

HPLC-MS-MS 分析桑叶总生物碱组成及含量

尚磊¹, 欧阳臻^{1*}, 赵明^{1,2}, 王吉标¹, 王璠¹, 汪愿¹

(1. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013; 2. 江苏大学附属医院, 江苏镇江 212013)

[摘要] **目的:**采用 HPLC-MS-MS 法,对桑叶总生物碱部位中的各生物碱成分进行分析和鉴别,采用柱前衍生化 HPLC-UV 测定生物碱部位中总生物碱的含量。**方法:**采用 HiQSiL C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以 9-氯甲酸苄基酯(FMOC-Cl)为柱前衍生化试剂,流动相乙腈-0.1% 醋酸(50:50),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,电喷雾离子源(ESI),正离子检测模式,以 1-脱氧野尻霉素(DNJ)为对照,外标法计算桑叶总生物碱含量。**结果:**鉴定了 6 个生物碱类成分分别为 DNJ, fagomine, 3-epi-fagomine, DAB, calystegine B₂ 和 2-O-β-Glc-DAB;测定 3 批供试品中总生物碱含量均达到 75% 以上。**结论:**该法简便、准确、灵敏,可用于桑叶总生物碱及其制剂的定性定量分析。

[关键词] 桑叶; 1-脱氧野尻霉素; 总生物碱; 高效液相色谱-质谱联用; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0047-05

[doi] 10.11653/syjf2014020047

HPLC-MS-MS Analysis and Determination of Alkaloids of Mori Folium

SHANG Lei¹, OUYANG Zhen^{1*}, ZHAO Ming^{1,2}, WANG Ji-biao¹, WANG Fan¹, WANG Yuan¹

(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

[Abstract] **Objective:** To use liquid chromatography-mass spectrometry techniques for qualitative analysis of alkaloids of Mori Folium and determine the content of total alkaloids in alkaloids in Mori Folium by HPLC-UV with pre-column derivatization. **Method:** The chromatographic separation was performed on a HiQSiL C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using acetonitrile and 0.1% acetic acid aqueous solution under isocratic elution (50:50) at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. Mori Folium alkaloids was analyzed with 9-fluorenylmethyl chlorformate (FMOC-Cl) as the pre-column derivative agent. Detection wavelength was set at 254 nm with electrospray ionization source (ESI) and positive ion mode. And 1-deoxynojirimycin as the external standard to calculate mulberry leaf total alkaloid content. **Result:** Six alkaloid compounds were identified as DNJ, fagomine, 3-epi-fagomine, DAB, calystegine B₂ and 2-O-β-Glc-DAB. The content of 3 batches test samples were more than 75%. **Conclusion:** The method is sensitive, accurate, simple, and reliable. It can be used for quantitative analysis of Mori Folium alkaloids and preparation.

[Key words] Mori Folium; 1-deoxynojirimycin; alkaloids; HPLC-MS-MS; content determination

[收稿日期] 20130823(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072985/H2801);江苏省“六大人才高峰”第七批高层次人才项目;江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2012171)

[第一作者] 尚磊, 硕士, 从事中药活性成分研究及新药开发, Tel:15862980416, E-mail:slshihao@163.com

[通讯作者] * 欧阳臻, 教授, 博士生导师, 从事中药活性成分研究及新药开发, Tel:0511-88791564, E-mail:zhenouyang@ujs.edu.cn

