

大孔树脂精制芦荟叶黄酮的研究

杨武英,上官新晨,吴磊燕,杨勇,李洪敏,姜醒

(江西农业大学 食品科学与工程学院 植物资源开发与利用研究室 江西 南昌 330045)

摘要:研究了大孔树脂对芦荟叶干粉中黄酮的最佳精制工艺。在相同条件下对五种不同的大孔树脂静态吸附率和解吸率的进行测定,优选出树脂,并研究了优选树脂在不同条件下对芦荟叶干粉中黄酮的静态、动态吸附与解吸特性,确定了树脂精制芦荟叶干粉中黄酮的最佳工艺。结果表明:芦荟叶干粉黄酮精制优选大孔树脂为 H1020,在室温下,吸附液 pH 为 3.0,静态吸附能力最强,解吸剂以体积分数 φ (乙醇) = 80% 的效果最好;动态吸附以芦荟黄酮粗提物溶液的质量浓度为 12 mg/mL 吸附效果最好,解吸以体积分数 φ (乙醇) = 80% 流速为 2.0 mL/min 洗脱效果最好。

关键词:芦荟;黄酮;大孔树脂;精制

中图分类号:S567.23⁺9;Q946.8 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0169-06

A Study on the Purification of the Flavonoids from Aloe Leaf Powder with Macroporous Resin

YANG Wu-ying, SHANGGUAN Xin-chen, WU Lei-yan, YANG Yong, LI Hong-min, JIANG Xing

(College of Food Science and Engineering, Plant Resource Exploitation & Utilization Research Room, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: The purification of the flavonoids from aloe leaf powder with macroporous resin was studied. The static adsorption rate and desorption rate of five different macroporous resins were surveyed under the same conditions to select the best one. The optimum purified technic was confirmed by studying the static and dynamic absorption and desorption of flavonoids with the best resin under different conditions. The result indicated that the optimum macroporous resin was H1020, and its static adsorptive ability was the strongest at room temperature and pH = 3, the most effective desorption could be obtained with 80% volume fraction alcohol. The best dynamic absorption was obtained at room temperature and crude flavonoids solution at 12 mg/mL, the most effective desorption was also obtained with 80% volume fraction alcohol at 2.0 mL/min desorption rate.

Key words: Aloe; flavonoids; macroporous resin; purification

芦荟系百合科芦荟属,是多年生常绿肉质草本植物,原产非洲,目前在世界上很多地区都有分布^[1]。芦荟具有收敛、催眠、强身、清胃、通便功效,可治疗黄疸、器官溃疡、痔疮、淤血、脓肿、疥疮、眼疾和口腔炎症等多种疾病^[2]。芦荟中主要含有蒽醌、多糖、黄酮类化合物、有机酸、蛋白质、多肽、氨基酸以及多种微量元素等多种有效成分^[3-4]。研究表明芦荟中黄酮类化合物主要包括槲皮素和芦丁两大类,槲皮素具有较好的祛痰、止咳、平喘作用,并有降低血压、治疗支气管炎和预防冠心病的作用,芦丁具有抗炎、抗病毒及维生素 P 样作用,可用于防治脑出血、视网膜出血、高血压、急性血性肾炎,治疗慢性

收稿日期:2009-09-03 修回日期:2009-12-09

基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ08195)

作者简介:杨武英(1971-)女,副教授,博士生,主要从事植物资源开发利用研究, E-mail: yangwuyi2003@yahoo.com.cn.

