

巴戟天及不同盐分炮制品中 糖类成分 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

刘硕¹, 马方励¹, 李养学^{2*}, 罗文汇²

(1. 无限极(中国)有限公司, 广州 510665; 2. 广东省中医研究所, 广州 510095)

[摘要] 目的: 建立巴戟天及不同盐分炮制品中糖类成分 HPLC-ELSD 指纹图谱分析方法, 为确定盐制巴戟天饮片在炮制过程中的用盐比例及其质量标准的制定提供依据。方法: 采用 HPLC, 色谱柱为 Agilent ZORBAX Carbohydrate (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-甲醇-水, 流速 1.2 mL·min⁻¹, 梯度洗脱, 柱温 35 °C, 以蒸发光散射检测器 (ELSD) 检测, 漂移管温度为 105 °C, 增益值为 1, 氮气流量 2.0 L·min⁻¹; 采用国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 年 A 版) 进行评价。结果: 以耐斯糖峰为参照峰, 18 批样品标定了共有峰 16 个, 各样品相似度均 > 0.90。结论: 该方法简单、准确、重复性好, 可用于巴戟天及其盐制品糖类成分的质量控制。

[关键词] 巴戟天; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器; 指纹图谱; 糖类成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0106-05

HPLC-ELSD Fingerprint of Carbohydrate Constituents in Morindae Officinalis Radix and its Salt Processed Products

LIU Shuo¹, MA Fang-li¹, LI Yang-xue^{2*}, LUO Wen-hui²

(1. Infinitus (China) Company Limited, Guangzhou 510665, China;

2. Guangdong Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China)

[收稿日期] 20120817(010)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2011B030500004)

[第一作者] 刘硕, 工程师, 硕士, 从事中草药及相关保健食品的研究, E-mail: shuo_liu@infinitus.com.cn

[通讯作者] * 李养学, 中药师, 本科, 从事中药及制剂的质量评价, Tel: 020-83501292, E-mail: efongzg@126.com

以及甲醇-1% 醋酸梯度洗脱, 结果显示甲醇-1% 醋酸(28:72)分离效果较好, 但是若采用等度洗脱, 样品中的杂质峰容易影响后续样品的分析, 故在等度条件基础上, 采用上述梯度洗脱, 以保证分离度, 并避免干扰。

4.2 供试品制备方法的优化 对提取溶剂进行了考察, 比较了甲醇, 70% 甲醇, 50% 甲醇, 结果 70% 甲醇提取大豆苷和染料木苷的效率最高; 对提取方法进行了考察, 比较了超声法和回流法的效果, 结果回流提取, 大豆苷和染料木苷含量均较高; 最后考察了不同提取时间(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 h)对含量的影响, 结果表明水浴加热回流 2, 3 h, 大豆黄卷中大豆苷和染料木苷的提取率基本一致, 故选用提取时间为 2 h。

[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: 19.
- [2] 沈烈行 徐瑞军. 大豆黄卷炮制工艺改进[J]. 中药材, 1994, 17(8): 7.
- [3] 霍红, 田明, 王秀海, 等. 大豆及其生物发胶制品淡豆豉异黄酮含量研究[J]. 中医药学报, 2011, 39(3): 74.
- [4] 刘清, 徐风华, 李永生. 优化 HPLC 法测定淡豆豉中大豆异黄酮的含量[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 182.
- [5] 章军, 薛翠娟, 荆文光, 等. HPLC 测定葛根饮片中 5 个成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 108.

[责任编辑 顾雪竹]

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC-ELSD fingerprint analysis method of carbohydrate constituents in *Morindae Officinalis Radix* and its salt processed products and provide the basis for the amount of salt proportions when being processed and quality standard. **Method:** HPLC analysis was performed on a Agilent ZORBAX carbohydrate analysis column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mixture of methanol and acetonitrile and water as mobile phase in gradient mode. The drift tube temperature was at 105 °C, nitrogen flow was 2.0 L · min⁻¹, gain value was 1, column temperature was at 35 °C and flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The chromatogram fingerprint was evaluated by the similarity evaluation software published by committee of pharmacopeia. **Result:** Sixteen co-possessing peaks were selected as the fingerprint peaks of *Morindae Officinalis Radix* by taking nystose peak as the referential peak. The fingerprint similarity value of eighteen batches was above 0.90 compared with system generation spectrum. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible; it can be used for quality control of carbohydrate components in *Morindae Officinalis Radix* and its salt processed products.