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 甘、苦、寒, 归肺、肝经, 具有疏散风热、清肺润燥、清肝明目的功效^[1]。在历代中医药典籍和国内外民间验方、秘方中记载有利用桑叶治疗“消渴症”, 即现在的糖尿病。现代药理学研究也表明, 桑叶可抑制血糖升高, 具有预防和治疗糖尿病的作用, 其桑叶中降血糖的主要活性成分是以 1-脱氧野尻霉素 (1-deoxyojirimycin, DNJ) 为主的多羟基生物碱类成分^[2-3]。DNJ 及其多羟基生物碱类成分属于强效 α -糖苷酶抑制剂, 具有很好的抑制血糖作用。本课题组前期已建立桑叶中 DNJ 的含量测定方法^[4], 也有其他相关文献报道^[5-9], 但对桑叶多羟基总生物碱类成分的含量分析报道较少。主要有雷氏盐比色法^[10]等, 但此方法灵敏度差, 干扰因素较多, 专属性较差。本实验通过 HPLC-MS-MS, 对桑叶总生物碱部位中的各生物碱成分进行定性分析, 并参照文献^[11]以 DNJ 为对照, 采用柱前衍生化 HPLC-UV 测定桑叶总生物碱含量, 为桑叶总生物碱及其制剂的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 JASCO LC1500 型高效液相色谱系统 (紫外检测器, N2000 色谱工作站); LXQ 型线性离子阱质谱 (LXQ Ion Trap LC/MS, 赛默飞世尔科技公司)。

1.2 试剂 1-脱氧野尻霉素对照品 (批号 20110405, 上海源叶生物科技有限公司, 纯度 > 98%); 桑叶总生物碱供试品 (自制, 批号 110910, 111008, 111020); 9-氯甲酸芴甲酯 (FMO-CI, Sigma 公司), 甘氨酸 (华美生物工程公司, 纯度 > 98%), 娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

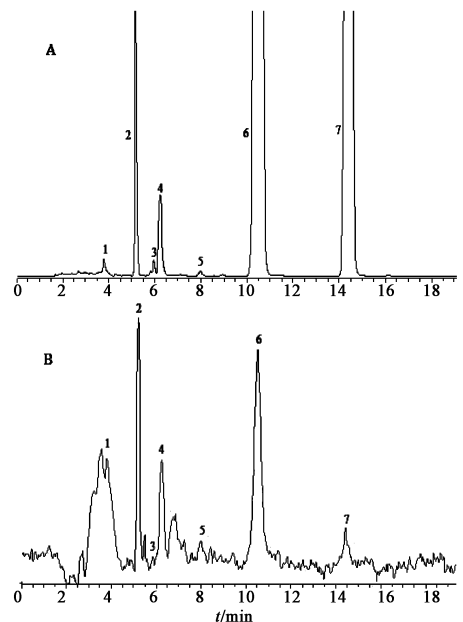
2.1 桑叶生物碱部位成分的液质联用 (HPLC-MS-MS) 分析

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取桑叶生物碱部位干燥粉末 100 mg, 加蒸馏水超声 1 min 溶解并定容至 50 mL, 摇匀。精密量取上述溶液 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 加水定容, 摇匀即得。

2.1.2 衍生化过程 精密量取供试液 100 μ L 置 1.5 mL 离心管中, 精密加入硼酸钾缓冲溶液 (pH 8.5) 100 μ L, 再精密加入 5 mmol \cdot L⁻¹ FMO-CI 乙腈溶液 200 μ L, 摇匀, 20 $^{\circ}$ C 水浴反应 20 min 后, 精密加入 0.1 mol \cdot L⁻¹ 甘氨酸 100 μ L, 最后加入 500 μ L 0.1% 的冰醋酸溶液, 摇匀, 过 0.45 μ m 滤膜, 即得。

2.1.3 色谱及质谱条件 HiQSiL C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈-0.1% 醋酸 (50:50), 流速 0.8 mL \cdot min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 紫外检测器检测波长 254 nm, 进样量 10 μ L。电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式, 鞘气 35 arb, 辅助气 10 arb, 喷雾电压 4.2 kV, 毛细管温度 300.00 $^{\circ}$ C, 毛细管电压 30.00 V, 透镜电压 120.00 V, 扫描范围 100.00 ~ 1500.00。

