

消癌平注射液 HPLC 指纹图谱及 7 种甾体有效成分的含量测定

龚晓斌¹, 曾庆花^{1,2}, 张凤¹, 高守红¹, 陆文铨¹, 陈万生^{1*}

(1. 第二军医大学附属长征医院, 上海 200003;
2. 广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**建立消癌平注射液 HPLC 指纹图谱,并准确测定消癌平注射液中 tenacissoside H(TSH)等 7 种甾体有效成分的含量。**方法:**采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱,流动相乙腈-水,梯度洗脱,柱温 30 ℃,流速 0.8 mL·min⁻¹,平衡时间 10 min,进样 20 μL,蒸发光散射检测器漂移管温度 60 ℃,载气压力 0.4 MPa,检测 17β-tenacigenin B(17β-TB),tenacigenin B(TB),tenacigenin A(TA),tenacigenoside A(TSA),marsdenoside I(MSI)和 tenacissoside F(TSF)的含量;并运用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件建立消癌平注射液的对照指纹图谱,计算其相似度。**结果:**11 批消癌平注射液的 HPLC 指纹图谱有 13 个共有峰,相似度均在 0.94 以上。TSH 等 7 种甾体在标准曲线范围内均呈现良好的线性($r > 0.999$),精密性、重复性和准确度均符合要求。**结论:**所建立的 HPLC-ELSD 方法操作简便、结果可靠,具有良好的精密性、稳定性和重复性,结合指纹图谱研究为消癌平注射液中多成分含量测定和质量控制提供了依据。

[关键词] 消癌平注射液; 高效液相色谱-蒸发光散射; 指纹图谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0068-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150068

Fingerprint Analysis of Xiaoaiping Injection and Simultaneous Determination of Its Seven Active Steroidal Components in Xiaoaiping Injection by HPLC-ELSD

GONG Xiao-bin¹, ZENG Qing-hua^{1,2}, ZHANG Feng¹, GAO Shou-hong¹, LU Wen-quan¹, CHEN Wan-sheng^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China;
2. Guangxi Institute For Food And Drug Control, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To develop and validate a high performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) method for the quantitative determination and fingerprint analysis of 7 active steroidal components in Xiaoaiping injection. **Method:** Chromatographic separation was performed on an Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution using acetic acid in acetonitrile solution at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The drift tube temperature of ELSD was set to 60 ℃ and nebulizer gas pressure was 0.4 MPa. Method validation was performed to assure its linearity, limits of detection and quantification, precision, repeatability, stability and accuracy. **Result:** Fingerprint analysis obtained 13 common peaks in Xiaoaiping injection, and the similarity was higher than 0.94. The HPLC-ELSD method allowed the quantification of 7 compounds (17β-tenacigenin B, tenacigenin B, tenacigenin A, tenacigenoside A, marsdenoside I and tenacissoside F), and was successfully applied to fingerprint analysis for 11 batches of Xiaoaiping injection. **Conclusion:** It was the first time to apply HPLC-ELSD for simultaneous determination of 7 active ingredients and

[收稿日期] 20150709(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202866)

[第一作者] 龚晓斌,在读硕士,从事生药学和临床药学研究,Tel: 021-60748767,E-mail:xiaobin_88@126.com

[通讯作者] *陈万生,博士,主任药师,从事生药学和临床药学研究,Tel: 021-81871345,E-mail:chenwansheng@smmu.edu.cn,chenwanshengsmmu@aliyun.com

fingerprint analysis of Xiaoaiping injection. The results proved the reliability and comprehensiveness of the combination of quantitative analysis for marker ingredients and chemical fingerprint for TCM formula.

