

药用菊花 HPLC 图谱分析及其模式识别研究

邵清松^{1,2}, 郭巧生^{1*}, 李育川¹, 王佩佩²

1. 南京农业大学 中药材研究所, 江苏 南京 210095

2. 浙江农林大学, 浙江 杭州 311300

摘要: 目的 研究药用菊花的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱法建立了药用菊花 HPLC 图谱, 对 29 种药用菊花栽培类型进行测定, 并使用聚类分析和主成分分析对图谱进行模式识别研究。结果 聚类分析和主成分分析结果相一致, 29 份药用菊花种质资源分为两类。结论 该方法可用于药用菊花质量控制及其综合评价。

关键词: 药用菊花; 质量控制; 聚类分析; 主成分分析; HPLC

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)11-2330-05

HPLC spectrum analysis and chemical pattern recognition of *Chrysanthemum morifolium* for medicinal use

SHAO Qing-song^{1,2}, GUO Qiao-sheng¹, LI Yu-chuan¹, WANG Pei-pei²

1. Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2. Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China

Key words: *Chrysanthemum morifolium* Ramat. for medicinal use; quality control; cluster analysis; principal component analysis; HPLC

药用菊花为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序, 具有散风清热, 平肝明目等功效, 用于风热感冒, 头痛眩晕, 目赤肿痛, 眼目昏花^[1]。我国药用菊花具有悠久的历史, 分布广泛, 类型多样, 根据产地的不同, 主要有杭菊、贡菊、亳菊、滁菊、怀菊、济菊、祁菊和川菊等栽培类型。由于长期引种栽培和定向选择, 其进化速率快于自然条件下的进化, 许多性状的变化已经明显区别于原始野生种。据初步调查, 药用菊花种质资源在形态特征、内在质量和产量等方面均有较大差异^[2-5]。本实验采用 HPLC 方法建立药用菊花的指纹图谱, 并将聚类分析和主成分分析等模式识别方法应用于药用菊花的指纹图谱, 建立药用菊花指纹图谱的指标参数评判标准, 为药用菊花药材的鉴别和质量控制提供参考。

1 材料与仪器

药用菊花采自南京农业大学中药材研究所种质

资源圃, 种质来源见表 1, 经南京农业大学郭巧生教授鉴定为 *Chrysanthemum morifolium* Ramat.。当舌状花序开放 70% 左右时采集头状花序, 采后立即置烘箱 105 °C 杀青 3 min, 60 °C 烘干, 粉碎后过 100 目筛, 备用。甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。槲皮素 (批号 87K0744, 质量分数 ≥ 98%) 购自 Sigma 公司。

Waters 2695 高效液相色谱仪 (配 Waters 2996 二极管阵列检测器、Waters 717 plus 自动进样器, Waters Empower Pro 色谱工作站, 美国 Waters 公司), AB265—S 分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司), Millipore 超纯水机 (法国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters X Bridge C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为甲醇, B 为 0.2% 磷酸-水溶液, 线性梯度洗脱, 0~20 min, 45% A; 20~30 min, 45%~70% A; 30~40 min, 70% A; 40~45 min,

收稿日期: 2011-04-15

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAI06A12-11); 浙江省自然科学基金项目 (Y2090175)

作者简介: 邵清松 (1980—), 男, 浙江人, 博士, 主要从事药用植物遗传多样性及中药资源开发与利用方面的研究。E-mail: sqszjfc@126.com

