doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.04.07

止痢散、杨树花口服液中非法添加盐酸小檗碱检测方法的建立

龚旭昊,范　强,李慧杰,顾进华,张秀英,杨　星,赵富华*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-12-01　[文献标识码] A　[文章编号] 1002-1280(2023)04-0046-08　[中图分类号] S859.79

[摘　要]　建立止痢散、杨树花口服液中非法添加盐酸小檗碱的 HPLC-PDA 检测方法,采用十八烷基键合硅胶为填充剂,乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调 pH 值至 3.0)(25∶75)为流动相,等度洗脱,流速为 1.0 mL/min,二极管阵列检测器,提取波长为 345 nm。采用峰纯度检查和光谱相似度检查辅助对照品比对方法,对非法添加药物进行确证。按外标法以峰面积计算,盐酸小檗碱在止痢散和杨树花口服液中的平均回收率分别为 99.8% 和 99.7%,*RSD* 分别为 0.3% 和 0.4%;线性方程为 $Y=41435X-15904$,$R^2=0.9999$;检测限分别为 0.2 g/kg,0.2 g/L。该检测方法专属型强,灵敏度高,操作简便,准确可靠,可用于测定止痢散、杨树花口服液中非法添加的盐酸小檗碱。

[关键词]　盐酸小檗碱;止痢散;杨树花口服液;高效液相色谱-二极管阵列检测法

To Establish a Method for the Determination of Illegally Added Berberine Hydrochloride in Zhili Powder and Yangshuhua Koufuye

GONG Xu-hao, FAN Qiang, LI Hui-jie, GU Jin-hua, ZHANG Xiu-ying, YANG Xing, ZHAO Fu-hua*

(*China Institute of Veterinary Drug Control*, *Beijing* 100081, *China*)

Corresponding author: *ZHAO Fu-hua*, *E-mail*: 627260859@*qq.com*

Abstract: A method for the determination of berberine hydrochloride illegally added in Zhili Powder and Yangshuhua Koufuye was developed by the high performance liquid chromatography with photo diode array detector. It was tested with C18 column, using Acetonitrile -0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (Adjust the pH to 3.0 with phosphoric acid) (V∶V=25∶75) as mobile phase for Isometric elution, flow rate was 1 mL per minute. The extract wavelength was 345 nm. Peak purity test and spectrum similar test were used to determine the illegally added drug except the method of comparison between sample and reference. The peak area is calculated according to the external standard method, the mean recovery of berberine hydrochloride in

---

基金项目:兽药行业公益性重点专项(GY202002)

作者简介:龚旭昊,从事兽药检验与科研工作。

通讯作者:赵富华。E-mail:627260859@qq.com

Zhili Powder and Yangshuhua Koufuye was 99.8% and 99.7%, and *RSD* was 0.3% and 0.4% respectively. The linear equation is $Y = 41435X - 15904$, $R^2 = 0.9999$, and the detection limits are 0.2 g/kg and 0.2 g/L respectively. In conclusion, the method is specificity, sensitive, simple, accurate and reliable, which can be used to determine berberine hydrochloride illegally added in Zhili Powder and Yangshuhua Koufuye.

Key words: Berberine Hydrochloride; Zhili Powder; Yangshuhua Koufuye; HPLC - PDA

在“减抗、替抗”的大背景下,兽用中药的使用日益广泛,一些企业为获得更好的产品疗效,在制剂中添加非处方中药提取物或中药单体抗菌成分的行为时有发生。如在以往检验工作中发现麻杏石甘口服液、杨树花口服液中非法添加中药黄芩苷成分[~2],相较于非法添加化药类物质,其隐蔽性更强,也是打击非法添加行为的空白区域。这些行为既不符合法规要求,也给安全用药带来风险,亟需建立相应的检测方法,为行政执法提供技术支持,遏制兽药造假行为。为进一步做好相关技术储备,我们选取兽用中药常用品种止痢散、杨树花口服液为目标制剂,盐酸小檗碱为测试药物,开展非法添加方法研究。