[Key words] Xiaoaiping injection; HPLC-ELSD; fingerprint; quantitative determination

消癌平注射液为萝藦科植物通关藤经过水提醇沉提取过程制得的单味多组分制剂,具有清热解毒、化痰软坚的功效^[1]。消癌平注射液通过阻滞肿瘤细胞周期、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成发挥抗肿瘤作用^[2],单药或配合放、化疗进行食道癌、肝癌、胃癌、肺癌和鼻咽癌^[3-9]等多种恶性肿瘤的治疗已有数十年的历史,并表现出良好的疗效,不仅毒副作用小,具有保肝、利尿和改善放、化疗后血象的作用,应用范围广泛,前景十分广阔^[10]。大量研究表明,消癌平注射液的用法用量及疗程长短并没有统一的标准^[9],为了确保其安全、有效,必须对其质量进行严格控制。

消癌平注射液中含有甾体皂苷、生物碱、有机酸、多糖、树脂及色素等化学成分^[11]。研究表明,甾体皂苷为主要的抗肿瘤活性成分^[1,12]。鉴于消癌平注射液成分和种类复杂、结构多样,因此要求其测定方法具有高度选择性。现有质量标准将绿原酸作为指标成分通过紫外分光光度法、薄层色谱法等方法对其进行含量测定^[10-11]。张阿琴等^[10]报道了对香豆酸和新绿原酸的含量,谢丽艳等^[1]报道了 17 β -tenacigenin B (17 β -TB) 和 tenacigenin A (TA) 的含量,然而上述研究仍难以准确反映消癌平注射液活性成分的种类、含量及其质量标准。为了对消癌平注射液更好地进行质量控制,本文采用指纹图谱联合多成分含量测定分析方法,运用高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)对 7 种甾体有效成分进行含量测定并建立了对照指纹图谱,操作简便、特征性强,能够较全面地表征活性成分的含量差异,为改进和提高消癌平注射液的质量控制提供了科学依据。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(包括四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD 二极管阵列紫外检测器,美国 Agilent),SEDEX75 型蒸发光散射检测器(法国 ELSD),MILLI-Q 型超纯水器(美国 Millipore 公司),Oasis HLB 3cc 固相萃取小柱(美国 Waters),AE240 型电子天平(美国梅特勒)。

消癌平注射液(南京圣和药业有限公司,批号分别为 201106081, 201108211, 201109161, 201109211, 201110191, 201111151, 201111171,

201111191, 201111231, 201111251, 201111291); tenacissoside H (TSH) 对照品由复旦大学药学院生药教研室制备,17 β -TB, tenacigenin B (TB), TA, tenacigenoside A (TSA), marsdenoside I (MSI) 和 tenacissoside F (TSF) 均由本实验室分离,纯度在 98% 以上,化学结构式如图 1 所示;水为超纯水(Milli-Q 型超纯水器制备),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

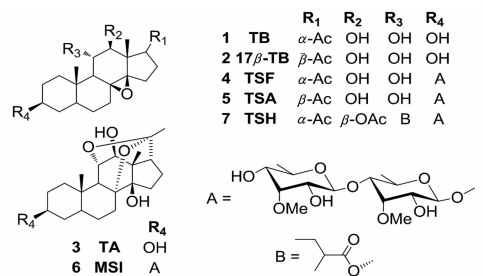


图 1 消癌平注射液中 7 种对照品化学结构

Fig. 1 Chemical structures of seven bioactive compounds in Xiaoaiping injection

2 方法与结果

2.1 HPLC-ELSD 分析条件 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0 ~ 10 min, 22% A; 10 ~ 15 min, 22% ~ 28% A; 15 ~ 20 min, 28% A; 20 ~ 25 min, 28% ~ 32% A; 25 ~ 32 min, 32% ~ 35% A; 32 ~ 40 min, 35% ~ 55% A; 40 ~ 60 min, 55% ~ 75% A),柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 0.8 mL \cdot min⁻¹,平衡时间 10 min,进样 20 μ L,蒸发光散射检测器漂移管温度 60 $^{\circ}$ C,载气压力 0.4 MPa。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取 17 β -TB 15.30 mg, TB 4.00 mg, TA 6.60 mg, TSA 5.00 mg, MSI 4.00 mg, TSF 4.00 mg, TSH 4.00 mg,加甲醇完全溶解并定容至 10 mL,摇匀,即得 7 种甾体有效成分的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取消癌平注射液 5 mL,用二氯甲烷 10 mL 进行振摇提取,重复 4 次,合并二氯甲烷提取液,在 45 $^{\circ}$ C 条件下进行减压浓缩吹干,再以 80% 甲醇将残渣充分溶解并转移至 5 mL 量瓶中定容,摇匀,作为供试品溶液。溶液经过 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 指纹图谱

