

益智仁的 UPLC 指纹图谱研究

刘冰¹, 蒋波¹, 廖争争¹, 赵旭¹, 毕开顺², 贾英^{1*}

1. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳市中药药效物质基础筛选与评价重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳药科大学药学院, 中药质量控制关键技术国家地方联合工程实验室, 辽宁 沈阳 110016

摘要:目的 建立益智仁 *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* 的超高效液相(UPLC)指纹图谱。方法 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 以乙腈-甲酸水溶液为流动相梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 样品室温度 10 ℃; 柱温 30 ℃; 检测波长 254 nm; 进样量 2 μL。结果 首次建立了益智仁的 UPLC 特征指纹图谱共有模式, 标定了 20 个共有峰, 结合保留时间和紫外光谱分析, 确定了原儿茶酸、α-羟甲基糠醛、oxyphyllenodiol A、teuhenone A、teuhenone B、白杨素、山柰素、杨芽黄素、圆柚酮共 9 个化合物。19 批益智仁, 其中 15 批的相似度在 0.970 以上。结论 该方法快速、高效, 可用于益智仁的质量评价。

关键词: 益智仁; 超高效液相色谱; 指纹图谱; α-羟甲基糠醛; 原儿茶酸; oxyphyllenodiol A; teuhenone A; teuhenone B; 白杨素; 山柰素; 杨芽黄素; 圆柚酮

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)06-0906-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.06.023

Study on UPLC fingerprint of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*

LIU Bing¹, JIANG Bo¹, LIAO Zheng-zheng¹, ZHAO Xu¹, BI Kai-shun², JIA Ying¹

1. Shenyang Key Laboratory of Active Components of Chinese Medicine Screening and Evaluation, School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. National and Local United Engineering Laboratory for Key Technology of Chinese Material Medica Quality Control, School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To establish the fingerprint of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* by UPLC. **Methods** The chromatographic fingerprint was obtained with ACQUITY UPLC HSS T3 column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) and gradient eluted with acetonitrile and aqueous formic acid. The flow rate was 0.5 mL/min, the sample room temperature and the column temperature were maintained at 10 ℃ and 30 ℃, respectively. The detection wavelength was set at 254 nm. The injection volume was 2 μL. **Results** The common mode of UPLC fingerprint of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* was set up firstly. There were 20 common peaks in the fingerprints. Protocatechuic acid, α-hydroxymethyl furfural, oxyphyllenodiol A, teuhenone A, teuhenone A, chrysin, kaempferide, tectochrysin, and nootkatone were identified by comparing the retention time and their ultraviolet spectra. The similarities of 15 *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* among 19 batches of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* were above 0.970. **Conclusion** The method is rapid and efficiency. It can be used for the quality evaluation of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*.

Key words: *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*; UPLC; fingerprint; α-hydroxymethyl furfural; protocatechuic acid; oxyphyllenodiol A; teuhenone A; teuhenone B; chrysin; kaempferide; tectochrysin; nootkatone

中药益智仁 *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* 是姜科 (Zingiberaceae) 多年生植物益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 的干燥成熟果实, 为中国四大南药之一, 主产于广东、海南等地; 具有温肾固精缩尿, 温脾开胃摄痰之功效^[1]。近年来随着对益智

仁研究的深入, 又陆续发现其有许多新的药理作用^[2-3]。本课题组前期工作已经研究了益智仁神经保护与抗氧化方面的活性^[4], 除此之外, 益智仁的镇静催眠效果也较为明显。目前为止, 益智中分离得到化学成分主要有萜类、黄酮类、酚类化

收稿日期: 2014-08-19

基金项目: 中药药效物质基础筛选与评价重点实验室 (F13-287-1-00); 辽宁省自然科学基金项目 (2011412004-1)

作者简介: 刘冰, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: liubing9246@sina.com

*通信作者 贾英, 教授, 女, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础与质量控制。Tel: (024)23986933 E-mail: jiayingsyphu@163.com

