

桑叶多糖超声-微波协同提取工艺优化及其抗氧化活性

张 华, 孟 博, 王 莉, 潘 婷, 谢 闰 虎, 朱 文 彬
(滁州学院材料与化学工程学院, 安徽 滁州 239000)

摘要: 目的 优化桑叶多糖超声-微波协同提取工艺, 并评价其抗氧化活性。方法 在单因素试验基础上, 以液料比、超声功率、微波功率、协同时间为影响因素, 多糖得率为评价指标, 响应面法优化提取工艺。考察多糖对 DPPH 自由基的清除作用。结果 最佳条件为液料比 25 : 1, 超声功率 139 W, 微波功率 250 W, 协同时间 14 min, 多糖得率为 5.19%。多糖对 DPPH 自由基具有一定清除能力, IC_{50} 为 0.513 2 mg/mL。结论 该方法稳定可靠, 可用于超声-微波协同提取抗氧化活性较强的桑叶多糖。

关键词: 桑叶; 多糖; 超声-微波协同提取; 抗氧化活性; 响应面法; DPPH 自由基

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)08-1972-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.08.002

Ultrasonic-microwave synergistic extraction process optimization and anti-oxidant activity for polysaccharides from *Mori Folium*

ZHANG Hua, MENG Bo, WANG Li, PAN Ting, XIE Run-hu, ZHU Wen-bin

(School of Materials Science and Chemical Engineering, Chuzhou University, Chuzhou 239000, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the ultrasonic-microwave synergistic extraction process for polysaccharides from *Mori Folium* and to evaluate the anti-oxidant activity. **METHODS** With liquid-solid ratio, ultrasonic power, microwave power and synergistic time as influencing factors, polysaccharides yield as an evaluation index, the extraction process was optimized by response surface method on the basis of single factor test. The scavenging effect of polysaccharides on DPPH free radical was investigated. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 25 : 1 for liquid-solid ratio, 139 W for ultrasonic power, 250 W for microwave power, 14 min for synergistic time, and the polysaccharides yield was 5.19%. The polysaccharides revealed a certain scavenging capacity on DPPH free radical with the IC_{50} of 0.513 2 mg/mL. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the ultrasonic-microwave synergistic extraction of polysaccharides with strong anti-oxidant activity from *Mori Folium*.

KEY WORDS: *Mori Folium*; polysaccharides; ultrasonic-microwave synergistic extraction; anti-oxidant activity; response surface method; DPPH free radical

桑叶为桑科植物桑树 *Morus alba* L. 的干燥叶, 具有祛风除湿、清肺润燥、平肝明目等功效^[1-2], 现代研究表明, 其主要活性成分为多糖、黄酮、生物碱、氨基酸、甾醇^[3]。其中, 多糖具有明显的降血糖、降血脂作用^[4], 在开发药品、保健品等方面前景广阔。

关于桑叶多糖的提取, 文献报道方法主要有热水浸提法、微波提取法、超声波提取法、酶解法^[5-8]等。其中, 超声波提取法利用超声波对溶剂

的空化作用和次级效应, 促进植物多糖浸出, 但其热效应不强, 需要较长时间才能达到足够高的提取温度; 微波提取法利用微波能量加热植物细胞内部, 使细胞内的活性成分更易释放^[9-10], 将上述 2 种方法相结合时, 具有提取率高、提取时间短、生物活性好的优点。目前, 已有将两者联合应用于植物天然成分提取的报道^[11-12], 但尚未涉及桑叶多糖。

因此, 本实验采用超声-微波协同提取桑叶多

收稿日期: 2020-01-03

基金项目: 国家级大学生创新训练项目 (201910377034); 安徽省大学生创新训练项目 (S201910377177)

作者简介: 张 华 (1989—), 女, 硕士, 讲师, 从事天然药物活性成分提取研究。Tel: 15755070386, E-mail: zhanghuaczu@163.com

糖, 响应面法优化工艺, 并考察该成分抗氧化活性, 以期为其深入开发及相关产品研制提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂与药物 桑叶采自滁州学院, 经滁州学院张伟钢副教授鉴定为正品。1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、葡萄糖 (纯度>99.5%)、维生素 C、无水乙醇、浓硫酸、苯酚均为国产分析纯。