2.1.4 质谱分析结果 按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.2 项下方法衍生化后进样 10 μ L 分析, 得到桑叶生物碱部位衍生化后的衍生物 HPLC 图和 HPLC-MS 总离子流图。根据质谱提供的一级、二级离子碎片数据并参照相关文献^[5, 11-16], 对桑叶总生物碱中的各生物碱成分进行定性分析, 初步鉴定出 6 个生物碱类成分, 分别为 1-脱氧野尻霉素 (1-deoxyojirimycin, DNJ), 荞麦碱 (fagomine), 3-表荞麦碱 (3-epi-fagomine), 1, 4-双脱氧-1, 4-亚氨基-D-阿拉伯糖醇 (1, 4-dideoxy-1, 4-imino-D-arabinitol, DAB), 打碗花精 B₂ (calystegine B₂) 和 1, 4-双脱氧-1, 4-亚氨基-(2-氧- β -D-吡喃葡萄糖基)-D-阿拉伯糖醇 [1, 4-dideoxy-1, 4-imino-(2-O- β -D-glucopyranosyl)-D-arabinitol, 2-O- β -Glc-DAB]。桑叶总生物碱部位的液相色谱图和质谱总离子流图见图 1, 6 个化合物的质谱数据见表 1。



1. 2-O- β -Glc-DAB-FMO; 2. DNJ-FMO; 3. 3-epi-fagomine-FMO; 4. fagomine-FMO plus DAB-FMO; 5. calystegine B₂-FMO; 6. glyci-en-FMO; 7. FMO-OH
图 1 桑叶总生物碱部位的 HPLC (A) 及总离子流 (B) 色谱峰 1 一级质谱中出现碎片 m/z 518.05

$[M + H]^+$, 二级质谱中给出产物离子峰 m/z 322. 81 $[M + H - 196]^+$, m/z 356. 12 $[M + H - 162]^+$ 。根据桑叶生物碱类化合物的裂解规律可推知 m/z 322. 81 $[M + H - C_{14}H_{12}O]^+$, m/z 356. 12 $[M + H - C_6H_{10}O_5]^+$, 符合 2-*O*- β -Glc-DAB-FMOC 的裂解规律, 并和文献^[5]报道基本一致。由以上信息推测 m/z 518. 05 $[M + H]^+$ 为 2-*O*- β -Glc-DAB-FMOC 的准分子离子峰。

色谱峰 2 一级质谱中出现碎片 m/z 386. 08 $[M + H]^+$, m/z 368. 08 $[M + H - H_2O]^+$; 二级质谱中给出产物离子峰 m/z 190. 08 $[M + H - 196]^+$ 。根据桑叶生物碱类化合物的裂解规律可推知 m/z 190. 08 $[M + H - C_{14}H_{12}O]^+$, 符合 DNJ-FMOC 的裂解规律, 并和文献^[5,12-14]报道基本一致。由以上信息推测 m/z 386. 08 $[M + H]^+$ 为 DNJ-FMOC 的准分子离子峰。

色谱峰 3 一级质谱中出现碎片 m/z 370. 13 $[M + H]^+$, m/z 174. 26 $[M + H - 196]^+$, 二级质谱中给出产物离子峰 m/z 174. 10 $[M + H - 196]^+$ 。根据桑叶生物碱类化合物的裂解规律可推知 m/z 174. 26 $[M + H - C_{14}H_{12}O]^+$, m/z 174. 10 $[M + H -$

$C_{14}H_{12}O]^+$, 符合 3-fagomine-FMOC 的裂解规律, 并和文献^[5,15-16]报道基本一致。由以上信息推测 m/z 370. 13 $[M + H]^+$ 为 3-*epi*-fagomine-FMOC 的准分子离子峰。

色谱峰 4 一级质谱中出现碎片 m/z 370. 14 $[M + H]^+$, m/z 356. 14 $[M + H]^+$, 二级质谱中给出产物离子峰 m/z 174. 07 $[M + H - 196]^+$, m/z 160. 02 $[M + H - 196]^+$ 。根据桑叶生物碱类化合物的裂解规律可推知 m/z 174. 07 $[M + H - C_{14}H_{12}O]^+$, m/z 160. 02 $[M + H - C_{14}H_{12}O]^+$, 符合 fagomine-FMOC 和 DAB-FMOC 的裂解规律, 并和文献^[5,15-16]报道基本一致。由以上信息推测 m/z 370. 14 $[M + H]^+$ 为 fagomine-FMOC 的准分子离子峰, m/z 356. 14 $[M + H]^+$ 为 DAB-FMOC 的准分子离子峰。