*通讯作者 郭巧生 Tel: (025)84396591 E-mail: gqs@njau.edu.cn

表 1 材料种质来源
Table 1 Germplasm sources of materials tested

序号	栽培类型	经度/E	纬度/N	来源	序号	栽培类型	经度/E	纬度/N	来源
1	早小洋菊	120°32′	30°38′	浙江桐乡	16	金菊 4 号	120°32′	30°38′	浙江桐乡
2	晚小洋菊	120°32′	30°38′	浙江桐乡	17	早贡菊	118°44′	29°88′	安徽歙县
3	大洋菊	120°32′	30°38′	浙江桐乡	18	晚贡菊	118°44′	29°88′	安徽歙县
4	异种大白菊	120°32′	30°38′	浙江桐乡	19	黄药菊	118°44′	29°88′	安徽歙县
5	小汤黄	120°32′	30°38′	浙江桐乡	20	小毫菊	115°47′	33°52′	安徽亳州
6	小白菊	120°13′	33°38′	江苏射阳	21	大毫菊	115°47′	33°52′	安徽亳州
7	红心菊	120°13′	33°38′	江苏射阳	22	特种毫菊	115°47′	33°52′	安徽亳州
8	大白菊	120°13′	33°38′	江苏射阳	23	怀小白菊	113°12′	35°14′	河南武陟
9	长瓣菊	120°13′	33°38′	江苏射阳	24	怀大白菊	113°12′	35°14′	河南武陟
10	黄菊	120°13′	33°38′	江苏射阳	25	怀小黄菊	113°12′	35°14′	河南武陟
11	大黄菊	120°13′	33°38′	江苏射阳	26	滁菊	118°31′	32°33′	安徽滁州
12	香溢菊	120°32′	30°38′	浙江桐乡	27	济菊	116°33′	35°23′	山东嘉祥
13	金菊 1 号	120°32′	30°38′	浙江桐乡	28	祁菊	115°20′	38°24′	河北安国
14	金菊 2 号	120°32′	30°38′	浙江桐乡	29	麻城菊	115°01′	31°10′	湖北麻城
15	金菊 3 号	120°32′	30°38′	浙江桐乡					

70%~100% A。体积流量 1 mL/min；检测波长 350 nm；柱温 25 ℃；进样量 20 μL。

2.2 供试品溶液的制备

甲醇提取样品，料液比 1：20，超声提取 1 h，滤过，根据 Lee 等^[6]方法，略有改动，在滤液中加入浓盐酸（5：1），90 ℃水浴水解 1 h，冷却后定容至 10 mL 量瓶中，过 0.45 μm 微孔滤膜，滤液为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取槲皮素对照品适量，用甲醇溶解，定容，配制成质量浓度为 0.16 mg/mL 溶液，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得对照品溶液。

2.4 精密度试验

取同一批供试品溶液（早小洋菊），连续进样 5 次，各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3%，符合指纹图谱的要求。

2.5 稳定性试验

取同一批号的供试品溶液（早小洋菊），分别在 0、1、4、12、24 h 进样，各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3%，表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定，符合指纹图谱的要求。

2.6 重现性试验

取同一批号的供试品溶液（早小洋菊）5 份进行测定，各共有峰的相对保留时间和单峰面积占总

峰面积大于或等于 5%的色谱峰面积比值基本一致（RSD 值均小于 3%），符合指纹图谱要求。

2.7 样品的测定

测定药用菊花 29 种栽培类型样品，共获得 28 个色谱峰，其中 13 号峰（槲皮素）为有效成分峰且分离度较好，因此选其为内参比峰（代表性色谱图见图 1）。各色谱峰对内参比峰的相对保留时间定性，计算各色谱峰相对于其内参比峰的峰面积比。若某一指纹图谱在某相对保留时间处无峰，相对峰面积为零，仍给相应的编号，以保证各色谱指纹图谱都有相同的色谱峰数。

2.8 数据处理

根据槲皮素对照品的出峰时间，对各样品检测到的色谱峰进行初步确认，参考洪筱坤等^[7]和邹纯

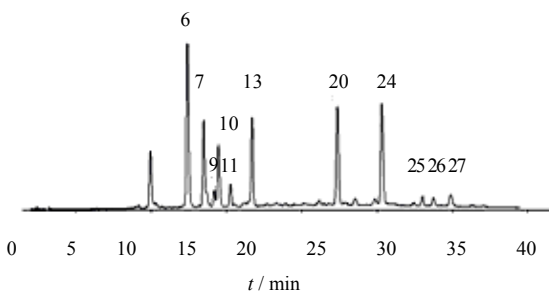


图 1 药用菊花 HPLC 图谱及共有峰
Fig. 1 HPLC chromatogram and common peaks of *C. morifolium* for medicinal use

才等^[8]关于中药数字化色谱分析方法, 计算各色谱峰的相对保留时间。应用 SPSS 13.0 统计软件对指纹图谱进行聚类分析和主成分分析。

3 结果与分析

3.1 HPLC 图谱直观分析

根据保留时间对所测定的药用菊花的色谱峰进行统计, 得出 28 个峰, 其中共有峰 11 个, 分别为第 6、7、9、10、11、13、20、24、25、26、27 号峰。从色谱峰数目看, 最多的是滁菊, 为 24 个; 其次是大洋菊、异种大白菊、小汤黄、红心菊、长瓣菊和麻城菊, 为 21 个; 怀小白菊和怀大白菊位居第三, 为 20 个; 而黄菊、大黄菊和黄药菊所检测到的色谱峰最少, 都为 14 个。经过保留时间比对, 发现有些栽培类型具有特殊色谱峰, 如第 15、16、17 号峰只有滁菊具有, 第 28 号峰只有大白菊

