

玉屏风煎剂中氨基酸类成分 HPLC 指纹图谱分析

罗兰¹,张素中¹,黄月纯^{2*},梁美君¹,陈嘉俊¹,赖湘银¹

(1. 中山大学新华学院, 广州 510520; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

〔摘要〕 目的:建立玉屏风煎剂中氨基酸类成分的 HPLC 指纹图谱分析方法,探讨不同配伍对氨基酸类指纹图谱的影响。方法:采用 2,4-二硝基氟苯柱前衍生法,以精氨酸为参照物。Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 nm×250 nm, 5 μm),流动相 A 为乙腈,B 为 *N,N*-二甲基甲酰胺-0.025 mol·L⁻¹醋酸钠(1:100,用 36% 乙酸调 pH 6.0),梯度系统,柱温 40 ℃,检测波长为 360 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,分析时间 70 min。结果:共标出 18 个共有峰,鉴定出 15 种对人体有益的氨基酸成分。除 1 批样品相似度为 0.916 外,9 批样品相似度均大于 0.98。对整方氨基酸指纹图谱的影响从大到小依次是黄芪、炒白术、防风。结论:所建立的玉屏风煎剂中氨基酸类成分指纹图谱特征性强,可作为玉屏风煎剂质量控制的手段之一,并可为中药复方配伍化学成分变化研究提供一定参考。

〔关键词〕 玉屏风煎剂;氨基酸;指纹图谱;高效液相色谱

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)03-0064-05

Analysis on Fingerprint of Amino Acids Composition of Yupingfeng Decoction by HPLC

LUO Lan¹, ZHANG Su-zhong¹, HUANG Yue-chun^{2*}, LIANG Mei-jun¹, CHEN Jia-jun¹, LAI Xiang-yin¹

(1. Xinhua College of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510520, China; 2. The First Hospital Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To establish a fingerprint analysis method for amino acids composition of Yupingfeng decoction by HPLC and explore its various combinations on amino acid composition. **Method:** According to pre-column derivatization method for 2,4 - dinitrofluorobenzene, gradient elution with *N,N*-dimethylformamide-0.025 mol·L⁻¹ sodium acetate (1:100, with 36% acetic acid adjust pH 6.0)- acetonitrile at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ in a Kromasil C₁₈ (4.6 nm×250 mm, 5 μm) Column. The temperature of column was at 40 ℃. The UV detection wave length was set at 360 nm. Incoming sample amount was for 10 μL, analysis of time was for 70 min. **Result:** Eighteen co-possessing peaks were selected as the fingerprint peaks, 15 kinds of beneficial amino acid composition were identified. Except for the fingerprint similarity value of one batch was 0.916, the fingerprint similarity value of the other nine batches was above 0.98. The impact of amino acid fingerprint is in descending order *Astragalus membranaceus*, *Fried Atractylodes macrocephala* *Saposhnikovia*. **Conclusion:** The fingerprint is characteristic, can be used for the quality control of Yupingfeng decoction, and can provide a reference for the research of the changes of chemical composition of traditional Chinese medicine compatibility.

〔Key words〕 Yupingfeng decoction; amino acid; fingerprint; HPLC

玉屏风散源于《丹溪心法》,由黄芪、防风、白术 固,自汗恶风,面色㿠白,或体虚易感风邪者^[1]。现代药理研究表明,玉屏风能明显提高机体免疫功能, (炒)3 味药组成,功能益气、固表、止汗,用于表虚不

〔收稿日期〕 20110309(004)

〔基金项目〕 广东省科技计划项目(2007B060401010)

〔第一作者〕 罗兰,学士,药学助理工程师,从事药物的质量分析,Tel:020-87065055, E-mail:zirolland@126.com

〔通讯作者〕 * 黄月纯,硕士生导师,主任中药师,从事中药质量标准与指纹图谱研究,Tel:020-36591724, E-mail:huangyuechun@163.com

