

冯馨慧,刘志明,王海英.桑枝活性成分的提取及其抑菌和抗氧化作用[J].江苏农业科学,2020,48(7):217-221.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.041

# 桑枝活性成分的提取及其抑菌和抗氧化作用

冯馨慧<sup>1</sup>,刘志明<sup>2</sup>,王海英<sup>1</sup>

(1.东北林业大学林学院,黑龙江哈尔滨 150040; 2.东北林业大学材料科学与工程学院,黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:**以桑枝作为原料,研究其乙醇提取物的抑菌活性和抗氧化活性。气相色谱-质谱分析结果表明,桑枝乙醇提取物的挥发性组分,主要由酯类(47.76%)、烷烃类(20.27%)、芳香烃类(15.84%)等化合物组成,GC含量最高的化合物是邻苯二甲酸二丁酯(41.20%),GC含量较高的化合物为十一烷(20.27%)。桑枝乙醇提取物的抑菌活性研究表明,桑枝乙醇提取物对大肠杆菌(*Escherichia coli*)具有较好的抑菌活性,抑菌圈直径为(11.77±0.54) mm。桑枝乙醇提取物的抗氧化活性研究表明,桑枝乙醇提取物 50% DPPH 自由基清除率质量浓度(IC<sub>50</sub>)为 1.570 mg/mL,维生素 C IC<sub>50</sub>为 0.001 mg/mL。桑枝乙醇提取物 50% 羟基自由基清除率质量浓度(IC<sub>50</sub>)为 68.437 mg/mL,维生素 C IC<sub>50</sub>为 7.082 mg/mL。桑枝乙醇提取物对 DPPH 自由基具有较好的清除作用。

**关键词:**桑;气相色谱-质谱;乙醇提取物;抑菌活性;抗氧化活性

**中图分类号:** R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)07-0217-04

桑(*Morus alba*)为桑科(Moraceae)桑属乔木或灌木,东北至西南各省区等均有栽培<sup>[1]</sup>。桑叶、桑椹为国家卫生部药食同源名录中的品种,桑白皮、桑枝为可用于保健食品名录中的品种<sup>[2-5]</sup>。桑枝中起主要药理活性作用的成分为桑枝多糖、黄酮类、生物碱类化合物,桑枝黄酮具有很强的抗氧化作用<sup>[6-10]</sup>。桑枝在食用菌、木醋液等行业领域应用方兴未艾<sup>[11-12]</sup>。桑种植园每年抚育间伐的桑枝资源丰富,高附加值桑枝的开发利用是桑枝加工利用亟待解决的问题之一。本研究以桑枝作为原料,研究其乙醇提取物的抑菌活性和抗氧化活性,通过气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry,简称 GC-MS)分析桑枝乙醇提取物的挥发性成分,以期桑枝的开发利用提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

收稿日期:2019-03-11

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0600805-01);省级财政林业科研专项经费(编号:201514);技术开发项目企业横向课题(编号:07043215003)。

作者简介:冯馨慧(1994—),女,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,主要从事植物资源开发利用研究。E-mail:fengxinhui2010@qq.com。

通信作者:王海英,博士,副教授,硕士生导师,主要从事植物资源化学以及木醋液、精油、纤维素等植物资源开发利用研究。E-mail:haiyingwang908@126.com。

试验用桑枝采自黑龙江省齐齐哈尔市甘南林场的桑产业科技示范园,来源植物为桑科桑属桑的抚育间伐剩余物<sup>[13-15]</sup>。

供试菌种主要有金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白色念珠菌(*Candida albicans*),由东北林业大学实验室提供。

试验主要试剂有二苯基苦基肼自由基(DPPH·)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸亚铁、水杨酸、无水乙醇、维生素 C,均为分析纯。琼脂,由北京奥博星生物技术有限责任公司提供。

试验主要仪器有索氏提取装置(自制)、RE-2000A 型旋转蒸发仪(巩义市予华仪器有限责任公司)、722 型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 桑枝乙醇提取物的制备 采用索氏提取装置,溶剂为无水乙醇。桑枝粉碎过筛,取 10 g 桑枝粉末(≤0.425 mm),用滤纸包好并用细线扎紧后放入滤筒内,圆底烧瓶中加入 100 mL 无水乙醇,放入水浴锅内,连接好索氏提取装置各部分,接通冷凝水,索氏提取 5 h,制得桑枝乙醇提取液。温度设为 50 ℃,大气压强为 0.1 MPa,转速为 35 r/min,用旋转薄膜蒸发法除去无水乙醇,制得桑枝乙醇提取物。

