

核桃仁内种皮中缩合单宁多聚体的分离 及其抗氧化活性分析

崔茂凯^{1,2}, 黄海涛³, 李庆杨¹, 沈丹玉¹, 肖鹏飞³, 刘毅华¹

(1. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 杭州 311400; 2. 南京林业大学 风景园林学院, 南京 210037;
3. 浙江农林大学 暨阳学院 生物与环境学院, 浙江 绍兴 312000)

摘要:为给核桃资源的高值化利用提供参考,以核桃仁内种皮为原料,通过70%甲醇溶液(含0.5%冰乙酸)萃取,Sephadex LH-20葡聚糖凝胶层析柱分离,经不同体积分数的甲醇溶液梯度洗脱得到13个核桃仁内种皮缩合单宁多聚体分离物(F1~F13),以V_c为标样,对这13个分离物的体外抗氧化活性进行分析。结果表明:采用甲醇溶液(体积分数40%~75%)梯度洗脱方法可从核桃仁内种皮中分离出缩合单宁二聚体(DP2)至七聚体(DP7);DP2和缩合单宁三聚体(DP3)的洗脱甲醇溶液体积分数在40%~60%,缩合单宁四聚体(DP4)和其他3种高聚体的洗脱甲醇溶液体积分数在60%~75%;优化洗脱操作后DP2和DP3可被高效分离,DP2洗脱率超过80%,其中F2、F3和F4中得到DP2,总含量超过1.40 mg/g,F5和F6中得到DP3,含量分别为0.66 mg/g和0.59 mg/g;F1~F13都具有良好的抗氧化活性,其中以DP2为主的F4抗氧化活性最高,铁离子还原能力(FRAP)和DPPH自由基清除能力分别为(17.22±0.68) mg/g和(24.36±0.73) mg/g。综上,采用梯度洗脱方法可实现缩合单宁多聚体的洗脱分离,可从核桃仁内种皮中分离出DP2和DP3。

关键词:核桃;内种皮;缩合单宁;多聚体;抗氧化活性

中图分类号:TS222+.1;TS229 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2025)04-0060-05

Isolation and antioxidant activity analysis of condensed tannin polymers in walnut pellicle

CUI Maokai^{1,2}, HUANG Haitao³, LI Qingyang¹, SHEN Danyu¹,
XIAO Pengfei³, LIU Yihua¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, China; 2. School of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3. School of Biology and Environment, Jiyang College of Zhejiang Agriculture and Forestry University, Shaoxing 312000, Zhejiang, China)

Abstract: To provide a reference for the high-value utilization of walnut resources, walnut pellicle was used as raw material and extracted with a 70% methanol solution (containing 0.5% acetic acid). The extract was separated with a Sephadex LH-20 dextran gel column and subjected to gradient elution with different volume fractions of methanol solution to obtain 13 fractions of condensed tannin polymers (F1 -

F13). The *in vitro* antioxidant activity of these 13 fractions were analyzed using vitamin C as the standard sample. The results indicated that the gradient elution method with methanol solution (volume fraction 40% - 75%) could successfully separate condensed tannin dimers (DP2) to heptamers (DP7) from walnut pellicle. The

收稿日期:2023-11-20;修回日期:2024-10-18

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(CAFYBB2019QD002)

作者简介:崔茂凯(1999),男,在读硕士,研究方向为食用林产品次生代谢产物及功能研究(E-mail) m18909189109@163.com。

通信作者:刘毅华,研究员(E-mail) liuyh@caf.ac.cn。

elution volume fractions for condensed DP2 and trimers (DP3) ranged from 40% to 60%, while the elution volume fractions for tetramers (DP4) and three other higher polymers were between 60% and 75%. After optimizing the elution process, efficient separation of DP2 and DP3 was achieved, with the elution rate of DP2 exceeding 80%. DP2 was isolated from elution fractions F2, F3, and F4, with a total content exceeding 1.40 mg/g, while DP3 was obtained from fractions F5 and F6, with contents of 0.66 mg/g and 0.59 mg/g, respectively. All fractions exhibited good antioxidant activity, with F4, primarily containing DP2, showing the highest antioxidant activity, measured by ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH methods as (17.22 ± 0.68) mg/g and (24.36 ± 0.73) mg/g, respectively. In conclusion, the gradient elution method enables the effective separation of condensed tannin polymers, allowing for the isolation of DP2 and DP3 from walnut pellicle.

