

高效液相色谱-串联质谱法快速分析 鱼肉中的类固醇激素残留

卢巧梅^{1,2}, 童萍^{1,2}, 蔡惠坚³, 张兰²

(1. 福州大学测试中心, 福建福州 350116) (2. 福州大学化学学院, 食品安全与生物分析教育部重点实验室, 福建福州 350116) (3. 福建盛迪医药有限公司, 福建厦门 361000)

摘要: 建立了一种快速高效的液相色谱-串联质谱法分析鱼肉中类固醇激素。实验优化了色谱分离条件和三重四级杆质谱检测参数。采用 Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, i.d. 5 μm), 甲醇-水 (含 0.1% 甲酸, V/V, %) 为流动相进行梯度洗脱, 在 20 min 内基本实现了大部分物质基线分离; 在电喷雾正离子和选择离子对模式下, 结合目标物保留时间和特征离子对信息, 对 16 种激素进行定性和定量分析。结果表明, 所有化合物具有良好的线性范围 (0.10~3000.00 ng/mL), 相关系数 R 大于 0.9987, 检测限介于 0.05~5.00 ng/mL 范围内。鱼肉样品在液氮中研磨成鱼粉, 经过固相萃取法净化处理后, 测得氢化可的松药物残留为 48.00 ng/g。16 种激素的回收率介于 82.84%~115.10% 之间, RSDs 值小于 9.30%。该法分离能力强、灵敏度高, 适用于水产品中类固醇药物的多残留同时测定。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 类固醇激素; 水产品; 鱼肉

文章编号: 1673-9078(2019)12-276-281

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.035

Rapid Analysis of Steroid Hormone Residues in Fish Flesh by High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

LU Qiao-mei^{1,2}, TONG Ping^{1,2}, CAI Hui-jian³, ZHANG Lan²

(1. Testing Center of Fuzhou University, Fuzhou 350116, China) (2. College of Chemical Engineering, Ministry of Education Key Laboratory of Analytical Science and Food Safety and Biology, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China) (3. Fujian Shengdi Pharmaceutical Co. Ltd, Xiamen 361000, China)

Abstract: A rapid and efficient high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was established for the analysis of steroid hormones in fish flesh. The conditions for chromatographic separation and triple-quadrupole mass spectrometry detection were optimized. Baseline separation was achieved for most of the substances within 20 min using a Hypersil GOLD C₁₈ column (150 mm×2.1 mm, i.d. 5 μm) and gradient elution with methanol-water (containing 0.1% formic acid, V/V, %). Most compounds were baseline separated in 20 min. Electrospray ionization in positive ion mode with selective ion pairing, along with the retention time and characteristic ion pairs of the target compound, was used for qualitative and quantitative analyses of 16 steroid hormones. The results showed that all compounds had a good linear range of 0.10~3000.00 ng/mL, with correlation coefficient R greater than 0.9987 and limit of detection in range of 0.05~5.00 ng/mL. Fish flesh was ground into powder in liquid nitrogen, and the latter was purified by solid phase extraction. The hydrocortisone drug residue in fish powder was 48.00 ng/g. The recoveries of 16 steroid hormones were in range of 82.84%~115.10%, with the RSD values lower than 9.30%. This method had high separation power and high sensitivity, and is suitable for simultaneous determination of steroid hormones in aquatic products.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; steroid hormone; aquatic product; fish flesh

收稿日期: 2019-07-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21575028; 21705026); 福建省自然科学基金资助项目 (2016J01051)

作者简介: 卢巧梅 (1983-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全、色谱分析等

通讯作者: 张兰 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全、色谱分析、新型材料制备

类固醇激素 (又名甾体激素) 是一类四环脂肪烃化合物, 具有环戊烷多氢菲母核 (图 1), 主要包括糖皮质激素及几类性激素。该类药物能够影响动物性别分化、促进生长, 因此在水产养殖业中应用广泛^[1,2]。由于该类药物比较稳定, 长期食用含有激素残留的食品, 会影响人体激素平衡和具有潜在致癌性^[3]。我国农业部第 235 号公告对激素类药物使用作出严格规