气管炎等^[5-6]具有潜在的开发利用价值。采用溶剂法提取的芦荟黄酮粗提物中存在多种杂质,必须对其纯化。在各种分离纯化方法中,大孔树脂由于具有物理化学稳定性高、比表面积大、吸附和交换容量大、速度快、选择性好、吸附条件温和、再生处理方便、强度高、使用寿命长等优点,在黄酮类化合物纯化中应用广泛^[7-10],但大孔树脂纯化芦荟黄酮的研究未见报道。本试验从 5 种大孔树脂中进行筛选,研究大孔树脂对芦荟黄酮的吸附特性,以期建立合适的芦荟黄酮纯化的条件,为芦荟的产业化开发利用提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

芦荟叶干粉:购于南通德福芦荟制品有限公司。

1.2 主要试剂

芦丁标准对照品购于中国药品生物制品检定所;乙醇、亚硝酸钠、氢氧化钠、三氯化铝均为分析纯;柱层析用 H1020、D301、AB-8、X-5、NKA-25 种大孔吸附树脂全部购于上海摩速科学器材有限公司。

1.3 主要仪器

“弘祥隆”HF-20B 超声循环提取机、旋转蒸发仪、真空冷冻干燥机、层析柱、754pc 紫外可见分光光度计。

1.4 试验方法

1.4.1 标准曲线的制备^[11,12] 精确称取 120 °C 干燥恒重的芦丁标准品 10 mg,加体积分数 φ (乙醇) = 80% 溶解,定容至 25 mL 容量瓶中,摇匀。精密吸取标准品溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL,分别置于 10 mL 试管中,加质量分数 ρ (亚硝酸钠) = 5% 0.3 mL,放置 6 min 后,加质量分数 ρ (硝酸铝) = 10% 0.3 mL,放置 6 min,再加质量分数 ρ (氢氧化钠) = 4% 的 4 mL,加水至刻度,摇匀,放置 15 min。用 754PC 型分光光度计进行全波长扫描,根据最大吸收波长做标准曲线,根据不同浓度下吸光度值经最小二乘法作线性回归,得回归方程。

1.4.2 芦荟叶黄酮含量测定 准确吸取 0.6 mL 样品溶液按标准曲线测吸光度,根据回归方程计算样品中的总黄酮含量。芦荟叶干粉总黄酮含量计算公式如下:

$$\text{总黄酮含量} = \frac{(0.2545A + 0.0003) \times V}{0.6 \times M} \times 100\% \quad (1)$$

(1) 式中: V 为初提物溶液定容后的体积/mL; M 为初提物的质量/g。

1.4.3 芦荟叶黄酮粗提物的制备 1 kg 芦荟叶干粉用“弘祥隆”HF-20B 超声循环提取机提取,以体积分数 φ (乙醇) = 80% 的作溶剂,提取功率为 1 000 W,料液比 1:20,提取时间为 20 min,然后过滤浓缩,再经真空冷冻干燥得到芦荟叶干粉黄酮粗提物,经 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法检测总黄酮含量为 3.24%。

1.4.4 大孔树脂的预处理 用无水乙醇浸泡 24 h,充分溶胀,用无水乙醇淋洗至洗出液加适量水无白色浑浊现象为止,再用去离子水洗至无乙醇,沥干树脂中水分备用。

1.4.5 大孔树脂的优选 吸附树脂的吸附性能与被吸附分子的极性、分子大小、吸附剂的极性、比表面积、孔径大小等因素有关。为分离、富集、纯化芦荟叶干粉中的总黄酮,选用以下几种进行试验,所选树脂的物理参数(来自厂家)见表 1。准确称取各种已经预处理的大孔树脂 1.000 g 各 3 份,分别置于不同的 150 mL 三角瓶中,加入 50 mL 一定浓度芦荟叶黄酮粗提物溶液,置振荡器上 30 °C、110 r/min 振荡吸附 24 h,将树脂滤出,测定滤液中剩余总黄酮浓度。将吸附平衡的树脂立即放入磨口三角瓶中,精确加入体积分数 φ (乙醇) = 60% 的 25 mL,置振荡器上 30 °C、110 r/min 再振荡 24 h,然后再将树脂滤出,测定洗脱液中总黄酮浓度。根据各种大孔树脂的吸附率、吸附量、解吸率、解析量,从而优选出最佳树脂。大孔树脂的吸附率、吸附量、解吸率、解析量按下式计算:

$$Q_a = (C_o - C_r) V_a / W \quad \alpha / \% = [(C_o - C_r) / C_o] \times 100 \quad (2)$$

$$Q_d = C_d \times V_d / W \quad \beta / \% = [(C_d \times V_d) / (C_o - C_r) \times V_a] \times 100 \quad (3)$$