临床应用亦日益广泛。其中的氨基酸类成分为补气、抗炎和抗疲劳功效的主要物质基础之一。课题组前期采用指纹图谱与含量测定相结合,系统建立了玉屏风煎剂中等极性部位 HPLC 指纹图谱分析方法,拟定了特征指纹成分群^[2],研究了不同配伍对 HPLC 指纹图谱及主成分含量的影响^[3-5],对玉屏风方饮片与玉屏风煎剂进行了 HPLC 指纹图谱及主成分含量的相关性分析^[6-8],并初步探讨基于玉屏风煎剂 HPLC 指纹图谱的玉屏风制剂质量评价研究^[9],此外还初步探讨了玉屏风煎剂多糖乙酰化物 GC 指纹图谱^[10]。本文进一步采用柱前衍生 HPLC 对玉屏风煎剂中的氨基酸类成分进行指纹图谱研究,为玉屏风煎剂的质量控制及物质基础提供一定的研究基础。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司,包括四元梯度泵、柱温箱、二级管阵列检测器、紫外检测器、Chemstation 工作站)。

1.2 试药 精氨酸(批号 20090719)、L-苏氨酸(批号 20070501)、L-色氨酸(批号 20070802)、L-组氨酸(批号 20080301)、L-丙氨酸(批号 20080303)、DL-丙氨酸(批号 20080701)、甘氨酸(批号 20080803)、亮氨酸(批号 20080901)、胱氨酸(批号 20081003)、脯氨酸(批号 20081103)、苯丙氨酸(批号 20090327)、缬氨酸(批号 20090618)、精氨酸(批号 20090719)、谷氨酸(批号 20091111)、天门冬氨酸(批号 20100121)等对照品,购于中国药品生物制品检定所。

10 批黄芪饮片、防风饮片、炒白术饮片均购于广州市天河区龙洞的健和堂大药房,经广州中医药大学第一附属医院黄月纯主任中药师鉴定,黄芪为豆科蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的根,防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的根,白术为伞形科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的根的麸炒品。

2,4-二硝基氟苯为生化试剂(批号 FIM01,东京化成工业株式会社),乙腈为色谱纯(Merk 公司产品);N,N-二甲基甲酰胺为色谱纯(批号 20100420,天津市瑞金特化学品有限公司),其他试剂均为分析纯;水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A 为乙腈, B 为 N,N-二甲基

甲酰胺-0.025 mol·L⁻¹ 醋酸钠溶液(1:100,用 36% 乙酸调 pH 6.0)(洗脱梯度 0 ~ 10 min, 13% ~ 15% A; 10 ~ 25 min, 15% ~ 18% A; 25 ~ 35 min, 18% ~ 28% A; 35 ~ 35 min, 28% ~ 45% A; 55 ~ 70 min, 45% ~ 13% A),柱温 40 °C,检测波长 360 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,检测时间 70 min。

2.2 玉屏风煎液及单味煎液、不同配伍煎液的制备

取黄芪饮片 45 g,防风饮片 15 g,白术(炒)饮片 15 g,加水 500 mL,浸泡 30 min,加热煮沸后文火慢煎 40 min,取出,趁热用 4 层纱布滤过,药渣再加水 300 mL 加入煮沸后文火慢煎 30 min,取出,趁热滤过,合并 2 次煎液后浓缩至 50 mL 左右,得玉屏风浓缩煎液。另取单味黄芪、防风、白术(炒)、不同配伍对照,同法制备单味煎液及不同配伍煎液。

2.3 混合氨基酸对照液及各氨基酸对照液的制备

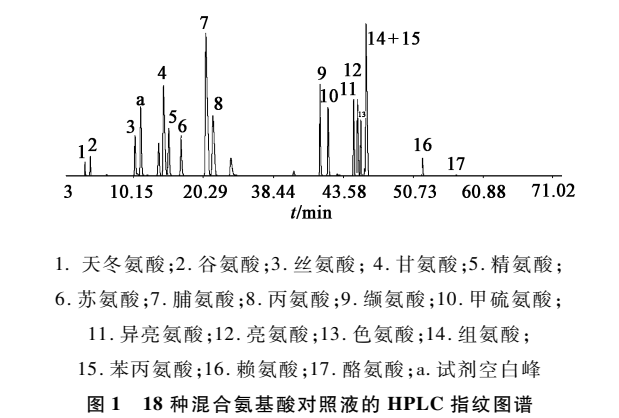
分别精密称取门冬氨酸 2.5 g、谷氨酸 4.2 g、丝氨酸 3.4 g、组氨酸 5.0 g、甘氨酸 5.9 g、苏氨酸 4.2 g、丙氨酸 12.2 g、精氨酸 8.4 g、酪氨酸 0.2 g、胱氨酸 0.2 g、缬氨酸 5.5 g、甲硫氨酸 4.2 g、色氨酸 1.4 g、苯丙氨酸 5.9 g、异亮氨酸 4.2 g、亮氨酸 5.9 g、醋酸赖氨酸 9.5 g、脯氨酸 5.0 g 共 18 种氨基酸对照品,加入焦亚硫酸钠 0.04 g、冰醋酸 2.5 mL,然后加水到 1 000 mL 制成混合氨基酸对照液。分别精密称取各等量氨基酸,同法制成各氨基酸对照液。

