

高效液相色谱法测定牛奶中雌激素残留量

迂君, 张秀丽, 张玉黔

(沈阳市疾病预防控制中心, 沈阳 110031)

【关键词】 高效液相色谱法; 牛奶; 雌激素

【中图分类号】 O657.7+2

【文献标识码】 C

【文章编号】 1004-8685(2007)06-1139-02

随着饲养业的迅猛发展,为促进动物生长而使用雌激素以及家畜排泄的雌激素,导致水产品、肉类、蛋类及乳类激素残留问题日益严重。食品中雌激素残留问题也日渐成为人们关注的热点。

有文献报道采用气相色谱-质谱(GC-MS)^[1]、红外光谱法、酶免疫分析法、放射免疫法、荧光免疫分析法、高效液相色谱法^[2,3]等方法测定雌激素的含量。其中气相色谱-质谱法和高效液相色谱法可以进行激素的多组分分析,但气相色谱法需要衍生化处理,耗时较长。本文采用高效液相色谱法以乙腈为提取溶剂沉淀蛋白,正己烷脱脂净化,在优化的色谱条件下,采用二极管阵列检测器对牛奶中雌二醇、雌三醇、雌酮 3 种雌激素残留进行检测,方法灵敏度较高,干扰少,结果令人满意。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

HP1100 型高效液相色谱仪、Milli-Q-A10 型超纯水器(美国 Millipore 公司)、RE-52 旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂)、超声波清洗仪(CX-300W,北京市医疗设备二厂)、TurboVap LV 蒸发仪(美国 Zymark 公司)、0.45 μm 微孔滤膜;甲醇(HPLC,天津四友生物医学有限公司)、乙腈(纯度 99.9%,Fisher 公司)、雌二醇、雌酮、雌三醇标准品。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理 吸取牛奶样品 10.0 ml 加入 10 g 无水硫酸钠、30 ml 乙腈于 50 ml 带盖的塑料离心管中,混匀,超声提取 30 min,取出,以 4 000 r/min 的速度离心 10 min,吸出上清液过无水硫酸钠后转移至旋转蒸发瓶中,残渣加入 20 ml 乙腈,重复提取二次,合并上清液,于 40℃ 旋转蒸发浓缩至近干,用 5 ml 乙腈洗涤蒸发瓶,转移至浓缩管中于 40℃ 水浴挥至近干,用甲醇定容至 1 ml。旋涡混合,再加入 2 ml 正己烷,混匀,以 4 000 r/min 的速度离心 5 min,弃去正己烷层,过 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,进行 HPLC 分析。

1.2.2 色谱条件 色谱柱 Diamonsil 高效液相色谱柱,检测波长 280 nm,柱温 40℃,流速为 1.0 ml/min,流动相为乙腈/水,采用梯度洗脱方法:0~3 min 乙腈/水(v/v,35:65),3~7 min 乙腈由 35% 升至 55%,保持 10 min,进样量 10 μl 。

2 结果与讨论

2.1 沉淀剂的选择

对比乙酸和乙腈两种沉淀剂的沉淀效果。分别配制了 0.1%~10% 的乙酸溶液,结果表明乙酸的沉淀效果不如乙腈,而且乙腈在沉淀蛋白同时可作为提取溶剂。因此,实验选择乙腈为沉淀剂和提取溶剂。

2.2 流动相的选择

实验中比较甲醇-水,甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钠、乙腈-水三种流动相体系对组分分离的影响。结果表明,乙腈-水作流动相,三种雌激素获得了很好的分离,且峰形对称。因此,实验采用乙腈-水为流动相。

2.3 流动相比的选择

选用乙腈-水(50%:50%)等度洗脱雌三醇的保留时间过短,与其他二组分出峰时间间隔过长。通过改变流动相的比例,增加水相比比例降低极性,但分析时间过长。采用梯度洗脱方式 0~3 min 乙腈/水(v/v,35:65),3~7 min 乙腈由 35% 升至 55%,保持 10 min,色谱峰峰形较好,达到基线分离,分析时间在 15 min 之内。标准色谱图见图 1。

