

HPLC法测定二仙汤提取物中抗骨质疏松有效成分的含量^Δ

许红涛^{1,2*}, 李媛^{1,2}, 何勇静², 袁婷婷^{1,2}, 张乃丹², 张巧艳^{1,2#}(1.福建中医药大学药学院,福州 350108;2.第二军医大学药学院生药学教研室,上海 200433)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)15-2122-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.15.39

摘要 目的:建立测定二仙汤提取物中抗骨质疏松有效成分淫羊藿黄酮、盐酸小檗碱和知母皂苷含量的方法。方法:淫羊藿苷和盐酸小檗碱采用高效液相色谱法,色谱柱为 Diamonsil C₁₈,流动相分别为甲醇-1%醋酸(60:40, V/V)和甲醇-乙腈-0.3%三乙胺水溶液(20:10:70, V/V/V, 磷酸调节 pH=4.0),检测波长分别为 270 nm 和 340 nm,柱温分别为 30 ℃ 和 25 ℃,进样量均为 20 μl,流速均为 1.0 ml/min。知母皂苷采用紫外-可见分光光度法测定,皂苷类成分用盐酸水解后,以菝葜皂苷元为对照品,与香草醛显色后,在(590±2) nm 波长下检测。结果:淫羊藿苷、盐酸小檗碱、知母皂苷质量浓度分别在 40.00~90.00、5.00~35.00、8.00~40.00 μg/ml 范围内具有良好的线性关系($r=0.999\ 8, 0.999\ 9, 0.999\ 5$);精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均 < 2%;平均加样回收率分别为 101.43%、99.55%、101.30%, RSD 分别为 1.26%、1.93%、1.55% ($n=6$)。结论:本方法简便、重复性和稳定性良好,适用于二仙汤提取物的质量控制。

关键词 二仙汤提取物;淫羊藿苷;盐酸小檗碱;知母皂苷;高效液相色谱法;紫外-可见分光光度法;含量测定

Content Determination of Active Ingredients of Antiosteoporosis in Er-xian Decoction Extracts

XU Hong-tao^{1,2}, LI Yuan^{1,2}, HE Yong-jing², YUAN Ting-ting^{1,2}, ZHANG Nai-dan², ZHANG Qiao-yan^{1,2}(1.College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2.Dept. of Pharmacognosy, School of Pharmacy, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of active ingredients (icariin flavone, berberin hydrochloride and timosaponin) of antiosteoporosis in Er-xian decoction extracts. METHODS: HPLC method was used to determine the icariin and berberin hydrochloride. The column was Diamonsil C₁₈ with the mobile phase of methanol -1% acetic acid (60:40, V/V) and methanol - acetonitrile -0.3% triethylamine water (20:10:70, V/V/V, adjusted pH to 4.0) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was respectively 270 nm and 340 nm, the temperature was respectively 30 ℃ and 25 ℃ and the volume was 20 μl. UV-visible spectrophotometry was conducted to determine timosaponin. Saponins were hydrolysed with hydrochloric acid and detected at the wavelength of (590±2) nm with the reference of sarsasapogenine after color-developed with vanillin. RESULTS: Icariin, berberin hydrochloride and timosaponin had a good linear relationship in the range of 40.00-90.00 μg/ml, 5.00-35.00 μg/ml and 8.00-40.00 μg/ml, respectively ($r=0.999\ 8, 0.999\ 9, 0.999\ 5$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The average recovery was respectively 101.43% (RSD=1.26%, $n=6$), 99.55% (RSD=1.93%, $n=6$) and 101.30% (RSD=1.55%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple and with high repeatability and stability and can be used for the quality control of Er-xian decoction extracts.

KEYWORDS Er-xian decoction extracts; Icariin; Berberin hydrochloride; Timosaponin; HPLC; UV-visible spectrophotometry; Content determination

二仙汤收载于《中医方剂临床手册》中,由淫羊藿、仙茅、知母、关黄柏、当归和巴戟天 6 味中药组成,具有温肾益精、滋阴降火的双重调节功能,临床上用于治疗妇女更年期综合征和骨质疏松症^[1-2]。为了明确二仙汤的活性物质基础,笔者以成骨细胞和破骨细胞为模型,对二仙汤水提物进行了抗骨质疏松活性成分的导向分离,以去卵巢骨质疏松大鼠为模型,对所获得的有效成分进行了抗骨质疏松的作用验证,明确二仙汤中的淫羊藿黄酮、知母皂苷和黄柏小檗碱为其抗骨质疏松