止痢散由雄黄、藿香、滑石三味中药制备而成,具有清热解毒、化湿止痢等功效,临床主治仔猪白痢[3]。杨树花口服液由杨树花单味药材经提取制备而成,具有清热解毒、化湿止泻等功效,主治痢疾、肠炎[3]。以上两种制剂在临床上因有较好疗效而被广泛使用。盐酸小檗碱作为一种中药单体抗菌化合物,多由黄连、黄柏等药材提取或化学合成而得,来源广泛,较易制备,其具有显著的生理活性,主要用于痢疾杆菌引起的肠道感染[4],如细菌性痢疾和胃肠炎等,在人医和兽医临床应用均十分广泛。由此可见,盐酸小檗碱和以上两种制剂的功效主治较为一致。基于此,以盐酸小檗碱为测试药物,止痢散、杨树花口服液为目标制剂开展非法添加研究,参考《中国药典》2020 年版一部、《中国兽药典》2020 年版二部黄连药材及制剂质量标准[5]和相关文献,建立了止痢散和杨树花口服液中非法添加盐酸小檗碱的检查方法,现说明如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器与试剂

1.1.1　仪器　高效液相色谱仪(Waters e2695, 2998 PDA 检测器,Empower3 色谱工作站软件),分析天平(Mettler XS205,分度值 0.01 mg),昆山 KQ - 300 型超声波清洗器,Millipore 超纯水仪。

1.1.2　试剂　乙腈、甲醇,色谱纯,购自德国 Merck 公司;磷酸二氢钾、磷酸、盐酸,分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司;超纯水由实验室 Millipore 超纯水仪制备。

1.2　试药

1.2.1　测试药物　盐酸小檗碱对照品,中国兽医药品监察所,批号:Z0221507,含量:92.7%。

1.2.2　目标制剂空白　止痢散空白:由实验室自制,照《中国兽药典》2020 年版二部止痢散处方,取雄黄 8 g,藿香 22 g,滑石 30 g,以上三味,粉碎,过二号筛,混匀,即得。处方所需药材均购自北京同仁堂四通桥药店。杨树花口服液空白:河南森隆兽药有限公司生产,经检验质量合格(批号:20210101,规格:每 1 mL 相当于原生药 1 g)。

1.2.3　供试品(阳性模拟样品)　上述两种目标制剂空白中添加测试药物盐酸小檗碱。

2　方法与结果

2.1　色谱条件与系统适用性试验　色谱柱:Waters SunFire C18(4.6×250 mm,5 μm),以乙腈 - 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调 pH 值至 3.0)(25∶75)为流动相,流速:1.0 mL/min,进样量:10 μL。二极管阵列检测器,采集波长范围为 200 nm ~ 400 nm,分辨率为 1.2 nm;记录 345 nm 波长处的色谱图。供试品溶液中盐酸小檗碱色谱峰和相邻色谱峰的分离度应符合要求。

2.2　溶液制备

2.2.1　对照品溶液　取盐酸小檗碱对照品约 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加盐酸 - 甲醇(1∶100)混合溶液使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为盐酸小檗碱

对照品贮备液(100 μg/mL);精密量取贮备液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加盐酸 - 甲醇(1∶100)混合溶液稀释至刻度,摇匀,即得盐酸小檗碱对照品溶液(50 μg/mL)。按 2.1 色谱条件测定,结果见图 1。