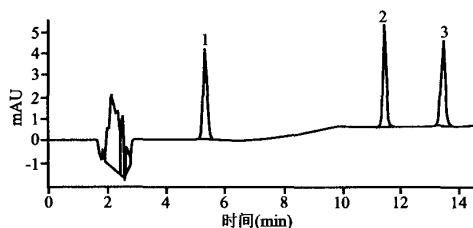


图 1 标准色谱图

1. 雌三醇; 2. 雌二醇; 3. 雌酮

2.4 检测波长的选择

对雌二醇、雌三醇和雌酮分别在 190~400 nm 范围内进行波长扫描,在 280 nm 波长处被测组分的灵敏度高且背景干扰小,对检测较为适宜,而在 200 nm 左右波长时干扰较多。因此,选择检测波长为 280 nm。

2.5 标准曲线及检出限

配制系列混合标准液,根据测定峰面积与其相应浓度绘制标准曲线。雌酮、雌二醇、雌三醇在 0.5~10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内具有良好的线性关系。以 10 倍噪声峰高计算定量限,分别为 0.43、0.40、0.60 $\mu\text{g/L}$ 。

2.6 方法精密度及准确度

向空白牛奶样品中添加标准溶液测定方法的回收率,雌二醇、雌酮、雌三醇的平均回收率结果见表 1,6 次测定的相对标准偏差分别为 4.96%、3.20%、4.13%。

【作者简介】 迂君(1971-),女,硕士,副主任技师,主要从事理化检验工作。

表 1 方法的回收率

标准物质	本底值	加标值 (ng)	测定值 (ng)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
雌二醇	UDL	10	9.6	96.0	94.5
	UDL	50	46.3	92.6	
	UDL	100	94.8	94.8	
雌酮	UDL	10	9.3	93.0	90.8
	UDL	50	45.6	91.2	
	UDL	100	88.2	88.2	
雌三醇	UDL	10	8.5	85.0	85.7
	UDL	50	41.0	82.0	
	UDL	100	90.2	90.2	

UDL - 低于检出限

2.7 实际样品的测定

分别取市售蒙牛、伊利和光明纯鲜牛奶按照上述方法进行测定,没有检出雌二醇、雌三醇和雌酮阳性样品。牛奶空白样品色谱图、加标样品色谱图见图 2、图 3。

3 小结

本文建立了牛奶中雌性激素高效液相色谱测定方法。样品经乙腈沉淀蛋白,超声波提取并对高效液相色谱条件进行优化。方法具有较高的灵敏度,回收率大于 85%,适用于实际样品的测定。

(上接第 1119 页)

6 诊断血清的有效性

根据常规检验方法,在分离到可疑菌落时即做血清学鉴定以排除其他非致病菌,但有时购买的诊断血清效价偏低,虽然在有效期内但并不一定有效,我室曾经在一起沙门菌引起的食物中毒中因使用效价偏低的诊断血清造成凝集试验并不凝集,并忽略了这种现象,贻误了判定食物中毒原因的大好时机,也同时给检验工作造成了困难。因此,购买诊断血清也应经过质量鉴定才能使用,当菌落形态和生化反应比较相符而诊断血清不凝集时,应注意使用不同批号或厂家的诊断血清做凝集试验,不能轻易否定而弃之。

7 细菌变异

细菌变异及细菌在保存过程中受到损害而为检验工作带来了很大困难,因此在接到样品后,应不同情况不同分析,使被检菌恢复其生化特性,才能保证结果的准确。致病菌的生长特性决定了在不同的环境下不断的改变自己以适应生存,致病菌最适的生长环境自然是人体,因此人体分离的致病菌的特性是最具典型性,也是最易鉴别的。食品不是它的最适环境,因此自食品中分离的菌株往往是不具典型性。在鉴别致病菌中应引起注意。

8 仪器检测与常规检测应相辅相成

近年来随着我国卫生事业建设力度的加大,各级疾病预防控制中心纷纷购置了微生物自动鉴定系统。微生物自动鉴定系统为快速出具鉴定结果提供了有利条件,但由于操作人员的经验不足、操作细节的错误等等的误差使得仪器检测的

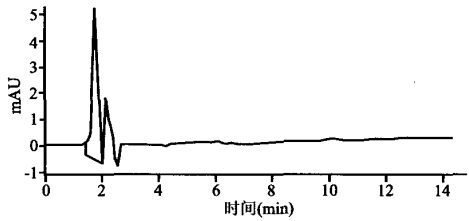


图 2 牛奶空白样品色谱图

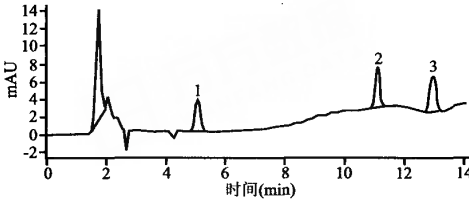


图 3 牛奶加标样品色谱图

[参考文献]