定,要求动物性食品中不得检出丙酸睾酮、甲基睾酮,并明确了地塞米松最高残留限量^[4]。民以食为天,食以安为先。因此,检测水产品中类固醇激素残留是食品安全问题的一项重要指标,有必要建立一种快速高效的方法监测此类药物残留。

类固醇激素的质谱检测主要有气相色谱-质谱法/串联质谱法(GC-MS或GC-MS/MS)、液相色谱-质谱法/串联质谱法(LC-MS或LC-MS/MS)两大类^[5]。由于该类激素不易挥发且极性较强,GC-MS分析时需要衍生化,增加了样品处理时间和复杂性^[6-8]。相比而言,LC-MS技术是一种强有力的化合物定性和定量工具,在类固醇激素类药物测定中应用较为成熟^[9-14]。特别是三重四级杆串联质谱采用选择反应监测(SRM)模式进行定量分析,同时结合样品保留时间和特征离子对信息,极大改善了目标物分析时的分离速度、灵敏度和准确性,更能满足复杂实际样品中痕量药物残留的检测需要。目前,基于LC-MS方法对类固醇激素的分析大多集中于人体组织液体、禽类肌肉及乳制品等基质样品^[9-12],针对水产品中此类激素药物使用残留的研究仍较少^[13,14]。实验采用固相萃取法对鱼肉样品进行提取富集,建立一种同时测定多种激素的LC-MS/MS方法,为水产品中激素药物残留分析提供方法参考。

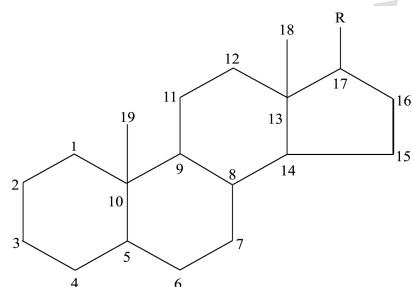


图1 类固醇激素母核-环戊烷多氢菲结构

Fig.1 Mother nucleus of steroid hormone-perhydrocyclopentanophenanthrene

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

液相色谱-三重四极杆质谱系统(Accela 600-TSQ Quantum Access Max; Thermo Fisher; USA)。色谱柱为Hypersil GOLD C₁₈柱(150 mm×2.1 mm, i.d. 5 μm)。7018-00固相萃取装置(J. T. Baker公司, USA)。

氢化可的松、泼尼松龙、醋酸地塞米松、泼尼松、地塞米松、醋酸泼尼松龙、曲安奈德、曲安西龙、黄体酮、甲睾酮、丙酸睾酮均由中国药品生物制品检定所(北京,中国)提供;1,4-雄烯二酮购买于东京化

成工业株式会社;美雄酮、4-雄烯二酮、雄酮、19-去甲-4-雄烯二酮购自Sigma(Sigma-Aldrich, USA)公司;色谱纯甲醇购自Sigma公司(Sigma-Aldrich, USA);甲酸购自DIKMA科技公司(北京,中国);所有实验用水均为超纯水,由Milli-Q超纯水系统(Millipore, USA)提供。

1.2 试剂配制和工作曲线绘制

准确称取1.00 mg各对照品,甲醇溶解,配制成1.00 mg/mL储备液,在4℃保存备用。使用前以12000 r/min、离心10 min,取上清液。

取适量的单标储备液,配成混合标准储备溶液。其中,醋酸地塞米松、雄酮、丙酸睾酮的浓度为50.00 μg/mL,其他物质的浓度均为5.00 μg/mL。将上述混合标准储备溶液用二次水逐级稀释,获得一系列不同浓度的混合标准溶液,用于绘制工作曲线。