1.2 仪器 SHZ-D (Ⅲ) 循环水式真空泵 (巩义市宇翔仪器有限公司); TU1810 紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); 微波超声波组合萃取仪 (上海比朗仪器制造有限公司); BSM-120 电子分析天平 (上海卓精电子科技有限公司)。

2 方法

2.1 桑叶多糖提取 称取一定量桑叶, 烘干粉碎后过 60 目筛, 石油醚脱脂, 80% 乙醇除去色素, 干燥, 密封置于干燥器中, 取适量按一定液料比加入蒸馏水后混合均匀, 超声-微波协同浸提, 抽滤, 75% 乙醇醇沉, 离心, 复溶, 再进行二次醇沉, 干燥至恒定质量, 即得桑叶多糖。称取 1.0 g, 加蒸馏水定容至 100 mL 作为样品溶液, 备用。

2.2 桑叶多糖得率测定 采用苯酚-硫酸法^[13-14], 在 490 nm 波长处测定吸光度, 以其为纵坐标 (A), 溶液质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程为 $A=2.1515X+0.00117$ ($r=0.9982$), 在 0.010~0.055 mg/mL 范围内线性关系良好。取 1 mL 样品溶液于试管中, 加入蒸馏水 1 mL、5% 苯酚溶液 1 mL、浓硫酸 5 mL, 水浴反应 15 min, 在 490 nm 波长处测定吸光度, 代入上述回归方程测定溶液质量浓度, 计算桑叶多糖得率, 公式为得率= $n \times c \times V / m \times 100\%$, 其中 n 为稀释倍数; c 为溶液质量浓度, 单位 g/mL; V 为提取物定容体积, 单位 mL; m 为样品质量, 单位 g。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度的试验 吸取 0.1 mg/mL D -无水葡萄糖对照品溶液 0.5 mL, 按“2.2”项下方法平行测定 6 次吸光度, 测得其 RSD 为 1.86%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一批桑叶多糖, 按“2.1”项下方法制备 6 份样品溶液, 按“2.2”项下方法测定吸光度, 测得其 RSD 为 1.29%, 表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 按“2.1”项下方法制备样品溶液, 室温下于 0、2、4、8、10、12 h 按

“2.2”项下方法测定吸光度, 测得其 RSD 为 1.39%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.4 加样回收率试验 吸取 9 份“2.1”项下样品溶液, 按 50%、100%、150% 水平加入 D -无水葡萄糖对照品溶液, 平行 3 份, 按“2.2”项下方法测定吸光度, 测得其平均加样回收率分别为 95.82%、97.62%、96.57%, RSD 分别为 1.63%、1.21%、1.89%。

2.4 DPPH 清除率测定 参考文献 [15], 称取 1.0 g 桑叶多糖, 无水乙醇制成不同质量浓度溶液, 各取 1.0 mL, 加 0.1 mmol/L DPPH 乙醇溶液 2.0 mL, 室温下避光反应 30 min, 于 517 nm 波长处测定吸光度 A_i ; 以无水乙醇代替 DPPH 乙醇溶液, 测定吸光度 A_j ; 以蒸馏水代替样品溶液, 测定吸光度 A_0 , 计算桑叶多糖对 DPPH 自由基的清除率, 公式为清除率= $\{ [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \} \times 100\%$ 。

3 结果

3.1 单因素试验

3.1.1 液料比 在超声功率 100 W、微波功率 250 W、提取时间 10 min 的条件下, 考察液料比对多糖得率的影响, 结果见图 1。由此可知, 液料比 10:1~25:1 (mL/g) 时多糖得率逐渐升高, 在 25:1 (mL/g) 时达到最大, 之后略有下降, 其原因可能是液料比升高时溶剂增多, 传质速率变大, 可促进多糖溶出, 但溶剂过多容易造成超声波、微波的大部分能量作用于溶剂上, 作用于物料上的减少^[16]。因此, 本实验选择 20:1、25:1、30:1 (mL/g) 进行响应面优化。