Key words: walnut; pellicle; condensed tannins; polymer; antioxidant activity

核桃(*Juglans regia* L.)为胡桃科核桃属植物,是我国重要的油料作物。核桃富含多酚物质,且主要集中在内种皮中^[1],核桃仁内种皮的总酚含量(115.25 ~ 338.33 mg/g,以没食子酸当量计)是带皮核桃仁总酚含量(11.31 ~ 28.92 mg/g)的 7.3 ~ 25.1 倍^[2]。然而核桃仁内种皮有涩味,且干燥过程中伴随褐变现象,颜色加深,在食品加工过程中常作为生产废弃物,利用率不高。研究发现,缩合单宁是核桃仁内种皮具有涩味的主要原因^[3]。缩合单宁(也称原花青素)是黄烷醇单体缩合形成的多聚合物,该多聚合物是由不同数量的儿茶素或表儿茶素等单体酚缩合成的二聚体(DP2)、三聚体(DP3)等直至十聚体(DP10),具有抗氧化、抗辐射、调节血糖、抗癌等优良的生物活性^[4]。研究核桃仁内种皮缩合单宁多聚体的高效提取与分离方法,对于核桃产业高值化开发利用具有至关重要的意义。

目前,已有关于从可可、葡萄、蓝莓等水果中提取缩合单宁多聚体的报道^[5]。缩合单宁分离提取方法有柱层析法、高效液相色谱法(HPLC)、高速逆流色谱法等^[6],其中以 Sephadex LH-20 为主的葡聚糖凝胶柱层析技术因工艺简单且分离高效成为分离缩合单宁多聚体的主要方法之一,且在野樱莓^[7]和贯叶连翘^[8]等农林产品中已有研究。但 Luca 等^[9]指出, Sephadex LH-20 凝胶层析柱用于不同植物或原料的分离洗脱操作时其所得缩合单宁聚合度存在较大差异。目前, Sephadex LH-20 凝胶层析柱在核桃仁内种皮缩合单宁多聚体分离研究中鲜有报道。因此,本研究建立一种基于 Sephadex LH-20 凝胶层析柱分离核桃仁内种皮缩合单宁多聚体的方法,并测定单宁多聚体分离物的抗氧化活性,以为核桃育种、培育以及高值化利用开发提供科学

依据,也为其他果实中缩合单宁的分离制备提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

‘辽核 1 号’脱青皮后新鲜核桃仁,辽宁省大连市核桃种质资源圃提供;乙腈、丙酮,美国 Fisher 公司;葡聚糖凝胶,美国 GE 公司;1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH 自由基),上海阿拉丁试剂公司;2,4,6-三吡啶基-1,3,5-三嗪,麦克林生化科技有限公司;冰乙酸、甲醇、FeCl₃等,国药集团化学试剂有限公司;缩合单宁标准品($\geq 98\%$,包含 DP2 ~ DP10 的多聚体),中国林业科学研究院林产化工研究所;原花青素 B2 标准品($\geq 98\%$),上海源叶生物科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

台式超声波清洗器,江苏昆山市超声仪器有限公司;Milli-Q 型纯水仪,美国 Millipore 公司;723N 可见分光光度计,上海精科仪器有限公司;Biofuge Stratos 高速冷冻离心机,美国 Thermo 公司;Waters E2695 高效液相色谱仪,美国 Waters 科技有限公司;SB-5200 DTD 大功率超声波水浴,宁波新芝生物科技有限公司;IKA T18 均质仪,艾卡(广州)仪器设备有限公司;Sephadex LH-20 凝胶层析柱(1 cm × 15 cm,填充葡聚糖凝胶),自制。

1.2 实验方法

1.2.1 核桃仁内种皮缩合单宁的提取

取一定量新鲜核桃仁,置于液氮中浸泡 1 min,用镊子撕取内种皮并将其均质成粉末。称取 1 g 内种皮粉末于 50 mL 离心管中,加入 15 mL 体积分数 70% 的甲醇溶液(含 0.5% 冰乙酸),均质 20 s,在超声(频率 40 kHz,功率 360 W)水浴(温度不高于