合物、甾醇类和二苯庚烷类等^[5-9]，其中，诺卡酮为益智仁中主要的倍半萜类成分，且量较高。《中国药典》2010年版项下关于益智仁的质量控制^[1]是以显微性状鉴别和挥发油的含量测定为指标进行的。由于我国幅源辽阔，不同的气候条件、生态环境对其地域内所产的药材质量有很大的影响，仅靠性状鉴别和测定不能全面控制益智仁的质量，因而对其质量进行进一步提高研究具有十分重要的意义。本实验采集了8个省份19批益智仁药材，建立能够反映该中药特征的UPLC色谱指纹图谱，在数据化处理的基础上，结合相似度评价的方法，进行药材的质量分析和评价，以期能更为全面地控制该药材的质量。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC 仪 [美国 Waters 公司，包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器 (PDA)、Empower2 色谱工作站]; BP210S 电子天平 (德国 Sartorius 公司); AB135-S 十万分之一天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ5200B 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 样品与试剂

19 批益智仁样品经沈阳药科大学学生药学教研室贾英教授鉴定，均为益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 的干燥成熟果实，密封存放于阴凉干燥处，具体来源见表 1。 α -羟甲基糠醛、原儿茶酸、oxyphyllenodiol A、teuhenone A、teuhenone B、白杨素、山柰素、杨芽黄素和圆柚酮对照品自制，质量分数均大于

98%; 乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司)，水为娃哈哈纯净水，甲醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱，流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B)，梯度洗脱，0~2 min, 13%~24% B; 2~12 min, 24%~65% B; 12~14 min, 65%~75% B; 体积流量 0.5 mL/min; 样品室温度 10 $^{\circ}$ C，柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 254 nm; 进样量 2 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

取 α -羟甲基糠醛、原儿茶酸、oxyphyllenodiol A、teuhenone A、teuhenone B、白杨素、山柰素、杨芽黄素和圆柚酮对照品各适量，精密称定，分别加甲醇溶解制成适当质量浓度的对照品储备液。精密量取上述对照品储备液各适量，置同一 2 mL 的量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得含 α -羟甲基糠醛、原儿茶酸、oxyphyllenodiol A、teuhenone A、teuhenone B、白杨素、山柰素、杨芽黄素和圆柚酮分别为 26.0、15.5、43.2、41.2、20.5、36.0、15.9、40.0、330.0 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取样品粉末约 2 g，精密称定，置 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，超声处理 30 min (功率 250 W，频率 33 kHz)，放至室温，滤过并减压浓缩，用甲醇溶解后并于 5 mL 量瓶中定容，过微孔滤膜 (0.22 μ m)，取续滤液，即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (S5)，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 2%，说明精密度良好。

2.4.2 重复性试验 分别取同一批 (S5) 益智仁样品适量，共 6 份，精密称定，分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液，照“2.1”项下色谱条件分别进样分析，测得其各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%，表明重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S5)，按“2.1”项下方法操作，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，测得其各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%，表明样品在 24 h 内稳定。

表 1 样品来源

Table 1 Sources of *Alpinia Oxyphyllae Fructus*

编号	来源	编号	来源
S1	广东省韶关市	S11	海南省海口市
S2	广东省佛山市	S12	海南省琼中市
S3	广东省龙门县	S13	云南省昆明市
S4	广东省中山市	S14	云南省玉溪市
S5	广东省广州市	S15	云南省普洱市
S6	广东省阳江市	S16	四川省成都市
S7	广西省桂林市	S17	四川省巴中市
S8	河北省安国市	S18	安徽省亳州市 1
S9	浙江省宁波市	S19	安徽省亳州市 2
S10	海南省定安县		