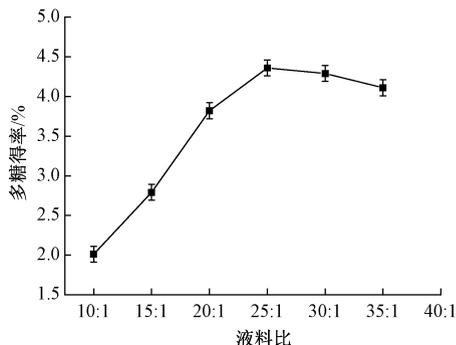


图 1 液料比对多糖得率的影响

Fig. 1 Effect of liquid-solid ratio on polysaccharides yield

3.1.2 超声功率 在液料比 20:1、微波功率 250 W、提取时间 10 min 的条件下, 考察超声功率对多糖得率的影响, 结果见图 2。由此可知, 超声功率 50~150 W 时多糖得率逐渐升高, 在 150 W 时达到最大, 但之后反而降低, 其原因可能是超声波

振动会产生较强的空化和剪切效应，使多糖传质效率提高，但振动过大可破坏其糖苷键^[17]。因此，本实验选择 100、150、200 W 进行响应面优化。

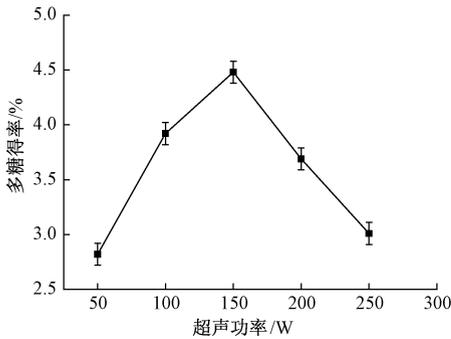


图2 超声功率对多糖得率的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic power on polysaccharides yield

3.1.3 微波功率 在液料比 20 : 1、超声功率 100 W、提取时间 10 min 的条件下，考察微波功率对多糖得率的影响，结果见图 3。由此可知，随着微波功率升高，多糖得率先增后减，在 250 W 时达到最大，其原因可能为微波功率升高可使温度快速上升，多糖溶出速度变大，溶出量增多，但功率过大可阻碍介质渗入^[18]。因此，本实验选择 150、200、250 W 进行响应面优化。

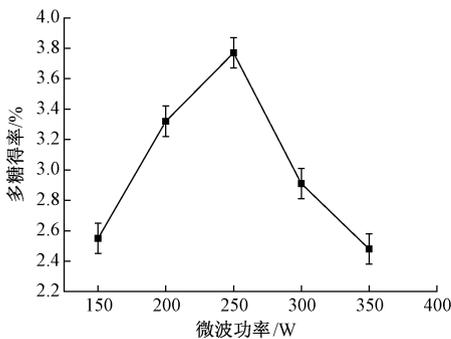


图3 微波功率对多糖得率的影响

Fig. 3 Effect of microwave power on polysaccharides yield

3.1.4 协同时间 在液料比 20 : 1、超声功率 100 W、微波功率 250 W 的条件下，考察协同时间对多糖得率的影响，结果见图 4。由此可知，多糖得率随着协同时间延长而升高，在 15 min 时达到最大，但继续延长时反而下降，其原因可能为多糖结构和性质在较长时间的超声-微波作用下可降解为单糖^[19-20]。因此，本实验选择 10、15、20 min 进行响应面优化。

3.2 响应面法优化 在单因素试验基础上，选择液料比 (A)、超声功率 (B)、微波功率 (C)、协同时间 (D) 作为影响因素，多糖得率 (Y) 作为评价指标，响应面法^[21]优化提取工艺。因素水平