1.3 液相色谱-质谱条件

液相色谱条件:以含0.1%甲酸的水溶液(A)和甲醇(B)为流动相,Hypersil GOLD C₁₈色谱柱(150 mm×2.1 mm, i.d. 5 μm),固定流速为250 μL/min,进样体积10 μL。梯度洗脱程序为:0 min, B相45%;12 min, B相63%;15 min, B相90%保持5 min。单次运行时间为20 min。

质谱条件:电喷雾正离子模式(ESI+),喷雾电压3.0 kV;采用选择反应监测(SRM)模式;碰撞气为高纯氦气(纯度>99.995%),压力设定为1.5 mTorr;鞘气压力和辅助气(纯氮),分别设定为40 arb和10 arb。

1.4 样品前处理

样品前处理过程主要参考文献^[15]方法,简要过程如下。草鱼样品采集于福州马尾水产品批发市场,由福建省水产研究所提供。称取适量新鲜鱼肉,液氮中研磨成鱼粉。准确称取0.10 g鱼粉,5.00 mL乙腈超声提取10 min,10000 r/min离心10 min,取上清液;残渣再用2.00 mL乙腈提取,合并两次上清液,氮吹近干,用2.00 mL二次水溶解备用。

固相萃取:用3.00 mL甲醇活化Bond Elut-C₁₈小柱(200 mg/3 mL, Agilent公司, USA);提取液过柱,4.00 mL乙腈-水(5:95, V/V, %)淋洗、2.00 mL乙腈-水(95:5, V/V, %)洗脱。收集洗脱液,氮吹近干,二次水定容至1.00 mL,过滤后供LC-MS分析。

1.5 数据统计分析

收集实验获得的数据, 经由 Excel 和 Origin 8.0 软件进行统计分析, 同时绘制相应的工作曲线和图片。

2 结果与讨论

2.1 色谱-质谱参数优化

2.1.1 液相色谱流动相

考察 16 种类固醇激素在甲醇/水、甲醇/水(含 0.1% 甲酸)等流动相中的分离情况。结果发现, 在正离子模式下, 甲酸有利于促进分析物的质子化, 增强目标物的质谱响应信号。因此, 选择流动相 A 为 H₂O (含 0.1% 甲酸)、B 为甲醇作为流动相体系。

鉴于上述化合物含有相同母核结构且极性差异较小, 故考察了几种梯度洗脱程序对色谱分离的影响。

(1) 0 min, 30% B; 30 min, 90% B; (2) 0 min, 40% B; 30 min, 90% B; (3) 0 min, 45% B; 30 min, 90% B; (4) 0 min, 50% B; 30 min, 90% B; (5) 0 min, 45% B; 12 min, 63% B; 15~20 min, 90% B。最终确定梯度洗脱方案为 (5) 时, 大部分物质 20 min 内基本实现分离, 同分异构体醋酸地塞米松和曲安奈德也能较好区分。图 2 为 16 种激素在最佳梯度洗脱程序时的提取离子流图。