的有效成分^[3]。随后,又进一步以黄酮、知母皂苷和小檗碱为指标,优化了二仙汤的提取方法和抗骨质疏松部位的制备方法。为此,笔者建立了采用高效液相色谱(HPLC)法测定二仙汤提取物中抗骨质疏松主要有效成分淫羊藿苷、小檗碱和知母皂苷含量的方法,为质量控制提供科学依据。

1 材料

Cary 50 紫外可见分光光度计(美国瓦里安公司), LC-10AD HPLC 仪,包括 SCL-10A 自动进样器、SPD-10A 检测器、LC-10AD 泵、Chrom Spirit Perfect 工作站(日本岛津公司);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

淫羊藿苷(批号:110737-201311,纯度≥98%)、盐酸小檗碱(批号:110713-201212,纯度≥98%)、菝葜皂苷元对照品(批号:110744-201310,纯度≥98%)均由中国食品药品检定研究院提供。

^Δ 基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目(No.12401900702)

* 硕士研究生。研究方向:中药质量控制及药效学研究。电话:021-81871303。E-mail: xht8710@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:中药有效成分及其生物活性研究。电话:021-81871303。E-mail: zqy1965@163.com

淫羊藿、仙茅、知母、黄柏、巴戟天和知母购于上海华宇药材公司,经第二军医大学药学院张巧艳副教授鉴定,符合2010年版《中国药典》(一部)的要求。经测定,淫羊藿中淫羊藿苷的质量分数为2.1%,黄柏中小檗碱的质量分数为0.683%,知母中皂苷类成分的质量分数为6.07%。

2 方法与结果

2.1 二仙汤提取物的制备

按照处方称取药材饮片,混合后,加50%乙醇提取3次,合并提取液。提取液减压浓缩至密度为1.05~1.10 g/ml,即为上柱样品液。将样品液按1倍柱体积上样量加入装有ZTC-1型大孔吸附树脂的色谱柱中,依次用12倍量水、8倍量50%乙醇和10倍量95%乙醇洗脱,收集50%乙醇洗脱液,减压浓缩成浸膏,60℃干燥,得棕褐色粉末,即为二仙汤提取物。

2.2 淫羊藿苷的含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Diamonsil C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm),保护柱:Dikma Easy Guard C₁₈(8 mm×4 mm, 5 μm);流动相:甲醇-1%醋酸(60:40, V/V);检测波长:270 nm;柱温:30℃;进样量:20 μl;流速:1.0 ml/min。理论板数按淫羊藿苷峰计应不低于1500。对照品溶液与供试品溶液在相同位置处有吸收峰出现,而阴性对照品溶液无此峰出现,表明阴性对照品溶液不干扰测定。色谱见图1。

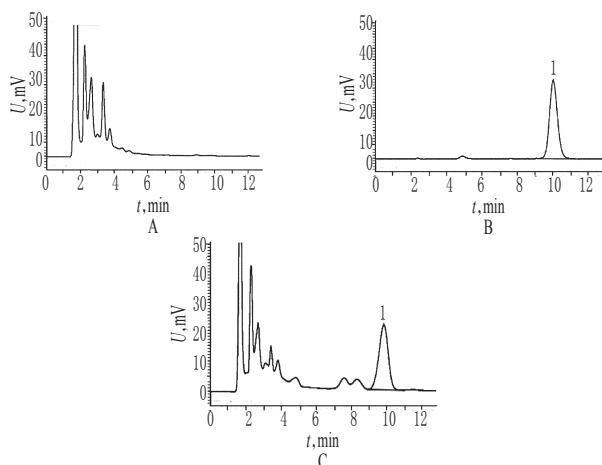


图1 淫羊藿苷高效液相色谱图

A. 阴性对照品; B. 淫羊藿苷对照品; C. 供试品; 1. 淫羊藿苷

Fig 1 HPLC chromatograms of icariin

A. negative control; B. icariin reference; C. test sample; 1. icariin

2.2.2 对照品溶液的制备 取淫羊藿苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 ml含淫羊藿苷70.0 μg的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取“2.1”项下二仙汤提取物约10 mg,精密称定,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,混匀,用微孔滤膜(0.45 μm)过滤,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照品溶液 以同样的提取制备方法,制备缺淫羊藿药材的二仙汤阴性对照提取物样品,按“2.2.3”项下方法制备,即得。

2.2.5 线性关系考察 精密称取淫羊藿苷对照品25.0 mg,置于25 ml量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制每1 ml含淫羊藿苷1.0 mg的贮备液。精密量取贮备液0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 ml,置于10 ml量瓶中,分别用甲醇定容至刻度,摇匀,按“2.2.1”项下色谱条件进样20 μl,记录峰面积。以

