

冬青油羟丙基- β -环糊精包合物制备工艺及 杀虫活性研究

周一万,李 涛,刘润强,冯俊涛,张 兴

(西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心,陕西省生物农药工程技术研究中心,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】考察冬青油羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)包合工艺条件及包合物制剂对菊小长管蚜的防治效果。【方法】以包合物的收率和油转化率的综合评分作为评价指标,选择冬青油与羟丙基- β -环糊精的质量比、包合温度及包合时间为主要影响因素,进行 $L_{16}(4^5)$ 正交试验,优化包合冬青油的工艺条件,并对包合物制剂进行田间药效试验。【结果】饱和水溶液法制备冬青油 HP- β -CD 包合物的最佳工艺条件为:羟丙基- β -环糊精与冬青油的质量比为 10 : 1,包合温度为 45 $^{\circ}\text{C}$,包合时间为 2.0 h。冬青油包合物制剂 250 倍稀释、常量喷雾对菊小长管蚜有较好的防治效果,包合物制剂的速效性略低于乳油制剂,但持效期较乳油制剂长,具有一定的缓释性。【结论】冬青油羟丙基- β -环糊精包合工艺合理可行,包合物制剂对菊小长管蚜具有较好的防治效果和一定的持效期。

【关键词】 冬青油;羟丙基- β -环糊精;包合工艺;田间药效

【中图分类号】 S482.3⁺9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)10-0110-05

Study on the inclusion of wintergreen oil with HP- β -CD and its insecticidal activity

ZHOU Yi-wan, LI Tao, LIU Run-qiang, FENG Jun-tao, ZHANG Xing

(Research and Development Center of Biorational Pesticide, Northwest A&F University, Biopesticide Engineering
Research Center, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to investigate the processing for HP- β -CD-inclusion of wintergreen oil and insecticidal activity of its formulation. 【Method】 The orthogonal design was used for the optimization of inclusion conditions. With the transformation rate of the wintergreen oil in inclusion complex and the yield of inclusion complex as the evaluation indexes, the mass ratio of HP- β -CD to oil, the temperature and the inclusion time were used as the main factors of $L_{16}(4^5)$ orthogonal design. 【Result】 The optimal conditions for inclusion were as follows: the mass ratio of HP- β -CD to oil 10 : 1, a saturated water solution, inclusion temperature at 45 $^{\circ}\text{C}$, and stirring for 2.0 h. The inclusion complex formulation diluted 250 times exhibited a good control efficacy against *Macrosiphoniella sanborni* and its quick-acting was worse than EC but the persistent effects was better. 【Conclusion】 The optimal conditions for HP- β -CD-inclusion of wintergreen oil were steady and feasible. The inclusion complex formulation exhibited a good and persistent control efficacy against *Macrosiphoniella sanborni*.

Key words: wintergreen oil; HP- β -CD; inclusion condition; field efficacy

冬青油是从冬青叶中提取的一种植物精油,由于具有抗菌消炎作用,被广泛用于医药及调制日化

* [收稿日期] 2010-03-26

[基金项目] 公益性行业(农业)科研专项(200903052)

[作者简介] 周一万(1973—),男,重庆荣昌人,讲师,在读博士,主要从事农药制剂加工技术研究。E-mail: yiwanyan1021@163.com

[通信作者] 张 兴(1952—),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事无公害农药研究。E-mail: zhixing1952@126.com

用香精。近年来,关于冬青油在农业上的应用研究报道日益增多。王春等^[1]研究发现,冬青油对烟草叶甲害虫有很高的熏杀毒力;方才君等^[2]研究表明,用 5 mg/L 冬青油对朱砂叶螨熏杀 24 h,死亡率可达 100%。笔者在试验中也发现,冬青油对多种蚜虫和红蜘蛛有较好的防治效果,是一种极具开发前景的无公害农药活性物质。但在田间用药过程中发现,由于冬青油具有较高的挥发性而致持效期较短,对于繁殖较快的害虫,在一个发生期内需频繁多次用药,防治成本偏高。另外,冬青油不溶于水,一般需要添加有机溶剂将其制成乳油在田间使用,不利于发挥其环境相容性好的优点。