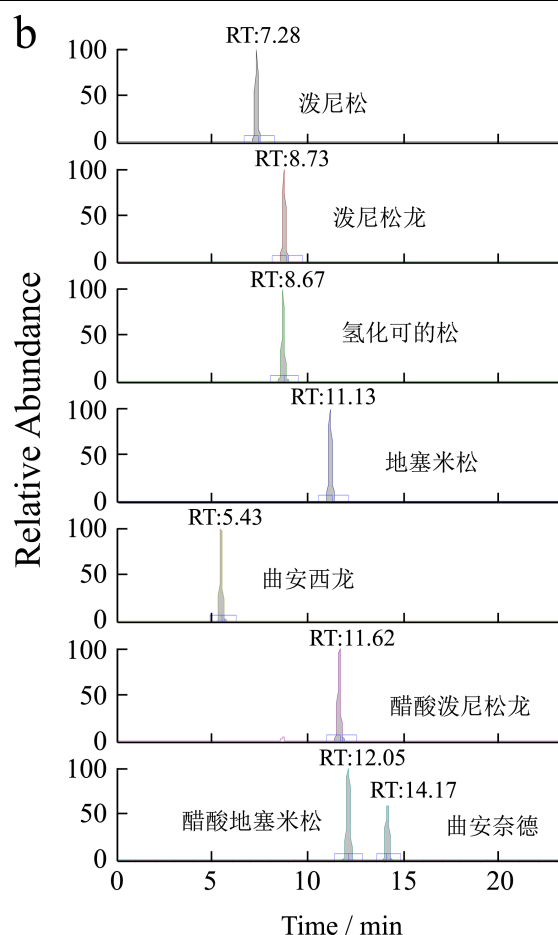
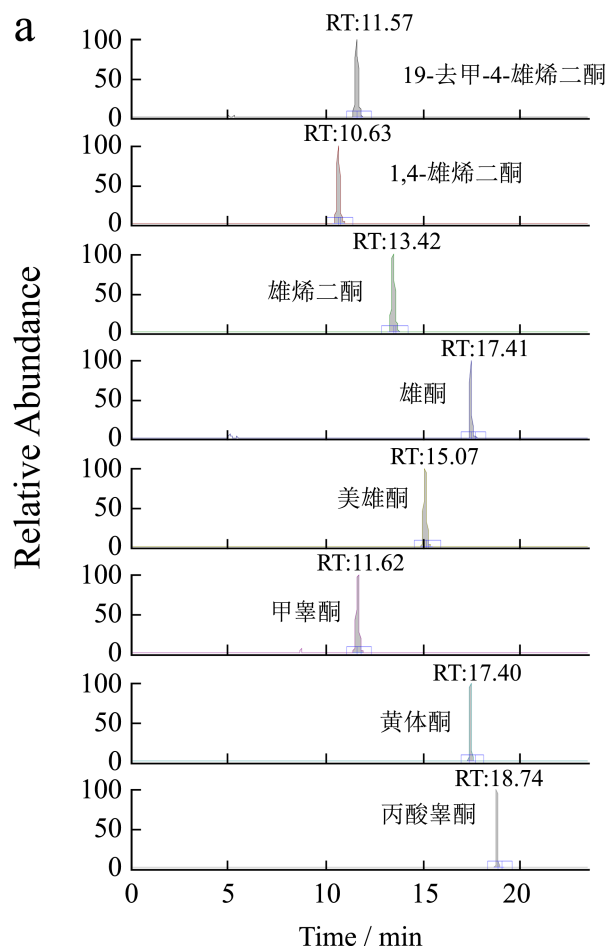


图 2 最佳梯度洗脱程序下 16 种激素的提取离子流图

Fig.2 The EIC of 16 steroid hormones under the optimal gradient elution condition

注: 流动相 A 为 H₂O (含 0.1% 甲酸); B 为甲醇, 梯度洗脱程序为: 0 min, 45% B; 12 min, 63% B; 15 min, 90% B 保持 5 min。

2.1.2 质谱检测条件优化

类固醇激素的检测既有采用正离子模式, 也有采用负离子模式^[12]。质谱结果显示, 在 ESI (-) 下, 部分激素产生了 [M+COOH]⁻、[M+Cl]⁻ 的准分子离子峰。[M+Cl]⁻ 可能来源于水中氯离子影响, [M+COOH]⁻ 则是由于流动相中甲酸引起。在 ESI (+) 下, 16 种激素均产生了较强的准分子离子峰 [M+H]⁺, 部分化合物也存在较弱的 [M+Na]⁺ 加合峰。为提高方法灵敏度, 实验选择 ESI (+), 以 [M+H]⁺ 作为母离子, 进行质谱其他参数的优化。

