

电化学传感技术在医药研究中的应用

刘学仁, 李鑫, 姜涛(湖北省黄冈市食品药品监督管理局, 湖北 黄冈 438000)

摘要: 随着电分析技术的发展, 电化学传感技术越来越成为生命科学、临床诊断和药学研究的重要手段之一。本文主要介绍了电化学传感器、DNA 生物传感器、酶生物传感器、免疫生物传感器的基本概念、原理, 以及各种传感器在生命医学、药学和传统医学领域的研究进展和应用状况。

关键词: 电化学传感器; 生物传感器; 生命医学; 药学

中图分类号: R9-39

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)03-0211-05

Application of Electrochemical Sensor Technology in Medicine Studies

LIU Xueren, LI Xin, JIANG Tao(*Huanggang Institute for the Control of Food and Drug of Hubei, Huanggang 438000, China*)

ABSTRACT: With the development of electrochemical technology, electrochemical sensor technology is increasingly becoming one of important methods in life science, clinical diagnosis and pharmaceutical analysis. This review mainly accounts for the basic conception and principle of electrochemical sensor, DNA biosensor, enzyme biosensor and immunity biosensor. By the way, the advance and the application of those sensors are recommended in the fields of life science, pharmaceutical analysis and traditional Chinese medicine.

KEY WORDS: electrochemical sensor; biosensor; life science; pharmacy

近年来, 随着物理学、材料科学、生物学等学科快速发展, 电化学分析有了很大的进步, 出现了许多新技术, 如电化学生物传感器技术、化学修饰电极、色谱电化学技术、微电极技术、光谱电化学法、电化学免疫分析技术、仿生电化学释放技术等。这些崭新的分析技术目前主要应用于生命科学领域, 如生物、医学、药学等学科的研究中。本文主要介绍电化学传感技术(electrochemical sensor technology)在生命医学和药学等领域中的应用。

电化学传感技术的核心是传感器。传感器能感受(或响应)规定的被测量并按照一定规律转换成可用信号输出的器件或装置。传感器通常由直接响应

于被测量的敏感元件和产生可用信号输出的转换元件以及相应的电子线路所组成, 是将一种信息能转换成可测量信号(一般指电学信号)的器件。传感器可分为物理传感器、化学传感器和生物传感器三大类。

化学传感器是把化学成分、浓度等转换成与之有确切关系的电学量的器件。通常利用某些功能性膜对特定成分的选择作用把被测成分筛选出来, 进而用电化学装置把它变成电学量。可按膜的响应机理、膜的组成和膜的结构进行分类。有离子选择性电极、气敏电极、湿敏电极、涂丝电极、聚合物基质电极、离子敏感场效应管等。

生物传感器是利用某些生物活性物质所具有

作者简介: 刘学仁, 男, 硕士生, 副主任药师

Tel: (0713)8673993

E-mail: lxr8189@sohu.com

的选择识别待测生物化学物质的能力制成的传感器。将生物体的成分(酶、抗原、抗体、激素)或生物体本身(细胞、细胞器、组织)作为敏感元件固定化在一器件上制成的传感器。

电化学生物传感器(electrochemical biosensor)以生物材料作为敏感元件,电极作为转化元件,电势或电流等作为特征检测信号。其中的生物材料包括了酶、抗原、抗体、激素等生物体成分和细胞、细胞器、组织等生物体本身。由于生物材料作为敏感元件使其具有高度选择性,这种传感器已成为一种最直接的生命反应过程检测方法;且控制速度快、灵敏度高和使用简便并且不破坏样品等特点,则又使其特别适用于生物溶液和活体组织中某组分的连续监测。根据所用生物材料的不同,生物电化学传感器可分为酶传感器、免疫传感器、电化学DNA生物传感器以及微生物传感器、动植物组织传感器等,其中,前三者尤其重视,而制备这些传感器并在生物体系中应用则是其研究的中心。

