

文章编号 :1673-1689(2007)01-0100-06

非水相酶促酯交换法合成抗坏血酸脂肪酸酯

袁红玲, 汤鲁宏, 陶文沂

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 研究了一种 L-抗坏血酸脂肪酸酯(AFAE)合成新途径。实验结果表明, 氢化棕榈油、大豆油和海狗油等食用油脂作为脂肪酸基团供体, 在固定化脂肪酶的催化下, 在有机溶剂中与 L-抗坏血酸直接进行酯交换反应形成 L-抗坏血酸脂肪酸酯。对反应介质体系的筛选发现, 在叔戊醇中用 Novozym435 催化此反应所得的产物浓度最高。对影响合成抗坏血酸脂肪酸酯的因素进行了探讨, 确定了最适反应条件: 初始油脂底物浓度为 200 ~ 600 mmol/L, 温度为 55 °C, 反应时间为 9 h。此条件下产物质量浓度可达 43.51 g/L。

关键词: 抗坏血酸脂肪酸酯; 酶法合成; 脂肪酶; 有机溶剂

中图分类号: R 977.23

文献标识码: A

Enzymatic Synthesis of L-Ascorbyl Fatty Acid Esters via Transesterification of Oil and L-Ascorbic Acid in Organic Media

YUAN Hong-ling, TANG Lu-hong, TAO Wen-yi

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A novel route for synthesis of L-ascorbyl fatty acid esters (AFAE) was investigated. The experiment results show that edible oils such as hardened palm oil, soybean oil and Namibian seal's oil can be used as the donor of fatty acid acyl group to synthesize the AFAE via transesterification with L-ascorbic acid in organic media catalyzed by immobilized lipase. Through screening of reaction media and lipase, it was found that the highest product concentration could be achieved by Novozym435 in tert-amyl alcohol. The influence of substrate concentration, reaction time etc. on the synthesis of L-ascorbic acid esters were also investigated and the reaction conditions were optimized. For hardened palm oil, the optimum reaction conditions were as follow: reaction time 9 hours under 55 °C with the initial concentration of oil 200 ~ 600 mmol/L. By combinational of optimal reaction conditions, the product concentration could be achieved at 43.51 g/L.

Key words: ascorbyl fatty acid esters (AFAE); enzymatic synthesis; lipase; organic solvents

L-抗坏血酸脂肪酸酯(L-Ascorbyl Fatty Acid Esters, AFAE 结构见图 1), 包括 L-抗坏血酸月桂酸

收稿日期 2005-12-19.

作者简介: 袁红玲(1980-), 女, 安徽阜阳人, 微生物与生物制药硕士研究生.

责任作者: 汤鲁宏(1960-), 男, 江苏南京人, 副教授, 工学博士, 主要从事非水相酶促有机合成技术研究.

万方数据 htang@sytu.edu.cn

酯(L-ascorbyl laurate)、L-抗坏血酸豆蔻酸酯(L-ascorbyl myristate)、L-抗坏血酸棕榈酸酯(L-ascorbyl palmitate)以及L-抗坏血酸硬脂酸酯(L-ascorbyl stearate)等,作为维生素C的脂溶性形态,是一种兼具抗肿瘤、抗衰老、抗生物氧化、清除体内自由基等多种功能特性的安全的新型食品添加剂。

由于脂肪酸基团(链长为 $C_{12} \sim C_{18}$ 的饱和脂肪酸的酰基)的植入,使得AFAE既有亲水的抗坏血酸基,又有亲油的脂肪酸基,成为一种表面活性剂。同时,与L-抗坏血酸相比,它们在脂肪中的溶解性和抗氧化性也有了显著的提高,使得它们兼具脂溶性抗氧化剂和食品乳化剂的特性,在食品工业中具有广泛的用途^[1,2]。

此外,作为具有防癌抗癌效果的生物活性物质,AFAE因其脂溶性特征也引起了广泛的关注。因为它们可以轻易穿过细胞膜和血脑屏障^[3],易于被细胞吸收,并累积在细胞内,可以到达维生素C本身所无法到达的组织和器官,保护机体的细胞膜等脂质部分不被氧化,因而具有良好的抗肿瘤、抗衰老等保健功能。Kageyama K等发现它们能强烈地抑制 Ehrlich ascites 癌细胞的DNA的合成,分解癌细胞的细胞膜的磷脂,是较好的抗癌物质^[4]。Naidu等人的研究表明,AFAE可以抑制鼠神经胶质瘤(mouse glioma, C6)和人脑瘤细胞,即抑制神经胶质瘤(glioma, U-373)和神经胶质母细胞瘤(glioblastoma, T98G)细胞和肾癌细胞的增殖^[5-7]。