质谱离子源的气化温度、鞘气流量等参数对电离、雾化效果也有一定影响。对比了 0 °C、50 °C、100 °C 的气化温度对各化合物质谱响应值的影响。随着气化温度升高, 噪声增大, 而响应值没有明显提高, 故选择气化温度为 0 °C。当鞘气流量在 30~40 arb 之间时, 增大鞘气流量, 目标物的气化和去溶剂效果随之改善,

灵敏度升高；而鞘气流量为 45 arb 时，化合物的灵敏度不再提高。因此，选择鞘气流量为 40 arb，节省气体的同时也获得了较好的灵敏度。

通过蠕动泵，分别将 16 种激素单标溶液直接注入质谱仪。在 MS 方式下，选择化合物的准分子离子，

进行 Tube lens 优化，使[M+H]⁺的响应最大；其次，选择 MS/MS 方式，优化化合物的子离子和碰撞能量，选择丰度较高的两个子离子作为化合物的定性和定量离子对。获得最佳的子离子、碰撞能量及透镜电压等参数见表 1 所列。

表 1 16 种类固醇激素的质谱参数

Table 1 The mass spectrum parameters of 16 steroid hormones				
化合物	分子式	保留时间/min	特征离子对/(m/z)	碰撞能/eV
曲安西龙	C ₂₁ H ₂₇ FO ₆	5.45	395.15>375.15、357.09*	11.00
泼尼松	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	7.28	359.14>341.17*、313.13	10.00
氢化可的松	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	8.67	363.18>327.16*、121.17	14.00
泼尼松龙	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	8.73	361.15>343.14*、325.14	9.00
1,4-雄烯二酮	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	10.63	285.13>267.14、121.16*	21.00
地塞米松	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	11.13	393.17>373.17、355.18*	11.00
19-去甲-4-雄烯二酮	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	11.57	273.12>197.12*、109.17	16.00
醋酸泼尼松龙	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	11.62	403.17>385.17*、307.11	9.00
醋酸地塞米松	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	12.05	435.19>415.19*、397.15	5.00
4-雄烯二酮	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	13.42	287.14>109.17、97.20*	22.00
曲安奈德	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	14.17	435.18>415.17、397.14*	14.00
美雄酮	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	15.07	301.16>149.18*、121.15	15.00
甲睾酮	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	16.68	303.18>109.21*、97.22	28.00
黄体酮	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	17.40	315.17>109.19*、97.21	26.00
雄酮	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	17.41	291.18>273.19、255.19*	15.00
丙酸睾酮	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	18.74	345.19>109.21、97.21*	22.00

注：*定量离子。

2.1.3 最佳分离效果

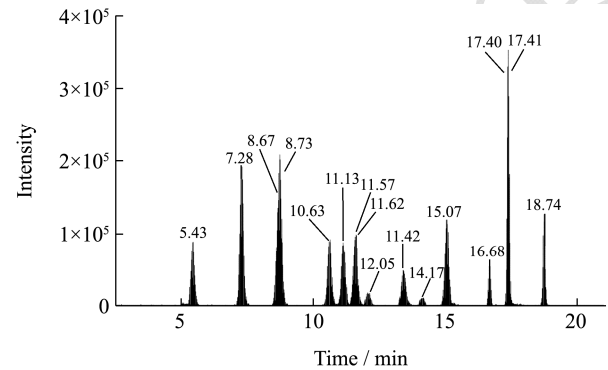


图 3 最佳条件下 16 种激素的总离子流图

Fig.3 The TIC of 16 steroid hormones under the optimal conditions

注：出峰顺序从左到右分别为：曲安西龙、泼尼松、氢化可的松、泼尼松龙、1,4-雄烯二酮、地塞米松、19-去甲-4-雄烯二酮、醋酸泼尼松龙、醋酸地塞米松、4-雄烯二酮、曲安奈德、美雄酮、甲睾酮、黄体酮、雄酮、丙酸睾酮。