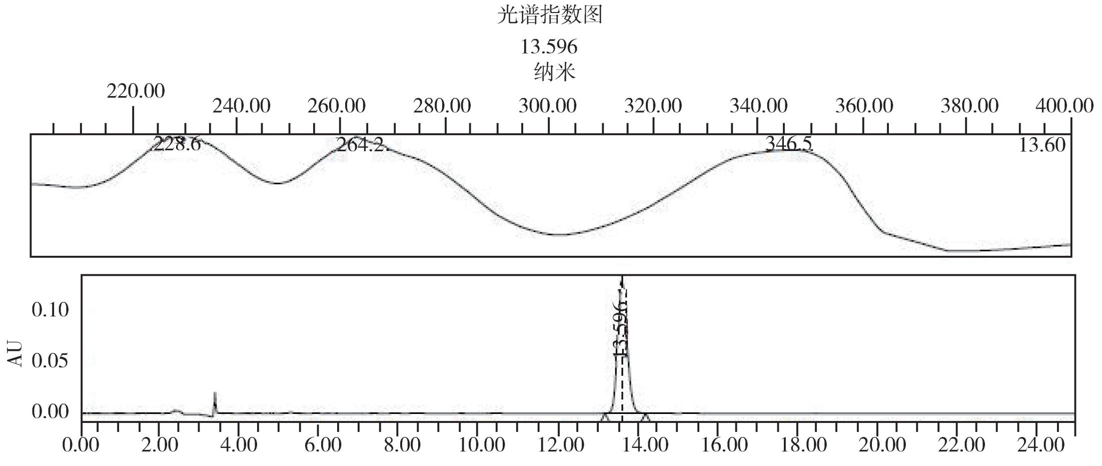

图 1　盐酸小檗碱对照品溶液光谱图

Fig 1　Spectrogram of Berberine Hydrochloride control solution

2.2.2 空白溶液

2.2.2.1　止痢散空白溶液　取止痢散 1 g,置具塞锥形瓶中,加入盐酸 - 甲醇(1∶100)混合溶液 100 mL,超声处理 10 分钟,放冷,摇匀,滤过;取续滤液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加盐酸 - 甲醇(1∶100)混合溶液稀释至刻度,摇匀,即得。按 2.1 色谱条件测定,结果见图 2,表明止痢散本底对盐酸小檗碱没有干扰。

2.2.2.2　杨树花口服液空白溶液　取杨树花口服液 1 mL,置具塞锥形瓶中,同 2.2.2.1 项制备方法,即得。按 2.1 色谱条件测定,结果见图 3,表明杨树花口服液本底对盐酸小檗碱没有干扰。

2.2.3　供试品溶液

2.2.3.1　止痢散供试液(阳性模拟)　取止痢散 1 g,置具塞锥形瓶中,再取盐酸小檗碱约 10 mg,精密称定,置同一锥形瓶中,加入盐酸 - 甲醇(1∶100)混合溶液 100 mL,超声处理 10 分钟,放冷,摇匀,滤过;取续滤液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,用盐酸 - 甲醇(1∶100)混合溶液稀释至刻度,摇匀,即得。按 2.1 色谱条件测定,结果见图 4。

2.2.3.2　杨树花口服液供试液(阳性模拟)　取杨树花口服液 1 mL,置具塞锥形瓶中,再取盐酸小檗碱约 10 mg,精密称定,置同一锥形瓶中,同 2.2.3.1 项制备方法,即得。按 2.1 色谱条件测定,结果见图 5。