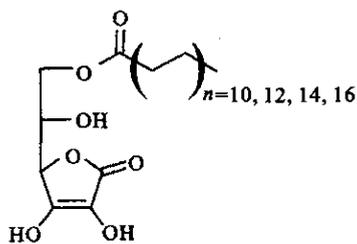


图 1 L-抗坏血酸脂肪酸酯

Fig. 1 The construction of L-ascorbyl fatty acid esters

目前,AFAE已经得到了美国、欧盟、日本等使用许可,以AFAE为有效成分的营养保健品,作为继卵磷脂、深海鱼油之后的新一代保健品已经出现在发达国家的保健品市场。

L-抗坏血酸脂肪酸酯的合成有化学合成^[8,9]和酶法合成^[10]两类方法。其中的化学合成工艺已经实现了工业化生产。目前市售的L-抗坏血酸脂肪酸酯类产品基本是用化学法合成的。然而,L-抗坏血酸脂肪酸酯的化学法合成工艺存在着某些缺陷。该工艺所采用的高温、高压等反应条件及以浓硫酸

为催化剂,不可避免地伴有副反应,产生有毒副作用的产物和非自然的异构体,对L-抗坏血酸的转化率和产物的产率及分离提纯都造成严重影响。此外,该工艺还存在能耗高、对设备要求高、环境污染较为严重等问题。

相比之下,L-抗坏血酸脂肪酸酯的酶法合成工艺是一种更具有发展前途的工艺。该法具有选择性高,副反应少,反应条件温和,L-抗坏血酸的转化率高和产品下游分离操作相对简单,对设备要求不高等优点,符合清洁生产、绿色化工的发展趋势,作为化学合成法的替代方法受到了科技界和工业界的普遍重视,研究异常活跃。汤鲁宏等人^[11,12]对催化合成L-抗坏血酸棕榈酸酯、月桂酸酯的适用反应体系(溶剂与脂肪酶),合成反应的动力学,反应产物的分离提纯工艺等进行了系统的研究,形成了一条L-抗坏血酸脂肪酸酯的非水相酶促合成工艺。形成了5 kg级的中试规模生产工艺,通过了国家科技部的验收。但研究中所采用的脂肪酸基供体原料与化学法相同,仅限于脂肪酸或相应的甲酯、乙酯,而非天然状态的食用油脂(甘油三酯)。以食用油脂为原料,在非水体系中在脂肪酶(lipase E. C. 3.1.1.3)的催化下,通过与L-抗坏血酸之间的酯交换反应进行的L-抗坏血酸脂肪酸酯的合成,在国内外尚未见任何报道。

作者系统地探索了以饱和脂肪酸三甘酯(如氢化棕榈油)、含不饱和脂肪酸的三甘酯(如大豆色拉油)、含多不饱和脂肪酸的三甘酯(如纳米比亚产海狗油)为脂肪酸基团供体,通过跟L-抗坏血酸之间的非水相酶促酯交换反应合成L-抗坏血酸脂肪酸酯的可能性,并获得了成功。选择了合适的反应体系,评价了底物浓度、反应时间等因素对L-抗坏血酸脂肪酸酯的非水相酶促酯合成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 脂肪酶 脂肪酶 Novozym435 :7 000 PLU/g,Novo Nordisk 公司赠送。

1.1.2 化学试剂 氢化棕榈油:东海粮油公司赠送;大豆油:上海嘉里粮油有限公司产品;海狗油:纳米比亚大学赠送;L-抗坏血酸、叔戊醇、丙酮等试剂均为国产分析纯。

1.1.3 实验仪器 HZS2H 水浴振荡器:哈尔滨市东联电子技术开发有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 L-抗坏血酸脂肪酸酯产物的定性定量分析