1 电化学传感器(electrochemical sensor)和电化学生物传感器

1.1 电化学传感器

电化学传感器是通过物理或化学(共价键合、吸附、聚合等)手段有目的地将具有功能性(如催化、配合、电色、光电)的物质引入电极表面,赋予电极新的、特定功能的过程,也称为电极的修饰,所得到的电极称为修饰电极。化学修饰电极是利用特殊试剂通过化学、物理方法得到的修饰电极。

电化学传感器可分为以下几个类型。①吸附型:通过吸附方式将修饰物质结合在电极表面得到的修饰电极为吸附型化学修饰电极。可以制备单分子层和多分子层。根据吸附作用力的不同,又可分为平衡吸附型、静电吸附型、LB膜型、SA膜型、涂层型。②共价键合型:在电极的表面通过键合反应把预定功能团接在电极表面而得到的化学修饰电极为共价型化学修饰电极。常用基体电极有碳电极、玻碳电极、金属和金属氧化物电极。③聚合物型:利用聚合反应在电极表面形成修饰膜的电极。制备方式有氧化还原沉积、有机硅烷缩合、等离子聚合、电化学聚合等。④其他类型:无机物修饰电极,如普鲁士蓝修饰电极、粘土修饰电极、沸石修

饰电极、金属及金属氧化物修饰电极。

1.2 电化学生物传感器

电化学生物传感器是生物传感器的一个分支。1968年Updik和Hicks研制出世界上第一支以生物体成分为敏感膜的电化学电极——葡萄糖酶电极,用于检测血清中葡萄糖的含量,从此出现了生物传感器。生物传感器以选择性高、可实现连续、无损监测、操作简便、价格低廉等特点,很快得到了人们的重视。

敏感元件固定化的目的是使其不易脱落,便于与转换器件组装,能反复使用。固定化的方法有吸附法、包埋法、共价交联法等。吸附法是采用物理吸附或离子吸附将生物材料直接结合在不溶性载体上;包埋法是用高聚物(如琼脂、动物胶、骨胶原、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇等)将生物活性材料包埋在高聚物的微小格子中;共价交联法利用含多个官能团的交联剂(如戊二醛、双重联苯胺、异氰酸盐等)使酶分子间以化学结合方式连结起来,形成不溶性网状结构的固相酶的方法。

1.2.1 电化学DNA生物传感器 电化学DNA传感器一般由一个固定DNA片段的电极和用于检测的电话性杂交指示剂构成。在适当条件下,利用两条互补的DNA单链间的特异性相互作用,使电极表面上已知序列的DNA片段(DNA探针)与溶液中的待测序列DNA(靶序列)发生杂交,通过杂交前后电话性指示剂的电化学响应的变化进行测定;或使电极表面的靶序列与溶液中的已标记电化学活性物质的DNA探针杂交来测定靶序列。在电极表面的DNA双螺旋结构形成后,该传感器还可用于检测那些与DNA双链有着特殊亲和力的电话性小分子。

DNA生物传感器的基本原理是检测由DNA探针所提供的分子识别过程,并通过一个换能器将检测结果转化为可识别信号。DNA传感器种类很多,按换能方法分类,主要有光纤荧光法、布儒斯特角反射法、表面等离子共振法、压电共振法、石英晶体微天平法、表面声波法、化学发光法、电位滴定法、阻抗谱法、电容法和伏安法等^[1]。其中基于电化学换能方法的DNA传感器因其体积小、花费低和易微型化等特点而备受人们青睐。

DNA生物传感器的关键性技术主要是两点:

一点是DNA探针在电极上的固定是电化学DNA传感器制备中的关键步骤^[2-3]；另一点是电活性指示剂^[4]。根据与固定DNA之间的关系，电活性杂交指示剂可分为内部和外部指示剂两类。所谓内部电活性指示剂是利用DNA分子中碱基或其他修饰基团的电活性进行检测。外部指示剂是指那些能与DNA单、双链以不同作用方式结合的电活性小分子，大致可分为两类：一类是过渡金属的络合物，主要有Pt, Ru, Co, Fe和Os等金属的络合物；另一类为杂环有机化合物，如乙锭、蒽类、吩噻嗪、吡啶及苯甲基紫罗碱等。