实验最终确定的色谱-质谱条件为：Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱（150 mm×2.1 mm，i.d. 5 μm），流

速 250 μL/min，进样体积 10 μL，流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液，B 为甲醇。0 min，45% B；12 min，63% B；15 min，90% B 保持 5 min。ESI（+），SRM 模式，喷雾电压 3.0 kV，气化温度 0 ℃，鞘气压力和辅助气分别为 40 arb 和 10 arb。在上述条件下，16 种类固醇激素的分离效果见图 3 所示。

2.2 分析方法建立

以各化合物浓度为横坐标，相应峰面积为纵坐标，得到 16 种激素的工作曲线方程。方法具有较宽的线性范围，R 在 0.9987~0.9998 范围内，检测限（定义为 3 倍信噪比）介于 0.05~5.00 ng/mL 之间（表 2）。

在最优条件下，用 25.00 ng/mL 的混合样品溶液（醋酸地塞米松、丙酸睾酮、雄酮的浓度为 250.00 ng/mL）每隔半小时进样，连续分析 7 次，获得方法的日内精密度。同一样品连续 5 天进样分析，得到方法的日间精密度。结果显示：16 种激素峰面积的日内 RSDs 在 2.09%~5.11% 范围内，日间 RSDs 在 3.25%~6.98% 范围内，表明该方法较为稳定。

表2 16种激素的分析参数

Table 2 The analytical parameters of 16 steroid hormones

化合物	线性范围/(ng/mL)	R	检测限/(ng/mL)	日内精密性/(n=7, %)	日间精密性/(n=5, %)
曲安西龙	0.10~300.00	0.9997	0.05	2.09	5.99
泼尼松	0.25~300.00	0.9998	0.10	2.65	3.25
氢化可的松	0.25~300.00	0.9996	0.10	4.04	6.98
泼尼松龙	0.50~300.00	0.9997	0.25	2.82	4.23
1,4-雄烯二酮	0.25~300.00	0.9998	0.10	2.25	4.17
地塞米松	0.25~300.00	0.9996	0.10	4.41	5.40
19-去甲-4-雄烯二酮	0.50~300.00	0.9997	0.25	3.50	3.79
醋酸泼尼松龙	0.25~300.00	0.9997	0.10	3.26	3.80
醋酸地塞米松	5.00~3000.00	0.9994	2.50	5.11	3.36
4-雄烯二酮	0.50~300.00	0.9997	0.25	3.23	4.18
曲安奈德	0.10~300.00	0.9996	0.05	2.98	3.84
美雄酮	0.25~300.00	0.9998	0.10	3.02	4.79
甲睾酮	0.50~300.00	0.9995	0.25	3.53	3.35
黄体酮	0.50~300.00	0.9995	0.25	4.42	6.01
雄酮	10.00~3000.00	0.9998	5.00	3.71	6.30
丙酸睾酮	5.00~3000.00	0.9987	2.50	2.86	4.61