色谱峰 5 一级质谱中出现碎片 m/z 398. 12 $[M + H]^+$, 二级质谱中给出产物离子峰 m/z 202. 08 $[M + H - 196]^+$ 。根据桑叶生物碱类化合物的裂解规律可推知 m/z 202. 08 $[M + H - C_{14}H_{12}O]^+$, 符合 calystegine B₂-FMOC 的裂解规律, 并和文献^[5,15-17]报道基本一致。由以上信息推测 m/z 398. 12 $[M + H]^+$ 为 calystegine B₂-FMOC 的准分子离子峰。

表 1 桑叶生物碱部位生物碱成分衍生物的 HPLC-DAD-ESI-MS-MS 定性分析

峰号	t_R /min	准分子量/M+1	裂解碎片	化合物归属
1	3.79	518.11	322.81, 356.12	2- <i>O</i> - β -Glc-DAB-FMOC
2	5.17	386.08	190.08, 368.08	DNJ-FMOC
3	5.93	370.13	174.26, 174.10	3- <i>epi</i> -fagomine-FMOC
4	6.24	370.14	174.07	fagomine-FMOC
		356.14	160.12	DAB-FMOC
5	7.98	398.12	202.08	calystegine B ₂ -FMOC

2.2 柱前衍生化 HPLC-UV 测定总生物碱含量

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 DNJ 对照品置 25 mL 量瓶中, 以蒸馏水溶解并定容, 制成 508 mg·L⁻¹ 的对照品储备液。

2.2.2 色谱条件 色谱条件同 2.1.3 项。测得的对照品和样品色谱图见图 2。

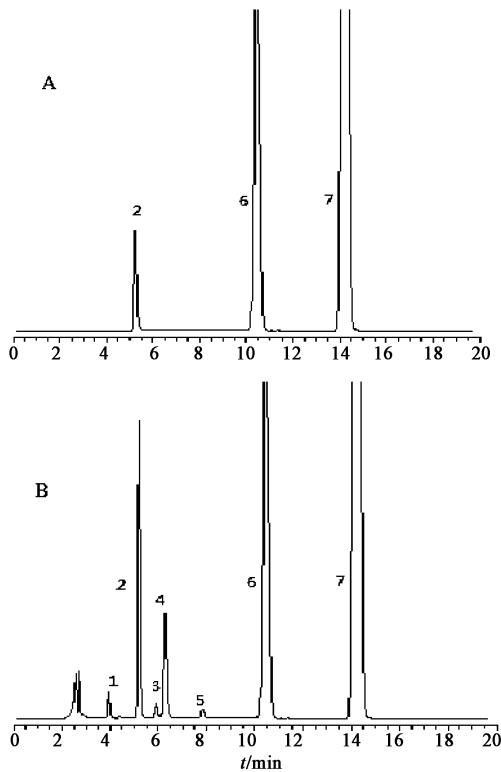
2.2.3 线性关系考察 分别精密量取对照品储备液以蒸馏水稀释成 508, 254, 127, 63.5, 31.75 mg·L⁻¹ 的 5 个质量浓度的对照品溶液。分别精密吸取上述 5 个对照品溶液及对照品储备液各 100 μ L, 按 2.1.2 项下方法进行衍生化, 过滤, 按 2.1.3 项下色谱条件进样 10 μ L 测定, 以进样浓度为 X 横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标进行回归。回归方程为 $Y = 13\,458X - 4\,708.1$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明 DNJ 在 31.75 ~ 508 mg·L⁻¹ 线性关系良好。根据信噪比 $S/N = 3$ 计算, DNJ 的最低检出限为 3.3 ng。

2.2.4 精密度试验 精密吸取 508 mg·L⁻¹ 的对照品溶液, 按 2.1.2 项下方法进行衍生化, 过滤, 进样 10 μ L 测定, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算 DNJ 的 RSD 为 1.39%。表明精密度良好。