(2)、(3) 式中 α 为吸附率(%); Q_a 为吸附量(mg/g); C_o 为黄酮初始质量浓度(mg/mL); C_r 为吸附平衡后黄酮质量浓度(mg/mL); V_a 为黄酮溶液体积(mL); W 为树脂质量(g); Q_d 为解吸量(mg/g); C_d 为解吸液质量浓度(mg/mL); V_d 为解吸液体积(mL); β 为解吸率(%)。

表 1 5 种大孔树脂的物理参数
Tab.1 Physical characters of 5 kinds of macroporous resin

树脂 Resin	极性 Polar	粒径范围/mm Size range	比表面积/($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) Specific surface area	平均孔径/ \AA Average pore size	孔容/($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$) Pore volume
NKA-2	极性	0.3 ~ 1.25	160 ~ 200	145 ~ 155	0.62 ~ 0.66
AB-8	弱极性	0.3 ~ 1.25	480 ~ 520	130 ~ 140	0.73 ~ 0.77
D301	弱极性	0.50 ~ 0.70			
H1020	非极性	0.3 ~ 1.25	1 000 ~ 1 100	85 ~ 95	1.08 ~ 1.12
X-5	非极性	0.3 ~ 1.25	500 ~ 600	290 ~ 300	1.20 ~ 1.24

1.4.6 不同条件下大孔树脂静态吸附与解析特性的研究 (1) 温度对树脂静态吸附性能的影响。称取 12 份由 1.4.5 中优选出的大孔树脂 1.000 0 g, 分别加入具塞三角瓶中, 再加入同体积、一定浓度的芦荟叶黄酮粗提物溶液, 然后分别在 20、30、40、50 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温振荡 (110 r/min, 每组 3 个重复) 最后在相同时间下收集一定量的上清液, 取上清液 0.6 mL 按标准曲线的制备方法, 自“加质量分数 ρ (亚硝酸钠) = 5% 0.3 mL”起依次操作, 测定吸光度, 根据回归方程计算上清液中的总黄酮浓度, 吸附率计算公式同 1.4.5。

(2) 不同 pH 值对大孔树脂静态吸附性能的影响。称取 21 份由 1.4.5 中优选出的大孔树脂 1.000 0 g, 分别加入具塞三角瓶中, 加入同体积、同浓度、不同 pH (每组 3 个重复) 的芦荟黄酮粗提物溶液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下, 170 r/min 振荡吸附相同的时间后收集一定量的上清液, 取上清液 0.6 mL 按标准曲线的制备方法, 自“加质量分数 ρ (亚硝酸钠) = 5% 0.3 mL”起依法测定吸光度, 根据回归方程计算上清液中的总黄酮浓度, 吸附率计算公式同 1.4.5。

(3) 洗脱剂对大孔树脂的静态解吸效果的影响。称取 18 份经活化后的大孔树脂 1.000 g 于具塞三角瓶中, 加入同体积、相同浓度的芦荟黄酮粗提物溶液, 20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡至吸附饱和, 再分别加入体积分数 φ (乙醇) = 0%、20%、40%、60%、80%、100% 的溶液 30 mL (每组 3 个重复), 恒温振荡进行解吸一定时间, 取洗脱液 0.6 mL 按标准曲线的制备方法, 自“加质量分数 ρ (亚硝酸钠) = 5% 0.3 mL”起依法测定吸光度, 根据回归方程计算洗脱液中的总黄酮浓度, 解吸量计算公式同 1.4.5。