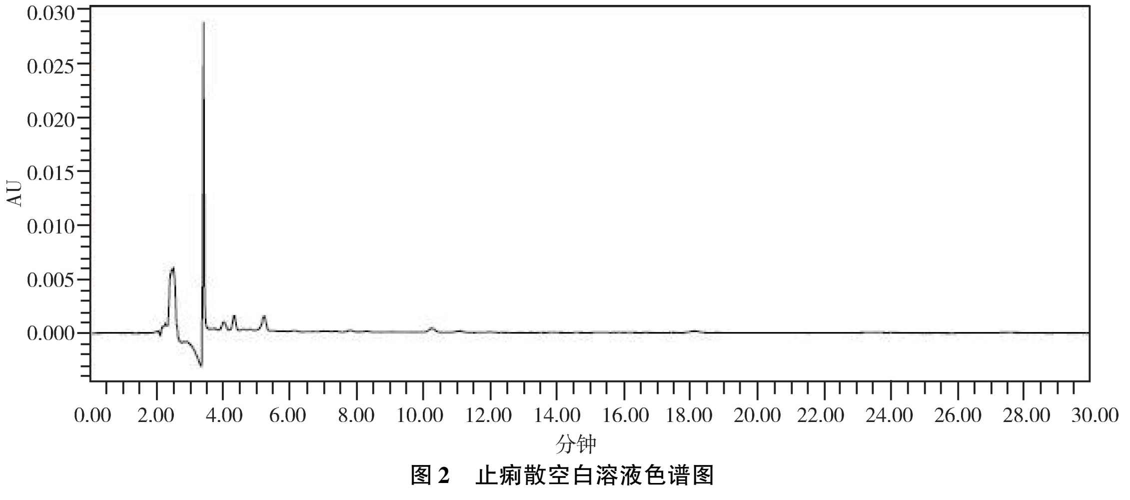

图 2　止痢散空白溶液色谱图

Fig 2　Chromatogram of blank solution of Zhili Powder

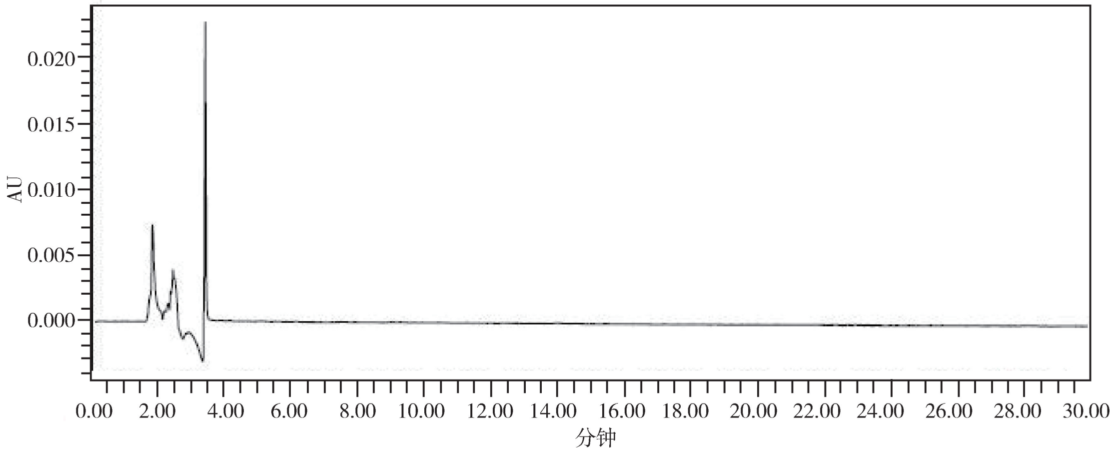

图 3　杨树花口服液空白溶液色谱图

Fig 3　Chromatogram of blank solution of Yangshuhua Koufuye

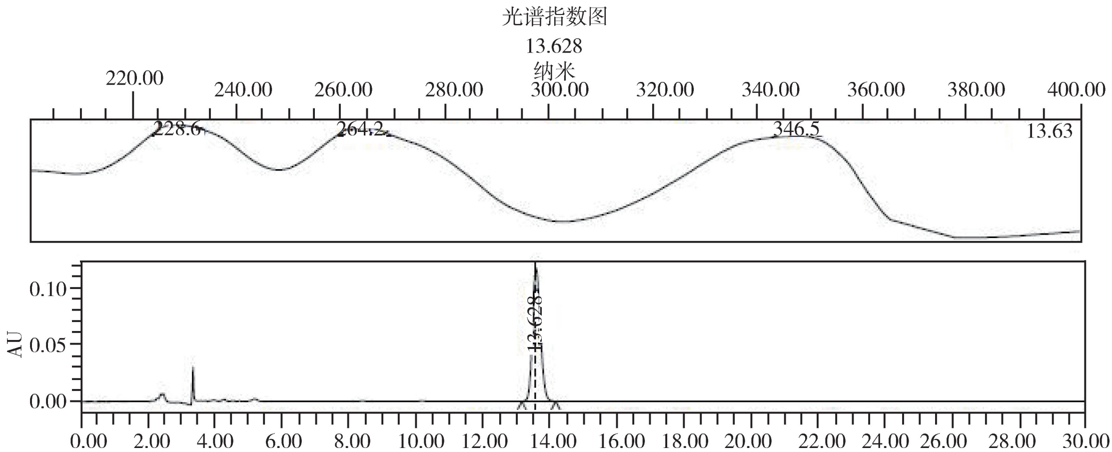

图 4　止痢散供试液光谱图(阳性模拟)