质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得淫羊藿苷回归方程为 $y=13\ 123x+31.885$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,淫羊藿苷质量浓度在40.00~90.00 μg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.6 最低定量限 以信噪比大于10计算淫羊藿苷的最低定量限约为1.00 μg/ml。

2.2.7 精密度试验 精密吸取“2.2.5”项下淫羊藿苷对照品溶液(70.00 μg/ml),按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,淫羊藿苷峰面积的RSD为0.51%,表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取二仙汤提取物适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于放置0、1、2、4、6、8 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,淫羊藿苷峰面积的RSD为2.02%,表明供试品溶液在8 h内稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 取二仙汤提取物适量,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果,淫羊藿苷含量的RSD为0.99%,表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 取已知淫羊藿苷含量的样品,共6份,精密称定,加入等量的淫羊藿苷对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 淫羊藿苷加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test of icariin (n=6)

样品量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.70	0.70	1.41	101.43		
0.71	0.70	1.43	102.86		
0.71	0.70	1.43	102.86	101.43	1.26
0.70	0.70	1.41	101.43		
0.71	0.70	1.41	100.00		
0.71	0.70	1.41	100.00		

2.2.11 淫羊藿苷含量测定 取3批样品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按外标法计算样品中淫羊藿苷的含量,结果见表2。

表2 淫羊藿苷含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of icariin (n=3)

样品批号	淫羊藿苷质量分数, %
1	6.36
2	6.28
3	6.26

2.3 盐酸小檗碱的含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Diamonsil C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm),保护柱:Dikma Easy Guard C₁₈(8 mm×4 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-0.3%三乙胺水溶液(20:10:70, V/V/V, 磷酸调节pH为4.0);检测波长:340 nm;柱温:25℃;进样量:20 μl;流速:1.0 ml/min。理论板数按盐酸小檗碱峰计应不低于3000。对照品溶液与供试品溶液在相同位置处有吸收峰出现,而阴性对照品溶液无此峰出现,表明阴性对照品溶液不干扰测定。色谱见图2。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成每1 ml含盐酸小檗碱20 μg的溶液,作为对照品溶液。

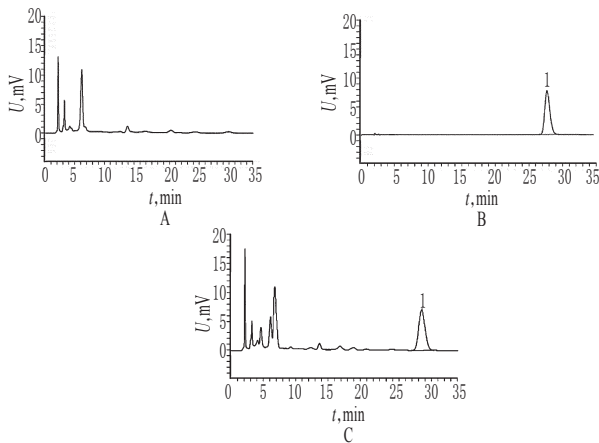


图2 盐酸小檗碱高效液相色谱图

A. 阴性对照品; B. 盐酸小檗碱对照品; C. 供试品; 1. 盐酸小檗碱

Fig 2 HPLC chromatograms of hydrochloride berberin

A. negative control; B. berberin hydrochloride reference; C. test sample; 1. berberin hydrochloride

2.3.3 供试品溶液的制备 取“2.1”项下二仙汤提取物约10 mg, 精密称定, 置于10 ml量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 混匀, 用微孔滤膜(0.45 μm)过滤, 取续滤液, 即得。

2.3.4 阴性对照品溶液 以同样的提取制备方法, 制备缺关黄柏药材的二仙汤阴性对照提取物样品, 按“2.3.3”项下方法制备, 即得。

2.3.5 线性关系考察 精密称取盐酸小檗碱对照品10.0 mg, 置于10 ml量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制每1 ml含盐酸小檗碱1.0 mg的贮备液。精密量取贮备液0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 ml, 置于10 ml量瓶中, 分别用甲醇定容至刻度, 摇匀, 按“2.3.1”项下色谱条件进样20 μl, 记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得盐酸小檗碱的回归方程为 $y=24\ 106x-5\ 917.2$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明, 盐酸小檗碱质量浓度在5.00~35.00 μg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.6 最低定量限 以信噪比大于10计算盐酸小檗碱的最低定量限约为1.00 μg/ml。

2.3.7 精密度试验 取“2.3.5”项下盐酸小檗碱对照品溶液(20.00 μg/ml), 按“2.3.1”项下色谱条件重复进样6次, 记录峰面积。结果, 盐酸小檗碱峰面积的RSD为0.93%, 表明仪器精密度良好。