[Key words] *Morindae Officinalis Radix*; HPLC-ELSD; fingerprint; carbohydrate components

巴戟天为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥肉质根,味甘、辛,性微温,有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效^[1]。始载于《神农本草经》,列为上品^[2]。主要分布在福建、广东、广西、海南等省的热带和亚热带地区,是我国著名的“四大南药”之一,也是出口创汇的名贵中药材。

巴戟天中含有蒽醌、氨基酸、多糖、脂类、有机酸、生物碱、黄酮等 11 类化合物及 24 种无机元素^[3]。巴戟天中多糖含量很高,其中巴戟天寡糖成分具有补肾壮阳作用^[4],并有提高细胞免疫、抗衰老、抗抑郁、降血糖等功能^[5-8],为巴戟天主要有效成分之一。《中国药典》2010 年版巴戟天项下收载有巴戟肉、盐巴戟天和制巴戟天 3 种饮片。巴戟天盐制后可引药入肾,主归肾经,温而不燥,多服久服无伤阴之弊,常用于阳痿早泄、宫冷不孕等。

蒸发光散射检测器 (evaporative light-scattering detector, ELSD) 是一种通用型质量检测器,由于其具有可测定无紫外吸收的化合物、可进行梯度洗脱等特点,弥补了紫外检测器 (UVD) 和示差折光检测器 (RID) 的不足,在中药分析领域应用越来越广泛。为确定盐制巴戟天饮片在炮制过程中的用盐比例,为盐制巴戟天质量标准的制定提供依据^[9-10],本实验采用 HPLC-ELSD 技术对广东德庆产巴戟天在不同生长环境下 (农家肥、壳聚糖、有机肥) 的药材及其不同盐分 (1%, 2%, 4%, 6%, 8%) 的炮制品进行了分析,选定果糖、蔗糖和耐斯糖 3 种指标性成分进行测定,找出巴戟天饮片与盐制品的共有峰,比较分析样品中寡糖之间的变化关系,生成盐巴戟天的对照指纹图谱^[11]。

1 材料

1.1 样品 巴戟天样品共 18 批次,均采自广东省

德庆县高良镇巴戟天 GAP 规范化种植基地,见表 1。(不同盐分巴戟天为自制,方法参考《中国药典》2010 年版附录 II D 盐蒸法,表中农家肥用“NJF”表示,有机肥用“YJF”表示,壳聚糖用“QJT”表示,如“巴戟天(NJF)1%”指“在农家肥的生长环境下,用 1% 的食盐炮制的巴戟天样品”,依此类推)。

表 1 不同巴戟天样品

No.	名称	No.	名称
S1	巴戟天 (NJF)	S10	巴戟天 (QJT)4%
S2	巴戟天 (NJF)1%	S11	巴戟天 (QJT)6%
S3	巴戟天 (NJF)2%	S12	巴戟天 (QJT)8%
S4	巴戟天 (NJF)4%	S13	巴戟天 (YJF)
S5	巴戟天 (NJF)6%	S14	巴戟天 (YJF)1%
S6	巴戟天 (NJF)8%	S15	巴戟天 (YJF)2%
S7	巴戟天 (QJT)	S16	巴戟天 (YJF)4%
S8	巴戟天 (QJT)1%	S17	巴戟天 (YJF)6%
S9	巴戟天 (QJT)2%	S18	巴戟天 (YJF)8%