具有, 特种毫菊、济菊和祁菊具有一个共有峰 19 号峰, 结果见图 2 和表 2、3。

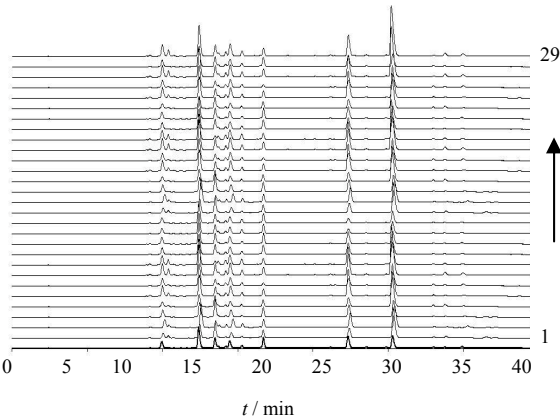


图 2 药用菊花 29 种栽培类型 HPLC 指纹图谱
Fig. 2 HPLC fingerprint for 29 kinds of cultivated *C. morifolium* for medicinal use

表 2 药用菊花各色谱峰的相对峰面积
Table 2 Relative peak areas of *C. morifolium* for medicinal use

编号	相对峰面积													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	—	0.764 2	—	0.093 7	—	2.291 1	1.216 7	—	0.182 7	0.823 2	0.273 3	—	1	0.076 7
2	—	0.742 2	—	0.096 1	—	2.266 7	1.245 6	—	0.191 3	0.853 6	0.262 0	—	1	0.073 3
3	0.156 9	1.725 4	—	0.760 7	0.124 0	4.020 6	1.413 2	0.422 3	0.536 7	1.841 0	0.647 4	—	1	0.154 0
4	0.146 4	1.738 4	—	0.760 1	0.125 2	4.019 7	1.445 7	0.421 5	0.537 5	1.841 2	0.617 3	—	1	0.154 2
5	0.159 1	1.690 2	—	0.759 3	0.101 7	4.021 0	1.418 1	0.434 2	0.546 5	1.800 1	0.647 4	—	1	0.144 2
6	—	0.772 3	—	0.095 7	—	2.278 9	1.209 8	—	0.193 1	0.832 2	0.281 0	—	1	0.069 9
7	0.156 1	1.725 1	—	0.760 1	0.121 3	4.086 7	1.420 4	0.422 0	0.516 0	1.811 0	0.605 4	—	1	0.154 0
8	—	0.726 3	—	0.314 8	—	2.055 0	2.284 6	—	0.169 2	0.818 2	0.227 4	0.147 3	1	—
9	0.164 1	1.515 2	—	0.631 2	0.180 9	4.318 3	1.387 2	0.390 9	0.596 1	1.791 4	0.596 1	—	1	0.130 7
10	—	0.886 3	—	—	—	1.699 5	2.081 7	—	0.172 1	0.877 6	0.180 0	0.085 9	1	0.085 2
11	—	0.886 2	—	—	—	1.699 7	2.082 3	—	0.171 9	0.879 0	0.179 6	0.086 7	1	0.084 9
12	—	0.846 6	—	0.106 2	—	2.477 6	1.184 4	0.113 4	0.276 3	0.940 6	0.355 8	0.084 5	1	—
13	—	0.765 3	—	0.096 3	—	2.291 3	1.201 4	—	0.191 3	0.854 4	0.262 8	—	1	0.075 7
14	—	0.748 9	—	0.094 9	—	2.294 6	1.202 4	—	0.193 5	0.854 0	0.263 7	—	1	0.074 9
15	—	0.750 2	—	0.095 4	—	2.270 6	1.213 5	—	0.192 5	0.854 1	0.261 1	—	1	0.075 3
16	—	0.745 3	—	0.096 2	—	2.242 2	1.206 8	—	0.181 1	0.834 1	0.242 1	—	1	0.071 3
17	—	—	1.211 5	0.337 3	—	3.450 9	0.880 3	0.337 8	0.386 9	1.358 5	0.538 8	0.135 8	1	—
18	—	—	1.240 2	0.338 3	—	3.441 2	0.870 4	0.357 8	0.389 9	1.361 1	0.566 1	0.151 3	1	—
19	—	0.914 6	—	0.237 0	—	2.177 1	2.012 3	—	0.272 1	0.938 9	0.330 9	0.142 2	1	—
20	—	—	1.210 6	0.325 7	—	3.453 2	0.863 6	0.330 4	0.313 5	1.344 7	0.563 6	0.164 4	1	—
21	—	—	1.232 8	0.331 3	—	3.460 3	0.846 6	0.352 6	0.333 3	1.357 8	0.541 0	0.183 7	1	—
22	—	2.620 2	—	0.598 7	—	5.806 7	2.290 1	0.711 4	1.001 2	3.255 4	1.147 9	—	1	0.260 2
23	0.149 9	1.808 7	—	0.535 9	0.118 9	3.576 9	1.379 9	0.410 9	0.521 4	1.809 9	0.523 3	—	1	0.128 8
24	0.152 4	1.839 0	—	0.501 9	0.123 4	3.570 3	1.386 0	0.411 7	0.517 4	1.833 7	0.525 1	—	1	0.129 4
25	—	—	1.209 8	0.330 3	—	3.465 7	0.881 9	0.307 8	0.376 8	1.388 4	0.505 7	0.143 8	1	—
26	0.162 9	1.718 0	—	0.762 5	0.129 2	4.011 7	0.584 1	0.573 2	0.710 4	1.825 9	0.866 8	0.135 3	1	0.224 0
27	—	2.582 8	—	0.532 5	—	5.812 1	2.313 3	0.777 0	1.089 9	3.266 9	1.105 8	—	1	0.294 4
28	—	2.541 7	—	0.511 2	—	5.781 2	2.304 5	0.747 8	1.032 1	3.265 3	1.129 1	—	1	0.278 8
29	0.166 9	1.525 9	—	0.662 7	0.195 0	4.426 1	1.499 1	0.316 7	0.527 4	1.681 4	0.615 7	—	1	0.124 7