2.3.1 指纹图谱的采集及共有指纹峰的确定 按 2.2.2 项下方法制备 11 批消癌平注射液的供试品溶液,取样品溶液依次进样,记录消癌平注射液 ELSD 色谱图,采集时间为 60 min。采集 120 min 色谱图时,60 min 后即无其他色谱峰出现,故确定记录 60 min 图谱。采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”对 11 批消癌平注射液的色谱图进行分析,生成共有指纹峰。结果显示,存在 13 个共有指纹峰,见图 2。

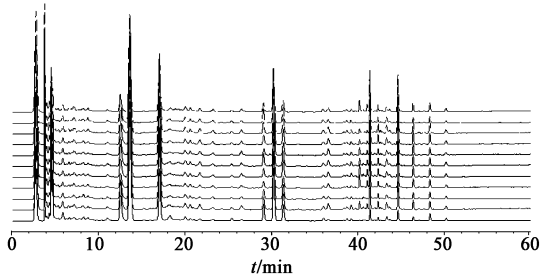


图 2 11 批消癌平注射液 HPLC 指纹谱叠加
Fig. 2 Overlapped HPLC fingerprint chromatograms of 11 batches of Xiaoaiping injection

2.3.2 参比峰的选择与指纹图谱方法学的考察

以内参照峰 TSA(S)的保留时间和峰面积值为 1,分别计算 13 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。以批号为 201108211 的消癌平注射液进行指纹图谱方法学考察。

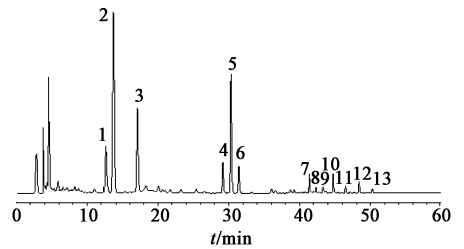
2.3.2.1 精密度的试验 取供试品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录并比较 60 min 指纹图谱,计算 RSD。结果显示,13 个共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%。表明仪器精密度良好。

2.3.2.2 重复性试验 取供试品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件进样 6 次,记录并比较 60 min 指纹图谱,计算 RSD。结果显示,13 个共有峰相对保留时

间的 RSD 均 < 1.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%。表明该方法的重复性良好。

2.3.2.3 稳定性试验 取供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时进样分析,结果显示,13 个共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%。表明至少在 24 h 内,供试品溶液中 7 种甾体有效成分保持稳定。

2.3.3 对照指纹图谱的建立及相似度评价 设定时间窗宽度为 0.20 min,采用多点校正方法进行色谱峰自动匹配消癌平注射液指纹图谱,以中位数法建立对照指纹图谱,见图 3。根据“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”进行 11 批消癌平注射液的 HPLC 指纹图谱相似度计算。相似度分别为 0.958, 0.997, 0.955, 0.986, 0.988, 0.998, 0.994, 0.975, 0.995, 0.951 和 0.943。



1. TB; 2. 17β-TB; 3. TA; 4. TSF; 5. TSA; 6. MSI; 13. TSH; 7~12. 未鉴定
图 3 消癌平注射液对照 HPLC 指纹谱

Fig. 3 Representative HPLC fingerprint chromatograms of Xiaoaiping injection

2.4 含量测定

2.4.1 线性关系、检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 的考察 精密量取适量对照品储备液,采用逐级稀释法,加甲醇稀释得一系列不同浓度的混合对照品溶液,按 2.1 项色谱条件下进行试验,测定峰面积,以峰面积的对数 (Y) 和以浓度的对数 (X) 进行线性回归,结果见表 1。各成分的 LOD (信噪比为 3:1) 及 LOQ (信噪比为 10:1) 见表 1。

