀止血、消肿定痛的作用, 并有止血不留瘀血、行血不伤新的优点^[1,2], 其药效作用与三七中皂苷的含量有关。一般可行的提取方法是醇回流法与醇超声法。三七醇提工艺方法及条件筛选文献报道很多^[1,3-6], 但结论不一致, 如有报道用 70% 醇提最佳, 有的用 30% 醇提最佳, 加醇量、加热回流时间亦是如此, 尚需进一步试验研究。超声波提取法越来越多地应用于中药材提取工业化生产, 但并不是所有的药材都适合, 提取效率与药材中提取成分的性质有关。本文以《中国药典》所载的有效成分三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 及这三种皂苷总和为评价指标, 首先优选回流与超声两种提取方法各自的最优工艺参数, 再比较两者的差异。报道如下。

1 仪器与试剂

Agilent-1200LC 高效液相色谱系统(美国安捷伦公司); 包括 G1311A 四元梯度泵, G1313A 标准型自动进样器, G1316A 柱温箱, G1314A 紫外检测器, Agilent Chemstation 色谱工作站; SK3300H 型浴式超声仪(上海科导超声仪器有限公司); AR124CN 精密电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司制造); S-25 型 pH 计(上海理达仪器厂); HH-S 型水浴锅(郑州长城科工贸有限公司); 98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司); 80-1 型离心沉淀机(江苏金坛市中大仪器厂); FW135 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); DZF-6050 型真空干燥箱(上海精密试验设备有限公司); RE-5299 旋转式蒸发仪与 SHZ-D(III) 循环水式真空泵(均为巩义市予华仪器有

基金项目: 湖南省科技厅一般项目(编号: 2009SK3125); 长沙市科技局一般项目(编号: K1003068-31)

通讯作者: 何群 Tel: (0731) 88458231 E-mail: hequn88@126.com

限责任公司)。

三七皂苷 R_1 对照品(批号:110745-200617)、人参皂苷 R_{g_1} 对照品(批号:110703-201027)、人参皂苷 R_{b_1} 对照品(批号:110704-200921)均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈、甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2,7-9]

色谱柱:Ultimate ODS C_{18} 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相组成及梯度洗脱程序见表1。检测波长:203 nm;流速:1.0 ml · min⁻¹;柱温:30℃;理论塔板数按三七皂苷 R_1 峰计算不低于4 000,分离度 > 1.5。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	水(%)	乙腈(%)	时间(min)	水(%)	乙腈(%)
0	80	20	65	69	31
10	80	20	70	64	36
20	78	22	72	80	20
30	78	22	78	80	20
45	69	31			

2.2 对照品溶液的制备

精密称取三七皂苷 R_1 对照品10.4 mg于10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制得含1.04 mg · ml⁻¹的三七皂苷 R_1 贮备液。精密称取人参皂苷 R_{g_1} 对照品10.1 mg于10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制得1.01 mg · ml⁻¹的 R_{g_1} 贮备液。精密称取人参皂苷 R_{b_1} 对照品10.2 mg于10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制得1.02 mg · ml⁻¹的人参皂苷 R_{b_1} 贮备液。

精密吸取1 ml三七皂苷 R_1 贮备液、4 ml人参皂苷 R_{g_1} 贮备液、4 ml人参皂苷 R_{b_1} 贮备液于同一10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。制得含0.104 mg · ml⁻¹三七皂苷 R_1 ,含0.404 mg · ml⁻¹人参皂苷 R_{g_1} ,含0.408 mg · ml⁻¹人参皂苷 R_{b_1} 的三七对照品混合贮备液,过0.45 μm 微孔滤膜,制得三七对照品混合溶液。

2.3 三七浸膏供试品溶液的制备

取三七浸膏约0.7 g,精密称定,加入25 ml甲醇,研磨,转入50 ml量瓶中,充分振摇使溶解完全,定容,过滤,精密吸取续滤液2 ml置于5 ml量瓶中定容,离心(1 000 r · min⁻¹)5 min,取上清液,过0.45 μm 微孔滤膜,制得三七浸膏供试品溶液,即样品液。