2.3.8 稳定性试验 取二仙汤提取物适量, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于放置0、1、2、4、6、8 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 盐酸小檗碱峰面积的RSD为0.58%, 表明供试品溶液在8 h内稳定性良好。

2.3.9 重复性试验 取二仙汤提取物适量, 共6份, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定。结果, 盐酸小檗碱含量的RSD为1.63%, 表明本方法重复性良好。

2.3.10 加样回收率试验 取已知盐酸小檗碱含量的样品, 共6份, 精密称定, 加入等量的盐酸小檗碱对照品, 按“2.3.3”项下方法制备供试品, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 计算加样回收

率, 结果见表3。

表3 盐酸小檗碱加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery test of berberin hydrochloride (n=6)

样品量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.199 4	0.200 0	0.400 8	100.70		
0.197 2	0.200 0	0.400 4	101.60		
0.199 6	0.200 0	0.402 2	101.30	99.55	1.93
0.200 0	0.200 0	0.394 2	97.10		
0.199 2	0.200 0	0.394 6	97.70		
0.195 8	0.200 0	0.393 6	98.90		

2.3.11 盐酸小檗碱含量测定 取3批样品, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 按外标法计算样品中盐酸小檗碱含量, 结果见表4。

表4 盐酸小檗碱含量测定结果(n=3)

Tab 4 Results of content determination of berberin hydrochloride (n=3)

样品批号	盐酸小檗碱质量分数, %
1	2.00
2	2.05
3	1.96

2.4 知母皂苷的含量测定

2.4.1 测定方法 取“2.1”项下二仙汤提取物约0.5 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加入2 mol/L盐酸20 ml, 回流3 h, 用60 ml氯仿分3次(10、20、30 ml)回流萃取, 每次20 min; 收集氯仿层, 回收至干, 残渣用氯仿溶解并定容至50 ml, 吸取1.0 ml, 用氯仿稀释至10.0 ml, 混匀, 即得供试品溶液。另取菝葜皂苷元对照品, 加氯仿制成每1 ml含菝葜皂苷元100 μg的溶液, 作为对照品溶液。分别精密量取供试品溶液及对照品溶液各2.0 ml于具塞试管中, 25 ℃水浴中吹干溶剂, 分别加入5%香草醛冰醋酸0.2 ml和高氯酸0.8 ml, 涡旋10 s混匀, 于70 ℃水浴中放置20 min; 取出后立即置冰水浴中冷却2 min, 分别加入9.0 ml冰醋酸, 混匀; 以试剂为空白, 按紫外-可见分光光度法[2010年版《中国药典》(一部)附录V A]规定, 在(590 ± 2) nm波长处测定吸收度, 计算所得值乘以2.16, 即得。

2.4.2 线性关系考察 精密称取菝葜皂苷元对照品, 用氯仿配制成1 ml含菝葜皂苷元0.20 mg的溶液, 分别精密量取0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 ml于10.0 ml具塞试管中, 按“2.4.1”项下方法进行样品处理和测定。以菝葜皂苷元质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标进行线性回归, 得菝葜皂苷元的回归方程为 $y=77x-1.625\ 4$ ($r=0.999\ 5$)。结果表明, 菝葜皂苷元质量浓度在8.00~40.00 μg/ml范围内与吸收度呈良好的线性关系。

2.4.3 精密度试验 取同一对照品溶液(24.00 μg/ml), 按“2.4.1”项下方法连续测定6次。结果, 菝葜皂苷元吸光度的RSD为1.06%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一份样品, 按“2.4.1”项下制备供试品溶液, 分别在0、20、40、60、90 min时进行测定。结果, 菝葜皂苷元吸光度的RSD为1.52%, 表明供试品溶液经显色反应

后在90 min内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 分别精密称取二仙汤提取物共6份,按“2.4.1”项下方法连续测定。结果,菝葜皂苷元含量的RSD为1.69%,表明本方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 在已知知母皂苷含量的样品中加入定量菝葜皂苷元对照品,按“2.4.1”项下方法测定,计算加样回收率,结果见表5。

表5 知母皂苷加样回收率试验结果(n=6)

Tab 5 Results of recovery test of timosaponin(n=6)

样品量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
4.73	5.00	9.88	103.00		
4.74	5.00	9.88	102.80		
4.72	5.00	9.70	99.60	101.30	1.55
4.73	5.00	9.75	100.40		
4.74	5.00	9.86	102.40		
4.71	5.00	9.70	99.80		