[1] 张宏,毛炯,孙成均,等. 气相色谱-质谱法测定尿及河底泥中的环境雌激素[J]. 色谱,2003,21(5):451-455.
[2] 陈春晓,康莉. 高效液相色谱法同时测定禽肉中四种雌激素的含量[J]. 中国卫生检验杂志,2003,13(1):68-68.
[3] 林春晓,王起思,刘开钊,等. 保健食品中五种性激素的高效液相色谱测定法[J]. 中华预防医学杂志,2003,37(4):275-277.

(收稿日期:2007-01-13)

结果虽然及时却并不完全准确,仪器的超前判断的结果,只能作为常规检测的辅助手段,不能作为最终的结果,只能为工作人员指明方向。仪器检测有它一定的局限性,并且仪器的软件虽然比较健全,但在实际工作中仍存在很多特殊情况,需要有丰富经验的检测人员予以矫正,以最终获得正确结果。因此在实际的操作中应做到仪器检测与常规检测的相辅相成,才能快速而准确的提高检出率。

9 讨论

随着科学技术的发展,新的快速检验方法不断涌现,为突发公共卫生事件的解决提供有力的实验室数据。如:显色培养基、微生物全自动鉴定系统、VIDAS 全自动荧光酶标免疫测试系统、PCR 技术、胶体金免疫结合实验、免疫磁珠浓缩、生物芯片技术等等^[2],但这些新技术、新方法都或多或少的存在一定的局限性,有的价格昂贵、有的不能获得纯菌、有的正在研究之中,因此对于基层实验室目前来说仍然是以传统的增菌、分离培养、生化试验、血清学试验为基础的。因此提高微生物实验室的基础检测能力仍然是非常重要的。

[参考文献]

[1] 刘渠. 细菌性食物中毒快速检验值得注意的几个问题[J]. 中国公共卫生,2000,16(7):584.
[2] 何金林,夏铁瑛,莫国华,等. 国内细菌性食物中毒检验进展[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(8):1015-1017.

(收稿日期:2007-01-20)

高效液相色谱法测定牛奶中雌激素残留量

作者: 迂君, 张秀丽, 张玉黔
作者单位: 沈阳市疾病预防控制中心, 沈阳, 110031
刊名: 中国卫生检验杂志 **ISTIC**
英文刊名: CHINESE JOURNAL OF HEALTH LABORATORY TECHNOLOGY
年, 卷(期): 2007, 17(6)
被引用次数: 2次

参考文献(3条)

1. 张宏, 毛炯, 孙成均 气相色谱-质谱法测定尿及河底泥中的环境雌激素[期刊论文]-色谱 2003(05)
2. 陈春晓, 康莉 高效液相色谱法同时测定禽肉中四种雌激素的含量[期刊论文]-中国卫生检验杂志 2003(01)
3. 林春晓, 王起思, 刘开钳 保健食品中五种性激素的高效液相色谱测定法[期刊论文]-中华预防医学杂志 2003(04)

相似文献(10条)

1. 期刊论文 罗昭军, 韦良云, 李军, LUO Zhao-jun, WEI Liang-yun, LI Jun 高效液相色谱法检测牛奶中甲磺霉素残留的研究 -广西农业科学2009, 40(11)

采用乙酸乙酯超声、涡旋提取牛奶中残留的甲磺霉素, 正己烷脱脂, C18固相萃取净化, 最后进行高效液相色谱法(HPLC)检测分析. 通过优化实验色谱条件, 明显减少了基质的干扰, 实现了甲磺霉素的定量分析; 而通过空白基质添加标准曲线, 则有效消除了基质效应的影响. 该方法最低检测限为 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$, 其加标水平为 $10\text{--}100\text{ }\mu\text{g/kg}$ 之间, 加标回收率在 $69.22\%\text{--}101.37\%$ 之间, 线性相关系数(r)均大于 0.998 , 相对标准偏差(RSD)均小于 10% . 可见, 高效液相色谱法(HPLC)是一种灵敏、准确的检测牛奶中甲磺霉素残留的分析方法.