表3 鱼肉样品的回收率实验

Table 3 The recovery experiment of fish sample

化合物	添加量/(ng/mL)	测得量/(ng/mL)	回收率/%	化合物	添加量/(ng/mL)	测得量/(ng/mL)	回收率/%
曲安西龙	25.00	24.00±0.78	96.00±3.12	醋酸	250.00	229.81±9.22	91.92±3.69
	50.00	50.37±0.27	100.74±0.54	地塞米松	500.00	487.04±12.05	97.41±2.41
泼尼松	25.00	24.93±0.40	99.72±1.60	4-	25.00	23.88±0.81	95.52±3.24
	50.00	51.34±1.38	102.68±2.76	雄烯二酮	50.00	50.92±1.15	101.84±2.30
氢化可的松	25.00	20.71±0.44	82.84±1.76	曲安奈德	25.00	25.26±0.23	101.04±0.92
	50.00	47.50±1.02	95.00±2.04		50.00	51.22±0.75	102.44±1.50
泼尼松龙	25.00	24.06±0.93	96.24±3.72	美雄酮	25.00	24.83±0.16	99.32±0.64
	50.00	49.41±0.36	98.82±0.72		50.00	50.64±0.34	101.28±0.68
1,4-雄烯二酮	25.00	26.74±1.21	106.96±4.84	甲睾酮	25.00	23.75±0.93	95.00±3.72
	50.00	50.03±0.48	100.06±0.96		50.00	53.52±2.52	107.04±5.04
地塞米松	25.00	25.64±0.33	102.56±1.32	黄体酮	25.00	26.02±2.22	104.08±8.88
	50.00	50.22±1.48	100.44±2.96		50.00	53.69±3.94	107.38±7.88
19-去甲-4-雄烯二酮	25.00	27.80±2.05	111.20±8.20	雄酮	250.00	240.81±23.24	96.32±9.30
	50.00	50.82±0.43	101.64±0.86		500.00	575.51±28.45	115.10±5.69
醋酸泼尼松龙	25.00	26.46±1.14	105.84±4.56	丙酸睾酮	250.00	240.66±10.05	96.26±4.02
	50.00	55.35±2.92	110.70±5.84		500.00	455.64±44.45	91.13±8.89

2.3 实际样品分析

按步骤 1.4 处理实际样, 通过各物质的保留时间及特征离子对 16 种激素进行定性分析。结果表明, 在鱼肉样品中测得 $m/z=327.16$, 对应于氢化可的松 $[M+H-2H_2O]$ 的碎片信号, 如图 4 所示。将测得的氢化可的松的峰面积带入上述工作曲线中, 得到相应的

浓度 (4.80 ng/mL), 经换算, 最终结果为每克鱼粉中含 48.00 ng 氢化可的松。农业部 235 号公告中明确^[4], 氢化可的松可用于动物性食品中, 暂未规定其最高残留限量。因此, 方法可应用于鱼肉等水产品中兽药残留分析。