Fig 4　Spectrogram of test solution of Zhili Powder(positive simulation)

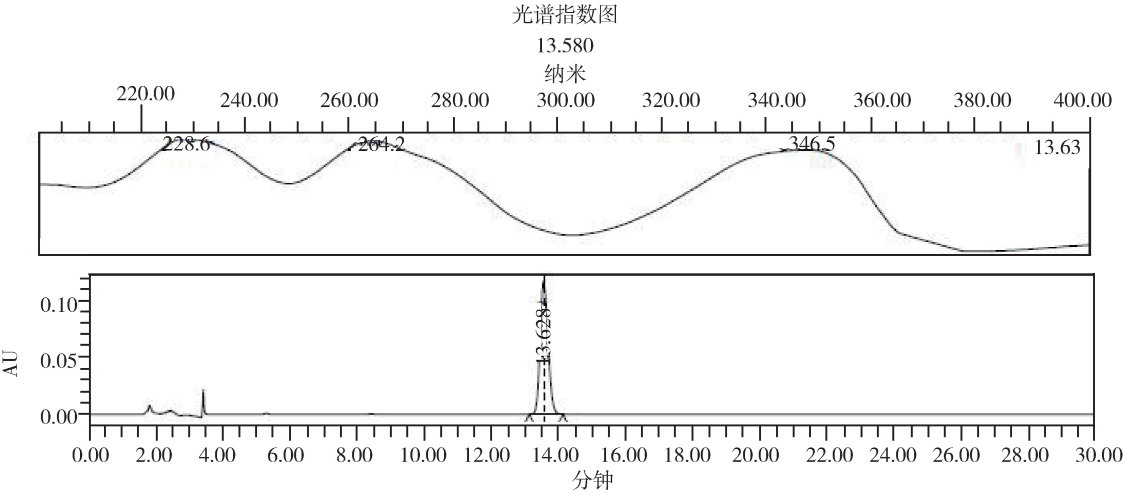

图 5　杨树花口服液供试液光谱图(阳性模拟)

Fig 5　Spectrogram of test solution of Yangshuhua Koufuye(positive simulation)

2.2.4　建立光谱数据库的溶液　以盐酸小檗碱对照品溶液作为建立光谱数据库的溶液。

2.3　峰纯度与光谱相似度检查　吸取两种供试品溶液(阳性模拟)各 10 μL,注入液相色谱仪,按 2.1 色谱条件测定。对两种供试品溶液色谱图中盐酸小檗碱色谱峰进行峰纯度检查,结果见表 1,显示盐酸小檗碱峰的纯度角度均小于纯度阈值,说明未包裹共流出物,本底对测定无干扰。表明在此色谱条件下,盐酸小檗碱的出峰处均无其他干扰峰,为单一物质峰,方法可行。

对两种供试品溶液中盐酸小檗碱峰的色谱图及光谱图与对照品溶液进行匹配,结果见表 1 – 2 与图 1、图 4 – 5。数据显示,止痢散及杨树花口服液供试品溶液中保留时间 13.628 min 和 13.580 min的色谱峰与盐酸小檗碱对照品的保留时间均一致,且均与对照品的光谱图及最大吸收波长一致,匹配角度均小于匹配阈值,即为同一物质。表明该方法适用于两种供试品中盐酸小檗碱的检测。

表 1　峰纯度及光谱相似度检查结果表

Tab 1　Test results of peak purity and spectral similarity

盐酸小檗碱色谱峰	纯度角度	纯度阈值	结果	匹配角度	匹配阈值	结果
止痢散供试品	0.058	0.210	单一物质峰	0.035	1.015	光谱相似
杨树花口服液供试品	0.051	0.210	单一物质峰	0.017	1.015	光谱相似