1.4.7 不同条件下大孔树脂动态吸附与解吸特性研究 (1) 料液浓度对大孔树脂动态吸附性能的影响。称取一定量由 1.4.5 中优选出的大孔树脂, 以湿法装入内径为 1.2 cm 的柱中, 使柱高为 10 cm; 室温条件下, 以流速为 2.0 mL/min 对质量浓度分别为 8、12 和 16 mg/mL 的芦荟黄酮粗提物溶液进行上柱, 并收集流出液, 测定流出液中芦荟总黄酮含量, 如吸附饱和则停止吸附, 考察芦荟黄酮粗提物溶液浓度对树脂吸附性能的影响。

(2) 洗脱剂对大孔树脂动态解吸效果的影响。分别将吸附芦荟黄酮达到饱和的大孔树脂湿法上柱, 使柱高为 10 cm, 用体积分数 φ (乙醇) = 40%、60%、80% 的溶液分别进行洗脱, 流速为 2.0 mL/min, 每管收集 2 min, 考察不同浓度洗脱剂对树脂解吸性能的影响。

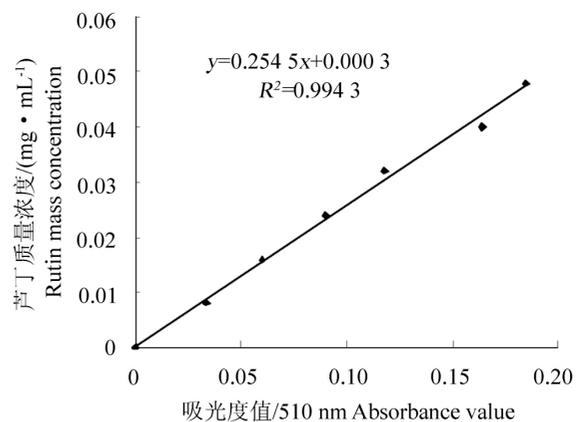


图 1 芦丁标准曲线

Fig. 1 The standard curve of rutin

2 结果与分析

2.1 工作曲线及线性回归方程

754PC 型分光光度计全波长扫描后得最大吸收波长为 510 nm, 根据最大吸收波长做标准曲线所得回归方程为: $C = 0.2545A + 0.0003$, $R^2 = 0.9943$, 见图 1。

表 2 5 种大孔吸附树脂对芦荟总黄酮的静态吸附效果比较

Tab. 2 Comparison of static adsorption of 5 kinds of macroporous resin to total flavonoids in aloe leaf powder

大孔树脂 Macroporous resin	吸附率/% Adsorption rate	吸附量/(mg · g ⁻¹) Adsorption amount	解吸率/% Desorption rate	解吸量/(mg · g ⁻¹) Desorption amount
H1020	92.67	65.23	29.94	19.53
D301	75.37	53.32	15.85	8.45
AB-8	80.45	56.96	32.50	18.51
X-5	79.19	55.99	34.90	19.54
NKA-2	54.40	38.46	17.84	6.86

2.2 5 种大孔树脂对芦荟总黄酮的静态吸附效果比较

大孔吸附树脂对芦荟叶干粉黄酮粗提物溶液中总黄酮的良好吸附作用要求吸附树脂具有适当的孔径、较高的比表面积和对黄酮有接近的极性。芦荟叶中含的总黄酮物质主要为芦丁和槲皮素,它们的极性较小。由表 2 可以看出,吸附量较大的树脂多为非极性和弱极性,如 H1020、AB-8 等。同时,树脂比表面积和孔径对吸附效果也有很大的影响,随着比表面积增加,表面张力随之增大,吸附量提高,对吸附有利,如 H1020 吸附树脂;另外,孔径大小也直接影响不同大小分子的自由出入,从而使树脂吸附具有一定的选择性,大的孔径虽然有利于溶质的扩散,但同时缺乏吸附的选择性,各种大小的分子都可以进入树脂内部,可能存在着各种溶质分子之间的竞争吸附,以至于总黄酮成分不能被很好地吸附,如 X-5,而 H1020 树脂的吸附量最大,是因为其孔径大小适宜,阻止了一些大分子溶质的进入,减少了竞争吸附。从试验结果可以看出,H1020 吸附树脂对芦荟叶干粉黄酮粗提物溶液中总黄酮有较好的吸附作用,加之解吸率较高,能达到对芦荟叶干粉黄酮粗提物溶液中总黄酮物质的富集纯化作用,因此,选用 H1020 吸附树脂进行对芦荟叶干粉黄酮粗提物溶液中总黄酮的吸附和解吸试验研究。