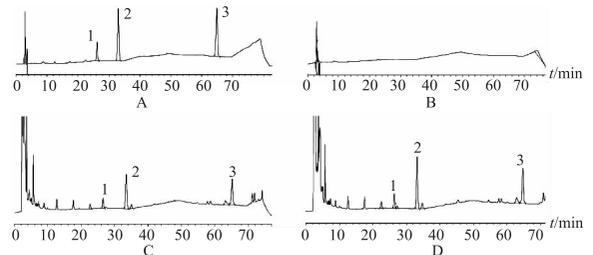
2.4 三七药材超微粉供试品溶液的制备

取三七药材超微粉(过四号筛)约0.6 g,精密称定,精密加入50 ml甲醇,充分振摇使溶解完全,定容,称重,放置过夜,置于80℃水浴上保持微沸2 h,

放冷,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,过0.45 μm 微孔滤膜,即得三七药材超微粉供试品溶液。

2.5 分离条件的考察

精密吸取供试品溶液、对照品溶液各10 μl ,分别注入高效液相色谱仪,照“2.1”色谱条件进行测定,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上有一相同的色谱峰(见图1)。



A. 三种对照品 B. 溶剂 C. 三七药材 D. 三七浸膏
1. 三七皂苷 R_1 2. 人参皂苷 R_{g_1} 3. 人参皂苷 R_{b_1}

图1 HPLC 色谱图

2.6 三七醇提基本方法

取三七药材超微粉约50 g,加一定浓度、一定量的乙醇浸泡30 min,水浴回流或超声一定时间,过滤,滤液于旋转薄膜蒸发器上50 ~ 60℃(-0.1 MPa)回收乙醇至无醇味,再倒入蒸发皿中,在水浴上浓缩成稠浸膏,最后放入60 ~ 70℃减压干燥箱中干燥成干浸膏,取样测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 及三种皂苷总和的含量。

2.7 三七醇提因素水平表

因只能购买到三七超微粉末,所以根据预试验结果及文献报道,对三七醇提影响大的三个因素:醇浓度、加醇量、回流或超声时间进行考察,其他工艺参数固定,如:浸泡时间确定为30 min,提取次数确定为1次,最优组合筛选出来后再在重复试验时考察2次、3次,回流温度控制在溶剂沸腾,超声(53 kHz,180 W)则自然升温(超声0.5 h后停10 min),其因素水平见表2。

表2 三七醇提因素水平表

水平	A 乙醇浓度(%)	B 加乙醇量(倍)	C 回流或超声时间(h)
1	35	10	0.5
2	50	8	1
3	70	6	2

2.8 三七醇提回流正交设计试验及结果分析

采用正交设计试验表安排试验。因三种皂苷中各成分含量相差较大,若仅用三种皂苷总和作为评价指标得出的结论较片面,故将各成分单独考察,再相加后用三种皂苷总和单独考察,所以4项评价指标综合分析考察可更客观地筛选最优工艺。结果分析见表3~表5。

表3 三七醇回流提取正交设计试验及数据处理分析结果

列号	A	B	C	D	三七醇回流提取物中各成分含量(mg · g ⁻¹)			
					三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{g1}	人参皂苷 R _{b1}	三种皂苷总和
1	1	1	1	1	2.62	13.32	10.58	26.52
2	1	2	2	2	2.38	12.16	9.64	24.18
3	1	3	3	3	1.91	9.52	7.30	18.73
4	2	1	2	3	3.36	17.05	12.70	33.10
5	2	2	3	1	2.89	14.61	11.75	29.26
6	2	3	1	2	2.46	11.70	8.98	23.14
7	3	1	3	2	2.79	13.90	11.04	27.74
8	3	2	1	3	2.70	13.64	10.88	27.21
9	3	3	2	1	2.52	12.63	10.15	25.30
K ₁	2.303	2.923	2.593	2.677	三七			
K ₂	2.903	2.657	2.753	2.543	皂苷			
K ₃	2.670	2.297	2.530	2.657	R ₁			
R	0.540	0.564	0.201	0.120				
K ₁	11.67	14.76	12.89	13.52	人参			
K ₂	14.45	13.47	13.95	12.59	皂苷			
K ₃	13.39	11.28	12.68	13.40	R _{g1}			
R	2.510	3.128	1.144	0.841				
K ₁	9.173	11.44	10.15	10.83	人参			
K ₂	11.14	10.76	10.83	9.887	皂苷			
K ₃	10.69	8.810	10.03	10.29	R _{b1}			
R	1.774	2.369	0.721	0.847				
K ₁	23.14	29.12	25.62	27.03	三种			
K ₂	28.50	26.88	27.53	25.02	皂苷			
K ₃	26.75	22.39	25.24	26.35	总和			
R	4.825	6.062	2.056	1.807				