产物生成的定性检测采用 2,6-二氯酚酞荧光薄层层析法^[12]。产物浓度的定量测定采用碘滴定法^[13]。

1.2.2 探索试验 在 100 mL 的具塞三角瓶中,分别加入 5 g 氢化棕榈油、大豆油或海狗油,然后加入 50 mL 叔戊醇 0.25 g 脂肪酶及过量的 L-抗坏血酸,55 °C,常压下,置于水浴振荡器上在 200 r/min 速度下旋转振荡反应 3 h 后取样进行薄层层析分析。展开剂为 V(氯仿):V(甲醇):V(冰醋酸):V(水)=(80:10:8:2);展开后用质量分数 1% 的 2,6-二氯酚酞乙醇溶液显色。喷涂显色剂后的薄板置于 105 °C 下加热 7 min。取出后,立即于白色斑点处滴加液体石蜡的己烷溶液保护,置于 365 nm 波长的紫外光下观察黄色荧光。

1.2.3 最佳反应介质的筛选 在 100 mL 的具塞三角瓶中,分别加入 0.21 g L-抗坏血酸和 20 mL 氢化棕榈油、大豆油或海狗油或相应的叔戊醇或丙酮溶液(0.1 mol/L),再按脂肪质量的 5% 添加脂肪酶,55 °C,常压下,置于水浴振荡器上在 200 r/min 速度下旋转振荡反应 3 h 后取样进行定量测定。

1.2.4 反应时间对 L-抗坏血酸脂肪酸酯合成反应的影响 在 100 mL 的具塞三角瓶中,分别加入 0.21 g L-抗坏血酸和 20 mL 0.1 mol/L 的氢化棕榈油、大豆油或海狗油的叔戊醇溶液,再按脂肪质量的 5% 添加脂肪酶,55 °C,常压下,置于水浴振荡器上在 200 r/min 速度下旋转振荡反应,自反应开始后的第 30 分钟起,按照一定的时间间隔取样进行定量测定。

1.2.5 底物浓度对 L-抗坏血酸脂肪酸酯合成反应的影响 在 100 mL 的具塞三角瓶中,分别加入 25 mL 不同浓度(20、40、60、100、200、400、600、800 和 1000 mmol/L)的氢化棕榈油、大豆油或海狗油的叔戊醇溶液,再加入过量 L-抗坏血酸并按脂肪质量的 5% 添加脂肪酶,55 °C,常压下,置于水浴振荡器上在 200 r/min 速度下旋转振荡反应 9 h 后取样进行定量测定。

1.2.6 反应溶剂与酶催化剂的循环使用试验 在 1 000 mL 的圆底烧瓶中,加入 600 mL 0.1 mol/L 氢化棕榈油的叔戊醇溶液 20 g L-抗坏血酸 5 g 脂肪酶,置于 55 °C 水浴中,常压 200 r/min 速度下搅拌反应 9 h 后将反应混合物倾出,而将固定化脂肪酶保留在反应容器中。反应混合物取样进行定量测定后,负压浓缩回收反应介质叔戊醇。回收的叔戊醇经添加新鲜叔戊醇和氢化棕榈油,构成下一个批次的反应溶液,连同留在反应容器中的固定化酶和

适量补足的 L-抗坏血酸,构成新一轮的反应体系。

2 结果与讨论

2.1 非水相酶促酯交换反应的探索试验

L-抗坏血酸脂肪酸酯可在非水体系中,在脂肪酶的催化下,按照图 2 所示的方式,通过 L-抗坏血酸跟脂肪酸之间的酯化反应,或 L-抗坏血酸跟脂肪酸的甲酯、乙酯之间的酯交换反应进行合成,这已为国内外许多研究者的工作所证实。

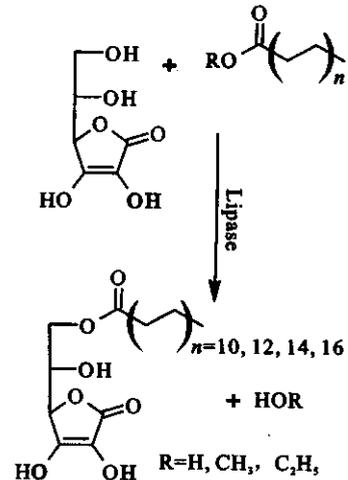


图 2 L-抗坏血酸与脂肪酸或其甲酯、乙酯反应合成 L-抗坏血酸脂肪酸酯的方程式

Fig. 2 Synthesis of L-ascorbyl fatty acid esters by transesterification of L-ascorbic acid and fatty acid or their corresponding methyl (ethyl) esters