目前，DNA传感器的电化学研究主要集中在：①与酶、免疫传感器结合起来进行研究，以扩大其实用性，进一步拓展DNA传感器的应用范围；②适合于高灵敏度检测的高灵敏度、高选择性杂交指示剂的筛选研究，主要为选用双嵌合剂和三嵌合剂来改进目前使用的单嵌合剂；③寻求单链DNA在电极表面固定化的新方法以优化电极结构；④在临床疾病基因诊断上和药物分析中的应用研究，尤其是抗癌药物在DNA修饰电极上的电化学机理研究，为抗癌药物的筛选提供依据。

1.2.2 酶传感器(enzyme sensor) 酶传感器的反应原理是传感器的敏感膜中包含有固定化的酶，当酶与被测定的无机物质或有机物质反应时，反应产物被传感器响应。目前已经报道的酶传感器有几百种，已经商品化的有十几种，如GOD(葡萄糖氧化酶)电极传感器、尿酸酶电极传感器、胆固醇传感器、L-乳酸单氧化酶电极传感器等。酶传感器应用较少，是因为自然界已经鉴定的2 500多种酶大都不稳定，且难以提纯和固定，使其商品化受到了限制。为此，选择稳定的酶并采用合适的酶固定化方法，以及对相关酶电极反应过程进行研究已成为酶电极研究的重点。

1.2.3 免疫传感器(immunity sensor) 免疫传感器是利用抗体对抗原的结合和识别功能将抗体或抗原与电极组合而成的检测装置。利用抗体和抗原的特效性结合，检测膜上生成抗体和抗原的复合物的电位改变，从而获得不同的响应。目前已经制成的免疫电极有：诊断原发性肝癌的甲胎蛋白(AFP或APF)免疫传感器、测定人血清蛋白(HSA)免疫传感器、胰岛素免疫传感器、诊断早期妊娠

的HCG免疫传感器以及IGG免疫传感器等^[5]。

2 电化学传感技术在生命医学和药学等领域中的应用

2.1 在生命医学领域的研究与应用

电化学传感器应用于生命医学领域。干宁等^[6]将四羧基钌(II)酞菁(RuPc)共价键合到自组装在Au电极表面的巯基丁二胺单分子层上，获得了自组装修饰电极(RuPc-CME)。在pH 3.0~5.5的PBS底液中，该电极对L-半胱氨酸(Hcy)的氧化有催化作用，采用计时安培电流法(CA)测定催化电流与Hcy的浓度在 $5.0 \times 10^{-7} \sim 5.4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内呈良好的线性关系，检出限为 $1.8 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用于检测人血清样品中的Hcy，结果满意。

电化学生物传感器应用于生命医学的研究。魏娜等^[7]基于急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)中PML/RARA(promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor alpha)融合基因的碱基序列，设计了一种新型发夹结构DNA电化学探针，并将此探针固定在玻碳电极表面，采用自行合成的硝基吡啶酮(NAD)作杂交指示剂，应用循环伏安法与差分脉冲伏安法实现了对人工合成的APL PML/RARA融合基因的检测，同时对检测条件进行优化。结果表明，在pH 7.0 Tris-HCl缓冲液中，杂交前后NAD氧化峰电流差值与靶标链浓度在 $2.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内呈良好的线性关系，检出限为 $3.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

核酸适体(aptamer)指的是经过一种新的体外筛选技术——SELEX(指数富集配体系统进化)，从随机单链寡聚核苷酸文库中筛选出来的短的单链寡聚核苷酸。它不仅对目标分子有高特异性和高亲和力，而且具有分子量小、易体外合成与修饰并可以反复变性复性等特性，其在分析化学、基因调控、蛋白质组研究、疾病治疗与新药研发等方面具有广阔的应用前景^[8]。