1.2 仪器与试剂 Agilent 1200 型高效液相色谱仪, Alltech 3300 蒸发光散射检测器, Agilent ZORBAX Carbohydrate 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 电子分析天平 (瑞士)。果糖 (批号 100231-200904)、蔗糖 (批号 111507-200302) 均购自中国药品生物制品检定所,耐斯糖 (批号 N-016-110721) 购于成都瑞芬思生物科技有限公司,水为超纯水,乙腈、甲醇均为色谱纯 (德国 Merck),其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Carbohydrate 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 蒸发光散射检测器, 漂移管温度为 105 °C, 氮气流速 2.0 L · min⁻¹, 柱温

35 ℃; 流动相乙腈(A)-甲醇(B)-水(C); 流速 1.2 mL·min⁻¹, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 2。

表 2 巴戟天流动相洗脱程序

t/min	乙腈(A)/%	甲醇(B)/%	水(C)/%
0	80	0	20
25	70	0	30
50	55	15	30
80	45	30	25
81	80	0	20
100	80	0	20

2.2 对照品溶液制备 取果糖、蔗糖、耐斯糖对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 分别含果糖 1.24 mg、蔗糖 1.06 mg、耐斯糖 0.98 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取巴戟天各样品(60 ℃干燥)粉碎成细粉, 过 60 目筛。称取粉末约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-水(3:97) 50 mL, 称定质量, 沸水浴中加热回流 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用甲醇-水(3:97)补足减失的质量, 摇匀, 放置, 取上清液, 滤过, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

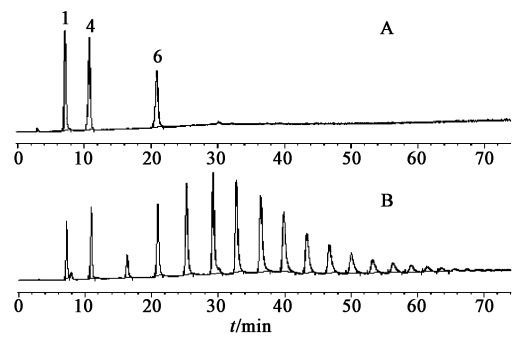
2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份供试品溶液(S7-1), 连续进样 6 次, 以 8 号峰为参照峰, 计算出 1-16 号共有峰相对保留时间和相对峰面积, RSD 均 < 3%, 同时用相似度评价软件计算, 所测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度均 > 0.99, 表明仪器稳定, 精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取 6 份同一批药材粉末(S7), 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别进样, 以 8 号峰为参照峰, 计算出 1~16 号共有峰相对保留时间和相对峰面积, RSD 均 < 3%, 同时用相似度评价软件计算, 所测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度均 > 0.99, 表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取重复性试验中同一份供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 以 8 号峰为参照峰, 计算出 1~16 号共有峰相对保留时间和相对峰面积, RSD 均 < 3%, 同时用相似度评价软件计算, 所测得的指纹图谱与其所得共有模式图谱的相似度均 > 0.99, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 样品测定 分别吸取上述对照品、供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 依法检测, 记录色谱图。结果见图 1, 2。



A. 对照品; B. 样品; 1. 果糖; 4. 蔗糖; 6. 耐斯糖

图 1 巴戟天盐制品 HPLC

2.6 指纹图谱的建立 精密吸取 2.3 项下制备的供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 得到巴戟天 HPLC 图谱, 经过与对照品 HPLC 图谱的比对, 初步确认了巴戟天样品中果糖、蔗糖和耐斯糖的色谱峰, 分别为 1, 4, 6 号峰。

将所得巴戟天样品的 HPLC 指纹图谱导入国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 年 A 版), 进行色谱峰匹配, 结果见图 2, 所得对照指纹图谱见图 3。以耐斯糖峰(6 号峰)为参照标定了 16 个共有峰, 确定了巴戟天及不同盐分炮制品中糖类成分的指纹图谱, 各样品共有峰的相对保留时间及相对峰面积分别列于表 3, 4。18 批巴戟天与对照指纹图谱相似度计算结果分别为 0.962, 0.978, 0.981, 0.981, 0.980, 0.972, 0.949, 0.973, 0.981, 0.982, 0.977, 0.954, 0.972, 0.976, 0.973, 0.928, 0.940, 0.906。