表 1 回归方程与线性范围

Table 1 Regression equation and linear range

化合物	回归方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹	LOD /μg	LOQ /μg
TB	Y = 1.484 3X + 0.028 4	0.999 8	25.00 ~ 400.00	0.160	0.300
17β-TB	Y = 1.459 3X - 0.005 1	0.999 1	31.88 ~ 1 530.00	0.132	0.366
TA	Y = 1.469 8X + 0.055 0	0.999 8	27.50 ~ 660.00	0.153	0.309
TSF	Y = 1.503 4X - 0.164 8	0.999 9	25.00 ~ 400.00	0.121	0.242
TSA	Y = 1.464 0X + 0.272 3	0.999 7	31.25 ~ 500.00	0.160	0.300
MSI	Y = 1.494 5X - 0.114 1	0.999 9	25.00 ~ 400.00	0.162	0.303
TSH	Y = 1.479 4X + 0.299 6	0.999 8	20.00 ~ 400.00	0.100	0.160

2.4.2 精密度试验、重复性试验、稳定性试验 分别同 2.3.2.1, 2.3.2.2, 2.3.2.3 项。结果显示,其 RSD 均 < 5.0%。

2.4.3 加样回收率试验 取 11 个批次的消癌平注射液,分别精密加入低、中、高 3 个不同浓度的对照品混合溶液适量,分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,测定 7 种甾体有效成分的含量,计算其回收率和 RSD,结果见表 2。

表 2 消癌平注射液中 7 种成分加样回收率试验
Table 2 Recovery results of seven bioactive compounds of Xiaoaiping injection

化合物	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	RSD /%
TB	144.04	114.68	256.91	98.42	3.0
		146.51	287.32	97.80	2.1
		180.95	333.14	104.50	2.0
17 β -TB	528.21	435.85	980.34	103.73	1.9
		526.24	1 029.13	95.19	4.8
		638.21	1 168.88	100.39	2.0
TA	268.85	223.12	501.29	104.18	2.8
		260.63	520.85	96.69	1.1
		320.16	581.45	97.64	3.1
TSF	139.12	112.78	255.03	102.78	1.6
		136.95	272.26	97.22	1.4
		181.69	327.61	103.74	1.1
TSA	207.23	167.72	380.99	103.60	1.2
		203.46	401.59	95.53	4.2
		249.39	459.27	101.06	3.9
MSI	129.32	114.31	246.50	102.51	0.6
		126.25	252.68	97.71	1.4
		156.97	291.54	103.34	3.5
TSH	32.69	25.68	58.12	99.03	3.9
		31.87	63.75	97.52	1.7
		41.13	74.84	102.48	2.1

2.5 样品含量测定 取 11 个不同批次的消癌平注射液,按 2.2.2 项下操作制备供试品溶液,平行 3 份,取其平均值作为各成分含量,并计算其 RSD。结果见表 3。

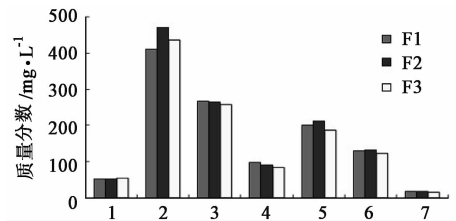
表 3 不同批次消癌平注射液中 7 种甾体成分的质量分数 ($n=3$)
Table 3 Contents of seven active compounds in 11 batches of Xiaoaiping injection ($n=3$) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

批次	TB	17 β -TB	TA	TSF	TSA	MSI	TSH
201108211	168.55	575.89	281.72	133.03	228.23	161.24	27.90
201109161	73.39	302.57	190.95	56.16	85.48	79.93	19.95
201106081	121.20	565.20	345.28	84.08	168.56	137.96	25.83
201111191	73.76	315.21	214.55	55.84	97.01	88.24	24.23
201111171	87.72	370.70	260.30	58.72	105.51	103.36	20.37
201109211	85.88	349.02	220.33	63.49	103.82	92.44	25.13
201111151	84.13	362.69	244.59	45.70	78.25	81.92	15.42
201111251	87.39	351.06	218.62	63.73	104.51	91.12	23.44
201111231	80.16	304.70	194.62	60.99	97.32	87.95	17.11
201111291	163.82	505.42	259.47	113.96	166.35	120.18	19.13
201110191	85.90	331.35	213.97	63.25	104.12	90.03	23.20