干宁等^[9]采用TiO₂凝胶包埋葡萄糖氧化酶(GOD/TiO₂)电化学传感器用于纤维素酶(CE)活性测定的研究。其理论依据是基于电极对纤维素水解后生成葡萄糖的催化氧化。穆绍林等^[10]用电化学方法将黄嘌呤氧化酶固定在聚苯胺中制成的聚苯胺黄嘌呤氧化酶电极，具有快速的生物电化学响应和较高的稳定性。

董飒英等^[11]利用酶电极与免疫电极的工作原理,研制用于检测样品中金黄色葡萄球菌肠毒素C₁(SEC₁)含量的生物电化学传感器来进行的检测方法。它克服了竞争法和夹心法中酶标抗原或抗体制备复杂的缺点,利用免疫反应对酶催化活性的调节作用及舟体电极响应电流的变化来达到检测抗原的目的。

袁若等^[12]分别采用聚乙烯缩丁醛(PVB)溶胶、巯基硅烷溶胶-凝胶及明胶固载金属纳米材料及病毒抗体、结合反电荷及自组装技术研制高灵敏电位型传染性乙肝、白喉等免疫传感器。

2.2 在药物研究中的应用

电化学传感器和电化学生物传感器在药物研究领域中有广泛的应用。席会平等^[13]以左氧氟沙星碘化物与碘化铋的分子缔合物为电活性物质,研制了一种左氧氟沙星PVC膜涂层聚乙烯吡咯烷酮膜离子选择性电极法测定左氧氟沙星含量的方法。该电极的Nernst响应范围为 $5.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,斜率为56.5 mV/pC,适用pH范围为2.5~4.0,平均回收率为98.31%~101.6%(RSD为2.80%~4.90%)。该电极法操作简单、响应迅速、重现性好,可用于左氧氟沙星的含量测定。刘平等^[14]利用戊二醛-牛血清白蛋白交联法和海藻酸钠包埋法制成青霉素酶传感器,探索其在测定牛奶中残留青霉素时的最佳实验条件,比较它们的性能,选择出高效、经济、可行的测量方法。

陈坚等^[15]采用三杯法结合光谱分析了解和证明了以石英光纤或光纤光缆传输光信号,荧光分子探针、固相支持剂等组成敏感膜(试剂相),荧光多元猝灭响应原理光纤化学传感器(fiber optic chemical sensors based on multiple quenching, FOCSMQ)在药物分析中对不同分析物响应的原理和机制。张全梅等^[16]采用基于荧光多猝灭原理的多通道光纤化学传感器连续在位监测甲硝唑片的体外溶出度。李新霞等^[17]采用了光纤化学传感器仪器系统,利用利福平与荧光分子探针4-(N,N-二辛基)氨基-7-硝基苯-2-氧-1,3-二氮杂茂(NDB)的可逆响应,基于荧光多元猝灭原理,实时监测利福平胶囊的溶出度。

利用生物传感技术检测中药中的组分与内毒素(LPS)的活性中心Lipid A的结合特性,以Lipid A

为靶点,从传统抗炎中药中筛选具有拮抗LPS的中药^[18];从白藓皮^[19]、黄芩^[20]中提取分离具有拮抗LPS活性的物质。

Zhang等^[21]用碳纳米管修饰电极制成的酶生物传感器技术测定杀虫剂残余,其检测限可达 $10^{-12} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Viswanathan等^[22]用单核苷酸(ssDNA)组装的碳纳米管测定河水样品中的杀虫剂甲基对硫磷和毒死蜱,其线性范围 $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限可达 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,具有良好的重复性和稳定性。Songa等^[23]采用植物辣根过氧化物酶传感器测定除草剂草甘膦的含量,其线性范围为 $0.25 \sim 14.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限 $1.7 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Ca^{2+} 是过氧化酶的激活剂,能催化过氧化氢使其分解为氧气和水。Akyilmaz等^[24]用过氧化物酶电化学传感器测定牛奶和矿泉水中的 Ca^{2+} 含量,线性范围 $1 \sim 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,反应时间约1 min,优化条件为tris-HCl缓冲液(pH7.0)和温度37 °C。Zheng等^[25]用碳纳米管技术测定菠菜中的草酸含量,线性范围 $5.0 \times 10^{-5} \sim 1.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限为 $1.20 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Maguerroski等^[26]用松子仁过氧化物酶传感技术测定迷迭香酸,线性范围为 $9.07 \times 10^{-7} \sim 4.46 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限为 $7.25 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,迷迭香酸的植物提取物的回收率为97.0%~109.6%。此法优于毛细管电泳法。