续表 2

编号	相对峰面积													
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	—	—	—	0.074 3	—	1.352 3	0.114 6	0.113 5	—	1.448 4	0.169 0	0.109 9	0.224 3	—
2	—	—	—	0.071 6	—	1.364 3	0.130 0	0.132 6	—	1.445 7	0.154 9	0.124 4	0.224 6	—
3	—	—	—	0.178 1	—	3.175 1	0.206 9	0.179 0	2.325 8	0.107 9	0.169 1	0.579 2	0.484 5	—
4	—	—	—	0.178 1	—	3.185 2	0.206 8	0.178 9	2.324 9	0.117 2	0.169 4	0.579 1	0.484 3	—
5	—	—	—	0.158 2	—	3.175 2	0.216 9	0.178 1	2.325 3	0.107 5	0.179 3	0.529 3	0.474 3	—
6	—	—	—	0.065 5	—	1.343 7	0.166 3	0.110 0	—	1.413 5	0.162 5	0.143 2	0.285 4	—
7	—	—	—	0.157 0	—	3.205 0	0.206 0	0.177 9	2.294 9	0.147 0	0.168 9	0.578 9	0.515 0	—
8	—	—	—	—	—	1.508 4	—	—	—	4.327 6	0.178 2	0.310 7	0.131 9	0.258 3
9	—	—	—	0.171 4	—	3.195 8	0.226 5	0.168 1	2.395 2	0.127 3	0.179 2	0.549 0	0.494 7	—
10	—	—	—	—	—	1.473 2	—	—	—	2.186 6	0.136 8	0.122 3	0.179 2	—
11	—	—	—	—	—	1.472 9	—	—	—	2.187 3	0.137 1	0.121 3	0.178 8	—
12	—	—	—	—	—	1.391 0	0.096 2	—	—	1.665 9	0.143 2	0.113 7	0.208 9	—
13	—	—	—	0.077 5	—	1.341 3	0.110 0	0.117 6	—	1.490 9	0.125 8	0.131 6	0.218 5	—
14	—	—	—	0.078 9	—	1.326 9	0.131 8	0.145 6	—	1.474 3	0.123 2	0.143 8	0.201 3	—
15	—	—	—	0.077 1	—	1.304 7	0.134 7	0.114 7	—	1.461 3	0.123 3	0.115 8	0.260 0	—
16	—	—	—	0.071 3	—	1.348 9	0.131 3	0.161 1	—	1.497 7	0.134 6	0.137 6	0.285 7	—
17	—	—	—	—	—	2.267 3	0.122 4	—	—	3.556 2	0.188 0	0.143 2	0.348 7	—
18	—	—	—	—	—	2.248 8	0.146 4	—	—	3.571 9	0.181 0	0.156 5	0.365 0	—
19	—	—	—	—	—	1.636 9	0	—	—	5.758 4	0.266 8	0.507 3	0.215 8	—
20	—	—	—	—	—	2.261 3	0.123 5	—	—	3.573 7	0.144 7	0.163 5	0.366 2	—
21	—	—	—	—	—	2.274 6	0.161 5	—	—	3.512 6	0.169 9	0.143 5	0.314 8	—
22	—	—	—	—	0.326 8	2.812 3	0.309 8	—	—	4.142 3	0.568 6	0.525 9	0.950 2	—
23	—	—	—	0.179 8	—	4.859 8	0.215 8	0.168 8	—	5.331 5	0.230 1	0.251 5	0.290 7	—
24	—	—	—	0.186 6	—	4.862 1	0.214 9	0.167 4	—	5.329 0	0.226 2	0.250 9	0.297 2	—
25	—	—	—	—	—	2.204 5	0.106 3	—	—	3.534 0	0.166 9	0.122 9	0.322 4	—
26	0.131 6	0.135 2	0.265 3	0.217 4	—	3.267 4	0.275 5	0.207 4	—	4.688 2	0.190 9	0.315 4	0.315 0	—
27	—	—	—	—	0.300 4	2.805 6	0.317 0	—	—	4.101 8	0.573 3	0.537 2	0.947 5	—
28	—	—	—	—	0.335 2	2.786 5	0.302 0	—	—	4.168 0	0.586 6	0.532 1	0.941 0	—
29	—	—	—	0.137 9	—	3.214 7	0.236 0	0.148 1	2.225 5	0.187 1	0.209 2	0.499 0	0.525 2	—