作者认为将该合成反应中的脂肪酸基供体(如图 3 所示)由脂肪酸或其甲酯、乙酯改为以天然状态存在的甘油三酯(食用油脂)时,该合成反应或许仍然可以进行。在已有工作的基础上,参照相关合成的反应条件,选择氢化棕榈油、大豆油和海狗油分别作为饱和甘油三酯、含不饱和脂肪酸的甘油三酯和含多不饱和脂肪酸的甘油三酯的代表,尝试进行了以甘油三酯和 L-抗坏血酸为反应物进行非水相酶促酯交换反应合成的试验。

试验结果表明,氢化棕榈油、大豆油和海狗油均可作为脂肪酸基供体跟 L-抗坏血酸进行酯交换反应,生成 L-抗坏血酸脂肪酸酯。55 °C,常压,200 r/min 速度下旋转振荡反应 3 h 后的反应混合物经薄层层析分析,均观察到了代表产物生成的双黄色荧光斑点。如图 4 所示,基线附近的黄色荧光斑点是由溶解于反应体系中但未发生反应的 L-抗坏血酸所形成(因缺乏脂溶性,L-抗坏血酸在该展开体系中基本保持不动),而位于薄板中部的黄色荧光斑点则是由反应生成的 L-抗坏血酸脂肪酸酯所形成(没有酯的生成不会有该斑点出现)。

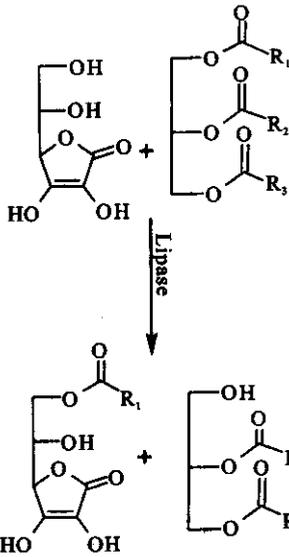


图 3 L-抗坏血酸与甘油三酯反应合成 L-抗坏血酸脂肪酸酯的方程式

Fig. 3 Synthesis of L-ascorbyl fatty acid esters by transesterification of L-ascorbic acid and triglycerides

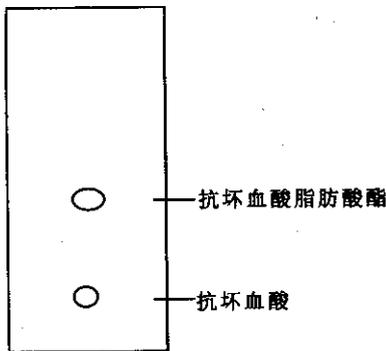


图 4 L-抗坏血酸与其脂肪酸酯的薄层层析分析

Fig. 4 TLC analysis of the L-Ascorbyl Acid and L-Ascorbyl Fatty Acid Esters

2.2 最佳反应介质的筛选

在探索性试验得出肯定结论的基础上,作者对以氢化棕榈油、大豆油和海狗油为脂肪酸基供体跟 L-抗坏血酸进行酯交换反应合成 L-抗坏血酸脂肪酸酯的反应介质进行了筛选,试验结果见图 5。

在不加任何溶剂的条件下,直接将脂肪酶和 L-抗坏血酸跟氢化棕榈油、大豆油或海狗油加以混合,在本实验所采用的条件(55 °C,常压下,200 r/min 旋转振荡反应 17 h)下,观察不到产物的生成。这跟 L-抗坏血酸在油脂中缺乏溶解性是相一致的。L-抗坏血酸不能溶解到脂肪中,也就无法到达酶的催化活性中心,因而也就不可能有产物生成。为了实现 L-抗坏血酸脂肪酸酯的有效合成,选择对 L-抗坏血酸和脂肪酸基供体(这里是油脂)都具有适度溶解性的反应介质是至关重要的。