2.4 柱前衍生及测定方法 分别精密量取各氨基酸对照液、混合氨基酸对照液各 1 mL,精密量取玉屏风浓缩煎液 0.5 mL,置于 25 mL 的量瓶中,置于 60 °C 恒温水浴箱中振荡 60 min,取出放冷至室温,加 pH 7.0 磷酸盐缓冲液至刻度,摇匀,用微孔滤膜滤过,取续滤液作为对照液及供试品溶液,按照 2.1 色谱条件进行测定,记录 70 min 的色谱图。另取水 1 mL 同法衍生作试剂空白。混合氨基酸对照液的 HPLC 图谱见图 1,18 种混合氨基酸对照液中检出 17 个特征峰。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液,依法连续进样 6 次,结果各特征峰的相对保留时间 RSD 均 < 1.01%,相对峰面积 RSD 均 < 2.68%,图谱导入相似度软件处理,相似度均 > 0.998,表明精密密度良好。

2.5.2 重复性试验 精密吸取同一玉屏风浓缩煎液 6 份,分别按照 2.4 项下方法进行衍生,分别进样,记录色谱图。结果各特征峰的相对保留时间



RSD 均 < 0.57% , 相对峰面积 RSD 均 < 2.80% , 相似度均在 0.999 以上,表明重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别 0,2,4,6,8,10,12 h 进样,记录色谱图。结果各特征峰的相对保留时间 RSD 均 < 1.48% ,相对峰面积 RSD 均 < 2.51% ,相似度均在 0.998 以上,表明供试品溶液在 12 h 较稳定。

2.6 指纹图谱的建立

表 1 玉屏风煎剂柱前衍生氨基酸指纹图谱成分鉴定与峰位归属

峰号	成分	峰位归属	峰号	成分	峰位归属
1	天冬氨酸	黄芪、防风、白术	10		黄芪、防风
2	谷氨酸	黄芪、防风、白术	11	脯氨酸	黄芪、防风、白术
3		黄芪、防风、白术	12	丙氨酸	黄芪、防风、白术
4	丝氨酸	黄芪、防风、白术	13		黄芪、防风
5		黄芪	14	缬氨酸	黄芪、防风
6		黄芪	15	异亮氨酸	黄芪、防风
7	精氨酸	黄芪、防风、白术	16	亮氨酸	黄芪、防风
8	苏氨酸	黄芪、防风、白术	17	赖氨酸	黄芪、防风
9		黄芪、防风	18	酪氨酸	黄芪、防风

2.6.3 参照峰的选择 峰 7(精氨酸)为玉屏风煎剂中主要的氨基酸成分,在 HPLC 中分离良好,含量较高且稳定,所以选择峰 7 为参照峰。

2.6.4 指纹图谱的建立 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版),生成玉屏风煎剂柱前衍生氨基酸对照指纹图谱,见图 3。以峰 7 为参照峰计算 10 批样品各特征峰的相对保留时间与相对峰面积,结果见表 2,3。除去溶剂空白峰,总共有峰面积百分含量达 91.70% ± 1.56% ,其中峰 3、峰 7(精氨酸)及峰 11(脯氨酸)为 3 强峰,3 强峰的峰面积百分含量达 65.09% 。

2.6.5 相似度分析 分别采用 SPSS 软件的相关

2.6.1 样品的测定及共有峰的标定 取 10 批样品,按 2.2 及 2.4 项下操作制备供试品溶液,并按上述色谱条件进样分析,通过供试品溶液与混合氨基酸对照液、各氨基酸对照液特征峰的紫外光谱,标示出 18 个氨基酸特征峰,10 批样品重叠图见图 2。