环糊精及其衍生物是一类具有特殊分子空腔结构的化合物,可与许多有机、无机和生物分子结合成主客体包合物,具有保护、稳定、增溶客体分子、减少挥发性物质的挥发和选择性定向分子的特性,在环境、医药、食品、化妆品、化学分离等方面都有广泛的应用^[3-5]。近年来也开始应用在农药加工领域,将农药活性物质用环糊精及其衍生物包合后,可提高农药的稳定性和水溶性,从目前的研究来看,环糊精及其衍生物可以大大降低溶剂的使用量、提高药物利用率、减少农药污染^[6-7]。采用环糊精包合技术对挥发油进行包合后加工成制剂,在中药制剂中研究较多,但有关采用环糊精及其衍生物对冬青油进行包合的研究尚未见报道。本研究通过正交试验优化筛选出了利用羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)包合冬青油的较佳工艺,并对包合物制剂进行了田间药效试验,以期冬青油在农业害虫防治中的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 仪器 DW-1 型无级直流恒速搅拌器,巩义市英峪予华仪器厂;恒温水浴锅,无锡市星海王生化设备有限公司;Lyo-0.4 冷冻干燥机,上海东富龙科技有限公司;PB303-N 电子天平(DO)、挥发油提取器、比重瓶(5 mL)、85-2 型恒温磁力搅拌器,均购自金坛市大地自动化仪器厂。

1.1.2 试剂 冬青油购自江西省吉水县水南威霸香料厂;羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD,纯度≥99.0%)购自洛阳市化学试剂厂;其他试剂均为分析纯。

1.1.3 供试昆虫 菊小长管蚜(*Macrosiphoniella sanborni* (Gillette))。

1.1.4 供试作物 菊花,品种为龙爪菊。

1.2 试验方法

1.2.1 正交试验设计 根据预试验及文献[8-9]的报道,影响 HP-β-CD 包合挥发油工艺的主要因素有挥发油与 HP-β-CD 质量比、包合温度及包合时间等。本试验以包合物的收率和油转化率的综合评分作为评价指标,进行 L₁₆(4⁵)正交试验。正交试验的因素和水平见表 1。

表 1 冬青油 HP-β-CD 包合工艺的正交试验因素和水平
Table 1 Orthogonal-testing factors and levels of inclusion of wintergreen oil with HP-β-CD

水平 Level	因素 Factor		
	<i>m</i> (HP-β-CD) :	包合时间(B)/	包合温度(C)/
	<i>m</i> (冬青油)(A)	h	℃
	<i>m</i> (HP-β-CD) : <i>m</i> (Wintergreen oil)	Inclusion time	Inclusion temperature
1	6 : 1	2.0	35
2	8 : 1	3.0	45
3	10 : 1	4.0	55
4	12 : 1	5.0	65

1.2.2 包合物的制备 采用饱和水溶液法制备冬青油 HP-β-CD 包合物。具体方法为:称取 4 g 经 50℃干燥 1.5 h 的 HP-β-CD,放入锥形瓶中,然后加入 20 mL 蒸馏水并加热至 30℃溶解。溶解后置于磁力搅拌器上,按表 1 中的条件,分别在一定温度下缓缓加入一定质量的冬青油,搅拌包合一定的时间,静置冷藏 24 h,抽滤。将滤液倒入培养皿,放入冰箱过夜,待结成冰后用真空冷冻干燥机制成蓬松的块状物质研碎即得包合物。