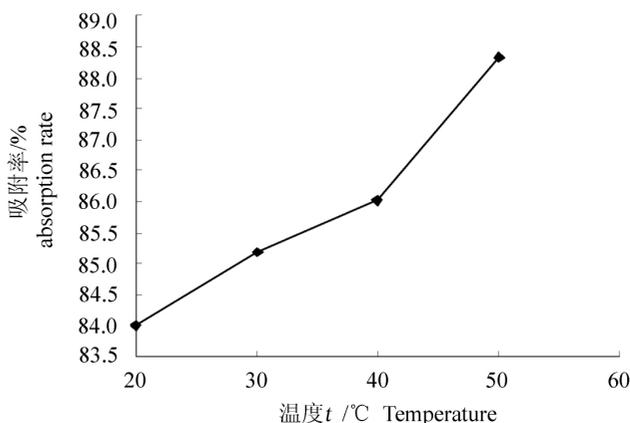


图 2 温度对 H1020 大孔树脂吸附率的影响

Fig. 2 Effects of temperature on H1020 macroporous resin adsorption rate

2.3 不同条件下 H1020 型大孔树脂静态吸附与解吸特性的研究结果

2.3.1 温度对 H1020 树脂静态吸附性能的影响 由于芦荟中的黄酮随温度的升高易发生水解和氧化,所以选择 60℃ 以下测定 H1020 型大孔树脂对其吸附能力。从图 2 中可以看出随着温度的上升,H1020 型大孔树脂的吸附率呈上升趋势,但是温度对其影响效果并不显著,所以从操作简便和保持芦荟黄酮活性考虑选择室温为大孔树脂吸附的环境温度。

2.3.2 pH 值对 H1020 树脂静态吸附性能的影响 从表 3 中可以看出,随着 pH 值的上升,H1020 型大孔树脂的吸附率先增加后显著下降,当 pH = 3 时吸附率最大,但考虑到操作的简便,并结合 pH = 4 时的吸附率的比较,选用 pH = 3 为吸附时的 pH 值条件。

2.3.3 洗脱剂浓度对 H1020 树脂的静态解吸效果的影响 解析量是衡量大孔树脂分离天然产物的又一重要技术参数。考虑到芦荟中的黄酮作为保健食品原料的安全性,选择乙醇水溶液为洗脱剂。由表 4 可知,体

表 3 pH 值对吸附率的影响

Tab. 3 Effects of pH value on adsorption rate

pH	吸附率/% Absorption rate
2	67.34
3	69.56
4	66.24
5	60.72
6	59.07
7	53.55
8	49.69

积分数 φ (乙醇) = 80% 的洗脱能力最好,其次为 60% 和 40% 的,洗脱液均澄清透明,蒸馏水洗脱效果最差。故选用体积分数 φ (乙醇) = 40%、60% 和 80% 的浓度作为洗脱剂进行后续动态解析。

2.4 不同条件下 H1020 型大孔树脂动态吸附与解吸特性研究结果

2.4.1 料液质量浓度对 H1020 树脂动态吸附性能的影响

芦荟中的黄酮粗提物溶液的质量浓度是影响大孔树脂吸附性能的重要因素之一,吸附树脂的吸附容量一般以较低质量浓度进行较为有利。如果原液质量浓度过高,则泄漏点早,处理量小,树脂使用周期短,从而树脂再生的次数增多;如果原液质量浓度偏低,工作效率降低。

从表 5 可知,芦荟黄酮粗提物的质量浓度为 12 mg/mL 时吸附量较合适,同时吸附时间也比较适宜,因此选择质量浓度为 12 mg/mL 的芦荟黄酮粗提物溶液作为吸附料液。