表4 三七醇回流提取正交设计试验因素间方差分析表

评价指标	变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
三七皂苷 R ₁	A	0.5489	2	0.2744	17.6934	0.0535
	B	0.5934	2	0.2967	19.1289	0.0497
	C	0.0795	2	0.0397	2.5623	0.2807
	D*	0.0310	2	0.0155		
人参皂苷 R _{g1}	A	11.87	2	5.933	7.647	0.1156
	B	18.50	2	9.250	11.92	0.0774
	C	2.781	2	1.390	1.792	0.3582
	D*	1.552	2	0.7758		
人参皂苷 R _{b1}	A	6.387	2	3.193	4.7897	0.1727
	B	11.17	2	5.587	8.3795	0.1066
	C	1.121	2	0.5603	0.8404	0.5434
	D*	1.333	2	0.6667		
三种皂苷总和	A	44.76	2	22.38	7.163	0.1225
	B	70.48	2	35.24	11.28	0.0814
	C	8.981	2	4.490	1.437	0.4103
	D*	6.249	2	3.125		

表5 三七醇回流提取正交设计试验水平间方差分析表

评价指标	变异来源	对比水平组	P
三七皂苷 R ₁	A 因素	1 水平与 2 水平	0.0275
	B 因素	1 水平与 3 水平	0.0253
人参皂苷 R _{g1}	A 因素	1 水平与 2 水平	0.0606
	B 因素	1 水平与 3 水平	0.0403
三种皂苷总和	B 因素	1 水平与 3 水平	0.0430

对水平间有统计意义的分析结果及数据列于表 2~5 中。

各指标因素水平方差分析结果可知,影响因素由大到小顺序为:B>A>C,C 因素水平间皆无统计意义可取任意水平,从降低成本及经济角度来看 C 因素取 1 水平(即回流 0.5 h)为佳。

以三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 为评价指标,A 因素 1 水平与 2 水平有统计意义,2 水平三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 含量高于 1 水平,故取 2 水平(50% 乙醇),2 水平与 3 水平及其他指标的因素水平间皆无统计意义,可任选,从降低成本及经济角度来看取 2 水平(50% 乙醇)为佳。

以三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、三种皂苷总和为评价指标,B 因素 1 水平与 3 水平皆有统计意义,1 水平三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、三种皂苷总和含量高于 3 水平;2 水平与 3 水平及其他指标的因素水平间皆无统计意义,可任选,故取 1 水平(加入 50% 乙醇的体积是药材量的 10 倍)为佳。

综合上述结论,三七醇回流提取最优工艺参数为:三七药材超微粉加入 50% 的乙醇浸泡 30 min,50% 乙醇体积为药材量的 10 倍,水浴回流时间 0.5 h。