1.2.3 包合物的收率、油转化率及空白回收率的测定 按文献[10]附录挥发油的测定法进行。精密称量所得的干燥包合物,置于圆底烧瓶中,放数粒沸石,加蒸馏水 150 mL,连接挥发油提取器,加热至沸,并保持微沸 6 h 后停止加热,放置 30 min 后读数,得挥发油体积。同时,测定挥发油空白回收率:用 0.90 mL 挥发油,加 5 g HP-β-CD 替代包合物,在相同条件下测定挥发油的体积。参照穆启运等^[8]的方法计算包合物的收率、油转化率,并根据其相应的权重进行综合评分。同时测定空白回收率,本试验挥发油的空白回收率为 98.35%。包合物收率($P_{\text{包合物收率}}$)、油转化率($P_{\text{油转化率}}$)、空白回收率($P_{\text{空白回收}}$)、综合评分($S_{\text{综合}}$)的计算公式为:

$$P_{\text{包合物收率}} = m_{\text{包合物}} / (m_{\text{HP-}\beta\text{-CD}} + m_{\text{挥发油}}) \times 100\%$$
$$P_{\text{空白回收}} = V_{\text{空白回收油}} / V_{\text{空白投入油}} \times 100\%$$
$$P_{\text{油转化率}} = (m_{\text{回收油}} / m_{\text{投入油}} \times P_{\text{空白回收}}) \times 100\%$$
$$S_{\text{综合}} = P_{\text{包合物收率}} \times 0.4(\text{权重}) + P_{\text{油转化率}} \times 0.6(\text{权重}).$$

1.2.4 冬青油 HP-β-CD 包合物制剂加工方法及乳油的配制 取一定量冬青 HP-β-CD 包合物,将其溶于水,加入适量表面活性剂及其他助剂,配制成冬青油含量为 5%的水剂备用。另取一定量冬青油,加入适量的乳化剂和溶剂,配制成各项性能指标合格的 5%冬青油乳油备用。

1.2.5 田间防效试验 试验在西北农林科技大学花圃进行,菊花品种为 3 年生龙爪菊。试验设 5%冬青油乳油 250 倍稀释常量喷雾、5%冬青油 HP-β-CD 包合物水剂 250 倍稀释常量喷雾、清水对照(CK)3 个处理。每处理重复 3 次,2 个药剂处理小区面积分别为 50 m²,清水对照小区面积为 30 m²。

分别于施药前及施药后 1,3,5,7,11 d 调查虫

口数。调查方法为每小区采用对角线 5 点取样,每点固定 5 个枝条挂牌标记,并记录枝条上的活蚜数,计算防治效果:

校正防效=(1- $\frac{Ta \cdot Cb}{Tb \cdot Ca}$)×100%。

式中:Ta 为药剂处理后虫口数,Tb 为药剂处理前虫口数,Ca 为对照处理后虫口数,Cb 为对照处理前虫口数。

2 结果与分析

2.1 冬青油 HP-β-CD 包合工艺的正交试验结果 冬青油 HP-β-CD 包合工艺的正交试验数据见表 2。

表 2 冬青油 HP-β-CD 包合工艺的正交试验及结果
Table 2 Design and analysis of orthogonal test on L₁₆(4⁵)

试验 编号 Number	<i>m</i> (HP-β-CD): <i>m</i> (冬青油)(A) <i>m</i> (HP-β-CD): <i>m</i> (Wintergreen oil)	包合 时间(B)/h Inclusion time	包合 温度(C)/℃ Inclusion temperature	D Factor D	E Factor E	包合物收率/% Ratio of obtained inclusion compound	油转化率/% Inclusion ratio of ail	综合评分 Comprehensive grading
1	1	1	1	1	1	90.33	73.46	80.20
2	1	2	2	2	2	92.35	74.74	81.78
3	1	3	3	3	3	92.88	74.32	81.74
4	1	4	4	4	4	91.13	71.41	79.30
5	2	1	2	3	4	97.94	96.22	96.91
6	2	2	1	4	3	96.12	95.29	95.62
7	2	3	4	1	2	95.85	93.70	94.56
8	2	4	3	2	1	92.73	94.52	93.80
9	3	1	3	4	2	93.85	97.68	96.15
10	3	2	4	3	1	94.86	97.79	94.62
11	3	3	1	2	4	92.38	97.63	95.53
12	3	4	2	1	3	90.84	98.82	94.63
13	4	1	4	2	3	85.60	98.85	93.55
14	4	2	3	1	4	86.40	99.41	94.21
15	4	3	2	4	1	87.72	99.63	94.87
16	4	4	1	3	2	86.36	99.27	94.11
<i>k</i> ₁	80.76	91.70	91.37	90.90	90.87			
<i>k</i> ₂	95.22	91.56	92.05	91.17	91.65			
<i>k</i> ₃	95.23	91.68	91.48	91.85	91.38			
<i>k</i> ₄	94.18	90.46	90.51	91.49	91.49			
<i>R</i>	14.48	1.24	1.54	0.95	0.78			