3 结果与讨论

3.1 巴戟天及盐制品指纹图谱比较 通过对巴戟天各样品的 HPLC 图谱进行分析, 发现各样品的相对保留时间基本一致, 利用国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 年 A 版)进行指纹图谱分析, 生成了巴戟天对照指纹图谱, 有 16 个色谱峰, 巴戟天各供试品指纹图谱与对照指纹图谱比较, 原药材与对照图谱有 15 个共有

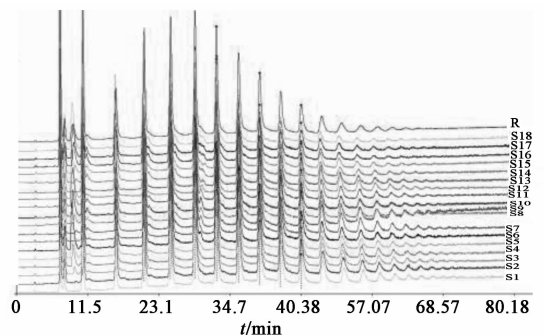


图 2 18 批巴戟天样品匹配色谱图

表 3 18 批巴戟天样品共有峰的相对保留时间

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	min
1	0.342	0.342	0.341	0.342	0.342	0.343	0.342	0.343	0.342	0.342	0.343	0.343	0.346	0.343	0.344	0.342	0.347	0.343	
2	0.378	0.379	0.377	0.378	0.378	0.379	0.377	0.379	0.377	0.377	0.378	0.348	0.381	0.379	0.379	0.378	0.378	0.377	
3	0.000	0.000	0.453	0.442	0.435	0.433	0.000	0.000	0.456	0.442	0.438	0.436	0.000	0.000	0.462	0.450	0.446	0.440	
4	0.519	0.522	0.521	0.523	0.522	0.523	0.521	0.521	0.520	0.521	0.522	0.521	0.523	0.521	0.521	0.520	0.520	0.521	
5	0.779	0.780	0.780	0.780	0.780	0.780	0.780	0.779	0.778	0.778	0.779	0.777	0.783	0.779	0.777	0.776	0.776	0.777	
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
7	1.209	1.207	1.206	1.206	1.206	1.206	1.206	1.205	1.207	1.207	1.207	1.209	1.219	1.207	1.208	1.209	1.209	1.210	
8	1.400	1.396	1.393	1.393	1.394	1.395	1.395	1.396	1.397	1.397	1.397	1.400	1.413	1.397	1.401	1.402	1.403	1.404	
9	1.572	1.566	1.562	1.561	1.561	1.561	1.561	1.563	1.564	1.564	1.564	1.567	1.583	1.565	1.570	1.571	1.572	1.572	
10	1.749	1.743	1.736	1.736	1.737	1.738	1.736	1.737	1.737	1.738	1.736	1.739	1.756	1.736	1.740	1.742	1.742	1.742	
11	1.919	1.911	1.902	1.902	1.902	1.902	1.899	1.902	1.902	1.901	1.901	1.903	1.923	1.900	1.904	1.905	1.905	1.905	
12	2.089	2.079	2.068	2.068	2.069	2.068	2.063	2.065	2.065	2.068	2.066	2.066	2.086	2.063	2.066	2.066	2.066	2.067	
13	2.255	2.243	2.231	2.231	2.230	2.229	2.223	2.228	2.226	2.229	2.226	2.227	2.248	2.223	2.226	2.223	2.225	2.224	
14	2.418	2.404	2.390	2.389	2.390	2.389	2.381	2.385	2.384	2.387	2.384	2.382	2.407	2.378	2.382	2.379	2.379	2.380	
15	2.576	2.557	2.544	2.544	2.541	2.542	2.530	2.539	2.536	2.537	2.536	2.536	2.561	2.530	2.534	2.529	2.530	2.528	
16	2.720	2.702	2.690	2.690	2.690	2.687	2.678	2.687	2.683	2.688	2.686	2.683	2.712	2.681	2.679	2.675	2.677	2.674	