2.5 指纹图谱的建立

取 19 批益智样品, 按“2.3”项下制备供试品溶液, 在“2.1”项下的色谱条件下依次进样检测, 记录色谱图, 混和对照品溶液和益智仁色谱图见图 1。共获得 20 个共有峰, 结合保留时间和紫外光谱分析指认了其中 9 个共有峰, 分别为 α -羟甲基糠醛 (1 号峰)、原儿茶酸 (2 号峰)、oxyphyllenodiol A (5 号峰)、teuhtenone A (6 号峰)、teuhtenone B (7 号峰)、白杨素 (13 号峰)、山柰素 (14 号峰)、杨芽黄素 (16 号峰) 和圆柚酮 (17 号峰)。

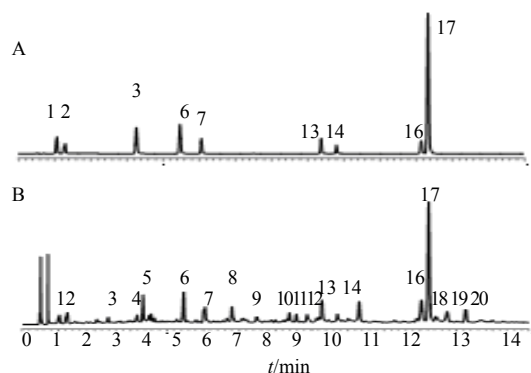


图 1 混合对照品 (A) 和益智仁 (B) 的 UPLC 色谱图
Fig. 1 UPLC of mixed reference substances (A) and *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* (B)

2.5.1 指纹图谱共有模式的建立 结合形态学鉴定结果, 选择 19 批益智仁建立共有模式。将 19 批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2009 版”软件, 建立了益智仁的指纹图谱的共有模式图, 结果见图 2。

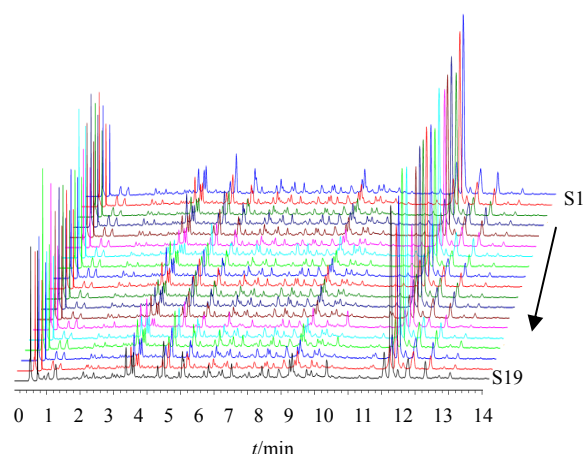


图 2 19 批益智仁 UPLC 特征指纹图谱
Fig. 2 UPLC fingerprints for 19 batches of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*

2.5.2 参比峰的选择 在各批次样品图谱中 teuhtenone A 的色谱峰 (6 号峰) 分离良好, 峰位居中, 峰面积较大且为所有样品共有, 所以确定 teuhtenone A 为参比峰, 相对保留时间和相对峰面积见表 2 和 3。

2.5.3 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2009 版”对 19 批益智仁样品的 UPLC 指纹图谱进行相似度评价, 以 S5 样品为对照标准, 结果见表 4。分析结果显示 15 批次的益智仁相似度均在 0.970 以上, 表明各产地益智仁具有较高的相似度, 只有个别产地或批次的药材有细微的差异。

3 讨论

3.1 样品提取条件考察

本实验对提取溶剂进行考察, 比较了 50%、75%、85%、100% 甲醇和 50%、75%、95% 乙醇, 结果表明, 以甲醇提取的样品, 色谱峰个数较多, 峰面积较大, 且无溶剂效应, 故提取溶剂选择甲醇。对超声与回流 2 种不同的提取方法考察结果表明, 两种提取方法效率相当, 考虑到超声操作较简便, 故提取选择超声。超声时间 30 min, 1 次即可提取较完全。故最终确定用甲醇超声 30 min, 提取 1 次。