比较表 2 中各因素级差值的大小可以看出,各因素对包合效果影响的主次顺序为 A>C>B。比较表 2 中每个因素在 3 个水平下试验指标 *k*₁,*k*₂,*k*₃,*k*₄ 的大小顺序,得到水平优势为 A₃>A₂>A₄>A₁,B₁>B₃>B₂>B₄,C₂>C₃>C₁>C₄。因此,可确定饱和水溶液法制备冬青油 HP-β-CD 包合物的最佳工艺条件为:HP-β-CD 和冬青油质量比 10:1,包合时间 2.0 h,包合温度 45℃。

由表 3 可知,因素 A(HP-β-CD 和冬青油质量比)对试验结果有显著影响;因素 B、C,即包合时间、包合温度对试验结果无显著影响。

表 3 冬青油 HP-β-CD 包合工艺正交试验的方差分析结果
Table 3 Analysis of variance of inclusion of
wintergreen oil with HP-β-CD

方差来源 Variance source	离均差 平方和 SSJ	自由度 V	方差 Ms	<i>F</i>
A	601.45	3	300.48	358.75*
B	4.26	3	1.42	2.54
C	4.85	3	1.62	2.89
D	2.00	3	0.667	1.193
E	1.35	3	0.451	0.807
误差 Error	0.35	6		

注:*F*_{0.05}(3,6)=4.76; * 表示在 *F*_{0.05} 差异显著。
Note: * Indicate significant differences, *F*_{0.05}(3,6)=4.76.

按照冬青油 HP-β-CD 包合物的最佳包合工艺条件制备 3 批样品,并检测各项指标,结果见表 4。

表 4 冬青油 HP-β-CD 包合工艺稳定性验证结果
Table 4 Stability test for the inclusion process of wintergreen oil with HP-β-CD

样品 Sample	包合物收率/% Ratio of obtained inclusion compound	油转化率/% Inclusion ratio of oil
1	98.67	96.45
2	98.14	95.96
3	97.86	96.37
平均值 Average	98.22	96.26
相对标准偏差 RSD	0.43	0.27

表 4 结果表明,正交试验筛选的制备冬青油

表 5 2 种冬青油制剂对菊小长管蚜的田间防治效果
Table 5 Efficacy of two wintergreen oil formation on *M. sanborni* (Gillette)

处理 Treatment	药前活虫数 Individuals before sprayed	校正防效/% Control efficacy				
		药后 1 d 1 d after sprayed	药后 3 d 3 d after sprayed	药后 5 d 5 d after sprayed	药后 7 d 7 d after sprayed	药后 11 d 11 d after sprayed
5%冬青油乳油 250 倍液 5% wintergreen oil EC diluted 250 times	1 865	93.94	97.73	91.27	78.06	61.66
5%冬青油 HP-β-CD 包合物水剂 250 倍液 5% wintergreen oil inclusion SL diluted 250 times	1 974	85.01	93.48	98.34	90.17	75.57
CK	2 015	—	—	—	—	—

注:表中虫数为 3 个重复之和,CK 药后 1,3,5,7 和 11 d 的活虫数分别为 2 086,2 145,2 215,2 265 和 2 176。
Note: Individuals before sprayed are the total of three repetitions, individuals of CK after sprayed 1,3,5,7 and 11 d are 2 086,2 145,2 215,2 265,2 176.