2.3 在传统医学研究领域中的应用

化学传感器为针灸经络的研究提供了一种有力的手段,它可以在体监测人体化学物质的变化,实时提供针刺过程中化学物质变化的信息。目前化学传感器技术在经络和腧穴研究、针刺作用原理的研究、针刺手法的研究等方面开展工作。但传感器的制作、稳定性、重复性、使用寿命等技术难题有待突破。生物传感器的发展使动态监测有机分子变化成为可能,国内已经研制成功了用于测量多巴胺的针型生物传感器,有望揭示神经化学物质与经络之间存在的关系。相信随着中医研究的不断深入,化学传感器必将在中医学研究中发挥其独特的作用。

3 结束语

电化学传感器技术具有选择性好、灵敏度高、测试费用低及适于联机化的优点;电分析化学不破坏测试体系,不受颜色影响,操作简便;虽然

目前电化学传感器的发展尚在探索阶段,但是在传感器的设计、特性、灵敏度、稳定性以及实际应用方面已经取得了显著的发展,对生命医学和药物研究工作的进行具有深远的价值。今后电化学传感器的研究将主要集中在以下几个方面:①扩大电化学传感器的研究范围,寻求其他技术与电化学传感器的结合;②拓展电化学传感器技术在生命医学中的应用;③高灵敏度高选择性的电化学活性物质的筛选研究;④寻找稳定的固定化方法,探索新的检测原理;⑤开拓电化学传感器在药物分析和药物筛选中的独特优势;⑥加强电化学传感技术在传统医学中的研究与应用,使古老的中医技术能借助现代化科技手段得到发展。