1.2.2 桑枝乙醇提取物的 GC-MS 分析 将桑枝乙醇提取物配制成 10 mg/L 的甲醇溶液,利用气相

色谱-质谱(GC-MS)联用仪对试样进行分析。色谱分析条件:HP-5MS 毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);FID 检测器;初始温度为 40 ℃(保持 2 min),以 10 ℃/min 的升温速率升到 280 ℃(保持 2 min);进样口温度为 250 ℃;进样量为 1.0 μL;不分流,氦气载气,流速为 1 mL/min。质谱分析条件:EI 电离源,接口温度 280 ℃,离子源温度 230 ℃,电子能量 70 eV,扫描范围 30~500 u。

1.2.3 桑枝乙醇提取物的抑菌活性 采用滤纸片法测定桑枝乙醇提取物的抑菌活性<sup>[16-18]</sup>。分别取活化培养的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)、白色念珠菌(*C. albicans*)置于液体培养基中,在 37 ℃恒温摇床中培养 24 h,再配制成浓度为 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> CFU/mL 的菌悬液,用移液枪吸取已活化好的菌悬液 20 μL,将其均匀涂抹在冷却后的琼脂平板表面,制成含菌平板。取浸泡过 10 mg/mL 桑枝提取物的干燥 6 mm 圆形滤纸片,贴在上述制好的含菌平板上,每个培养皿(直径为 90 mm)贴上 3 片浸过同一种质量浓度溶液的滤纸片(滤纸片尽量间隔相同),以不含药滤纸片作为空白对照。把处理过的含菌平板置于恒温箱中(温度控制在 37 ℃),培养 24 h,用十字交叉法测定抑菌圈直径。

1.2.4 桑枝乙醇提取物的抗氧化活性

1.2.4.1 样品溶液的配制 称取 1 g 桑枝乙醇提取物,加入 100 mL 无水乙醇充分溶解,得到 10 mg/mL 的样品母液,用移液管准确移取体积为 0.5、1.0、2.0、2.5、5.0 mL 的母液,定容,至 10 mL 容量瓶中,得到 0.5、1.0、2.0、2.5、5.0 mg/mL 的样品溶液。

1.2.4.2 DPPH 自由基清除率测定 精确称取 0.02 g DPPH 样品,加入无水乙醇定容至 500 mL 容量瓶中,得到质量浓度为 0.04 mg/mL 的 DPPH 溶液。向 DPPH 溶液中加入自由基清除剂,孤对电子被配对,深紫色的 DPPH 自由基被还原成黄色 DPPH-H 非自由基形式,其褪色程度与所接受的电子数量成定量关系,因而可以通过吸光度的变化进行定量分析<sup>[19-22]</sup>。称取 1 g 维生素 C,加入 1 000 mL 水定容为 1 mg/mL 标准溶液,分别取 2、4、6、8 mL 溶液于 10 mL 容量瓶中定容,作为标准液待用。分别取 2 mL 不同浓度的样品溶液及标准液,加入 2 mL DPPH 溶液,混合均匀,室温放置 30 min 后,于 517 nm 处测吸光度( $D_1$ ),用无水乙醇替代样品溶液测定吸光度( $D_0$ ),用无水乙醇替代 DPPH 溶

液测定吸光度( $D_2$ )。平行操作 3 次,样品对 DPPH 自由基的清除率用以下公式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{D_1 - D_2}{D_0}\right) \times 100\%。$$

1.2.4.3 羟基自由基清除率测定 在 Fenton 反应中,检测木醋液对羟基自由基的清除作用,过氧化氢和铁离子混合产生羟基自由基,在体系内加入水杨酸产生有色物质,该物质在 510 nm 波长处有最大吸收波长<sup>[23-24]</sup>。称取 2 g 维生素 C,加入 1 000 mL 水定容为 2 mg/mL 标准溶液,分别取 1、2、3、4、5、6、7、8、9 mL 溶液于 10 mL 容量瓶中定容,作为标准液待用。向试管中依次加入 1 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液 1 mL、不同浓度样液或标准液 1 mL、1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mL、3 mmol/L 水杨酸溶液 1 mL 混匀,室温下放置 30 min,于 510 nm 波长处测定吸光度( $D_x$ ),用蒸馏水代替水杨酸测定吸光度( $D_0$ ),用蒸馏水代替样液测定吸光度( $D_{x0}$ )。平行操作 3 次,取平均值。根据下式计算试样对羟基自由基的清除率:

$$\text{羟基自由基清除率} = \left(1 - \frac{D_x - D_{x0}}{D_0}\right) \times 100\%。$$

1.3 数据计算与处理

采用 Excel 2007、SPSS 19.0 软件进行数据统计分析、处理,数据均以均值 ± 标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 桑枝乙醇提取物的 GC-MS 分析

采用索氏提取法,以无水乙醇作为溶剂,提取得到的桑枝乙醇提取物为黄色透明黏稠油状液体,提取得率为 12%。由桑枝乙醇提取物样品的总离子流色谱(图 1)可知,通过面积归一化法计算出各组分的 GC 含量,总 GC 含量的 83.87% 的化合物被鉴定,共鉴定出 4 种化合物,桑枝乙醇提取物的 GC-MS 分析结果如表 1 所示。

由表 1 可知,桑枝乙醇提取物的挥发性组分,主要由酯类(47.76%)、烷烃类(20.27%)、芳香烃类(15.84%)等化合物组成,GC 含量最高的化合物是邻苯二甲酸二丁酯(41.20%),GC 含量较高的化合物为十一烷(20.27%)。

### 2.2 桑枝乙醇提取物的抑菌活性分析

由表 2 可知,桑枝乙醇提取物对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)、白色念珠菌(*C. albicans*)均有抑制作用。桑枝乙醇提取物对 3 种菌的抑制作用表现为大肠杆菌 > 金黄色葡萄球菌 >

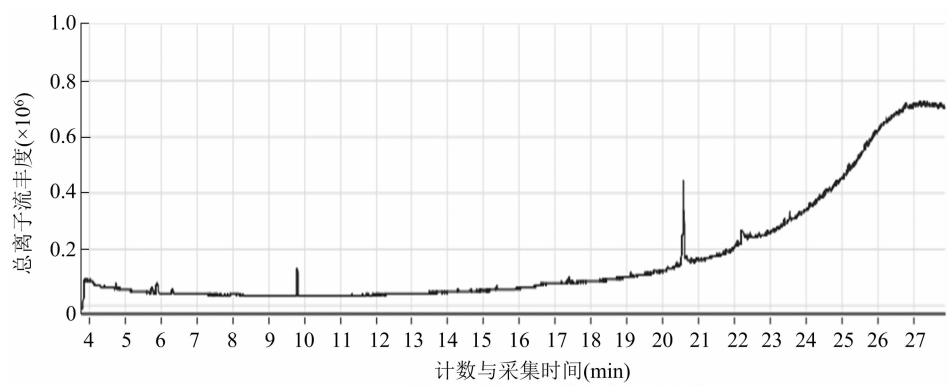


图1 桑枝乙醇提取物的总离子流色谱

表 1 桑枝乙醇提取物的 GC-MS 分析结果

序号	保留时间 (min)	化合物名称	分子式	匹配度 (%)	GC 含量 (%)
1	5.862	邻二甲苯	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	69.10	15.84
2	9.777	十一烷	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	80.30	20.27
3	20.498	十六烷酸(棕榈酸)-1-羟甲基-1,2-乙二醇酯	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> O <sub>5</sub>	67.70	6.56
4	20.532	邻苯二甲酸二丁酯	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	64.40	41.20

表 2 桑枝乙醇提取物的抑菌活性

菌种	抑菌圈直径(mm)
金黄色葡萄球菌( <i>S. aureus</i> )	10.05 ± 0.13b
大肠杆菌( <i>E. coli</i> )	11.77 ± 0.54c
白色念珠菌( <i>C. albicans</i> )	8.15 ± 0.28a