2.4.2 洗脱剂对 H1020 树脂动态解吸效果的影响

从图 3 中可以看出,体积分数 φ (乙醇) = 80% 洗脱最快,在第 35 管时基本洗脱干净;洗脱剂为体积分数 φ (乙醇) = 40% 时第 30 管基本洗脱干净;而洗脱剂为体积分数 φ (乙醇) = 60% 在第 35 管基本洗脱干净。故体积分数 φ (乙醇) = 80% 为最佳洗脱剂。

3 结论与讨论

5 种国产大孔树脂的静态吸附和解吸试验结果表明 H1020 型大孔吸附树脂对芦荟叶干粉黄酮粗提物溶液中的总黄酮有较好的吸附和解

吸效果。H1020 树脂静态吸附和解吸试验结果表明在室温下,吸附液 pH 为 3 时吸附效果较好,乙醇体积分数为 $\varphi = 80\%$ 时洗脱效果最好;动态吸附和解吸试验结果表明在室温下黄酮粗提物溶液质量浓度为 12 mg/mL、洗脱流速为 2.0 mL/min、体积分数 φ (乙醇) = 80% 作为解吸剂时比较适宜。大孔树脂在黄酮类化合物纯化中应用广泛,但用大孔树脂纯化芦荟黄酮的研究未见报道,由本试验结果可知 H1020 大孔树脂是纯化芦荟黄酮粗提物理想的吸附树脂,具有吸附量大,解吸率大的优点。笔者采用 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法对吸附前的芦荟黄酮醇粗提物中总黄酮含量及 H1020 大孔树脂一次吸附纯化后冷冻干燥所得物中总黄酮含量进行了检测,吸附前的为 3.24%,一次吸附纯化后的稳定在 35% 以上,纯度提高了 30% 以上,可见此大孔树脂纯化黄酮效果良好,基本能满足市场上要求的纯度 20%,所得物可作为一般药剂和保健食品的原料,并且此精制纯化工序操作简便,对环境污染很少,纯化时使用的乙醇可回收蒸馏后重复使用,树脂亦可处理后重复使用,故提取成本较低,适宜于工厂化生产。

表 4 不同浓度乙醇溶液对 H1020 树脂静态解析性能的影响

Tab. 4 Effect of different concentration ethanol on static desorption of H1020 macroporous resin

乙醇体积分数 / % Ethanol volume fraction	解吸量 / (mg · g ⁻¹) Desorption amount
0	2.83
20	12.48
40	20.57
60	25.08
80	27.45
100	25.49

表 5 料液质量浓度对动态吸附性能的影响

Tab. 5 Effect of concentration of mass crude flavone extracted from *Aloe* leaf powder solution on the dynamic adsorption of macroporous resin

料液质量浓度 / (mg · mL ⁻¹) Feed liquid mass concentration	泄漏点 / mL Weep point
8	272
12	152
16	104

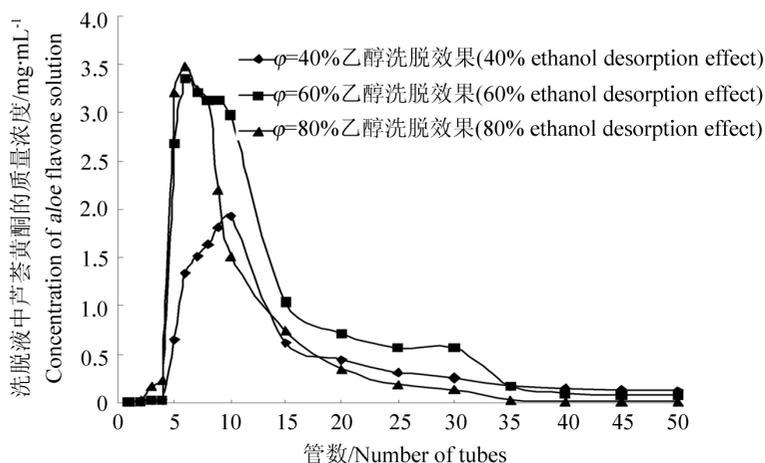


图 3 质量分数为 40%、60%、80% 的乙醇溶液动态洗脱曲线

Fig. 3 Dynamic desorption curves of macroporous resin with mass fraction of 40%、60% and 80% ethanol