3 结论与讨论

饱和水溶液法制备环糊精包合物具有操作简单,易于实现工业化等优点。本试验以包合物收率和油转化率为考核指标,通过正交试验,确定的饱和水溶液法制备冬青油 HP-β-CD 包合物的最佳工艺条件为:HP-β-CD 和天然冬青油质量比 10 : 1,包合时间 2.0 h,包合温度 45 ℃。

将植物精油用 HP-β-CD 包合后加工成制剂,可有效降低其挥发性,延长药剂的持效期。植物精油用 HP-β-CD 包合后,还可大大增加其在水中的溶解度,有利于加工成环保性高的水基化制剂,最大限度地发挥其安全、高效、无公害的特点。从本试验的田间试验结果来看,将冬青油加工成 HP-β-CD 包合物制剂后,药剂的持效期明显优于冬青油乳油,但其速效性略低于乳油制剂,这可能与药剂中到达作物表面活性物质的初始浓度有关,乳油制剂中活性物质都是以游离态存在,而环糊精包合物制剂中活性物质大多被包合在环糊精内,因而当药液喷洒到田间

HP-β-CD 包合物的最佳包合工艺条件,稳定可行。

2.2 冬青油乳油和包合物制剂对菊小长管蚜的田间防治效果

由表 5 可知,2 种冬青油制剂对菊小长管蚜均有较好的防治效果。5%冬青油乳油的速效性较好,施药后 1 d 校正防效达到 93.94%,但其持效期较短,药后第 5 天防效开始出现下降趋势,药后第 7 天时防效明显下降。5%冬青油 HP-β-CD 包合物水剂 250 倍稀释常量喷雾处理的速效性要略低于乳油制剂,但其持效期优于乳油制剂,施药后第 5 天防效达到最大,为 98.34%,施药后 7 d 药效仍能维持在 90%以上。

后,乳油制剂中的活性物质迅速到达作用靶标发挥药效,而包合物中的活性物质会以一定的速度持续稳定地向外释放到达作用靶标。如果将一定量游离态的活性物质与其包合物同时加工在一个制剂中,则在保证其速效性的同时,还能有效提高制剂的持效期。

将环糊精包合物这一剂型引入植物源农药领域中,具有重要的理论意义和实用价值。目前,环糊精包合物作为一种剂型在农药中的应用研究还较少,在植物源农药中的应用研究更少。将植物源农药活性物质制成包合物制剂,能够有效成分的稳定性和具有一定的缓释作用。胡林等^[11]将鱼藤酮制成环糊精包合物后,发现其对紫外光的光照稳定性明显增强。郝蕙玲等^[12]将印楝素制成环糊精包合物后,在试验条件下放置 60 d 后,对蚊幼虫的杀灭率仍保持在 60.4%,表现出良好的缓释性能和持效期长的特点。结合本研究结果可以认为,将植物源农药活性物质制成包合物制剂,可提高药剂的田间利用率,延长药剂持效期,减少田间用药次数,

从而降低田间用药成本。所以, 尽管由于环糊精及其衍生物的价格较高, 难以制成高有效成分含量的制剂等因素使得制剂成本偏高, 植物源农药环糊精包合物制剂仍具有较高的性价比, 值得进一步研究。

[参考文献]

[1] 王 春, 杨德军, 胡仕林. 植物精油对烟草甲害虫的毒力测定 [J]. 生命科学研究, 2001, 5(3): 223-226.
Wang C, Yang D J, Hu S L. Determination of toxicity of plant essential oils to tobacco beetle [J]. Life Science Research, 2001, 5(3): 223-226. (in Chinese)

[2] 方才君, 胡仕林. 植物精油对朱砂叶螨的毒性试验 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 1997, 22(4): 470-472.
Fang C J, Hu S L. Toxicity evaluation of essential oils on *Tetranychus cinubrinus* [J]. Journal of Southwest China Normal University: Natural Science, 1997, 22(4): 470-472. (in Chinese)

[3] 龚敏阳. β -环糊精及其衍生物在中药制剂中的研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(5): 90-91.
Gong M Y. Advances of research on β -cyclodextrin and its derivatives applied in Chinese traditional medicine formulation [J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2009, 16(5): 90-91. (in Chinese)