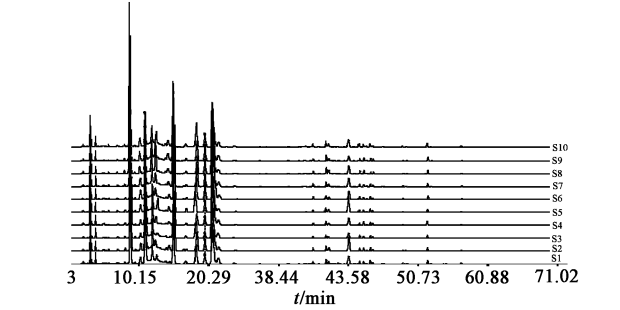
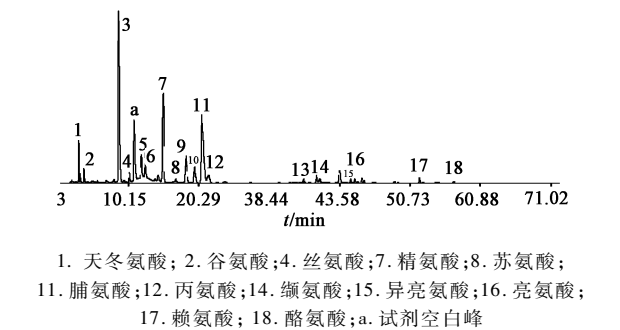


图 2 10 批玉屏风煎剂氨基酸柱前衍生 HPLC 指纹图谱叠加

2.6.2 成分鉴定及峰位归属 通过对玉屏风煎剂与氨基酸对照液、单味煎剂、不同配伍煎剂供试液的分析,进行了 18 个特征峰的成分鉴定与峰位归属,鉴定了 15 个特征峰,结果见表 1。



系数法与夹角余弦法(以 10 批样品均值为对照)以及中国药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版)(均值法),进行相似度评价。除样品 S3 外,其他样品相似度均较高。

表 2 10 批玉屏风煎剂柱前衍生氨基酸指纹图谱相对保留时间

峰号	相对保留时间										$\bar{x} \pm s$
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	0.202	0.199	0.202	0.199	0.198	0.198	0.203	0.203	0.203	0.202	0.201 ± 0.002
2	0.252	0.249	0.252	0.249	0.248	0.251	0.255	0.256	0.253	0.253	0.252 ± 0.003
3	0.582	0.576	0.584	0.579	0.575	0.576	0.579	0.580	0.579	0.579	0.579 ± 0.003
4	0.682	0.678	0.682	0.679	0.677	0.679	0.683	0.683	0.682	0.683	0.681 ± 0.002
5	0.795	0.791	0.795	0.791	0.791	0.793	0.796	0.795	0.794	0.795	0.793 ± 0.002
6	0.839	0.819	0.844	0.825	0.843	0.821	0.829	0.834	0.828	0.838	0.831 ± 0.009
7(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	1.119	1.118	1.121	1.118	1.118	1.120	1.123	1.121	1.123	1.121	1.120 ± 0.002
9	1.220	1.214	1.218	1.217	1.203	1.209	1.224	1.224	1.226	1.221	1.217 ± 0.008
10	1.302	1.290	1.304	1.294	1.294	1.291	1.298	1.297	1.301	1.301	1.297 ± 0.005
11	1.368	1.362	1.367	1.360	1.362	1.365	1.370	1.361	1.370	1.372	1.365 ± 0.004
12	1.432	1.421	1.431	1.424	1.421	1.423	1.432	1.428	1.433	1.433	1.427 ± 0.005
13	2.349	2.310	2.351	2.321	2.306	2.284	2.340	2.350	2.354	2.343	2.329 ± 0.025
14	2.502	2.432	2.502	2.444	2.456	2.401	2.492	2.503	2.508	2.496	2.470 ± 0.038
15	2.800	2.748	2.804	2.761	2.741	2.709	2.789	2.803	2.808	2.791	2.773 ± 0.035
16	2.841	2.789	2.844	2.803	2.783	2.747	2.830	2.846	2.851	2.832	2.814 ± 0.035
17	3.461	3.390	3.462	3.407	3.383	3.337	3.446	3.465	3.472	3.449	3.423 ± 0.046
18	3.786	3.709	3.789	3.728	3.698	3.648	3.773	3.792	3.802	3.776	3.746 ± 0.053