表 2　供试品与对照品色谱、光谱结果表

Tab 2　Chromatographic and spectral results of test and control samples

结果	盐酸小檗碱对照品	止痢散	杨树花口服液
保留时间/min	13.596	13.628	13.580
最大吸收波长/nm	228.6,264.2,346.5	228.6,264.2,346.5	228.6,264.2,346.5

2.4　方法学考察

2.4.1　专属性　通过两种制剂空白试验排除了样品基质对待测物盐酸小檗碱的干扰。同时,峰纯度检查结果显示在此色谱条件下,两种供试品色谱图中盐酸小檗碱峰均为单一物质峰。结果表明该检测方法专属性良好。

2.4.2　检测限　两种制剂检测限溶液的配制:分别取止痢散 1.0 g 和杨树花口服液 1 mL,各置 100 mL量瓶中,分别精密加入盐酸小檗碱对照品贮备液适量(0.5 mL、1 mL、2 mL),用盐酸 – 甲醇(1∶100)混合溶液稀释至刻度,摇匀,滤过;取续滤液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,用盐酸 – 甲醇(1∶100)混合溶液稀释至刻度,摇匀,即得。经光谱相似度检查结果显示,测试药物光谱指数图发生轻微变形时仍能实现与光谱库中对照品光谱的匹配,但考虑到兽药非法添加量一般都较大,且本实验两种目标制剂本底对被测物完全没有干扰。因此,本检验方法以光谱图失真的最大浓度作为方法的检测限。根据测定结果,止痢散、杨树花口服液中盐酸小檗碱的检测限分别为 0.2 g/kg,0.2 g/L。

2.4.3　线性关系考察　取盐酸小檗碱对照品约 10 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加盐酸 – 甲醇(1∶100)混合溶液超声使溶解并稀释至刻度,得浓度为 200 μg/mL 的对照溶液。取该溶液适量置不同量瓶中,用盐酸 – 甲醇(1∶100)混合溶液依次制

成 2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 μg/mL 的标准曲线系列溶液，照 2.1 色谱条件测定，以盐酸小檗碱峰面积 Y 为纵坐标，相应浓度 X 为横坐标，绘制标准曲线，得盐酸小檗碱回归方程（$n=7$）：$Y=41435X-15904$，$R^2=0.9999$。结果表明，盐酸小檗碱在 2.0~200.0 μg/mL 浓度范围内线性关系良好。

2.4.4　准确度　以止痢散和杨树花口服液空白中添加被测物对照品（检测限浓度的 10 倍）做回收率试验来考察方法的准确度。两种制剂回收率试验溶液配制方法：分别取止痢散 1.0 g、杨树花口服液 1 mL，各置 100 mL 量瓶中，精密加入盐酸小檗碱对照品贮备液 20 mL，用盐酸 - 甲醇（1∶100）混合溶液稀释至刻度，摇匀，滤过；取续滤液 5 mL，置 10 mL量瓶中，用盐酸 - 甲醇（1∶100）混合溶液稀释至刻度，摇匀，即得，每种供试品重复制备 6 份，以2.2.1中的对照品溶液作为对照进样，每份回收率试验溶液平行测定 2 次，以外标法按峰面积计算回收率。结果显示，止痢散中盐酸小檗碱的回收率为 99.8%，*RSD* 为 0.3%；杨树花口服液中盐酸小檗碱回收率为 99.7%，*RSD* 为 0.4%。结果见表 3。

表 3　回收率结果

Tab 3　Recovery results

止痢散				杨树花口服液			
加入量 mg	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%	加入量 mg	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%
2.07	100.23	99.8	0.3	2.04	100.28	99.7	0.4
	100.28				100.28		
2.07	99.83			2.04	99.58		
	99.76				99.37		
2.07	100.07			2.04	99.51		
	99.80				99.17		
2.07	99.52			2.04	99.64		
	99.82				99.99		
2.07	99.80			2.04	99.59		
	99.83				99.29		
2.07	99.40			2.04	100.06		
	99.57				99.73		