3 讨论

3.1 前处理条件的选择 本试验以含量较大的甾体成分 17 β -TB, TA 和 TSA 作为考察指标,同时以 TB, TSF, MSI 和 TSH 作为辅助指标,考虑到固相萃取和液液萃取为实验室常用的前处理方法,故本试验设计以上两种方法进行比较。固相萃取法具体操作步骤如下:对 Waters Oasis HLB 3cc 固相萃取小柱进行活化,平行 5 份,在每根小柱中加入 1 mL 精密量取的消癌平注射液,用水 2 mL 淋洗后,再以甲醇 1 mL 进行洗脱,收集洗脱液,在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下减压压缩吹干,用 80% 甲醇将所得残渣充分溶解并转移至 5 mL 量瓶中定容,摇匀,得供试品溶液 F1。根据分析化合物极性,液液萃取法选择中药提取中常用的有机溶剂二氯甲烷和乙酸乙酯,具体操作见 2.2.2 项。二氯甲烷萃取得供试品溶液 F2,乙酸乙酯萃取得供试品溶液 F3。

将供试品溶液 F1 ~ F3 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,后按 2.1 项下检测条件进行分析,记录 7 种甾体有效成分的峰面积,计算其含量并记录色谱图。结果见图 4。



1. TB; 2. 17 β -TB; 3. TA; 4. TSF; 5. TSA; 6. MSI; 7. TSH

图 4 不同前处理方法提取效率

Fig. 4 Results of different extract methods

结果显示,相对于固相萃取法和乙酸乙酯萃取法,二氯甲烷萃取法不仅能够实现较高的甾体提取率,能够有效地去除杂质,降低其对甾体成分测定的干扰,并且成本也优于固相萃取法。因此试验选用二氯甲烷液液萃取作为消癌平注射液的前处理条件。

3.2 色谱条件的优化

3.2.1 流动相的选择 本试验对不同的流动相系统进行了考察,包括甲醇-水和乙腈-水系统,以及不同梯度洗脱的分析条件,结果显示,乙腈-水系统的等度和梯度洗脱均能有效地对其进行色谱分离;而采用梯度洗脱可缩短分离时间,因此最终确定采用乙腈-水系统的梯度洗脱程序进行分析。

3.2.2 柱温的选择 本试验考察了 20, 30, 35, 40 $^{\circ}\text{C}$ 4 个不同温度,结果显示,30 $^{\circ}\text{C}$ 时分离所需时间

较合适,且能较好地实现各成分的色谱分离。20 ℃ 时能实现较好的分离,但耗时较长,35 和 40 ℃ 时分离度不佳。故最终选择 30 ℃ 作为最佳柱温。

3.2.3 蒸发光散射检测器(ELSD)参数的选择 蒸发光散射检测器响应主要有漂移管温度和载气压力两个影响因素。本试验分别对这两个参数值进行了考察。首先固定载气压力,比较 40,55,60,70,80 ℃ 6 个不同温度水平下检测器的响应情况。结果显示,40,55,60 ℃ 时待测组分均有较好的响应,但是在 40,55 ℃ 时,溶剂对待测组分的干扰较大,最终确定 60 ℃ 为漂移管的最佳温度。其次将漂移管温度固定在 60 ℃,比较 0.3,0.35,0.4,0.45 MPa 4 个不同压力水平下检测器的响应情况。结果显示,0.3,0.35,0.4 MPa 时,待测组分均有较好的响应,但在 0.3,0.35 MPa 时,由于雾化器中形成的气溶胶液滴较大,导致噪音较强,对测组分的响应产生干扰。最终确定载气压力为 0.4 MPa。