[4] 纵 伟, 苗榕宸, 袁文亮. 环糊精包合物在食品工业中的应用 [J]. 食品工程, 2009(3): 13-15.
Zong W, Miao R C, Yuan W L. Application of cyclodextrin inclusion complexes in food industry [J]. Food Engineering, 2009(3): 13-15. (in Chinese)

[5] 张晓光, 刘洁翔, 范志金, 等. 环糊精及其衍生物在农药领域应用的研究进展 [J]. 农药学学报, 2009, 11(3): 291-297.
Zhang X G, Liu J X, Fan Z J, et al. Advances of research on cyclodextrin and its derivatives applied in pesticides [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2009, 11(3): 291-297. (in Chinese)

[6] 张慧容, 彭 浩, 贺红武. 环糊精在农药中的研究及其应用 [J]. 农药, 2008, 47(6): 405-411.

Zhang H R, Peng H, He H W. Research and application of cyclodextrins in pesticide [J]. Pesticide, 2008, 47(6): 405-411. (in Chinese)

[7] Zhang A P, Liu P, Wang L M, et al. Characterization of inclusion complexation between fenoxaprop-p-ethyl and cyclodextrin [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(18): 7193-7197.

[8] 穆启运, 阮新民. β -环糊精包合川芎和细辛挥发油的正交试验研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(5): 471-474.
Mu Q Y, Ruan X M. Study on the inclusion of volatile oil extracted from rhizoma chuanxiong and radix et rhizoma asari with β -cyclodextrin [J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2009, 26(5): 471-474. (in Chinese)

[9] 胡淑平, 吕圭源, 于晓敏, 等. 羟丙基- β -环糊精包合莪术油的制备工艺研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(5): 615-617.
Hu S P, Lv G Y, Yu X M, et al. Preparation technical research of HP- β -CD containing ezhu oil [J]. Journal of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, 2007, 31(5): 615-617. (in Chinese)

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 1 部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 57-58(附录).
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China: I [S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 57-58(Addendum). (in Chinese)

[11] 胡 林, 夏 坚, 詹素兰, 等. 鱼藤酮的环糊精包合物对松材线虫的杀虫作用 [J]. 华东交通大学学报, 2006, 23(1): 164-168.
Hu L, Xia J, Zhan S L, et al. The preparation and characterizations of rotenone cyclodextrin inclusion complex the bioactivity against *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Journal of East China Jiaotong University, 2006, 23(1): 164-168. (in Chinese)

[12] 郝蕙玲, 孙锦程, 林永丽. 印楝素包合物的制备及活性效应测试研究 [J]. 中华卫生杀虫药械, 2009, 15(1): 18-19.
Hao H L, Sun J C, Lin Y L. Preparation and effectiveness of the inclusion compound of β -cyclodextrin with azadirachtin [J]. Chinese Journal of Hygienic Insecticides & Equipments, 2009, 15(1): 18-19. (in Chinese)

(上接第 109 页)

[17] 王兆守, 林 淦, 李秀仙, 等. 拟除虫菊酯降解菌的分离、筛选及鉴定 [J]. 福建农林大学学报, 2003, 32(2): 176-180.
Wang Z S, Lin G, Li X X, et al. Isolation, screening and identification of synthetic pyrethroid-degrading bacteria [J]. Journal of Fujian A&F University, 2003, 32(2): 176-180. (in Chinese)

[18] 张战泓, 罗源华, 刘 勇, 等. 一株光合细菌分离鉴定及其降解甲氧菊酯特性 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 35(4): 417-419.
Zhang Z H, Luo Y H, Liu Y, et al. Isolation, identification and

degradation characteristics of fenpropathrin-degrading strain [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Science Edition, 2009, 35(4): 417-419. (in Chinese)

[19] 辛 伟, 洪永聪, 胡美玲, 等. 氯氰菊酯降解菌的筛选及其特性研究 [J]. 莱阳农学院学报: 自然科学版, 2006, 23(2): 88-92.
Xin W, Hong Y C, Hu M L, et al. Screening and degradation characteristics of cypermethrin-degrading strain [J]. Laiyang Agricultural College: Natural Science Edition, 2006, 23(2): 88-92. (in Chinese)