参考文献:

- [1] 铁军, 白海艳. 芦荟的综合利用现状与发展趋势[J]. 中国野生植物资源 2006, 25(4): 22-24.
- [2] 张连富, 季宏武. 药食兼用资源与生物活性成分[M]. 北京: 化学工业出版社 2005: 146-147.
- [3] 戴光胜, 聂凌鸿. 芦荟功能性食品资源的开发利用[J]. 现代食品科技 2006, 9(2): 271-274.
- [4] 姚立华, 何国庆, 陈启和. 芦荟活性成分的生物学作用研究进展[J]. 科技通报 2007, 23(6): 812-815.
- [5] 蔡健. 芦荟的功能成分与保健功效[J]. 食品与药品 2006, 8(08A): 27-30.
- [6] 铁军, 白海艳, 赵芳芳. 芦荟的综合利用现状与发展趋势[J]. 中国野生植物资源 2006, 25(4): 22-24.
- [7] 鄢贵龙. 大孔树脂对葛根素吸附行为的研究[J]. 食品工业科技 2007, 28(1): 63-65.
- [8] 雍晓静, 刘钢, 张境. 应用大孔树脂分离纯化枸杞叶总黄酮的研究[J]. 宁夏大学学报: 自然科学版 2005, 26(2): 148-150.
- [9] 朱中贵, 蔡光明, 王峰, 等. 大孔树脂纯化艾叶总黄酮的研究[J]. 解放军药学学报 2009, 25(1): 10-13.
- [10] 杨武英, 上官新晨, 徐明生, 等. 聚酰胺树脂精制青钱柳黄酮的研究[J]. 天然产物研究与开发 2008, 20(2): 320-324.
- [11] 洪艳平, 上官新晨, 刘楠, 等. 枸骨叶总黄酮提取与测定[J]. 江西农业大学学报 2008, 30(3): 529-533.
- [12] 杨武英, 上官新晨, 周志娥, 等. 柑桔皮总黄酮提取工艺的研究[J]. 江西农业大学学报 2009, 31(2): 345-349.

(上接第 162 页)

参考文献:

- [1] 余焕玲, 杨参, 阙建全. 食品中食用天然色素的应用[J]. 广州食品科技 2001, 17(3): 63-65.
- [2] 陈纯馨, 陈忻, 吕嘉明. 竹叶叶绿素的提取及其性质研究[J]. 食品工业科技 2001, 22(5): 11-12.
- [3] 王君, 张宝善. 微生物生产天然色素的研究进展[J]. 微生物学通报 2007, 34(3): 580-583.
- [4] 曹雷, 陈红君. 黑木耳多糖的研究进展[J]. 长春师范学院学报: 自然科学版 2009, 28(2): 57-60.
- [5] 倪丽娜. 一株高产黑色素细菌的分离及鉴定[J]. 微生物学通报 2004, 31(1): 55-59.
- [6] 赵东红, 陆玲, 秦怀兰. 一种微生物发酵产蓝色素的稳定性及毒性研究[J]. 食品与发酵工业 1998, 24(5): 21-24.
- [7] 袁保红, 杜青平, 蔡创华. 海洋细菌 *Pseudomonas sp.* 色素的提取及稳定性的研究[J]. 海洋通报 2005, 24(6): 92-96.
- [8] Yang Hai long, Xiao Cai xia, Ma Wen xin et al. The production of hypocrellin colorants by submerged cultivation of the medicinal fungus *Shiraia bambusicola* [J]. Dyes and Pigments 2009, 82: 142-146.
- [9] 李建波, 宋欣, 田敏, 等. 粗糙脉孢菌产黑色素条件优化及黑色素物理特性研究[J]. 山东大学学报: 理学版 2004, 30(4): 120-123.