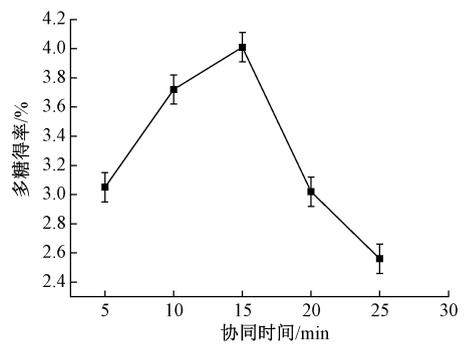


图4 协同时间对多糖得率的影响

Fig. 4 Effect of synergistic time on polysaccharides yield

见表 1，结果见表 2。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	A 液料比	B 超声功率/W	C 微波功率/W	D 协同时间/min
-1	20 : 1	100	200	10
0	25 : 1	150	300	15
1	30 : 1	200	400	20

表 2 试验设计与结果

Tab. 2 Design and results for tests

试验号	A	B	C	D	Y 多糖得率/%
1	0	0	1	-1	3.28
2	0	1	1	0	2.47
3	0	0	0	0	5.12
4	0	-1	-1	0	3.09
5	-1	0	-1	0	3.52
6	1	1	0	0	3.43
7	0	0	0	0	5.08
8	-1	0	0	1	3.04
9	-1	1	0	0	4.02
10	0	1	0	-1	3.29
11	0	-1	0	-1	4.36
12	1	0	0	1	3.83
13	0	0	0	0	5.27
14	0	-1	0	1	3.05
15	-1	0	0	-1	4.48
16	1	-1	0	0	4.56
17	0	0	0	0	5.18
18	0	1	-1	0	2.92
19	0	0	1	1	2.17
20	1	0	1	0	3.82
21	1	0	0	-1	4.16
22	0	0	-1	1	2.37
23	0	-1	1	0	3.09
24	-1	-1	0	0	4.01
25	0	0	0	0	5.21
26	-1	0	1	0	3.01
27	1	0	-1	0	3.48
28	0	0	-1	-1	3.20
29	0	1	0	1	2.69

通过 Design-Expertv8.0.6 软件进行拟合, 得到二次回归方程为 $Y=0.57+0.100A-0.28B-0.062C-0.4D-0.28AB+0.21AC+0.28AD-0.11BC+0.18BD-0.070CD-0.31A^2-0.85B^2-1.42C^2-0.99D^2$, 模型决定系数 $R^2=0.9922$, 调整系数 $R^2_{adj}=0.9845$, 均接近于 1, 表明模型一致性良好; 变异系数为 3.06%, 表明模型拟合程度理想, 方差分析见表

3。由此可知, 模型 $P<0.0001$, 表明它有显著意义; 失拟项 $P>0.05$, 表明失拟程度不显著; 各因素影响程度依次为协同时间>超声功率>液料比>微波功率, B 、 D 、 AB 、 AD 、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 有显著影响 ($P<0.05$, $P<0.01$), 表明该模型能用于预测。响应面分析见图 5。

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	22.98	14	1.64	128.01	<0.0001
A	0.12	1	0.12	9.36	0.0085
B	0.93	1	0.93	72.50	<0.0001
C	0.046	1	0.046	3.56	0.0801
D	2.63	1	2.63	205.27	<0.0001
AB	0.32	1	0.32	25.34	0.0002
AC	0.18	1	0.18	14.09	0.0021
AD	0.31	1	0.31	24.02	0.0002
BC	0.051	1	0.051	3.95	0.0669
BD	0.13	1	0.13	9.83	0.0073
CD	0.02	1	0.02	1.53	0.2367
A^2	0.6	1	0.6	47.11	<0.0001
B^2	4.72	1	4.72	367.79	<0.0001
C^2	13.13	1	13.13	1023.88	<0.0001
D^2	6.3	1	6.3	490.98	<0.0001
残差	0.18	14	0.013	—	—
失拟项	0.16	10	0.016	2.82	0.1646
纯误差	0.022	4	5.57×10^{-3}	—	—
总和	23.16	28	—	—	—