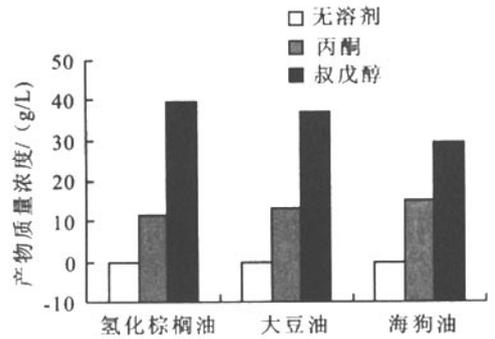


图 5 最佳反应介质的筛选

Fig. 5 The selection of reaction media

在以丙酮和叔戊醇为介质的反应体系中,均观察到了产物的生成,说明丙酮和叔戊醇均可作为反应介质用于以 L-抗坏血酸和油脂为原料的 Novozym435 催化 L-抗坏血酸脂肪酸酯合成中。但叔戊醇作为反应介质对所选用的所有这 3 种油脂而言均优于丙酮,在叔戊醇体系中得到的 L-抗坏血酸脂肪酸酯的质量浓度要比丙酮中的高,因此选择叔戊醇作为后面各项试验的反应介质。关于叔戊醇优于丙酮的原因,可能是酶在这两种溶剂中的相对活性方面的差异造成的,也可能是 L-抗坏血酸在这两种溶剂中的相对溶解性方面的差异造成的,或许是两方面的因素都有,甚至还有更多的因素在起作用,需要通过更为深入的研究才能得出结论。

所选择的 3 种代表性甘油三酯,即氢化棕榈油、大豆油和海狗油,在不同的反应介质中表现出了不同的反应水平。当以丙酮为介质时,产物质量浓度按氢化棕榈油、大豆油、海狗油的顺序逐渐增大,而当以叔戊醇为介质时则相反,产物质量浓度按氢化棕榈油、大豆油、海狗油的顺序逐渐减小。这个结果表明,油脂的类型(饱和、不饱和或多不饱和)对反应是有影响的,并且这种影响还会因反应介质的不同而不同。其中的原因涉及酶对不同长度、不同饱和程度的脂肪酸及甘油三酯中的不同位置的相对活性,以及溶剂对酶的这类相对活性的影响。这是一个有趣的现象,作者将对该现象进行深入研究,以确定酶催化剂、反应介质以及甘油三酯之间的相互影响和关系。

2.3 反应时间对 L-抗坏血酸脂肪酸酯合成反应的影响

在确定了叔戊醇为反应介质之后,对以 3 种代表性油脂为反应物的产物质量浓度随反应时间的变化曲线进行了测定,结果见图 6。

从图 6 可清楚地看出,3 种代表性油脂的产物质量浓度随反应时间的变化曲线基本相似,当反应

时间达到9 h后,反应均趋于平衡,继续延长反应时间均不能有效增加体系中产物的质量浓度。因此,最适反应时间可以定为9 h。3种代表性油脂在整个反应过程中,产物质量浓度为氢化棕榈油 > 大豆油 > 海狗油。实验表明,油脂的脂肪酸组成对最终产物质量浓度有显著影响,油脂中饱和脂肪酸的质量分数越高,最终产物的质量浓度越高。

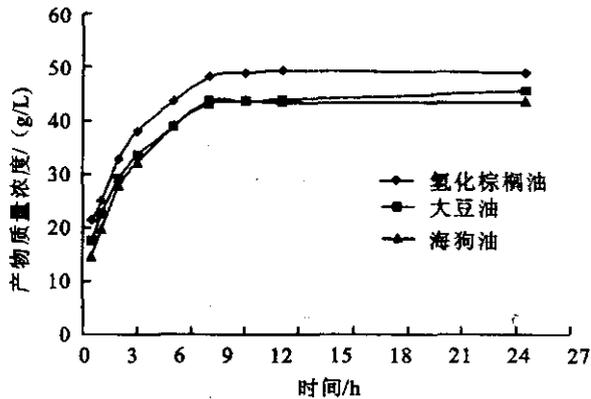


图6 反应时间对产物的影响

Fig. 6 Effect of reaction time on the product yield

2.4 底物浓度对 L-抗坏血酸脂肪酸酯合成反应的影响

由于 L-抗坏血酸微溶于叔戊醇,且反应结束后仍有部分固态 L-抗坏血酸残留在反应体系中,因此 L-抗坏血酸在反应体系中的质量浓度可视为定值。因此,作者所讨论的底物浓度仅指氢化棕榈油、大豆油或海狗油的浓度。以一系列不同的起始底物浓度进行油脂与 L-抗坏血酸的酯交换反应试验,测定了起始底物浓度对最终反应产物质量浓度的影响,实验结果示于图 7。