表 4 18 批巴戟天样品共有峰的相对峰面积

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
1	0.575	0.888	0.829	0.918	0.821	0.907	0.534	0.834	0.939	0.962	0.817	0.710	0.537	1.148	1.005	1.653	1.559	1.824
2	0.102	0.143	0.121	0.129	0.149	0.142	0.062	0.078	0.087	0.096	0.079	0.076	0.092	0.182	0.158	0.240	0.214	0.240
3	0.000	0.000	0.072	0.250	0.482	0.674	0.000	0.000	0.101	0.335	0.567	0.836	0.000	0.000	0.079	0.274	0.482	0.774
4	1.156	1.036	1.010	1.101	1.162	1.129	0.772	0.939	0.981	0.840	0.880	0.917	0.935	1.110	1.040	1.238	1.180	1.330
5	0.457	0.487	0.468	0.505	0.551	0.538	0.304	0.442	0.473	0.456	0.448	0.381	0.512	0.653	0.624	0.763	0.706	0.788
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	1.198	1.174	1.189	1.139	1.148	1.152	1.378	1.414	1.488	1.036	1.263	1.387	1.208	1.272	1.267	1.054	1.338	1.063
8	1.348	1.347	1.388	1.342	1.361	1.142	1.745	1.428	1.416	1.097	1.180	1.694	1.257	1.319	1.208	1.044	1.062	1.058
9	1.180	1.173	1.152	1.091	1.075	1.054	1.552	1.384	1.380	1.074	1.300	1.569	1.170	1.069	1.092	1.009	1.078	1.009
10	1.067	1.008	1.045	1.028	0.899	0.929	1.393	1.301	1.190	0.919	0.969	1.343	0.880	0.722	0.847	0.624	0.691	0.641
11	0.902	0.874	0.888	0.846	0.741	0.752	1.206	1.033	0.959	0.724	0.822	1.100	0.714	0.613	0.600	0.506	0.555	0.496
12	0.682	0.720	0.675	0.672	0.617	0.599	0.910	0.766	0.743	0.548	0.619	0.871	0.516	0.400	0.469	0.371	0.422	0.382
13	0.559	0.520	0.527	0.485	0.446	0.464	0.728	0.585	0.479	0.427	0.466	0.631	0.379	0.297	0.333	0.278	0.317	0.271
14	0.400	0.392	0.400	0.363	0.328	0.337	0.537	0.462	0.415	0.312	0.350	0.498	0.261	0.221	0.226	0.172	0.201	0.196
15	0.298	0.300	0.284	0.276	0.240	0.240	0.395	0.366	0.312	0.220	0.244	0.343	0.186	0.153	0.161	0.127	0.151	0.131
16	0.250	0.234	0.231	0.225	0.182	0.181	0.304	0.267	0.235	0.146	0.185	0.254	0.148	0.109	0.120	0.088	0.105	0.096

峰,炮制品有 16 个共有峰,其中 3 号峰为炮制后新生成的峰。同时,对各巴戟天样品色谱图的峰面积进行归一化处理,分析各样品峰面积的变化,结果各样品的峰面积在炮制前后基本保持稳定,无较大变化,说明巴戟天在炮制前后各成分的总量未发生较大变化,只是发生了不同成分之间的相互转化。

3.2 巴戟天样品及不同盐分炮制品相对保留时间及相对峰面积比较 由表 3,4 分析可看出,各样品的相对保留时间基本一致;相对峰面积具基本相同的规律,即 1~7 号峰(除 3,6 号峰),随着炮制盐分浓度的增加,各样品的相对峰面积也逐渐增加,当炮制盐分浓度达到 4% 时,相对峰面积停止增加,随着