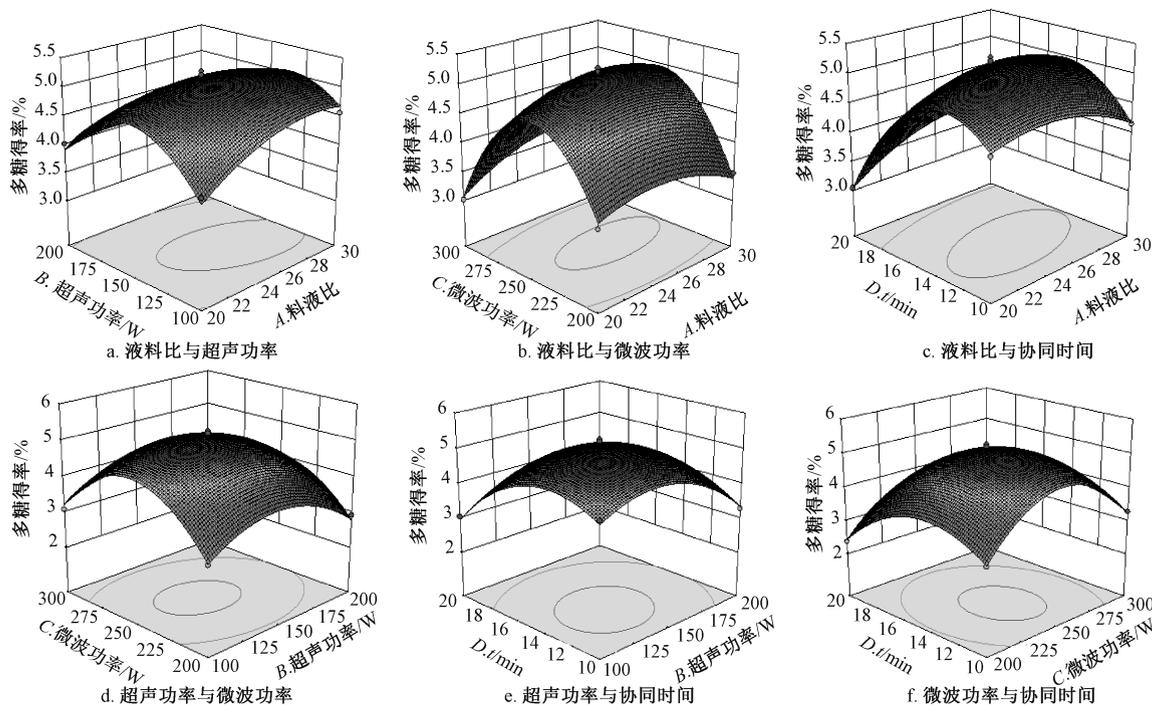


图 5 各因素响应面图

Fig. 5 Response surface plots for various factors

通过 Design-Expert8.0.6 软件进行拟合, 得到最优工艺为液料比 25.49 : 1, 超声功率 139.3 W, 微波功率 250.19 W, 协同时间 13.82 min, 桑叶多糖得率为 5.264 6%, 为了便于实际操作, 将其修正为液料比 25 : 1, 超声功率 139 W, 微波功率 250 W, 协同时间 14 min。对上述优化工艺进行 3 批验证试验, 测得桑叶多糖平均得率为 5.19%, 与预测值 5.264 6% 接近, 表明模型稳定可靠。再将本实验所用的超声-微波协同提取与热水浸提^[5]、微波提取^[6]、超声提取^[7]进行比较, 结果见表 4, 可知该方法提取时间更短, 多糖得率更高。

表 4 4 种提取方法比较

Tab. 4 Comparison of four extraction methods

提取方法	提取时间/min	多糖得率/%
热水浸提	85	4.33
微波提取	10	4.26
超声提取	30	2.99
超声-微波协同提取	15	5.19

3.3 抗氧化活性研究 图 6 显示, 多糖溶液质量浓度与 DPPH 自由基清除率呈正比, IC₅₀ 为 0.513 2 mg/mL, 表明它具有较强的抗氧化活性。