REFERENCES

- [1] LU X J, JU H X. Principles and application of electrochemical sensor of DNA [J]. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2003, 31(1): 110-115.
- [2] BAI Y, DAI X F, LIU Z M, et al. Immobilization of DNA and discuss of hybridization conditions in electrochemical sensor of DNA [J]. *J Trans Tech*(传感器技术), 2005, 24(6): 23-28.
- [3] CAI H, XU Y, HE P G, et al. Research advance of DNA immobilization in electrode surface [J]. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2004, 32(6): 815-820.
- [4] ZHANG Y, ZHANG W Y, ZHU G Y. Detection of fragments of coagulation factor by electrochemical DNA sensor assembled with gold nanoparticle and 1,6-hexyl-dithioalcohol [J]. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2008, 36(4): 478-472.
- [5] HAN D M, NAN J M. Progress on the studies of electrochemistry in life chemistry [J]. *Chem Ind Times*(化工时代), 2004, 18(5): 23-28.
- [6] GAN N, LI T H, WANG L Y. Development of self-semblled electrochemical sensoe for Cys determination in human serum [J]. *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2008, 27(3): 235-239.
- [7] WEI N, CHENG J H, WANG K, et al. Research of electrochemical sensor for detection of leucemia PML/RARA fusion gene by hairpin structure DNA probe [J]. *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2008, 27(9): 907-910.
- [8] ZHANG Y L, ZHU J, ZHOU J L, et al. Research advance of aptamer electrochemical sensor [J]. *Chem Sensor*(化学传感器), 2008, 28(3): 1-6.
- [9] GAN N, XU W M, LI T H. Research of bio-sensor for determination of cellulolgtic activity [J]. *J Cellul Sci Tech*(纤维素科学与技术), 2007, 15(3): 30-35.
- [10] MU S L, XUE H G. Bioelectrochemical activities of polyaniline xanthine oxidase electrode [J]. *Acta Chim Sin*(化学学报), 1995, 53(6): 521-525.
- [11] DONG S Y, QIAN J H, LU M X, et al. Preparation and electrochemical mechanism research of electrode with high-loaded enzyme and enzyme immunization [J]. *J Anal Sci*(分析科学学报), 2001, 17(4): 283-287.
- [12] YUAN R. Research of immunity electrochemical sensor for diagnosis of multiple contagious virus [J]. *Chem Sensor*(化学传感器), 2005, 25(2): 22-22.
- [13] XI H P, ZHANG D G, LIU Y Z, et al. Quantitative determinative of Levofloxacin by PVC membrane ion-selective electrode method [J]. *J China Pharm*(中国药房), 2007, 18(34): 2696-2698.
- [14] LIU P, LIU Y G, CHU Y M, et al. Determination of residual penicillin in milk by self-made enzyme electrode [J]. *Chin J Appl Chem*(应用化学), 2004, 21(8): 832-834.
- [15] CHEN J, LI X X. Fiber-optic chemical sensors based on multiple quenching, apparatus system and its applications in pharmaceutical analysis [J]. *J Xinjiang Med Univ*(新疆医科大学学报), 2003, 26(6): 515-517.
- [16] ZHANG Q M, GE J H, MAI E D, et al. Continuous online monitoring for *vitro* dissolution of metronidazole by multichannel optical fiber chemical sensor [J]. *Xinjiang Med J*(新疆医学), 2002, 32(4): 28-30.
- [17] LI X X, WANG Y W, WANG Y, et al. Monitoring online for *vitro* dissolution of Rifam-picin capsules by optical fiber chemical sensor [J]. *Acta Pharm Sin*(药科学报), 2002, 37(9): 721-723.
- [18] LONG Y P, ZHENG J. Screening anti-inflammatory traditional Chinese medicine by target of lipid A [J]. *China Pharm*(中国药业), 2008, 17(7): 4-6.
- [19] GUO Y B, CAO H W, FAN L, et al. Extraction and activity of anti-lipopolysaccharide component from densefruit pittany root-bark [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*(第三军医大学学报), 2007, 29(17): 1654-1656.
- [20] FU J F, CAO H W, WANG N, et al. Extraction and biologic activities of active anti-lipopolysaccharide comound from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*(第三军医大学学报), 2008, 30(5): 382-385.
- [21] ZHANG S P, SHAN L G, TIAN Z R, et al. Study of enzyme biosensor based on carbon nanotubes modified electrode for detection of pesticides residue [J]. *Chin Chem Let*, 2008, 19(5): 592-594.
- [22] VISWANATHAN S, RADECKA H, RADECKI J. Electrochemical biosensor for pesticides based on acetylcholinesterase immobilized on polyaniline deposited on vertically assembled carbon nanotubes wrapped with ssDNA [J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(9): 2772-2777.
- [23] SONG A, AROTIBA O A, OWINO J H O, et al. Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix [J]. *Bioelectrochemistry*, 2009, 75(2): 117-123.
- [24] AKYILMAZ E, KOZGUS O. Determination of calcium in milk and water samples by using catalase enzyme electrode [J]. *Food Chem*, 2009, 115(1): 347-351.
- [25] ZHENG Y Q, YANG C Z, PU W H, et al. Determination of oxalic acid in spinach with carbon nanotubes-modified electrode [J]. *Food Chem*, 2009, 114(4): 1523-1528.
- [26] MAGUERROSKI K D S, FERNANDES S C, FRANZOI A C, et al. Pin nut peroxidase immobilized on chitosan crosslinked with citrate and ionic liquid used in the construction of a biosensor [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 44(6/7): 400-405.

收稿日期: 2010-04-22