2.9 三七醇超声提取正交设计试验及结果分析

采用正交设计试验表安排试验,结果分析见表 6、表 7。

表6 三七醇超声提取正交设计试验及数据处理分析结果

列号	A	B	C	D	三七醇超声提取物中各成分含量(mg·g ⁻¹)			
					三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 R _{b₁}	三种皂苷总和
1	1	1	1	1	2.49	12.53	8.90	23.92
2	1	2	2	2	1.95	9.98	7.34	19.27
3	1	3	3	3	2.10	10.54	7.93	20.57
4	2	1	2	3	1.87	9.38	6.69	17.94
5	2	2	3	1	2.29	11.40	8.50	22.19
6	2	3	1	2	0.00	1.38	0.90	2.28
7	3	1	3	2	2.78	14.21	10.85	27.83
8	3	2	1	3	1.46	7.57	5.86	14.89
9	3	3	2	1	2.27	11.60	9.31	23.19
K ₁	2.180	2.380	1.317	2.350	三七			
K ₂	1.387	1.900	2.030	1.577	皂苷			
K ₃	2.170	1.457	2.390	1.810	R ₁			
R	0.7145	0.8316	0.9667	0.6965				
K ₁	11.02	12.04	7.160	11.84	人参			
K ₂	7.387	9.650	10.32	8.523	皂苷			
K ₃	11.13	7.840	12.05	9.163	R _{g₁}			
R	3.368	3.783	4.404	2.990				
K ₁	8.057	8.813	5.22	8.903	人参			
K ₂	5.363	7.233	7.780	6.363	皂苷			
K ₃	8.673	6.047	9.093	6.827	R _{b₁}			
R	2.981	2.492	3.489	2.288				
K ₁	21.25	23.23	13.70	23.10	三种			
K ₂	14.14	18.78	20.13	16.46	皂苷			
K ₃	21.97	15.35	23.53	17.80	总和			
R	7.055	7.100	8.857	5.980				

表7 三七醇超声提取正交设计试验因素间方差分析表

评价指标	变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
三七皂苷 R ₁	A	1.243	2	0.6215	1.317	0.4316
	B	1.280	2	0.6397	1.355	0.4246
	C	1.790	2	0.8952	1.896	0.3452
	D*	0.9441	2	0.4720		
人参皂苷 R _{g₁}	A	27.18	2	13.59	1.460	0.4065
	B	26.63	2	13.31	1.430	0.4114
	C	36.89	2	18.44	1.982	0.3354
	D*	18.61	2	9.307		
人参皂苷 R _{b₁}	A	18.59	2	9.295	1.693	0.3713
	B	11.56	2	5.780	1.053	0.4871
	C	23.28	2	11.64	2.121	0.3205
	D*	10.98	2	5.489		
三种皂苷总和	A	112.5	2	56.26	1.521	0.3967
	B	93.73	2	46.86	1.267	0.4411
	C	149.7	2	74.83	2.023	0.3308
	D*	73.78	2	36.99		

各指标因素间方差分析结果可知,影响因素由大到小顺序总的来说为:C > B > A, A、B、C 因素水平间皆无统计意义可取任意水平,从降低成本及经济角度来看 C 因素取 1 水平(即超声0.5 h)为佳,B

因素取 3 水平(加入乙醇的体积是药材量的 6 倍)为佳,A 因素取 1 水平(30%乙醇)为佳。

综合上述结论,三七醇超声提取最优工艺参数为:三七药材超微粉加入 30% 的乙醇浸泡 30 min, 30% 乙醇体积为药材量的 6 倍,超声时间0.5 h。

2.10 三七醇回流与超声提取差异比较

因三七超声提取各因素水平间皆无统计意义,可取任意水平,为比较两种提取方法的差异,采用配对 *t* 检验将两者正交设计试验表中三种皂苷总和测定结果对比分析,结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。回流提取的均值(26.13 mg·g⁻¹)优于超声提取的均值(19.12 mg·g⁻¹),故三七采用回流提取为佳。

2.11 三七醇回流验证试验

按最优工艺参数重复试验 3 次,结果见表 8。

表 8 反映出用三种皂苷总和作为评价指标时,三七醇回流工艺的稳定性。

2.12 三七醇回流提取次数的考察

三七超微粉用醇回流最优工艺条件提取 3 次,将 3 次提取的成分相加,作为总提取量,再计算每次

的提取转移率,结果见表9。

由表9可知,三七醇回流提取2次转移率可达95%以上,故确定提取2次。

2.13 三七醇回流提取物(干浸膏)转移率的考察

从三七超微粉中用醇回流最优工艺条件制成的醇提取物(干浸膏),制备过程中有效成分的损失情况可用提取转移率作为指标进行考察,方法是三七醇提取物(干浸膏)中各成分含量除以三七超微粉药材

中各成分含量,取百分数。所得结果见表10。

表8 三七醇回流验证试验结果($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

重复次数	三七皂苷 R_1	人参皂苷 R_{g_1}	人参皂苷 R_{b_1}	三种皂苷总和
1	3.19	15.88	12.37	31.43
2	2.94	14.16	11.22	28.33
3	3.05	14.85	11.66	29.55
$\bar{x} \pm s$	3.06 ± 0.12	14.96 ± 0.86	11.75 ± 0.58	29.77 ± 1.56
RSD(%)	3.922	5.749	4.936	5.240