2. 期刊论文 林玲, 杨春亮, 黎珍莲, 查玉兵, 程盛华, LIN Ling, YANG Chun-liang, Lii Zhen-lian, CHA Yu-bing.

CHENG Sheng-hua 高效液相色谱法测定牛奶中苯甲酸、山梨酸和糖精钠 -广东农业科学2008, ""(12)

建立了采用高效液相色谱法同时测定牛奶中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的分析方法, 牛奶样品经水提取、离心后直接进样, 于 230 nm 处检测. 外标法定性、定量. 结果表明: 苯甲酸、山梨酸和糖精钠在 15 min 内能得到较好的分离, 检出限分别为 0.06 、 0.07 、 0.08 mg/kg , 样品加标平均回收率在 $90\%\text{--}105\%$ 之间.

3. 期刊论文 叶能胜, 谷学新, 张琦, YE Neng-seng, GU Xue-xin, ZHANG Qi 固相萃取-高效液相色谱法检测牛奶和猪肉中5种 β -内酰胺类抗生素 -分析试验室2010, 29(6)

建立了牛奶和猪肉样品中氨苄西林、青霉素V、青霉素G、苯唑西林和氯唑西林等5种 β -内酰胺类抗生素残留量的高效液相色谱(HPLC)测定方法. 实验采用固相萃取法(SPE)富集抗生素残留, 考察了样品前处理方法; 并对色谱分离条件加以优化, 在C18色谱柱上以乙腈- 0.1% 氨水进行梯度洗脱, 可在 10 min 内实现5种抗生素的分离与检测, 检测波长为 210 nm . 方法可用于动物性食品中上述抗生素残留的同时检测.

4. 期刊论文 蔡志斌, 张英, 刘丽, Cai Zhi-bin, Zhang Ying, Liu Li 固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中3种四环素类抗生素残留量 -中国卫生检验杂志2007, 17(2)

目的: 为快速、简便、灵敏地检测牛奶中土霉素、四环素、金霉素残留量, 建立固相萃取(SPE)-高效液相色谱(HPLC)分析法. 方法: 样品用McIlvaine缓冲液提取, 硫酸锌-亚铁氰化钾体系沉淀蛋白质后, 再经超声波提取, 固相萃取, 高效液相色谱法同时测定3种抗生素. 固相萃取小柱为Waters Sep-Pak C18 Cart, 洗脱液为甲醇/柠檬酸溶液; 色谱柱为Kromasil C18柱($5\text{ }\mu\text{m}$, $150\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$), 流动相为乙腈: 0.01 mol/L 柠檬酸溶液= $25:75$ (v/v , $\text{pH}=2.5$), 流速 $0.4\text{--}0.8\text{ mL/min}$, 检测波长为 355 nm . 结果: 本方法的最低检出浓度分别为: 土霉素($0.009\text{ }\mu\text{g/mL}$)、四环素($0.007\text{ }\mu\text{g/mL}$)、金霉素($0.034\text{ }\mu\text{g/mL}$), 标准曲线线性良好, 其回归方程及相关系数 r 分别为: 土霉素: $Y=490379X-13947$, $r=0.9998$; 四环素: $Y=454806X-17029$, $r=0.9995$; 金霉素: $Y=156256X-20479$, $r=0.9996$, 回收率在 $86.5\%\text{--}95.0\%$ 之间, 相对标准偏差($n=6$)小于 3% . 结论: 该方法简单、快速、灵敏度高, 适用于牛奶中四环素类抗生素残留量检测.

5. 期刊论文 秦燕, 陈毓芳, 林峰, 张美金, QIN Yan, CHEN Yu-fang, LIN Feng, ZHANG Mei-jin 固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中的多种四环素残留 -食品科学2005, 26(3)

目的: 建立牛奶中四环素族抗生素残留的高效液相色谱法. 方法: 样品 5g 经 20 mL EDTA-McIlvaine缓冲液提取, 离心后取 5 mL 上清液于预平衡的Sep-Pak Waters TMSep-Pak C18固相萃取柱净化, 用 10 mmol/L 的草酸甲醇溶液洗脱, 并于 40°C 用 N_2 浓缩仪吹干, 流动相 0.5 mL 溶解残渣进行HPLC分析. 结果: 标准校准曲线在 $0.05\text{--}1.0\text{ mg/L}$ 的范围内, 相关系数 $r>0.99$. 牛奶中土霉素、四环素-金霉素和强力霉素的定量检测限(LOQ)依次是 0.025 、 0.025 、 0.05 、和 0.05 mg/L ; 添加水平分别为 0.1 、 0.1 、 0.2 和 0.2 mg/L 时, 样品加标回收率为 $84\%\text{--}110\%$, $\text{RSD}<10\%$. 结论: 方法简便可行、净化效果好、检测灵敏度、准确度及精密度均满足检测要求.