2.4.5　耐用性　从调节柱温、流动相比例及 pH 值、色谱柱四个方面考察方法的耐用性。调节柱温分别为 25 ℃、30 ℃和 35 ℃，结果显示，两种制剂的供试液中盐酸小檗碱保留时间随柱温升高，保留时间有所提前。调节流动相乙腈 - 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液（用磷酸调 pH 值至 3.0）比例分别为 20∶80，25∶75，30∶70，结果显示，两种制剂供试液中盐酸小檗碱的保留时间，随有机溶剂乙腈比例的增加而明显提前。但调节柱温、流动相比例，测试药物盐酸小檗碱主峰均无干扰，分离度符合要求，且峰面积、拖尾因子、理论塔板数等基本没有变化。调节流动相中 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液的 pH 值为 2.8、3.0、3.2，结果显示，调节 pH 值对两种制剂供试液中盐酸小檗碱的测定无明显影响。选择三款不同品牌色谱柱，对两种制剂的供试液进样测定，考察不同色谱柱对测定的影响。结果显示，使用三款不同色谱柱，测试药物盐酸小檗碱的纯度角度均小于纯度阈值，匹配角度均小于匹配阈值，且主峰均无干扰，分离度、理论塔板数等均符合要求。通过以上考察，表明方法耐用性良好，结果见表 4（以杨树花口服液为例）。

表 4 方法耐用性考察

Tab 4 Method of durability investigation

项目	类别	保留时间(min)	理论塔板数	拖尾因子
柱温	25 ℃	13.580	>15000	<1.2
	30 ℃	12.788	>15000	<1.2
	35 ℃	11.872	>16000	<1.2
流动相比例	20∶80	32.561	>17000	<1.2
	25∶75	13.580	>15000	<1.2
	30∶70	7.343	>14000	<1.2
色谱柱	Waters SunFire C18 (4.6×250 mm,5 μm)	13.580	>15000	<1.2
	Shiseido MGⅡ C18 (4.6×150 mm,5 μm)	14.025	>9000	<1.1
	Thermo BDS C18 (4.6×250 mm,5 μm)	17.420	>6000	<1.2

3 讨 论

3.1 流动相的选择 查阅《中国兽药典》2020 年版二部、《中国药典》2020 年版一部及相关文献,盐酸小檗碱的测定多采用高效液相色谱法,流动相主要为“乙腈 – 磷酸盐溶液”系统,且多为等度洗脱。本试验分别考察了《中国药典》2020 年版一部黄连、黄连胶囊项下含量测定方法,二者流动相均为“乙腈 – 磷酸盐溶液”系统,但流动相比例、pH 值等不同。经试验发现,两种方法均适用于两种目标制剂中待测药物盐酸小檗碱的测定,且样品中其他成分对测试药物均没有干扰,而在流动相中加入少量磷酸均可以起到改善峰形和分离度、减少拖尾的效果。但黄连相较于黄连胶囊项下含量测定方法,其流动相配制过程更加繁琐,且需两相溶剂合成一路进行洗脱,不方便根据测定情况进行比例调整,缺乏灵活性。此外,测试药物的保留时间相对较长。综上,为便于测定,简化操作流程,根据试验结果,最终参考黄连胶囊含量测定方法,选择乙腈 – 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调 pH 值至 3.0)(25∶75)作为本方法的流动相。

3.2 提取溶剂选择 根据药典及文献资料,分别考察了盐酸 – 甲醇(1∶100)、甲醇、50% 甲醇、水对测试药物盐酸小檗碱的提取效率。即取杨树花口服液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,再取盐酸小檗碱约 10 mg,精密称定,置同一量瓶中,分别加入上述不同溶媒超声使溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,用盐酸 – 甲醇(1∶100)混合溶液稀释至刻度,摇匀,即得不同溶媒供试品溶液,进样测定,以 2.2.1 中的对照品溶液作为对照进样,以外标法按峰面积进行计算比较。结果发现,测试药物盐酸小檗碱在盐酸 – 甲醇(1∶100)及甲醇中的提取效果优于其他溶剂,由于盐酸小檗碱为生物碱,常以季铵碱形式存在,碱性强,甲醇中加入适量盐酸,有助于增加溶解度[6]。故参考药典,最终选择盐酸 – 甲醇(1∶100)混合溶液作为提取溶剂。