3.2 色谱条件的选择

使用 Waters 的 PDA 检测器进行紫外区全波长扫描, 结果表明在 254 nm 波长下, 色谱图基线噪音较低, 特征峰响应较高, 各个成分色谱峰信息较完全, 因此选择 254 nm 作为本实验的检测波长。实验还考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液 4 个流动相系统, 结果发现采用乙腈-0.1% 甲酸水溶液流动相系统, 各峰的分离度较好, 且基线平稳, 因此最终采用乙腈-0.1% 甲酸水系统作为流动相系统。

3.3 结果分析

首次建立了 14 min 内快速鉴别益智仁的 UPLC 指纹图谱方法, 相似度评价分析得 19 批益智仁药材中, 15 批药材的相似度在 0.970 以上, 表现出很高的相似度。结合保留时间和紫外光谱分析指认了其中 9 个共有峰, 分别为 α -羟甲基糠醛、原儿茶酸、oxyphyllenodiol A、teuhtenone A、teuhtenone B、白杨素、山柰素、杨芽黄素、圆柚酮等成分, 其中, 原儿茶酸为酚类成分, oxyphyllenodiol A、teuhtenone A、teuhtenone B 和圆柚酮为萜类成分, 白杨素、山柰素和杨芽黄素

表 2 共有峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks

样品	峰号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S1	0.237	0.287	0.536	0.691	0.750	1.000	1.123	1.295	1.448	1.650
S2	0.235	0.285	0.535	0.690	0.749	1.000	1.123	1.296	1.449	1.637
S3	0.232	0.281	0.548	0.713	0.750	1.000	1.125	1.299	1.453	1.657
S4	0.233	0.281	0.533	0.689	0.749	1.000	1.125	1.300	1.454	1.642
S5	0.235	0.287	0.537	0.674	0.750	1.000	1.132	1.295	1.448	1.649
S6	0.237	0.288	0.537	0.691	0.750	1.000	1.123	1.295	1.447	1.635
S7	0.236	0.285	0.537	0.691	0.751	1.000	1.123	1.296	1.448	1.634
S8	0.234	0.282	0.533	0.705	0.750	1.000	1.124	1.299	1.452	1.640
S9	0.233	0.283	0.534	0.714	0.750	1.000	1.124	1.298	1.452	1.647
S10	0.235	0.284	0.534	0.703	0.750	1.000	1.124	1.297	1.451	1.653
S11	0.235	0.283	0.534	0.702	0.750	1.000	1.124	1.298	1.451	1.654
S12	0.234	0.281	0.535	0.709	0.751	1.000	1.133	1.299	1.452	1.638
S13	0.237	0.287	0.536	0.681	0.750	1.000	1.123	1.296	1.449	1.631
S14	0.235	0.286	0.535	0.703	0.749	1.000	1.123	1.296	1.450	1.639
S15	0.236	0.286	0.536	0.681	0.750	1.000	1.123	1.295	1.448	1.650
S16	0.237	0.288	0.535	0.681	0.750	1.000	1.123	1.295	1.448	1.634
S17	0.236	0.287	0.536	0.681	0.750	1.000	1.123	1.295	1.448	1.626
S18	0.234	0.285	0.535	0.689	0.750	1.000	1.124	1.296	1.450	1.628
S19	0.233	0.283	0.533	0.690	0.749	1.000	1.124	1.297	1.451	1.630
均值	0.235	0.285	0.536	0.694	0.750	1.000	1.124	1.297	1.450	1.641