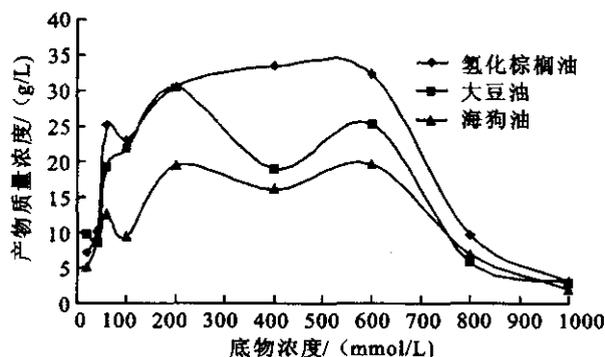


图7 底物浓度对产物质量浓度的影响

Fig. 7 Effect of substrate concentration on the yield for three kinds of oil

由图 7 可知,3 种代表性油脂的最终产物质量浓度在较低的起始底物浓度下,均随起始底物浓度的增加而增加,当起始底物浓度达到 200 mmol/L (相当于 160 ~ 180 g/L) 左右时,出现一个最高底物浓度区间,产量保持到 600 mmol/L (相当于 480 ~

540 g/L) 左右。越过此区间后,再增加初始底物浓度,则最终产物质量浓度将随初始底物浓度的增加而下降。作者认为,这一现象是 L-抗坏血酸的实际有效质量浓度过低造成的。前已述及,为了实现 L-抗坏血酸脂肪酸酯的合成,必须选择适当的反应介质,使反应体系中含有溶解状态的 L-抗坏血酸和油脂。当油脂的初始底物浓度小于 200 mmol/L 时,反应体系中的油脂浓度不断增加而 L-抗坏血酸的浓度没有受到太大影响,因而最终产物质量浓度随油脂浓度的增加而增加,而当油脂的初始底物浓度大于 600 mmol/L 后,过高的油脂浓度造成了反应体系中 L-抗坏血酸质量浓度的急剧下降,因而最终产物的质量浓度便随之下降了。200 ~ 600 mmol/L 为最佳的初始油脂底物浓度。3 种代表性油脂在整个最佳初始底物浓度(200 ~ 600 mmol/L)中,最终产物质量浓度均为氢化棕榈油 > 大豆油 > 海狗油,油脂中饱和脂肪酸的含量越高,最终产物的质量浓度越高。造成这种影响的原因可能和酶对各种脂肪酸的相对反应活性有关,有待采用各种脂肪酸的纯甘油三酯进行该合成反应后才能作出定量的解释。

2.5 反应溶剂与酶催化剂的循环使用试验

固定化酶的使用寿命是决定工业化过程生产成本的一个重要影响因素。作者以氢化棕榈油为底物,对该合成反应中酶的使用寿命做了初步的探讨,进行了一回连续 10 次合成反应的实验,结果见图 8。

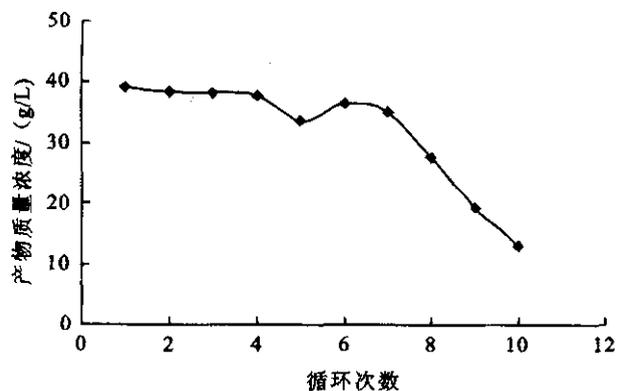


图8 55 °C时酶的循环利用次数

Fig. 8 Effect of enzyme recycling times on product production at 55 °C

从图 8 可知,酶在选定的反应体系和条件下是稳定的,随着时间的延长,反应 7 批次后相对活性逐渐降低,因此延长酶的使用寿命具有非常现实的意义。随反应时间的增加酶的相对活性降低,一方面是由于酶的变性失活引起,另一方面可能是由酶从固定载体上脱落所致。具体哪种因素在酶使用寿命上起主导作用有待于进一步研究。