表 3 药用菊花各色谱峰的相对保留时间

Table 3 Relative retention time of *C. morifolius* for medicinal use

峰号	相对保留时间	峰号	相对保留时间
1	0.190 1	15	1.125 4
2	0.198 9	16	1.162 3
3	0.562 8	17	1.197 3
4	0.638 4	18	1.237 4
5	0.659 6	19	1.300 8
6	0.743 1	20	1.338 6
7	0.807 8	21	1.373 6
8	0.829 0	22	1.446 7
9	0.849 6	23	1.485 4
10	0.866 0	24	1.514 8
11	0.914 1	25	1.676 6
12	0.937 9	26	1.719 9
13	1.000 0	27	1.788 5
14	1.025 7	28	1.840 7

3.2 模式识别研究

3.2.1 聚类分析 根据 28 个色谱峰相对峰面积按 Q 法聚类, 结果见图 3, 当聚类距离在 L1=17 时供试样品聚为 2 类: 第 1 类由 23 个不同栽培类型的药用菊花组成, 除小毫菊、大毫菊、怀小黄菊外, 其余 20 个栽培类型均来自于南方。根据聚类图可以将第 1 类进一步的划分为 3 组, 第 1 组包括早小洋菊、晚小洋菊、小白菊、黄菊、大黄菊、香溢菊、金菊 1 号、金菊 2 号、金菊 3 号、金菊 4 号、早贡菊、晚贡菊、小毫菊、大毫菊、怀小黄菊等 15 个栽培类型; 第 2 组包括大白菊和黄药菊等 2 个栽培类型; 第 3 组包括大洋菊、异种大白菊、小汤黄、红心菊、长瓣菊、麻城菊等 6 个栽培类型。第 2 类由 6 个不同栽培类型的药用菊花组成, 除滁菊均来自于北方。根据聚类图可以将第 2 类进一步的划分为两组, 第 1 组包括特种毫菊、济菊和祁菊; 第 2

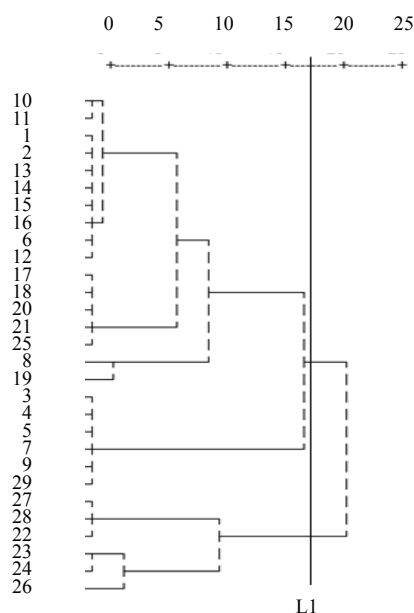


图 3 基于 HPLC 的药用菊花聚类分析结果

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis of *C. morifolium* for medicinal use based on HPLC