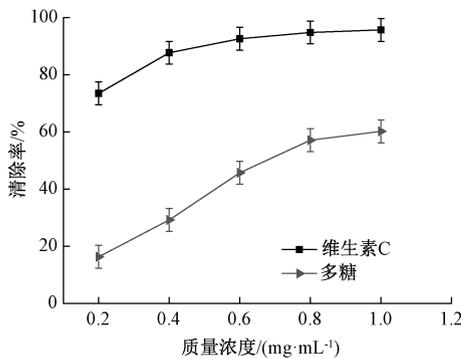


图 6 多糖对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 6 Scavenging effect of polysaccharides on DPPH free radical

4 讨论

桑叶多糖主要由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖等组成^[22], 具有明显的免疫调节、抗氧化、降血糖等作用。桑叶作为我国传统中药, 具有安全性好、无不良反应的优点, 而且资源丰富, 在医药方面的应用越来越受到重视, 多糖作为其主要活性成分之一, 目前相关研究主要集中在单糖组成、糖苷键类型、分子极性, 鲜有涉及提取工艺。本实验进行超声-微波协同提取桑叶多糖, 该方法操作简单, 提取时间短, 多糖得率高, 最优工艺为液料比 25 : 1, 超声功率 139 W, 微波功

率 250 W, 协同时间 14 min, 平均得率为 5.19%。验证试验结果显示, 该工艺合理可行, 准确稳定, 可为桑叶多糖的工业化生产提供参考。

现代研究表明, 桑叶多糖能有效减少体内氧自由基及脂褐质^[23]; 本实验对该成分抗氧化活性进行评价, 发现它具有明显的清除 DPPH 自由基能力, IC₅₀ 为 0.513 2 mg/mL。由此可知, 超声-微波协同提取的桑叶多糖具有较好的抗氧化活性, 可为相关药物的研发提供参考。

参考文献:

[1] 钱超尘. 神农本草经校注[M]. 北京: 学苑出版社, 2008.
 [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 115.
 [3] 程莹, 赵骏. 桑叶多糖含量测定与成分分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(18): 1803-1805; 1809.
 [4] Li Y G, Ji D F, Zhong S, et al. Hybrid of 1-deoxynojir-imycin and polysaccharide from mulberry leaves treat diabetes mellitus by activating PDX-1/insulin-1 signaling pathway and regulating the expression of glucokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in alloxan-induced diabetic mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134 (3): 961-970.
 [5] 魏文杰, 李浩浩. Box-Behnken-响应面法优化桑叶总多糖提取工艺[J]. 农业科学研究, 2018, 39(4): 5-11; 17.
 [6] 黄山, 吕明, 公衍玲. 微波法提取桑叶多糖的工艺条件研究[J]. 中国林副特产, 2009(5): 7-10.
 [7] 王丰俊, 王建中, 郝俊, 等. 响应面法优化超声波辅助提取桑叶多糖的工艺研究[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(5): 142-146.
 [8] 夏平, 谢何青. 复合酶法提取桑叶中多糖的工艺条件优化[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(1): 198-199.
 [9] 李萍, 秦国正, 付双, 等. 打破碗花花多糖微波提取工艺的优化及其抗氧化活性[J]. 中成药, 2018, 40(4): 954-957.
 [10] Xie J H, Shen M Y, Xie M Y, et al. Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 89(1): 177-184.
 [11] 王峰, 孙倩, 侯月盈, 等. 离子液体协同超声微波提取秦皮总香豆素工艺的优化[J]. 中成药, 2017, 39(9): 1947-1950.
 [12] 陈宇航, 岳凤丽, 张洁, 等. 超声微波协同提取豆渣中水溶性多糖的工艺优化[J]. 食品工业, 2017, 38(6): 148-152.
 [13] 王瑞娟, 楚渠, 褚苏, 等. 15份桑叶中多糖和γ-氨基丁酸含量的测定[J]. 陕西农业科学, 2018, 64(10): 74-75; 99.
 [14] 蒋德旗, 蒋荣棠, 夏家朗, 等. 复合酶提取金樱子根多糖工艺的优化及其抗氧化活性[J]. 中成药, 2018, 40(11):