表9 三七醇回流提取次数考察结果(含量: $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,转移率:%)

提取次数	三七皂苷 R_1		人参皂苷 R_{g_1}		人参皂苷 R_{b_1}		三种皂苷总和	
	含量	转移率	含量	转移率	含量	转移率	含量	转移率
1	3.06	77.47	14.96	78.08	11.75	78.54	29.77	78.20
2	0.69	17.47	3.34	17.43	2.57	17.18	6.60	17.34
3	0.20	5.06	0.86	4.49	0.64	4.28	1.70	4.47

表10 三七醇提取物(干浸膏)转移率的考察结果($n=3$)

	统计量	三七皂苷 R_1	人参皂苷 R_{g_1}	人参皂苷 R_{b_1}	三种皂苷总和
干浸膏药材	$\bar{x} \pm s$	3.06 ± 0.12	14.96 ± 0.86	11.75 ± 0.58	29.77 ± 1.56
	95%可信区间	2.649 ~ 3.371	12.81 ~ 17.11	10.31 ~ 13.19	25.89 ~ 33.65
	$\bar{x} \pm s$	3.7 ± 0.05	18.24 ± 0.23	14.85 ± 0.42	36.8 ± 0.62
	95%可信区间	3.576 ~ 3.824	17.66 ~ 18.82	13.81 ~ 15.89	35.30 ~ 38.30
转移率(%)	干浸膏/药材粉 $\times 100\%$	82.70	82.02	79.12	80.90

注:①含量单位 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,转移率单位%。②干浸膏与药材粉含水量基本上一致。

由表10结果可知,三七醇提取物(干浸膏)转移率平均值达到了80%以上。

3 讨论

3.1 超声波提取是利用超声波空化、机械、热学作用机制增大溶剂分子的运动速度及穿透力以高效提取中药有效成分的方法,具有省时、节能、提取效率高等优点,特别适合非水溶剂,目前药物分析供试品处理中超声波法逐渐取代了回流法,工业化生产中用的不多,因不一定适用所有的药物,应用上有局限性。本试验从三七中提取三种皂苷总和,试验结果表明,三种皂苷总和和加热条件下提取效率高,故醇回流法优于超声波提取法。

3.2 本试验得出的三七醇回流法提取最优工艺参数未见有相似的报道,故可为同类研究提供参考。

3.3 试验用样品采用三七醇提干浸膏粉,原因是HPLC测定需等很久,三七醇提液放置一段时间前后变化大、误差大、无可比性;另外,浓缩、干燥工艺皆相同,样品含水量接近,所以测定结果实际上反映的是提取工艺,故结果误差小,具可比性。

参 考 文 献

- 贺建东,付廷明,郭立玮. 湿式超微粉碎提取三七总皂苷及粒径对提取率的影响[J]. 世界科技研究与发展,2008,30(6):706-708
- 中国药典[S]. 2010年版.一部.13
- 何静雯,罗干明. 正交试验法优选三七提取工艺[J]. 中成药,2005,27(8):964-966
- 罗晓健,周书余,王丹蕾,等. 均匀设计优化三七总皂苷提取工艺[J]. 沈阳药科大学学报,2002,19(2):122-124
- 宋宏新,刘静,张彦娟. 半仿生酶法提取三七皂苷工艺研究[J]. 中草药,2009,40(6):905-907
- 马妮,高明菊,崔秀明,等. 三七皂苷成分的超声波提取研究[J]. 时珍国医国药,2005,16(9):854-855
- 刘志宝,王爱民,苏红. HPLC-ELSD法测定心脉通软胶囊中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} 的含量[J]. 中国中药杂志,2008,33(2):198-200
- 仇燕咪,李楠,李晓菲. HPLC测定三七粉及三七片中人参皂苷 R_{g_1} 、三七皂苷 R_1 的含量[J]. 中成药,2006,28(12):1851-1852
- 金阳. HPLC同时测定脑脉泰胶囊中三七皂苷 R_1 与人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} 的含量[J]. 中成药,2006,28(11):1581-1584

(2013-01-06 收稿 2013-04-07 修回)