6. 学位论文 韩业超 牛奶中两种磺胺类药物残留量的同时测定(HPLC法)及其消除规律的研究 2004

本研究采用固相萃取法提纯净化, 高效液相色谱法分离和紫外检测器检测, 对牛奶中的磺胺嘧啶(SD)和磺胺间甲氧嘧啶(SMM)的残留检测进行了研究, 旨在建立一种能对牛奶中SD和SMM残留进行快速、准确的检测方法, 并通过这种方法研究牛奶中两种磺胺类药物的消除规律, 确立合理的休药期.

经实验对比, 确立同时检测牛奶中SD和SMM的样品前处理方法为: 精密量取 10 mL 待测奶样, 置于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入无水硫酸钠 4g 和乙腈 25 mL , 涡动混合 15 s , 中速振荡 20 min , 2500 r/min 离心 5 min . 上清液移至分液漏斗中, 加入 30 mL 正己烷, 振荡 2 min 后, 静置 5 min , 分离乙腈层. 用 25 mL 乙腈将沉淀物重复提取 1 次, 乙腈层经同一份正己烷分配, 合并乙腈层于 100 mL 鸡心瓶中, 加入正丙醇 5 mL , 50°C 减压浓缩至近干. 用 3 mL 乙腈-水($95:5$)溶解残留物过碱性氧化铝SPE柱, 不收集, 用乙腈-水($95:5$) 5 mL 洗涤鸡心瓶, 并过SPE柱, 吹去柱内滞留的液体. 用 5 mL 乙腈-水($75:25$)洗脱待测物至 10 mL 容量瓶中, 用水(用磷酸调 pH 值至 4.0)定容至 10 mL , 用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 收集滤液供高效液相色谱测定.

高效液相色谱检测条件为: ODS-A柱, 流动相为水(用磷酸调 pH 至 4.0)-乙腈($80:20$), 等梯度洗脱, 流速为 1.00 mL/min , 柱温为 25°C , 进样量 $50\text{ }\mu\text{L}$, 紫外检测器, 检测波长为 270 nm .

在上述条件下, SD和SMM在 $0.05\text{--}1.00\text{ }\mu\text{g/mL}$ 间有良好的线性关系, 相关系数分别为 0.99997 , 0.99997 . 本研究所建立的方法对SD的最低检出限为 $10\text{ }\mu\text{g/L}$, 对SMM的最低检出限为 $10\text{ }\mu\text{g/L}$. SD在添加浓度为 $0.05\text{--}1.00\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时的回收率为 $70.3\%\text{--}102.5\%$, RSD 为 $5.6\%\text{--}8.2\%$; SMM在添加浓度为 $0.05\text{--}1.00\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时的回收率为 $80.8\%\text{--}113.6\%$, RSD 为 $4.6\%\text{--}8.8\%$. 完全达到实用要求.

用这种方法研究两种磺胺类药物在牛奶中的消除规律, 确立了合理的休药期(SD为 60 h , SMM为 6 d), 并和国家的有关规定进行了对比, 结果基本相符

7. 期刊论文 [吴银良](#), [赵莉](#), [刘勇军](#), [姜艳彬](#), [刘兴国](#), [沈建忠](#), [WU Yinliang](#), [ZHAO Li](#), [LIU Yongjun](#), [JIANG Yanbin](#), [LIU](#)

[Xingguo](#), [SHEN Jianzhong](#) [固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中残留的9种磺胺类药物](#) -[色谱](#)2007, 25(5)