- 2421-2425.
- [15] 韦献雅, 殷丽琴, 钟 成, 等. DPPH 法评价抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 317-322.
- [16] 和法涛, 刘光鹏, 朱凤涛, 等. 微波超声波组合提取猴头菇多糖工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(1): 74-82.
- [17] 宋思圆, 苏 平, 王丽娟, 等. 响应面试验优化超声提取黄秋葵花果胶多糖工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 283-289.
- [18] 应瑞峰, 黄梅桂, 王耀松, 等. 超声波微波协同提取青钱柳超微粉多糖及活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(23): 32-37.
- [19] 杜晓平, 郑明珠, 刘景圣. 超声波破壁提取松花粉多糖的工艺研究[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 308-311.
- [20] 鞠兴荣, 税 丹, 何 荣, 等. 响应面分析法优化莱籽多糖酸法提取工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(3): 89-93.
- [21] 周 吉, 陈章元, 蔡 芹, 等. 响应面法优化黄连-罗汉果药对中降糖成分的超声提取工艺研究[J]. 化学研究与应用, 2019, 31(6): 1021-1027.
- [22] 杨 雨, 欧阳 臻, 常 钰, 等. 桑叶不同组分降血糖作用研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 454-456.
- [23] 王婷婷, 马天宇, 李 琪, 等. 桑叶化学成分及生物活性研究进展[J]. 食品与药品, 2018, 20(5): 390-393.

黄连膏提取工艺优化及其体外抗炎活性

王远茜¹, 韩 冰¹, 王 丹², 王思明¹, 李 娜^{1*}, 赵大庆^{1*}

(1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117; 2. 长春金赛药业股份有限公司, 吉林 长春 130012)

摘要: 目的 优化黄连膏提取工艺, 并评价其体外抗炎活性。方法 以药材粒度、煎炸时间、煎炸温度、浸泡时间为影响因素, 姜黄素总量为评价指标, 正交试验优化提取工艺。检测黄连膏提取油(0.05、0.5、1 $\mu\text{L}/\text{mL}$)对Hacat细胞中TARC、MDC、RANTES、IL-8水平的抑制作用。结果 最佳工艺为饮片不浸泡而直接投入5倍量香油中, 200 $^{\circ}\text{C}$ 下煎炸4 h, 姜黄素总量为1.198 g。黄连膏提取油降低了TARC、MDC、RANTES、IL-8水平, 并呈剂量依赖性($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 该方法稳定可行, 可用于提取体外抗炎活性较强的黄连膏。

关键词: 黄连膏; 提取; 体外抗炎活性; 正交试验; 炎症因子; Hacat细胞

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)08-1977-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.08.003

Extraction process optimization and *in vitro* anti-inflammatory activity of Huanglian Ointment

WANG Yuan-xi¹, HAN Bing¹, WANG Dan², WANG Si-ming¹, LI Na^{1*}, ZHAO Da-qing^{1*}

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Changchun Jinsai Pharmaceutical Co., Ltd., Changchun 130012, China)

ABSTRACT: AIM To optimize the extraction process for Huanglian Ointment and to evaluate the *in vitro* anti-inflammatory activity. **METHODS** With particle size of medicinal material, frying time, frying temperature and soaking time as influencing factors, total amount of curcumin as an evaluation index, the extraction process was optimized by orthogonal test. The inhibitory effects of Huanglian Ointment extract oils (0.05, 0.5, 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) on TARC, MDC, RANTES and IL-8 levels in Hacat cells were detected. **RESULTS** The optimal process was determined that decoction pieces were directly put into 5 times amount of sesame oil without soaking and fried for 4 h at 200 $^{\circ}\text{C}$, the total amount of curcumin was 1.198 g. The Huanglian Ointment extract oils decreased TARC,

收稿日期: 2020-03-06

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20190304097YY)

作者简介: 王远茜(1994—), 女, 硕士生, 从事中药药效物质基础研究。Tel: 18043918086, E-mail: Wangyx011@163.com

* 通信作者: 李 娜(1978—), 女, 博士, 研究员, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: lhln@botmail.com

赵大庆(1963—), 男, 博士, 研究员, 从事中药有效成分研究与开发。E-mail: zhaodaqing1963@163.com