注:不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

白色念珠菌,对大肠杆菌的抑制作用最明显,抑菌圈直径达到(11.77 ± 0.54) mm,提取物对 3 种菌的抑制作用有显著性差异,具有统计学意义。

2.3 桑枝乙醇提取物的抗氧化活性分析

2.3.1 桑枝乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除作用 从图 2 中可以看出,桑枝乙醇提取物对 DPPH 自由基有较强的清除作用,且随着质量浓度增大,清除效果呈增加趋势,在质量浓度较低时,清除效果随浓度升高表现增强趋势较快,当浓度升高到一定程度时,曲线趋势变平缓。试验中最小质量浓度为 1 mg/mL,最大质量浓度为 10 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率达 87.62%,在本试验条件下,维生素 C 清除 50% DPPH 自由基质量浓度(IC<sub>50</sub>)为 0.001 mg/mL,桑枝乙醇提取物清除 50% DPPH 自由基质量浓度(IC<sub>50</sub>)为 1.570 mg/mL。拟合回归方程为  $y = 22.37\ln x + 39.50$  ( $r^2 = 0.98$ )。图 3 为维生素 C 对 DPPH 自由基的清除率,桑枝乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除效果较维生素 C 弱。由于维生素 C 清除 DPPH 自由基的效果明显,当维生素 C 质量浓度为 0.02 mg/mL 时,对 DPPH 自由基清除率

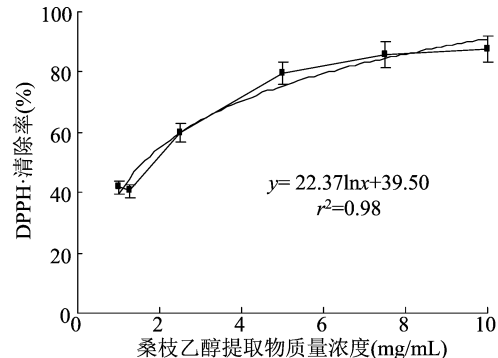


图2 桑枝乙醇提取物的 DPPH·清除率

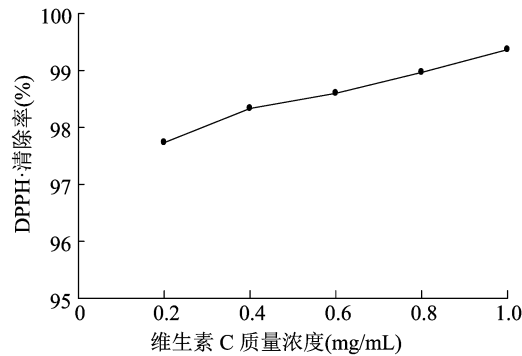


图3 维生素 C 的 DPPH·清除率

与桑枝乙醇提取物质量浓度为 10 mg/mL 时的清除率相当,本试验中维生素 C 的最低质量浓度清除率依然高于桑枝乙醇提取物最大质量浓度的清除率,桑枝乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除作用比较明显,抗氧化效果较好。

2.3.2 桑枝乙醇提取物对羟基自由基的清除作用

由图 4 可知,桑枝乙醇提取物对羟基自由基清除效果不明显,且随质量浓度增大,清除效果并没有明显的增强趋势,在质量浓度为 7.5 mg/mL 时,清除率最高为 18.26%,在本试验条件下,维生素 C 清除 50% 羟基自由基质量浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 7.082 mg/mL,然而桑枝乙醇提取物对羟基自由基清除率未达到 50%,拟合回归方程为  $y = 2.09\ln x + 13.57$  ( $r^2 = 0.45$ )。图 5 为维生素 C 对羟基自由基的清除作用,桑枝乙醇提取物对羟基自由基的清除效果较维生素 C 弱。通过计算得出,当维生素 C 质量浓度为 1.522 mg/mL 时,其羟基自由基清除率为 20%,桑枝乙醇提取物质量浓度为 10 mg/mL 时对羟基自由基的清除率与维生素 C 相当。桑枝乙醇提取物 50% 羟基自由基清除率质量浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 68.437 mg/mL。