表 3 10 批玉屏风煎剂柱前衍生氨基酸指纹图谱相对峰面积

峰号	相对峰面积										$\bar{x} \pm s$
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	0.136	0.148	0.137	0.284	0.148	0.115	0.174	0.110	0.140	0.157	0.155 ± 0.049
2	0.080	0.079	0.104	0.083	0.074	0.068	0.086	0.054	0.058	0.080	0.077 ± 0.014
3	1.383	2.079	1.125	1.567	2.102	1.713	2.083	1.704	1.586	2.076	1.742 ± 0.340
4	0.067	0.095	0.067	0.069	0.092	0.110	0.100	0.075	0.077	0.101	0.085 ± 0.016
5	0.259	0.254	0.340	0.361	0.273	0.154	0.216	0.234	0.206	0.261	0.256 ± 0.061
6	0.094	0.144	0.061	0.121	0.184	0.113	0.157	0.316	0.184	0.179	0.155 ± 0.070
7(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	0.047	0.037	0.049	0.032	0.071	0.023	0.033	0.048	0.034	0.055	0.043 ± 0.014
9	0.344	0.470	0.427	0.255	0.367	0.366	0.432	0.289	0.308	0.445	0.370 ± 0.072
10	0.150	0.215	0.105	0.163	0.208	0.231	0.223	0.208	0.208	0.234	0.195 ± 0.042
11	1.191	1.214	1.692	1.630	1.251	1.081	1.140	1.470	1.081	1.076	1.283 ± 0.231
12	0.152	0.109	0.180	0.169	0.108	0.118	0.129	0.114	0.135	0.127	0.134 ± 0.025
13	0.023	0.031	0.021	0.026	0.030	0.026	0.036	0.025	0.018	0.034	0.027 ± 0.006
14	0.040	0.062	0.041	0.054	0.059	0.050	0.051	0.052	0.051	0.057	0.052 ± 0.007
15	0.031	0.032	0.041	0.026	0.027	0.036	0.033	0.029	0.024	0.036	0.031 ± 0.005
16	0.018	0.023	0.022	0.035	0.024	0.017	0.022	0.026	0.023	0.024	0.023 ± 0.005
17	0.031	0.032	0.036	0.049	0.030	0.031	0.030	0.032	0.033	0.034	0.034 ± 0.006
18	0.007	0.010	0.006	0.009	0.009	0.007	0.011	0.007	0.008	0.009	0.008 ± 0.002

2.7 配伍对玉屏风煎剂中氨基酸指纹图谱整体的影响 为了解玉屏风中组方 3 味药对整方中的氨基酸类成分影响大小,采取拆方试验,以玉屏风煎剂中组分的不同配伍的指纹图谱与玉屏风煎剂的共有模式图谱相似度为评价指标,运用直观分析方法,分析其组方黄芪、防风、炒白术中 3 种饮片对全方氨基酸类成分影响,见表 4,5。由直观分析结果,3 个因素

对氨基酸类成分指纹图谱影响的大小顺序为黄芪(君药)>白术(臣药)>防风(佐药)。结果初步提示君药黄芪在组方中可能占主要地位,臣佐药起辅助作用,与传统的玉屏风方中医理论具有一致性。

3 讨论

3.1 衍生条件的优化 氨基酸衍生化试剂主要有邻苯二甲醛、9-芴甲基氯甲酸酯、异硫氰酸苯酯、6-

表 4 不同方法分析氨基酸类成分相似度

方法	相似度									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相关系数	0.993	0.992	0.930	0.978	0.993	0.995	0.989	0.992	0.997	0.985
夹角余弦	0.995	0.848	0.967	0.985	0.995	0.996	0.992	0.995	0.998	0.990
相似度软件	0.989	0.992	0.916	0.980	0.995	0.993	0.993	0.984	0.993	0.987

表 5 玉屏风煎剂配伍因素水平

水平因素	黄芪	防风	白术
1	用药	用药	用药
2	不用药	不用药	不用药

表 6 配伍对玉屏风煎剂指纹图谱影响直观分析

配伍组/因素	黄芪	防风	白术	不同配伍与 全方相似度
实验 1	1	1	1	1
实验 2	1	1	2	0.949
实验 3	1	2	1	0.830
实验 4	1	2	2	0.996
实验 5	2	1	1	0.610
实验 6	2	1	2	0.376
实验 7	2	2	1	0.674
实验 8	2	2	2	0
均值 1	0.994	0.734	0.779	
均值 2	0.415	0.625	0.580	
极差(R)	0.529	0.109	0.199	