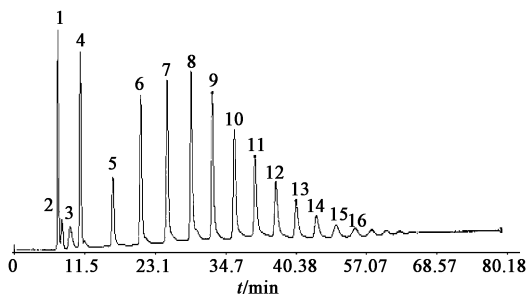


图 3 巴戟天对照指纹图谱

炮制盐分浓度的进一步增加,相对峰面积又逐渐减少;8~16号峰走势基本相反,随着炮制盐分浓度的增加,各样品的相对峰面积逐渐减少,当炮制盐分浓度达到4%时,相对峰面积停止减少,随着炮制盐分浓度的继续增加,相对峰面积也逐渐增加。各样品中,壳聚糖类的变化较为明显,尽管其他两类不太明显,但变化趋势基本保持一致。3号峰相对较为特殊,是炮制后新生成的峰,且随着炮制盐分浓度的增加相对峰面积也保持增加趋势。通过对各样品相对峰面积的分析,进一步论证了《中国药典》对盐制时盐分含量要求的合理性。

3.3 试验条件的选择^[11-12] 对供试品溶液的制备、色谱条件进行了优化选择,对不同提取溶剂、提取方法进行反复考察,结果选择参考《中国药典》2010年版巴戟天含量测定项下供试品处理方法,采用甲醇-水(3:97)为溶剂,在沸水浴中加热回流提取,所得到的信息量较多;选择乙腈-甲醇-水为流动相,梯度洗脱,样品中各色谱峰能较好的分离,且出峰较多;对漂移管温度进行了考察,优选的最佳温度为105℃;对N₂气流速度进行考察,流速1.2 L·min⁻¹时峰形较好,基线平稳;在柱子选择上,比较了不同厂家的色谱柱,结果表明,Agilent ZORBAX Carbohydrate(4.6 mm×250 mm,5 μm)的分离效果较好。

3.4 其他糖类成分的比较 除了选择果糖、蔗糖、耐斯糖外,还选择阿拉伯糖、半乳糖、麦芽糖、乳糖、

鼠李糖等多种糖分与巴戟天样品进行指纹图谱比对,但在巴戟天指纹图谱中未发现相对应的色谱峰,对于指纹图谱中其他较为明显的峰,尚未能一一指认,推测其中可能有多糖类成分^[13],还有待进一步研究。

[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, 2010:75.
[2] 森立之辑. 神农本草经(卷下)[M]. 上海:上海卫生出版社(影印版),1957:93.
[3] 王卫平. 巴戟天化学成分和药理作用研究概况[J]. 时珍国医国药,2000,11(7):665.
[4] 张巍,康懿鹏,陈清瑞,等. 巴戟天对微波损伤的雄鼠睾丸生精功能的影响[J]. 解剖学研究,2010,32(5):338.
[5] 何传波,李琳,汤凤霞,等. 不同巴戟天多糖对免疫活性的影响[J]. 中国食品学报,2010,10(5):68.
[6] 李远彬,王羚郦,赖小平,等. 巴戟天抗衰老活性成分研究[J]. 中南药学,2011,9(2):101.
[7] 刘飞虎,师建国,张晓红,等. 巴戟天寡糖胶囊治疗轻中度抑郁症42例[J]. 陕西中医,2012,33(2):165.
[8] 刘霄. 巴戟天多糖的降血糖和抗氧化作用研究[J]. 中药材,2009,32(6):949.
[9] 许冬瑾,伍小妹,黄云,等. 鲜巴戟天盐制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):50.
[10] 邹兵,马雪松,佟连琨,等. 盐巴戟天炮制工艺的优化[J]. 中国医药指南,2010,8(34):223.
[11] 刘晓涵,陈永刚,林励,等. 不同产地巴戟天中糖类成分 HPLC-ELSD 指纹图谱研究[J]. 中草药,2009,40(10):1641.
[12] 郭念欣,李颖春,蔡佳良,等. 不同生长年限的巴戟天化学成分的指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):65.
[13] 梁丽敏,徐勇. 南药巴戟天多糖的研究进展[J]. 食品工业科技,2011,总244(8):478.

[责任编辑 顾雪竹]