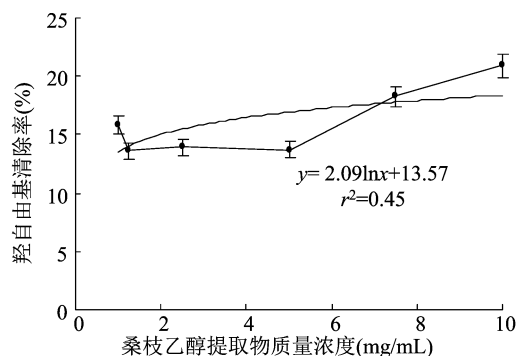


图4 桑枝乙醇提取物的羟基自由基清除率

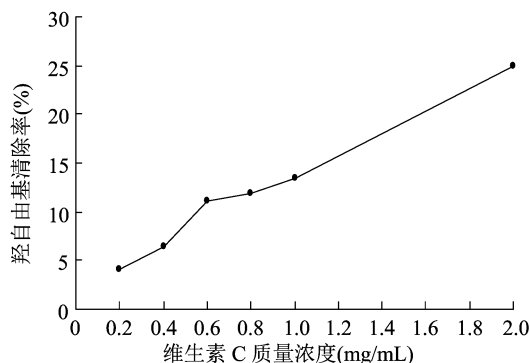


图5 维生素 C 的羟基自由基清除率

### 3 结论

以桑枝作为原料,研究其乙醇提取物的抑菌活性和抗氧化活性。气相色谱-质谱分析结果表明,桑枝乙醇提取物的挥发性组分,主要由酯类(47.76%)、烷烃类(20.27%)、芳香烃类(15.84%)等化合物组成,GC 含量最高的化合物是邻苯二甲酸二丁酯(41.20%),GC 含量较高的化合物为十一

烷(20.27%)。桑枝乙醇提取物的抑菌活性研究结果表明,桑枝乙醇提取物对大肠杆菌(*E. coli*)具有较好的抑菌活性,抑菌圈直径为( $11.77 \pm 0.54$ ) mm。桑枝乙醇提取物的抗氧化活性研究结果表明,桑枝乙醇提取物 50% DPPH 自由基清除率质量浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 1.570 mg/mL,维生素 C  $IC_{50}$  为 0.001 mg/mL。桑枝乙醇提取物 50% 羟基自由基清除率质量浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 68.437 mg/mL,维生素 C  $IC_{50}$  为 7.082 mg/mL。桑枝乙醇提取物对 DPPH 自由基具有较好的清除作用。抗氧化作用试验主要为清除自由基,选择以 1 ~ 10 mg/mL 质量浓度测定桑枝乙醇提取物的抗氧化活性,并在 1 ~ 10 mg/mL 范围内设立了 7 个质量浓度梯度,测定桑枝乙醇提取物的清除自由基能力。结果表明,桑枝乙醇提取物具有较强的抗氧化作用,且随着浓度增大,抗氧化效果增强,其抗氧化效果对 DPPH 自由基作用优于羟基自由基,桑枝乙醇提取物质量浓度为 10 mg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率达 87.62%。桑枝乙醇提取物中黄酮类化合物的分离、鉴定及其抗氧化作用,有待进一步研究。桑枝提取物作为天然抑菌剂、抗氧化剂,在药品、化妆品行业具有较好的开发潜力。

### 参考文献:

- [1] 中国科学院编委会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2] 白 华. 《神农本草经》桑叶考证[J]. 内蒙古中医药,2016(1): 102-103.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2009.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 国家卫生计生委公布 101 种药食同源品种征求意见[J]. 山东中医杂志,2015,34(1):76.
- [5] 王庆稳,朱云龙. “既是食品又是药品”的物品名单探析[J]. 四川烹饪高等专科学校学报,2013(2):25-26,29.
- [6] 李 晋,杜昆泽,罗 蓉,等. HPLC 法同时测定桑枝中 6 种成分的含量[J]. 天津中医药,2017,24(11):775-777.
- [7] Guo C, Liang T, He Q L, et al. Renoprotective effect of ramulus mori polysaccharides on renal injury [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 62:720-725.
- [8] 杨 爽,王宝莲,李 燕. 植物桑的药理研究进展[J]. 药学报,2014,49(6):824-831.
- [9] 邢冬杰,项东宇,张彩坤. 桑枝活性成分提取及药理作用研究进展[J]. 中国现代中药,2014,16(11):957-960.
- [10] Du X J, Mu H M, Zhou S, et al. Chemical analysis and antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Inonotus obliquus* sclerotia [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 62(62):691-696.