样品	峰号									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S1	1.692	1.760	1.850	1.944	2.078	2.458	2.502	2.547	2.615	2.729
S2	1.694	1.762	1.852	1.948	2.080	2.462	2.505	2.551	2.620	2.734
S3	1.700	1.767	1.859	1.954	2.123	2.473	2.517	2.564	2.633	2.747
S4	1.700	1.768	1.860	1.955	2.090	2.475	2.518	2.565	2.634	2.748
S5	1.691	1.760	1.849	1.944	2.078	2.457	2.502	2.547	2.616	2.691
S6	1.691	1.759	1.848	1.943	2.075	2.454	2.498	2.543	2.612	2.725
S7	1.691	1.759	1.849	1.943	2.077	2.458	2.501	2.547	2.616	2.673
S8	1.698	1.765	1.857	1.950	2.085	2.469	2.513	2.559	2.616	2.741
S9	1.696	1.764	1.854	1.949	2.084	2.467	2.511	2.557	2.626	2.741
S10	1.695	1.763	1.853	1.948	2.083	2.464	2.508	2.554	2.622	2.736
S11	1.696	1.764	1.854	1.949	2.084	2.465	2.510	2.555	2.624	2.738
S12	1.697	1.767	1.855	1.946	2.083	2.467	2.511	2.557	2.625	2.739
S13	1.694	1.763	1.853	1.948	2.083	2.463	2.507	2.552	2.621	2.734
S14	1.697	1.766	1.856	1.953	2.086	2.469	2.513	2.559	2.628	2.742
S15	1.692	1.761	1.850	1.946	2.079	2.458	2.502	2.548	2.617	2.673
S16	1.691	1.759	1.849	1.943	2.077	2.456	2.500	2.545	2.613	2.727
S17	1.691	1.760	1.849	1.944	2.077	2.456	2.499	2.545	2.614	2.727
S18	1.693	1.762	1.851	1.946	2.080	2.460	2.503	2.550	2.619	2.676
S19	1.695	1.764	1.853	1.949	2.083	2.464	2.508	2.555	2.624	2.682
均值	1.694	1.763	1.853	1.947	2.084	2.463	2.507	2.553	2.615	2.721

表 3 共有峰相对峰面积

Table 3 Relative peak areas of common peaks

样品	峰号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S1	0.318	0.332	0.268	0.307	0.690	1.000	0.766	0.696	0.395	0.554
S2	0.311	0.331	0.313	0.395	0.961	1.000	0.921	0.771	0.519	0.719
S3	0.301	0.355	0.306	0.271	0.750	1.000	0.951	0.871	0.821	0.645
S4	0.289	0.261	0.232	0.305	0.606	1.000	0.829	0.700	0.419	0.556
S5	0.354	0.413	0.401	0.357	0.760	1.000	0.848	0.833	0.655	0.470
S6	0.324	0.293	0.298	0.387	0.837	1.000	0.900	0.810	0.447	0.740
S7	0.261	0.237	0.353	0.323	0.591	1.000	0.792	0.658	0.362	0.532
S8	0.450	0.330	0.293	0.731	0.731	1.000	0.955	0.379	0.441	0.681
S9	0.366	0.295	0.357	0.283	0.802	1.000	1.006	0.880	0.545	0.627
S10	0.401	0.419	0.391	0.365	0.990	1.000	1.007	0.783	0.582	1.030
S11	0.458	0.432	0.389	0.364	0.976	1.000	0.040	0.779	0.580	0.566
S12	0.427	0.337	0.281	0.434	0.586	1.000	0.809	0.854	0.395	0.707
S13	0.352	0.329	0.455	0.345	0.716	1.000	0.891	0.788	0.500	0.599
S14	0.412	0.420	0.352	0.411	0.995	1.000	1.055	0.793	0.581	0.698
S15	0.316	0.297	0.198	0.307	0.871	1.000	0.809	0.657	0.416	0.513
S16	0.355	0.313	0.554	0.343	0.691	1.000	0.832	0.631	0.416	0.578
S17	0.303	0.286	0.513	0.332	0.731	1.000	0.819	0.743	0.382	0.498
S18	0.301	0.239	0.211	0.305	0.526	1.000	0.081	0.671	0.401	0.473
S19	0.232	0.466	0.190	0.191	0.623	1.000	0.875	0.506	0.555	0.541
均值	0.344	0.336	0.335	0.356	0.760	1.000	0.799	0.727	0.495	0.617