40 ℃) 条件下提取 30 min, 以 8 000 r/min 离心 5 min, 取上层提取液, 重复提取 3 次, 将提取液合并后旋转蒸发至干, 即得缩合单宁粗提物。

1.2.2 缩合单宁多聚体的分离

采用柱层析法(Sephadex LH-20 凝胶层析柱) 分离缩合单宁多聚体。将缩合单宁粗提物溶解于甲醇中, 配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的缩合单宁粗提液, 以 1 mL/min 流速上样吸附, 吸附平衡后水洗至流出物无浑浊, 然后用一定体积分数的甲醇溶液进行洗脱, 收集洗脱液, 旋蒸至干, 得到缩合单宁多聚体分离物。

1.2.3 缩合单宁多聚体的测定

采用 HPLC 测定缩合单宁多聚体的含量。将待测物用甲醇溶解定容后, 过 0.45 μm 有机滤膜, 待 HPLC 分析。HPLC 条件: Phenomenex 200 Å Luna HILIC 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 3 μm); 流动相 A 为乙腈-乙酸溶液(体积比 98:2), 流动相 B 为甲醇-水-乙酸溶液(体积比 95:3:2); 梯度洗脱程序为 0~25 min 100% A, 25~30 min 55% A, 30~34 min 100% A; 流速 1 mL/min; 进样量 5 μL; 检测波长 316 nm; 柱温 30 ℃。以缩合单宁标准品(DP2~DP10) 的保留时间进行定性, 以原花青素 B2 标准品标准曲线进行定量, 结果以原花青素 B2 当量表示。

1.2.4 抗氧化活性测定

参考 Wu^[10]、张华^[11] 等方法, 以 V_c 为标样, 分别测定样品的 DPPH 自由基清除能力和铁离子还原能力(FRAP), 结果以 V_c 当量表示。每个样品重复测定 3 次。

1.2.5 数据分析

实验数据经 Microsoft Excel 2019 进行整理和初步分析, 采用 SPSS 23.0 进行显著性分析, 采用 Origin 2019 软件制图。

2 结果与讨论

2.1 核桃仁内种皮缩合单宁多聚体分离上样量的优化

在柱层析分离时, 增加上样量, 可降低生产成本, 然而, 过大的上样量会导致分离效率降低, 增加样品在层析柱中残留, 增加重生成本。按 1.2.2 方法, 在上样量为 0.5、1.0、1.5、2.0 mL 时, 采用体积分数 40%~100% 的甲醇溶液进行梯度洗脱(每 10% 为一个梯度), 每个梯度洗脱剂用量为 5BV, 收集每个梯度下的洗脱液, 旋转蒸发后测定其缩合单宁多聚体含量, 以此考察上样量对缩合单宁多聚体含量的影响, 结果如图 1 所示。

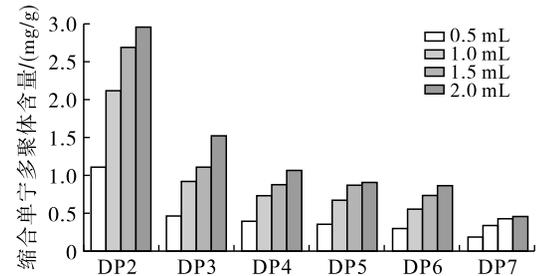


图 1 上样量对核桃仁内种皮缩合单宁多聚体含量的影响

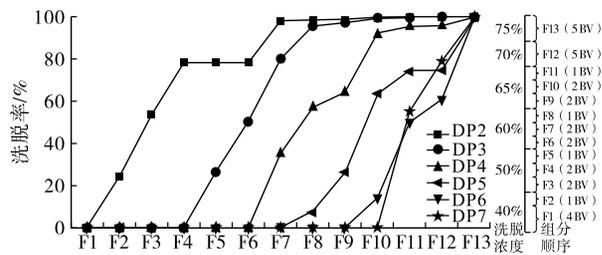
Fig. 1 Effect of loading amount on condensed tannin polymers content of walnut pellicle