3 结 论

作者首次以食用油脂(饱和脂肪酸三甘酯(如氢化棕榈油)、含不饱和脂肪酸的三甘酯(如大豆色拉油)、含多不饱和脂肪酸的三甘酯(如纳米比亚产海狗油)为脂肪酸基团的供体,探讨了其跟 L-抗坏血酸经非水相酶促酯交换反应合成 L-抗坏血酸脂肪酸酯的可行性。在此基础上,对氢化棕榈油、大

豆油和海狗油作为脂肪酸基供体跟 L-抗坏血酸进行酯交换反应的介质进行了筛选,发现在叔戊醇中用 Novozym435 催化此反应所得的产物质量浓度最高,同时对影响合成抗坏血酸脂肪酸酯的因素进行了探讨,确定了最适反应条件:初始油脂底物浓度为 200~600 mmol/L,反应时间可以定为 9 h。最佳反应条件下的产物质量浓度最高可达 43.51 g/L。

参考文献(References):

- [1] Nippon Roche K. Antioxidant activity of ascorbic acid and ascorbyl palmitate[J]. *New Food Ind*, 1991, 33(6): 6-13.
- [2] Nippon Roshu K. Antioxidative properties of ascorbyl palmitate[J]. *Jpn Fudo Saiensu*, 1992, 31(9): 22-30.
- [3] Banks W A, Kastin A J. Peptides and blood brain barrier: lipophilicity as predictor of permeability[J]. *Brain Res Bull*, 1985, 15: 287-292.
- [4] Kageyama K. Enhanced inhibition of DNA and release of membrane phosphor-lipids in tumor cells treated with a combination of acylated ascorbate and hyperthermia[J]. *Int J Hyperthermia*, 1991, 7(1): 85-91.
- [5] Naidu A K, Wiranowska M, Kori S H. Inhibition of human glioma cell proliferation and glutathione-S-transferase by ascorbyl esters and interferon[J]. *Anticancer Res*, 1993, 13: 1469-1471.
- [6] Naidu A K, Wiranowska M, Kori S H. Inhibition of cell proliferation and glutathione-S-transferase by ascorbyl esters and interferon in mouse glioma[J]. *J Neuro-Oncol*, 1993, 16: 1-10.
- [7] Makino Y, Sakagami H, Takeda M. Induction of cell death by ascorbic acid derivatives in human renal carcinoma and glioblastoma cell lines[J]. *Anticancer Res*, 1999, 19: 3125-3132.
- [8] Kaymond C. Synthesis of 6-fatty acid esters of L-ascorbic acid[J]. *JAACS*, 1977, 54(8): 308-312.
- [9] 陆豫, 甘利军, 陈葆仁. L-抗坏血酸棕榈酸酯的合成[J]. *精细化工*, 1996, 13(3): 17-18.
Lu Y, Gan L, Chen B. Synthesis of L-Ascorbyl Palmitate[J]. *Fine Chemical Engineering*, 1996, 13(3): 17-18. (in Chinese)
- [10] Humeau. Synthesis of 6-O-Palmitoyl L-Ascorbic acid catalyzed by *Candida antarctica* lipase[J]. *Biotech Lett*, 1995, 17(10): 1091-1094.
- [11] 汤鲁宏, 张浩. 非水相脂肪酶催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯的研究[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(3): 363-366.
Tang L, Zhang H. Synthesis of L-Ascorbyl Palmitate Catalyzed by Lipase on Non-aqueous Media [J]. *Journal of Biochemical Engineering*, 2000, 16(3): 363-366. (in Chinese)
- [12] 汤鲁宏, 张浩, 孙云飞. 薄层扫描法测定 L-抗坏血酸棕榈酸酯[J]. *食品工业科技*, 1999(5): 57-58.
Tang L, Zhang H, Sun Y. Detection of L-Ascorbyl Palmitate by TLC [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 1999, 5: 57-58. (in Chinese)
- [13] 中华人民共和国标准(食品添加剂卷) [M]. 北京: 中国标准出版社, 1996.

(责任编辑 朱明)