为考察方法的可靠性, 进行加标回收率实验。在鱼肉中添加了两种不同浓度的 16 种激素的标准混合

溶液。由表 3 可以看出, 16 种激素的回收率介于 82.84%~115.10%之间, RSDs 值小于 9.30%, 基本满足分析要求。

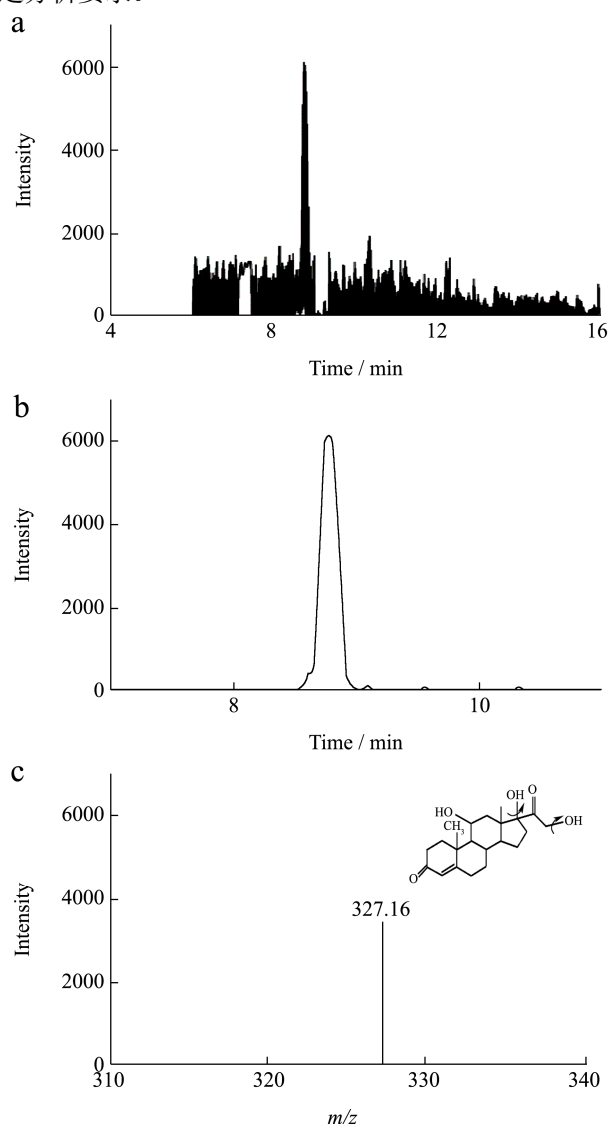


图4 鱼肉样品中类固醇激素残留检测

Fig.4 Determination of steroid hormone residues in fish

注: (a) 空白样品的总离子流图; (b) 氢化可的松提取离子流图; (c) 氢化可的松特征离子。

3 结论

实验基于定量灵敏度很高的三重四级杆质谱技术和选择反应监测模式, 快速分析了鱼肉中 16 种类固醇激素残留。方法受基质干扰小, 各物质检测限小于 5.00 ng/mL。方法的建立对于水产品类食品安全分析具有指导意义。

参考文献

- [1] 姚汝励, 姜鹏, 白俊杰. 17 α -甲基睾酮对草鱼性腺发育及性类固醇激素水平的影响[J]. 水产学报, 2019, 43(4): 801-809
YAO Wen-li, JIANG Peng, BAI Jun-jie. Effects of 17 α -methyltestosterone on gonadal development and hormone levels in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(4): 801-809
- [2] 徐美奕, 方富永, 蔡琼珍, 等. 三种甾体激素在湛江海域的紫红笛鲷体内的残留调查[J]. 现代食品科技, 2006, 23(3): 75-77
XU Mei-yi, FANG Fu-yong, CAI Qiong-zhen, et al. Investigation of three kinds of steroid hormones in *Lutjanus argentimaculatus* in Zhanjiang sea area by radioimmunoassay [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 23(3): 75-77
- [3] 周秋玲, 姜婷婷, 王素英, 等. 动物源性食品中性激素检测方法的比较分析[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(9): 183-189
ZHOU Qiu-ling, LOU Ting-ting, WANG Su-ying, et al. Comparative analysis of detection methods of gonadal hormone in animal derived food [J]. Food Research And Development, 2018, 39(9): 183-189
- [4] 中华人民共和国农业部公告第 235 号, 2002
The Ministry of Agriculture Bulletin of PRC 235, 2002
- [5] French D. Advances in bioanalytical techniques to measure steroid hormones in serum [J]. Bioanalysis, 2016, 8(11): 1203-1219
- [6] 王园园, 宋晓明, 温玉娟, 等. 固相萃取-衍生化-气相色谱-质谱联用测定不同水体中类固醇雌激素方法研究[J]. 岩矿测试, 2017, 36(5): 519-528
WANG Yuan-yuan, SONG Xiao-ming, WEN Yu-juan, et al. Determination of steroid estrogens in different water samples using SPE-derivatization coupled with GC-MS [J]. Rock and Mineral Analysis, 2017, 36(5): 519-528
- [7] Mickael D, Caroline W, Emmanuelle B, et al. Supercritical fluid chromatography applied to the highly selective isolation of urinary steroid hormones prior to GC/MS analysis [J]. Journal of Chromatography B, 2018, 1086: 97-104
- [8] 赵超敏, 古淑青, 郑江, 等. 凝胶渗透色谱净化-气相色谱-质谱法测定黄油中 6 种激素的残留[J]. 现代食品科技, 2018, 34(4): 281-286
ZHAO Chao-min, GU Shu-qing, ZHENG Jiang, et al. Detection of six steroid hormone residues in butter samples by gel permeation chromatography purification and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(4): 281-286

(下转第 215 页)