王 萌,蒋 芸,赵世豪,等. 消化条件对大豆油 O/W 乳状液脂肪消化的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(7):221-225.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.042

# 消化条件对大豆油 O/W 乳状液脂肪消化的影响

王 萌,蒋 芸,赵世豪,万刘灵,张文丽,伍 娟,程 宇

(江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013)

**摘要:**以游离脂肪酸释放量为指标,通过 pH-stat 方法考察脂肪酶、胆盐、CaCl<sub>2</sub> 浓度对大豆油 O/W 乳状液在静态胃消化和动态胃消化模型中脂肪消化的影响。结果表明,乳状液消化过程符合一级动力学方程  $y - y_0 = ae^{-kt}$ 。脂肪酶活性升高可增大脂肪酸释放速率,增加脂肪酸释放量。在一定浓度范围内,胆盐和 CaCl<sub>2</sub> 浓度增加可提高脂肪酸释放速率,增大游离脂肪酸释放量。在相同消化条件下,乳状液中的脂肪在动态消化模型中的消化程度高于静态消化模型。

**关键词:**乳状液;pH-stat;体外消化模型;脂肪酸释放

**中图分类号:**TS201 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)07-0221-05

随着人们生活水平的提高,体质量超标导致的肥胖已经成为影响人们健康的因素之一。通常,控制脂肪的消化进而调控其吸收被认为是实现体质

量控制的有效手段之一<sup>[1]</sup>。食品乳状液是食品中脂肪存在的主要形式之一,因而关于食品乳状液中脂肪消化的研究受到了关注。目前,模拟消化模型结合 pH-stat 法是研究食品乳状液中脂肪消化的主要手段<sup>[2]</sup>。然而,由于脂肪消化主要发生在肠消化阶段,因而这些模型通常只是考察肠消化阶段的影响而较少考虑胃消化阶段对乳状液中脂肪在后续肠消化阶段的影响。同时,不同研究人员使用的消化模型存在一定差异,因而多国科学家共同讨论出了一个标准化的静态消化模型<sup>[3]</sup>来消除模型带来的差异,这一模型在目前的研究中被广泛地用于

收稿日期:2019-03-07

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK20130494);高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20123227120018);江苏大学“青年骨干教师培养工程”青年学术带头人培育项目;江苏大学大学生创新创业训练计划(编号:201710299398W、201810299486W)。

作者简介:王 萌(1993—),男,江苏徐州人,硕士研究生,主要从事食品的模拟消化研究。E-mail:q188926885@qq.com。

通信作者:程 宇,博士,副教授,主要从事食品蛋白质功能及其模拟消化研究。Tel:(0511)88780174;E-mail:chengyu@ujs.edu.cn。

[11] 吴 登,许振华,黄奕洲,等. 不同比例桑枝屑栽培黑木耳试验[J]. 食用菌,2017(6):46-47.

[12] 吴 亥,李芳红,易 铭,等. 用物理法热解制备桑枝活性炭及木醋液的试验[J]. 蚕业科学,2015,41(5):914-920.

[13] Liu Z M, Wang H Y, Liu S S, et al. Volatile components of essential oil from mulberry variety “Lonsang I” leaves[J]. Nat Prod Res Dev, 2011, 23(6):1069-1072, 1084.

[14] 曹明全,王海英,刘姗姗,等. 鲜桑叶与干桑叶精油的挥发性组分分析[J]. 国土与自然资源研究,2010(2):86-87.

[15] 刘志明,王海英,牛 晶,等. 龙桑 1 号叶片的抑菌活性组分[J]. 经济林研究,2010,28(3):109-112.

[16] 张小莉,李 雪,高苏妮,等. 没食子和五倍子体外抑菌作用比较研究[J]. 中国药业,2018,27(23):29-31.

[17] 国佳鑫,王艺萌,孟 铭,等. 荔枝草提取物抗菌作用研究及其软膏的制备[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2018,34(5):528-532.

[18] 段晓玲,王海英,刘志明,等. 农林废弃物干馏产物木醋液的抑菌活性[J]. 西南农业学报,2016,29(2):425-429.

[19] 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.

[20] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, et al. Antioxidant properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(6):945-948.

[21] Kumaran A, Karunakaran R J. Antioxidant and free radical scavenging activity of aqueous extract of *Coleus aromaticus* [J]. Food Chemistry, 2006, 97(1):109-114.

[22] Karioti A, Hadjipavlou - Litina D, Mensah M L, et al. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopia aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(26):8094-8098.

[23] 刘 曼,韩升廷,张海悦,等. 花生红衣粗多酚体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2013,34(2):120-123.

[24] 段晓玲,王海英,刘志明,等. 木醋液体外抗氧化活性评价[J]. 生物质化学工程,2015,49(6):22-26.