2.4.7 知母皂苷含量测定 取3批样品,按“2.4.1”项下方法测定样品中知母皂苷的含量,结果见表6。

表6 知母皂苷含量测定结果(n=3)

Tab 6 Results of content determination of timosaponin(n=3)

样品批号	知母皂苷质量分数,%
1	20.02
2	20.69
3	20.66

3 讨论

淫羊藿是二仙汤处方中的君药,淫羊藿苷为其主要的化学成分。研究表明,淫羊藿苷能够减缓去卵巢骨质疏松大鼠的骨丢失,促进成骨细胞的增殖、碱性磷酸酶活性的提高和骨矿化结节的形成^[3-5],抑制破骨细胞的骨吸收^[6]。知母、黄柏具有协同处方中温补肾阳的淫羊藿、仙茅和巴戟天的作用,使其更好地调节机体机能。知母皂苷能够减轻去卵巢骨质疏松大鼠的骨丢失,促进成骨细胞的形成和分化^[3]。小檗碱是黄柏的主要成分,对于去卵巢和地塞米松诱导的骨丢失具有显著的保护作用,能够显著抑制破骨细胞的形成、分化和骨吸收^[3,7-8]。

应用HPLC法可测定淫羊藿苷的含量,但是二仙汤作为中药复方,其所含化学成分比单味药材淫羊藿的成分复杂得多,也与含淫羊藿的其他中药方剂不同^[9]。本文通过优化色谱条件,以甲醇-1%醋酸(60:40,V/V)为流动相,在270 nm波长下检测,取得了较好的分离效果,具有简便迅速的优点。

小檗碱属于生物碱类成分,研究中考察了不同的流动相体系、三乙胺的用量及pH,最终确定流动相为甲醇-乙腈-0.3%三乙胺水溶液(20:10:70,V/V/V,磷酸调节pH为4.0)时,可较好地解决色谱分离中的拖尾问题。

知母皂苷为二仙汤主要的皂苷类成分,由于该类成分没有紫外吸收,《中国药典》采用高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法测定知母皂苷B II的含量,以控制知母药材

的质量。也有文献采用液相-质谱联用测定知母皂苷类成分的含量^[10-11]。这些方法对仪器要求较高,难以普及。知母皂苷元的主要成分为菝葜皂苷元,其能与香草醛发生显色反应,基于这一原理,可通过测定知母皂苷的水解产物菝葜皂苷元的含量,来测定知母皂苷的含量。本研究通过优化皂苷水解时间、显色反应的温度和时间,获得了稳定、可靠、简便的二仙汤中知母皂苷类成分的含量测定方法。

参考文献

- [1] 上海中医学院. 中医方剂临床手册[M]. 上海: 上海人民出版社, 1973: 113.
- [2] 王长海, 张仲海, 马静. 二仙汤治疗骨质疏松症50例[J]. 陕西中医, 1998, 19(5): 205.
- [3] Qin LP, Han T, Zhang QY, et al. Antiosteoporotic chemical constituents from Er-Xian Decoction, a traditional Chinese herbal formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 118(2): 271.
- [4] 贾晓斌, 兰雪莲, 陈彦, 等. 淫羊藿黄酮类成分抗骨质疏松作用及其机制研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(3): 269.
- [5] Chen KM, Ge BF, Ma HP, et al. Icarin, a flavonoid from the herb Epimedium enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells[J]. *Pharmazie*, 2005, 60(12): 939.
- [6] Zhang D, Zhang J, Fong C, et al. Herba epimedii flavonoids suppress osteoclastic differentiation and bone resorption by inducing G2/M arrest and apoptosis[J]. *Biochimie*, 2012, 94(12): 2514.
- [7] Xu D, Yang W, Zhou C, et al. Preventive effects of berberine on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats[J]. *Planta Med*, 2010, 76(16): 1809.
- [8] 魏鹏, 焦磊, 秦路平, 等. 小檗碱对大鼠骨髓源性破骨细胞的分化及骨吸收功能的影响[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(4): 342.
- [9] 雷永涛, 梁妍, 郝小燕, 等. 不同产地淫羊藿中4种活性成分含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(6): 1404.
- [10] 孙颖光, 杜英峰, 生宁, 等. 高效液相色谱质谱联用法同时测定金莲清热颗粒中菝葜苷、知母皂苷等7种成分的含量[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(16): 1407.
- [11] Zhao Y, Kang LP, Yu HS, et al. Simultaneous determination of steroidal saponins in Anemarrhena asphodeloides Bge. by ultra high performance liquid chromatography/quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Science*, 2013, 22(3): 226.

(收稿日期: 2014-10-20 修回日期: 2015-01-05)

(编辑: 余庆华)