建立了同时测定牛奶中残留的9种磺胺类药物的固相萃取-高效液相色谱分析方法. 牛奶样品经磷酸盐缓冲液稀释后高速离心去除脂肪, 过C18小柱, 用水淋洗, 甲醇洗脱. 洗脱液经氮气吹干后用乙酸乙酯溶解, 并过氨基固相萃取小柱净化, 用正己烷及水淋洗, 以甲醇-乙腈-水(含1%乙酸)(体积比为1:1:8)洗脱, 洗脱液用于高效液相色谱分析. 采用Inertsil ODS-3 C18柱分离, 以水-乙酸和甲醇-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 二极管阵列检测器检测, 外标法定量. 9种磺胺类药物标准曲线的线性回归系数均在 0.999 9 以上, 线性范围为25~5 000 μg/L, 检出限为1.7~2.8 μg/L, 定量限为5.7~9.2 μg/L. 在10, 20, 40 μg/L 添加水平下的添加回收率为72.1%~88.3%, 相对标准偏差为2.3%~5.0%. 该方法具有快速、灵敏的特点, 符合现行兽药残留分析的要求.

8. 期刊论文 [王炼](#), [杨元](#), [王林](#), [WANG Lian](#), [YANG Yuan](#), [WANG Lin](#) [酶水解-高效液相色谱法测定肉类食品及牛奶中11种](#)

[甾体激素](#) -[理化检验-化学分册](#)2007, 43(6)

碎肉用乙腈超声提取, 挥干后加入KH₂PO₄缓冲液(牛奶直接加入KH₂PO₄缓冲液), 再加β-葡萄糖醛酸酐酶, 37℃恒温24 h, 稀释后过SPE小柱, 用乙腈洗脱, 线性梯度变化的KH₂PO₄-CH₃CN分离, 二极管阵列检测器检测. 所测11种激素的检出限为0.009~0.020 mg·kg⁻¹; 平均回收率为51.0%~107.0%; 相对标准偏差为0.77%~6.42%之间; 相关系数为0.999 5~0.999 9之间. 酶水解-高效液相色谱法测定肉类食品及牛奶中11种甾体激素是一种简便、快速、灵敏、线性好的检测方法.

9. 期刊论文 [陆艳霞](#), [杨立刚](#), [赵道远](#), [杨明敏](#) [浊点萃取-高效液相色谱法对牛奶中三聚氰胺的测定](#) -[分析测试学报](#)

2009, 28(10)

建立了浊点萃取法(CPE)对牛奶样品进行净化和浓缩后用高效液相色谱(HPLC)检测的方法. 采用三氯乙酸(CC13COOH)结合非离子型表面活性剂Triton X-100对牛奶进行破乳, 以非离子表面活性剂聚乙二醇600(PEG 600)为萃取剂, 研究牛奶中三聚氰胺的萃取行为. 破乳的最佳条件: Triton X-100的质量浓度为20 g/L, CC13COOH的质量浓度为20 g/L, 100℃水浴加热10 min; CPE方法的最佳条件: PEG 600的质量浓度为130 g/L, Na₂CO₃和Na₂SO₄的质量浓度分别为5 g/L和260 g/L, 平衡温度70℃, 平衡时间30 min. 在优化的实验条件下, 牛奶样品的加标回收率为80%~98%, 相对标准偏差为1.2%~5.7%, 检出限为0.9 mg/kg. 该方法简便、快速、灵敏度高、污染少.

10. 期刊论文 [邓斌](#), [邓春来](#), [张曦](#) [高效液相色谱法检测牛奶中青霉素残留的研究进展](#) -[中国兽药杂志](#)2003, 37(6)

本文综述了高效液相色谱法检测牛奶中青霉素残留量的研究进展情况, 包括样品的提取、层析柱净化、衍生化及青霉素类药物残留的分离和检测等方面.

引证文献(2条)

1. [周虹](#), [秦立强](#), [王燕](#), [王培玉](#) [改良奶牛与传统蒙古黄牛的牛奶中雌激素和孕激素含量的比较](#)[期刊论文]-[中华预防](#)

[医学杂志](#) 2009(6)

2. [周虹](#), [王燕](#), [王培玉](#) [市场牛奶和传统牛奶对乳腺癌发生影响的研究](#)[期刊论文]-[中华肿瘤防治杂志](#) 2008(20)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwsjyzz200706085.aspx

授权使用: 新疆石河子大学图书馆(wfxjshz), 授权号: d3774ef3-79e0-426a-8fba-9dce015fcf1b

下载时间: 2010年8月10日