由图 1 可知, 增加样品的上样量可显著提高核桃仁缩合单宁多聚体的含量, 在上样量为 1.0、1.5、2.0 mL 时, 6 种多聚体(DP2~DP7) 的总含量分别是 0.5 mL 上样量时的 1.84、2.35、2.75 倍。但随着上样量的增加, 6 种多聚体含量的增长率呈先升后降的趋势, 最大增长率均出现在上样量为 1.0 mL 时, 此时 6 种多聚体含量的增长率在 75%~92% 之间。另外, 实验结束后观察到不同上样量 Sephadex LH-20 凝胶层析柱中色素残留程度为 2.0 mL > 1.5 mL > 1.0 mL > 0.5 mL, 说明 4 种上样量在层析柱中都有残留成分, 但 1.0 mL 上样量的残留程度仅高于 0.5 mL 上样量的。综合比较, 选择最佳上样量为 1.0 mL。

2.2 洗脱操作对核桃仁内种皮缩合单宁多聚体分离的影响

在上样量为 1.0 mL 的条件下, 预实验采用体积分数 50%~90% 的甲醇溶液进行梯度洗脱(每 10% 为一个梯度), 每个梯度洗脱剂用量 5BV, 结果发现, 随着甲醇体积分数的增加, 依次洗脱出 6 种缩合单宁多聚体, 即 DP2、DP3、DP4、DP5、DP6 和 DP7, 其中, 50%~60% 甲醇溶液洗脱出 DP2 和 DP3, 60%~70% 甲醇溶液洗脱出 DP4 和 DP5, 70%~80% 甲醇溶液洗脱出 DP6 和 DP7, 90% 甲醇溶液未洗脱出任何多聚体, 说明采用不同体积分数甲醇溶液梯度洗脱可洗脱出不同聚合度类型的缩合单宁多聚体。值得注意的是, 该洗脱条件下各多聚体之间的分离效果较差。研究表明, Sephadex LH-20 凝胶层析柱分离沙棘和杨梅缩合单宁聚合物时, 细化洗脱剂浓度, 能够得到分离效果更佳的多聚体组分^[12-13]。为此, 本研究对洗脱操作进一步优化, 按 1.2.2 方法采用甲醇溶液梯度洗脱, 其中 40%~60% 甲醇溶液(每 10% 为一个梯度), 每个梯度平均分 5 次添加 5BV 洗脱剂, 65%~75% 甲醇溶液(每 5% 为一个梯度), 每个梯度平均分 5 次添加 5BV 洗脱剂, 再根据预实验中所得 30 瓶洗脱液中多聚体组成类似的合

并原则对洗脱液进行合并(合并方式见图 2),旋蒸至干后得到 13 个缩合单宁多聚体分离物(F1 ~ F13)。以缩合单宁多聚体分离物为横坐标,不同缩合单宁多聚体的洗脱率(该分离物中含有的单宁多聚体的质量与所有分离物中该单宁多聚体的质量之比)为纵坐标,绘制洗脱曲线,结果如图 2 所示。



注:F1 中为单聚体(DP1)

Note: F1 is a monomer (DP1)

图 2 优化洗脱操作所得核桃仁内种皮缩合单宁多聚体洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of condensed tannin polymers of walnut pellicle obtained by optimized elution operation

由图 2 可知,优化洗脱操作后可实现 DP2 和 DP3 的高效分离,DP2 洗脱率超过 80%。其中:F2、F3 和 F4 中为 DP2,总含量超过 1.40 mg/g;F5 和 F6 中为 DP3,含量分别为 0.66 mg/g 和 0.59 mg/g;F2 ~ F13 中存在不同聚合度(DP2 ~ DP7)的缩合单宁。缩合单宁多聚体的具体分布为 DP2 在 F2、F3 和 F4 中,DP3 在 F5 和 F6 中,DP4 及以上的多聚体在 F7 ~ F13 中。以葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 为层析柱,用无水乙醇洗脱从黑荆树皮^[14]中分离出 DP2,用体积分数 30% 的甲醇溶液洗脱从蔓越莓^[15]中分离出 DP2,然而上述研究未分离出高聚体缩合单宁,这可能与单一的洗脱浓度有关。在本研究中 F2 ~ F6 的洗脱浓度(甲醇溶液体积分数)范围为 40% ~ 60%,F7 ~ F13 的洗脱浓度范围为 60% ~ 75%,表明核桃仁内种皮缩合单宁 DP2 和 DP3 的适宜洗脱浓度在 40% ~ 60%,DP4 及以上高聚体的适宜洗脱浓度在 60% ~ 75%。而且近些年有研究证实缩合单宁低聚物可以穿过上皮 Caco-2 细胞单层被人体吸收,而聚合度 4 以上的高聚体则因较大的空间位阻限制了酚羟基活性使得其难以被人体吸收^[16],因此采用合适的梯度洗脱方法得到的不同聚合度缩合单宁可以有不同的利用方向。