4 结论

指纹图谱的建立能够全面地反映制剂中各成分的有无及成分间比例的相似程度^[13],与中药多成分、多靶点协同发挥作用的理论相吻合,相对于指纹图谱反映的“宏观”特征,对有效成分的含量控制即属于“细化”指标,反映了发挥药效作用的化学成分的直观含量。近年来“指纹图谱联合多成分含量测定”的方法已经成为中药及其制剂的质控手段,而本课题组也已经基于此研究手段展开了多项研究^[14-17]。本课题以南京圣和药业有限公司生产的消癌平注射液为实验对象,建立了 HPLC 方法,在对消癌平注射液进行指纹图谱研究的基础上,对所含 7 种甾体有效成分进行了含量测定。研究结果表明所考察 11 批注射液相似度系数大于 0.94,7 种甾体有效成分同一批次中含量由高到低依次为 17 β -TB, TA, TSF, TSA, MSI, TB 和 TSH,但在各批次中含量差异较大(RSD 最大达 37.76%),这提示了“指纹图谱联合多成分含量测定”对其质量控制的必要性和全面性,本研究也为相关具有类似组分的复方制剂提供了方法参考。

[参考文献]

[1] 谢丽艳,刘史佳,徐洁,等. LC-MS 法测定消癌平注射液中两种主要成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):90-93.
[2] 姚小燕. 消癌平注射液治疗晚期恶性肿瘤机制研究进展[J]. 亚太传统医药,2014,10(18):41-42.
[3] 张阿琴,李迩娜,张仓,等. LC-MS 分析消癌平注射液中有机酸类成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18

(4):88-90.

[4] 朱春霞,刘丹,黄萍,等. 基于物质基础组分结构的消癌平注射液多维结构质量控制的研究思路[J]. 中国中药杂志,2013,38(21):3627-3631.
[5] 吕芳芳. 消癌平注射液治疗中晚期原发性肝癌临床观察[J]. 河北中医,2011,33(8):1218-1219.
[6] 刘淮东,朱子元. 消癌平注射液联合化疗治疗晚期胃癌的临床研究[J]. 河北医学,2012,18(12):1704-1707.
[7] 李亚莉,周恒根,倪敬忠,等. 消癌平注射液联合 TC 方案治疗晚期非小细胞肺癌临床观察[J]. 现代中西医结合杂志,2015,24(3):316-318.
[8] 肖红梅,邹彦,吴小亮. 消癌平注射液联合放疗在局部中晚期鼻咽癌治疗中的疗效观察[J]. 中国医学创新,2014,11(28):51-53.
[9] 王中奇,王妙新. 消癌平注射液治疗中晚期肿瘤临床研究 meta 分析[J]. 药学与临床研究,2012,20(6):531-535.
[10] 张阿琴,张仓,梁敬钰. HPLC 法测定消癌平注射液中 5 种酚酸的含量[J]. 药学与临床研究,2011,19(6):498-500.
[11] 王振,许作超. HPLC 法测定消癌平注射液中绿原酸的含量[J]. 世界最新医学信息文摘,2013,13(27):130-135.
[12] 陈敏,李媛媛,李先荣. HPLC 测定通关藤药材及消癌平片中通关藤苷 A 含量[J]. 中国中医药信息杂志,2013,20(3):55-57.
[13] 尤立华,杨秉呼,叶萌,等. 清热解毒口服液 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(14):84-87.
[14] Wei H, Sun L N, Tai Z G, et al. A simple and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of eight bioactive components and fingerprint analysis of Schisandrasphenanthera[J]. Anal Chim Acta, 2010, 662(1):97-104.
[15] Sun L, Wwi H, Zhang F, et al. Qualitative analysis and quality control of traditional Chinese medicine preparation Tanreqing injection by LC-TOF/MS and HPLC-DAD-ELSD[J]. Anal Methods, 2013, 5(5):6431-6440.
[16] Zhang F, Yang Q, Sun L N, et al. Fingerprint analysis of Zhimu-Huangbai herb pair and simultaneous determination of its alkaloids, xanthone glycosides and steroidal saponins by HPLC-DAD-ELSD[J]. Chin J Nat Med, 2014, 12(7):525-534.
[17] La M P, Zhang F, Gao S H, et al. Constituent analysis and quality control of *Lamiophlomis rotata* by LC-TOF/MS and HPLC-UV[J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 102(102):366-376.

[责任编辑 顾雪竹]