3.3 非法添加物筛查合理性分析 首先,本研究所选取的目标制剂止痢散和杨树花口服液在功效主治方面和测试药物盐酸小檗碱有诸多相似之处,如兽医临床常用盐酸小檗碱搭配杨树花、白头翁、柴胡、鱼腥草等组方治疗猪流行性腹泻病,故存在目标制剂非法添加盐酸小檗碱的理论可能性。其次,查阅相关资料和文献,两种目标制剂中均不含有盐酸小檗碱成分,如止痢散中雄黄、滑石为矿物药,主要成分分别为二硫化二砷和硅酸镁,而藿香主要含挥发油及黄酮类成分等[7];杨树花口服液为杨树花药材的单味药制剂,主要含黄酮类、酚酸类成分等[8-9]。基于以上分析,上述两种目标制剂中非法添加盐酸小檗碱符合逻辑规律,具备理论的可能性。

3.4 检查方法的扩充使用 除止痢散和杨树花口服液外,其他兽药制剂亦可能非法添加盐酸小檗碱成分。当采用该检查方法用于其他兽药制剂中非法添加盐酸小檗碱检查时,要注意目标分析物以外的成分是否会对测定产生干扰和添加量是否达到药物发挥药效的可能浓度,需进行空白试验、系统适用性试验及检测限的测定,进而满足检验检测的要求。

4 结 论

本试验建立了 HPLC – PDA 法检测止痢散和杨树花口服液中非法添加盐酸小檗碱的检查方法,综

合保留时间、最大吸收波长、峰纯度检查和光谱相似度检查等方面的信息,实现了兽药中非法添加物的准确识别。该方法操作简单、专属性强、灵敏度高、易于推广,为打击兽药制剂中非法添加盐酸小檗碱的制假行为提供了有力的技术支撑。

参考文献:

[1] 龚旭昊,杨 星,张 璐,等. 麻杏石甘口服液、杨树花口服液中非法添加黄芩苷 HPLC - PDA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志,2020,54(9):22 - 27.
Gong X H, Yang X, Zhang L, *et al*. Determination of Baicalin in Maxingshigan Koufuye and Yangshuhua Koufuye by HPLC - PDA [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2020,54(9):22 - 27.

[2] 魏秀丽,张传津,李有志. UPLC - PDA 法测定杨树花口服液中非法添加物黄芩苷[J]. 中国兽药杂志,2018,52(1):50 - 55.
Wei X L, Zhang C J, Li Y Z. Determination of Baicalin in Yangshuhua Koufuye by UPLC - PDA[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2018,52(1):50 - 55.

[3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2020 年版二部)[S].
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia, 2020 version 2[S].

[4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2020 年版一部)[S].
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia, 2020 version 1 [S].

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020 年版一部)[S].
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2020 version 1 [S].

[6] 王绪英,左经会,林长松,等. 优选不同溶剂对永思小檗中盐酸小檗碱提取工艺[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2012,43(3):355 - 360.
Wang X Y, Zuo J H, Lin C S, *et al*. The technology effect of different menstruum on extraction rate of Berberine Chloride from *Berberis Tsienil* Ying[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science),2012, 43(3):355 - 360.

[7] 凡 杭,聂安政,包 莉,等. 藿香化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2021,40(11):45 - 53.
Fan H, Nie A Z, Bao L, *et al*. Research Progress on Chemical Constituents and Pharmacological Effects of Herba Agastache[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2021,40(11):45 - 53.

[8] 侯 勇. 杨树花化学成分及其生物活性研究[D]. 安徽医科大学,2019.
Hou Y. Studies on Chemical Constituents and Biological Activities of Poplar Flowers [D]. Anhui Medical University,2019.

[9] 唐国胜. 杨树花化学成分分析、结构修饰及生物活性筛选[D]. 吉林农业大学,2015.
Tang G S. Chemical Composition Analysis, Structure Modification and Biological Activity Screening of Poplar Flowers[D]. Jilin Agricultural University,2015.

(编 辑:陈 希)