研究发现,美国山核桃^[17]中 DP2 是缩合单宁主要的聚合度类型,其 DP2 相对含量超过 56.6%,而中国山核桃中 DP3 含量更多^[18]。本研究发现,DP2

是核桃仁内种皮中含量最多的缩合单宁多聚体类型。

2.3 核桃仁内种皮缩合单宁多聚体分离物的体外抗氧化活性

核桃仁内种皮缩合单宁多聚体分离物(F1 ~ F13)的体外抗氧化活性如表 1 所示。

表 1 核桃仁内种皮缩合单宁多聚体分离物的体外抗氧化活性
Table 1 *In vitro* antioxidant activity of condensed tannins polymers isolated from walnut pellicle mg/g

样品	FRAP	DPPH 自由基清除能力
F1	13.99 ± 0.69	14.67 ± 0.73
F2	2.44 ± 0.12	2.68 ± 0.13
F3	4.08 ± 0.32	7.77 ± 0.23
F4	17.22 ± 0.68	24.36 ± 0.73
F5	8.78 ± 0.35	15.11 ± 0.45
F6	4.08 ± 0.16	5.48 ± 0.16
F7	3.63 ± 0.15	5.55 ± 0.16
F8	2.03 ± 0.08	5.00 ± 0.15
F9	4.57 ± 0.18	10.36 ± 0.31
F10	8.05 ± 0.32	12.68 ± 0.38
F11	7.81 ± 0.31	9.82 ± 0.29
F12	10.01 ± 0.40	17.31 ± 0.52
F13	4.77 ± 0.16	6.01 ± 0.18

由表 1 可知,F2 ~ F13 均具有抗氧化活性,值得注意的是,F1 也具有一定的抗氧化活性。F1 是单聚体(DP1),现有的研究已经证实核桃等坚果中存在的 DP1 具有良好的抗氧化活性^[19-20]。在 F1 ~ F13 中,F4 的抗氧化活性最高,比 F1 的抗氧化活性分别高 23.08% (FRAP) 和 66.05% (DPPH 自由基清除能力),F4 中主要以 DP2 为主,含量为 1.66 mg/g,表明 DP2 在抗氧化方面可能更具有潜力。而 F13 中尽管未检出 DP2 ~ DP7,按照聚合度依次洗脱的顺序我们推测其中可能含有聚合度不小于 8 的多聚体混合物,因此导致 F13 也表现出较好的抗氧化活性,但这需要合适的高聚体标准品进行进一步验证。

3 结论

本研究借助 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶层析柱用甲醇溶液(体积分数 40% ~ 75%)梯度洗脱方法从核桃仁内种皮中分离出 13 个缩合单宁多聚体分离物(F1 ~ F13)。初步探明 DP2 和 DP3 2 种低聚体的洗脱浓度在 40% ~ 60%,DP4 及以上高聚体的洗脱浓度在 60% ~ 75%。DP2 主要存在于 F2、F3 和 F4 中,而 DP3 主要存在于 F5 和 F6 中,通过优化洗脱操作实现了 DP2 和 DP3 的有效分离。13 个缩合单宁多聚体分离物都具有良好的抗氧化活性,其

中以 DP2 为主的 F4 的抗氧化活性最高, FRAP 和 DPPH 自由基清除能力分别为 $(17.22 \pm 0.68) \text{ mg/g}$ 和 $(24.36 \pm 0.73) \text{ mg/g}$ 。综上, 采用梯度洗脱方法可实现缩合单宁多聚体的洗脱分离, 可从核桃仁内种皮中分离出 DP2 和 DP3。