样品	峰号									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S1	0.496	0.532	0.726	0.480	0.383	1.124	4.256	0.363	1.086	0.629
S2	0.635	0.694	0.847	0.536	0.447	1.251	5.136	0.440	1.342	0.765
S3	0.450	0.540	1.598	0.573	0.355	1.096	4.958	0.435	1.207	0.726
S4	0.514	0.509	0.977	0.495	0.388	1.084	4.848	0.381	1.158	0.640
S5	0.379	0.574	0.733	0.761	0.837	0.938	3.259	0.475	0.816	0.265
S6	0.627	0.627	0.851	0.655	0.429	1.294	5.407	0.443	1.389	0.787
S7	0.400	0.478	0.770	0.574	0.357	1.160	4.398	0.330	1.083	0.206
S8	0.538	0.553	0.864	0.327	0.351	1.149	5.826	0.329	1.184	0.617
S9	0.606	0.574	0.914	0.586	0.526	1.421	5.395	0.435	1.387	0.753
S10	0.394	0.730	0.879	0.560	0.606	1.274	5.331	0.443	1.234	0.749
S11	0.562	0.732	1.253	0.563	0.607	1.284	5.394	0.443	1.360	0.751
S12	0.284	0.467	1.157	0.376	0.371	1.509	5.537	0.376	1.308	0.768
S13	0.537	0.526	0.790	0.348	0.415	1.183	5.544	0.376	1.280	0.761
S14	0.628	0.648	0.982	0.621	0.493	1.330	5.963	0.456	1.403	0.832
S15	0.473	0.574	1.464	0.472	0.476	0.943	4.111	0.364	1.066	0.204
S16	0.513	0.513	0.803	0.328	0.382	1.113	4.560	0.373	1.146	0.688
S17	0.533	0.506	0.707	0.320	0.433	1.082	4.709	0.420	1.163	0.659
S18	0.444	0.412	0.749	0.290	0.358	1.125	4.189	0.312	1.073	0.215
S19	0.456	0.602	0.110	0.643	0.653	0.850	3.986	0.383	0.993	0.249
均值	0.498	0.568	0.904	0.500	0.467	1.169	4.885	0.399	1.194	0.593

表4 19批益智仁的相似度分析

Table 4 Similarity analysis of 19 batches of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.983	S11	0.976
S2	0.982	S12	0.985
S3	0.990	S13	0.984
S4	0.984	S14	0.971
S5	0.999	S15	0.971
S6	0.968	S16	0.976
S7	0.985	S17	0.967
S8	0.958	S18	0.985
S9	0.965	S19	0.977
S10	0.984		

为黄酮类成分,这些成分能够广泛地代表益智仁中的有效化学成分,为益智仁的质量评价提供了快速、有效的分析方法。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 张俊清,王 勇,陈 峰,等. 益智的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(2): 280-287.
- [3] 陈 萍,王培培,焦泽沼,等. 益智仁的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 617-623.
- [4] 石绍淮,张晨宁,刘 冰,等. 益智仁不同极性提取物抗老年痴呆作用的研究 [J]. 中国药房, 2013, 24(27): 2507-2510.
- [5] 罗秀珍,余竞光,徐丽珍,等. 中药益智化学成分的研究 [J]. 药学学报, 2000, 35(3): 204-207.
- [6] 邸 磊,王治元,王 志,等. 益智仁的化学成分 [J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(2): 94-96.
- [7] 吕秀香,张连学. 益智化学成分及药理作用研究进展 [J]. 吉林农业, 2011(4): 330-331.
- [8] 冯淑香,刘耀明,董俊兴. 中药益智仁化学成分与药理研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(5): 58-61.
- [9] 张起凤,罗仕德,王惠英,等. 中药益智仁化学成分的研究 [J]. 中草药, 1997, 28(3): 131-133.
- [10] 刘 楠,于新宇,赵 红,等. 益智仁化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 29-32.