氨基喹啉-*N*-羟基琥珀酰亚氨基及 2,4-二硝基氟苯等。本文采用 2,4-二硝基氟苯柱前衍生化法建立玉屏风煎剂中游离氨基酸指纹图谱,通过参考文献资料^[11-12],对衍生剂用量(1.0,2.0,2.5,3.0,4.0 mL)、衍生温度(40,50,60,70 ℃)、衍生时间(30,60,90,120 min)等条件进行试验比较及优化,最终确定 2.4 项下衍生方法。

3.2 色谱柱的比较 试验中比较了 Kromasil C₁₈, Luna C₁₈(2),Diamond C₁₈,Zorbax SB-Aq 及 Gemini C₁₈ 5 种色谱柱;Kromasil C₁₈,Luna C₁₈(2) 与 Gemini C₁₈ 分离效果及稳定性均较好,其中 Kromasil C₁₈ 分离效果最佳。

3.3 柱温的选择 试验中比较了柱温 25,30,35,40 ℃;温度越低,氨基酸的峰就会越推迟出峰,导致 40 min 以后的峰发生重叠,在柱温 40 ℃时分离比较好,故选择柱温为 40 ℃。

本文对玉屏风煎剂中氨基酸类成分进行指纹图谱分析,共标出 18 个共有峰,鉴定出 15 种对人体有益的氨基酸成分;除 1 批样品相似度较低外,9 批样品相似度均 >0.98。结果显示,此方法简便可靠、分离效果好,所建立的指纹图谱特征性强,具有较好的稳定性和可控性,可以作为玉屏风煎剂的质量控制

和评价指标之一。

通过对不同配伍煎剂的分析,结果对整方氨基酸指纹图谱的影响从大到小依次是黄芪、炒白术、防风,提示君药黄芪在组方中可能占主要地位,臣佐药起辅助作用,与传统的玉屏风方中医理论具有一致性。本研究亦可为中药复方配伍化学成分变化研究提供一定参考。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2005:409.

[2] 黄月纯,尹雪,魏刚.玉屏风汤剂的 HPLC 指纹图谱研究[J].中成药,2008,30(10):1405.

[3] 尹雪,黄月纯,魏刚.黄芪、白术、防风单煎、合煎对玉屏风煎剂 HPLC 指纹图谱的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(3):1.

[4] 黄月纯,魏刚,尹雪.玉屏风煎剂不同配伍对毛蕊异黄酮苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量的影响[J].中国药房,2010,21(7):621.

[5] 尹雪,黄月纯,张素中,等.玉屏风汤剂不同配伍对黄芪甲苷含量的影响[J].时珍国医国药,2009,20(5):1152.

[6] 黄月纯,尹雪,魏刚.玉屏风方饮片与汤剂 HPLC 指纹图谱的相关性研究[J].中药新药与临床药理,2008,19(4):283.

[7] 黄月纯,尹雪,魏刚.玉屏风方饮片及汤剂中毛蕊异黄酮苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含量相关性研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(6):6.

[8] 涂兴明,黄月纯,张素中.黄芪饮片及玉屏风方汤剂中黄芪甲苷含量的相关研究[J].河南中医,2009,29(6):603.

[9] 黄月纯,陈慕媛,刘翠玲,等.基于玉屏风煎剂的玉屏风制剂质量评价研究[J].中国药房,2010,21(35):3319.

[10] 黄樱华,黄月纯,张素中.玉屏风汤剂多糖乙酰化物 GC 特征图谱研究[J].中国药师,2010,13(1):6.

[11] 付宜和,杨国庆,龚道芬,等.2,4-二硝基氟苯柱前衍生化法测定复方氨基酸注射液 HPLC 色谱条件的优化[J].药物分析杂志,2005,25(7):762.

[12] 张宏杰,周建军,李新生,等.2,4-二硝基氟苯衍生法测定游离氨基酸方法的优化[J].氨基酸和生物资源,2000,22(4):59.

[责任编辑 蔡仲德]