参考文献:

- [1] WU S, MO R, WANG R, et al. Identification of key antioxidants of free, esterified, and bound phenolics in walnut kernel and skin[J/OL]. *Foods*, 2023, 12(4): 825 [2023 - 11 - 20]. <https://doi.org/10.3390/foods12040825>.
- [2] TRANDAFIR I, COSMULESCU S, BOTU M, et al. Antioxidant activity, and phenolic and mineral contents of the walnut kernel (*Juglans regia* L.) as a function of the pellicle color[J]. *Fruits*, 2016, 71(3): 177 - 184.
- [3] 刘雨霞, 田鑫, 杨笑, 等. 不同核桃品种内种皮苦涩味物质差异分析[J]. *果树学报*, 2021, 38(2): 222 - 230.
- [4] QI Q Q, CHU M J, YU X T, et al. Anthocyanins and proanthocyanidins: Chemical structures, food sources, bioactivities, and product development[J]. *Food Rev Int*, 2022(2): 4581 - 4609.
- [5] NIE F, LIU L, CUI J, et al. Oligomeric proanthocyanidins: An updated review of their natural sources, synthesis, and potentials[J/OL]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(5): 1004 [2023 - 11 - 20]. <https://doi.org/10.3390/antiox12051004>.
- [6] ZHAO Y, JIANG C, LU J, et al. Research progress of proanthocyanidins and anthocyanidins[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(6): 2552 - 2577.
- [7] CHEN L M, CHENW X, LI D M, et al. Anthocyanin and proanthocyanidin from *Aronia melanocarpa* (Michx.) Ell.: Purification, fractionation, and enzyme inhibition [J]. *Food Sci Nutr*, 2023, 11(7): 3911 - 3922.
- [8] HELLENBRAND N, LECHTENBERG M, PETEREIT F, et al. Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in the aerial parts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) [J]. *Planta Med*, 2015, 81(12/13): 1175 - 1181.
- [9] LUCA S V, BUJOR A, MIRON A, et al. Preparative separation and bioactivity of oligomeric proanthocyanidins [J]. *Phytochem Rev*, 2020, 19(5): 1093 - 1140.
- [10] WU S, SHEN D, WANG R, et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of free, esterified and bound phenolic compounds in walnut kernel[J/OL]. *Food Chem*, 2021, 350: 129217 [2023 - 11 - 20]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129217>.
- [11] 张华, 周志钦, 席万鹏. 15 种柑橘果实主要酚类物质的体外抗氧化活性比较 [J]. *食品科学*, 2015, 36(11): 64 - 70.
- [12] FAN J L, DING X L, GU W Y. Radical - scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed [J]. *Food Chem*, 2007, 102(1): 168 - 177.
- [13] FU Y, QIAO L, CAO Y, et al. Structural elucidation and antioxidant activities of proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96162 [2023 - 11 - 20]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096162>.
- [14] 周蒙, 刘功骏, 何凌霄, 等. 黑荆树原花色素二聚体的分离制备及抗氧化活性研究[J]. *林产化学与工业*, 2017, 37(2): 135 - 140.
- [15] 李唯. A 型低聚原花青素的检测、转化研究及应用 [D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2022.
- [16] 白欢欢, 刘睿杰, 王珊珊, 等. 不同纯度花生红衣原花青素的制备工艺研究[J]. *中国油脂*, 2017, 42(7): 74 - 78, 83.
- [17] ROBBINS K S, MA Y, WELLS M L, et al. Separation and characterization of phenolic compounds from U. S. pecans by liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(19): 4332 - 4341.
- [18] GONG Y, PEGGEGG R B. Separation of ellagitannin - rich phenolics from US pecans and Chinese hickory nuts using fused - core HPLC columns and their characterization[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(28): 5810 - 5820.
- [19] GRZESIK M, NAPARŁO K, BARTOSZ G, et al. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants [J]. *Food Chem*, 2018, 241: 480 - 492.
- [20] 杜伊晗, 王书语, 向燕, 等. 核桃内源性多酚的体外抗氧化能力及对核桃油氧化稳定性的影响 [J]. *中国油脂*, 2024, 49(5): 88 - 94, 143.