2.2.5 重复性试验 按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液 6 份, 按 2.1.2 项下方法进行衍生化, 过滤, 进样 10 μ L 测定, 测得 6 份供试品溶液中 DNJ 和总生物碱的含量 RSD 分别为 1.78%, 1.77%, 表明重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 将衍生后的供试品溶液置冰箱 4 $^{\circ}$ C 保存, 分别于 0, 2, 6, 8, 12, 16, 24 h 后, 进样 10 μ L 测定, 记录 DNJ 的峰面积 RSD 为 1.49%。结果表明, 与 0 h 相比, 24 h 内峰面积基本不变。即衍生物在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取已知 DNJ 含量的样品粉末 50 mg 共 6 份, 至 50 mL 量瓶中, 加水溶



A. 对照品; B. 供试品; 1. 2-O-β-Glc-DAB;

2. DNJ; 3. 3-epi-fagomine; 4. fagomine plus DAB;

5. calystegine B₂; 6. glyci-en-FMOC; 7. FMOC-OH

图2 桑叶总生物碱样品 HPLC

解并定容, 摇匀。分别精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入 DNJ 的对照品储备液 1 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀后精密吸取 100 μL, 按 2.1.2 项下方法进行衍生化, 过滤, 进样 10 μL 测定, 计算 DNJ 的平均回收率为 98.68%, RSD 1.21%。

2.2.8 总生物碱含量测定 精密称取桑叶总生物碱样品粉末, 按 2.1.1 项下方法制备样品溶液, 按 2.1.2 项下方法进行衍生化, 过滤, 进样 10 μL 测定。记录与对照品主峰保留时间一致的色谱峰, 峰面积按外标法计算 DNJ 的含量, 并同时记录与对照品主峰相对保留时间为 1.17 ~ 1.58 的色谱峰, 相对保留时间见表 2。根据各生物碱成分色谱峰的峰面积之和按外标法计算样品中总生物碱的含量(以 DNJ 计)。3 批中试放大的桑叶总生物碱中 DNJ 含量分别为 51.03%, 50.88%, 57.11%, 总生物碱含

表2 桑叶总生物碱部位中生物碱类成分的相对保留时间

批号	相对保留时间				
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5
110910	1.31	1.00	1.17	1.21	1.56
111008	1.32	1.00	1.17	1.20	1.55
111020	1.31	1.00	1.19	1.22	1.58

量分别为 75.37%, 77.21%, 79.84%。

3 讨论

桑叶生物碱类化合物因其分子结构中缺少发色团, 无紫外吸收, 而且水溶性较大, 在 C₁₈ 柱上保留较弱, 出峰时间过早, 不能够完全分离。因此, 利用柱前衍生化后 HPLC-MS-MS 法进行分离鉴定, 确定了主要生物碱成分为 5 个多羟基生物碱和 1 个多羟基生物碱糖苷, 分别为 1-脱氧野尻霉素 (1-deoxynojirimycin, DNJ), 莽麦碱 (fagomine), 3-表莽麦碱 (3-epi-fagomine), 1,4-双脱氧-1,4-亚氨基-D-阿拉伯糖醇 (1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, DAB), 打碗花精 B₂ (calystegine B₂) 和 1,4-双脱氧-1,4-亚氨基-(2-氧-β-D-吡喃葡萄糖基)-D-阿拉伯糖醇 [1,4-dideoxy-1,4-imino-(2-O-β-D-glucopyranosyl)-D-arabinitol, 2-O-β-Glc-DAB]。其中 fagomine 与 DAB 的衍生物的色谱峰重叠, 原因可能是由于两者属于同系物, 极性非常相似, 但是并不影响两者在质谱中的定性鉴别。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 279.
- [2] 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.
- [3] Jakobsen P, Lundbeck J M, Kristiansen M, et al. Iminosugars: potential inhibitors of liver glycogen phosphorylase [J]. Bioorg Med Chem, 2001, 9(3): 733.
- [4] 欧阳臻, 陈钧, 李永辉. 柱前衍生化高效液相色谱荧光检测法测定桑叶中的 1-脱氧野尻霉素[J]. 分析化学, 2005, 33(6): 817.
- [5] Kim Jin-Won, Kim Soo-Un, Lee Heui Sam, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatography A, 2003(1002): 93.
- [6] 关丽萍, 郑光浩, 金晴昊, 等. RP-HPLC 测定不同地区、不同采集期桑叶中 1-脱氧野尻霉素[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1881.
- [7] 梁建宁, 陈正收, 吴璐. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定桑白皮中 1-脱氧野尻霉素的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7): 905.
- [8] 姜永涛, 陈继永, 刘珂. HPLC-ELSD 测定桑叶中 1-脱氧野尻霉素的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(1): 27.