组包括怀小白菊、怀大白菊和滁菊。

3.2.2 主成分分析 通过色谱工作站将药用菊花 HPLC 图谱进行积分后以保留时间和色谱峰面积作为数据的信息, 一个样本的数据为一个数据向量生成样本数据, 29 个样本数据组成样本指纹数据矩阵。对数据矩阵进行主成分分析 (PCA) 后, 分别以其第 1、第 2 主成分建立坐标系, 进行投影即可得到所有样本的主成分分析平面投影图 (图 4), 第 1 主成分贡献率为 57.96%, 第 2 主成分贡献率为 36.35%, 样本间内在的相互关系可较好地表现出来。进而实现样本之间的分类。从药用菊花主成分分析平面投影图可知怀小白菊、怀大白菊、特种毫菊、济菊和祁菊归为一类, 其余栽培类型的药用菊花归为一类。

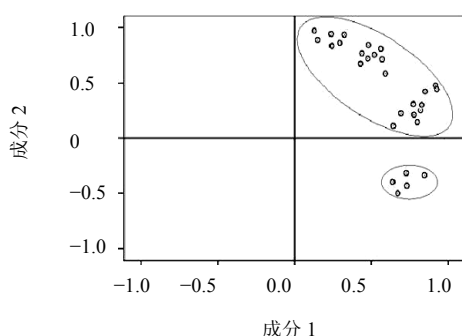


图 4 药用菊花主成分分析平面投影图

Fig. 4 Projection of PCA analysis on *C. morifolium* for medicinal use

4 讨论

本研究比较了不同比例甲醇和水混合溶剂 (100% 甲醇、75% 甲醇、60% 甲醇) 的提取效果, 发现 100% 甲醇的条件下, 色谱图中所有成分的峰面积较大。对超声和回流法进行比较, 由于超声法操作简单, 提取时间短, 效果好, 故选用该法。同时还考察了以 100% 甲醇为提取溶剂, 不同提取时间 (30、60、90 min) 的提取效果, 结果表明以甲醇为提取溶剂, 超声提取 60 min, 提取较完全, 且方法稳定、重现性好。

药用菊花黄酮类成分多且结构相近, 等度洗脱方式很难将其分开, 为了使供试样品中的化学成分尽可能洗脱和分离, 最大限度地提供鉴别及分类信息, 本实验采用甲醇和 0.2% 磷酸-水溶液梯度洗脱。实验最后所确定的梯度洗脱程序使各色谱峰分离较好, 保留时间适中。本研究在 200~500 nm 进行波长扫描, 发现 350 nm 处色谱峰信息丰富, 各峰分离情况良好, 各组分均有较大吸收, 且基线平稳, 故选择 350 nm 作为测定波长。

应用聚类分析和主成分分析两种化学计量学方法对药用菊花色谱积分数据进行了模式识别的初探。聚类分析和主坐标分析所获得的结果基本一致, 两种分析所表达的信息各有特点: 聚类分析能提供丰富的数量信息, 量化地体现种源之间的关系。主成分分析能从不同的方向和层面更直观地提供更多的关于各种源或群体的关系。因此, 两种方法并不重复, 将聚类分析和主成分分析结合起来使用, 可以互相印证和补充。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 邵清松, 郭巧生, 张志远. 药用菊花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1971-1975.
- [3] 郭巧生, 何先元, 刘丽, 等. 药用白菊花新品种选育研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 28-31.
- [4] 徐文斌, 郭巧生, 李彦农, 等. 药用菊花不同栽培类型内在质量的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1645-1648.
- [5] 汪涛, 郭巧生, 沈学根, 等. 杭菊不同栽培类型内在质量比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(9): 783-785.
- [6] Lee J J, Crosby K M, Pike L M, et al. Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* spp.) [J]. *Sci Horticult*, 2005, 106: 341-352.
- [7] 洪筱坤, 王智华. 中药数字化色谱指纹谱 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003.
- [8] 邹纯才, 鄢海燕. 中药指纹图谱及其数字化 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2008.