HPLC-ELSD 测定咽炎颗粒中齐墩果酸与常春藤皂苷元

郭宇姝¹, 窦冕², 张沂¹, 刘江云², 郝丽莉^{2*}

(1. 海军总医院药剂科, 北京 100048; 2. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123)

[摘要] 目的: 建立测定咽炎颗粒中齐墩果酸与常春藤皂苷元的高效液相色谱-蒸发光散射含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, Cosmosil PAQ-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇(A)-水(B) 流动相梯度洗脱, 蒸发光散射检测, 流速 0.9 mL·min⁻¹。结果: 齐墩果酸的线性范围为 1.321 ~ 5.285 μg (r = 0.999 3), 平均加样回收率为 98.5%; 常春藤皂苷元的线性范围为 0.473 6 ~ 1.894 μg (r = 0.999 2), 平均加样回收率为 100.2%。结论: 该方法操作简便, 结果准确可靠, 可作为咽炎颗粒中齐墩果酸与常春藤皂苷元的含量测定方法。

[关键词] 咽炎颗粒; 齐墩果酸; 常春藤皂苷元; 高效液相色谱; 蒸发光散射检测

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2014) 02-0051-04

[doi] 10.11653/syfy2014020051

Determination of Oleanolic Acid and Hederagenin in Yanyan Granule by HPLC-ELSD

GUO Yu-shu¹, DOU Mian², ZHANG Yi¹, LIU Jiang-yun², HAO Li-li^{2*}

(1. Department of Pharmacy, Navy General Hospital, Beijing 100048, China;
2. College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

[收稿日期] 20130626(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274190)

[第一作者] 郭宇姝, 副主任药师, 从事药物分析研究, Tel: 010-66958206, E-mail: guoyusu@sina.com

[通讯作者] * 郝丽莉, 研究员, 从事中医药基础与临床研究, Tel: 0512-65884301, E-mail: haolili@suda.edu.cn

- [9] 欧阳华学, 黎源倩, 肖全伟. HPLC 法测定桑叶中 1-脱氧野尻霉素[J]. 中草药, 2007, 38(5):774.
- [10] 李凡, 裘雅渔, 钱文春, 等. 桑叶中总生物碱和 1-脱氧野尻霉素的含量考察[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(3):176.
- [11] 夏学军, 汪仁芸, 刘玉玲. 柱前衍生化 RP-HPLC 法测定桑枝总生物碱的含量[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(23):2044.
- [12] Chalunton Vichasilp, Kiyotaka Nakagawa, Phumon Sookwong, et al. Development of high 1-deoxyojirimycin (DNJ) content mulberry tea and use of response surface methodology to optimize tea-making conditions for highest DNJ extraction[J]. LWT-Food Sci Technol, 2012(45):226.
- [13] Naoki Asano, Emiko Tomioka, Haruhisa Kizu, et al. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis* [J]. Carbohydr Res, 1994, 253:235.
- [14] Naoki Asano, Toru Yamashita, Kayo Yasuda, et al. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.) [J]. J Agric Food Chem, 2001(49):4208.
- [15] Kim Ji-Yeon, Mua Yu, Jin Xiangdan, et al. Efficient and stereoselective syntheses of DAB-1 and D-fagomine via chiral 1, 3-oxazine [J]. Tetrahedron, 2011(67):9426.
- [16] Hajime Yokoyama, Hiromi Ejiri, Masahiro Miyazawa, et al. Asymmetric synthesis of fagomine [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2007(18):852.
- [17] Atsushi Kato, Naoki Asano, Haruhisa Kizu, et al. calystegine alkaloids from *duboisia leichhardtii* [J]. Phytochemistry, 1997, 45(2):425.

[责任编辑 顾雪竹]