

格列齐特对氯沙坦钾血浆蛋白结合率的影响

蒋玲燕, 陈赛贞*, 田自有, 徐利君, 林佳苗(浙江省台州市中心医院药剂科, 浙江 台州 318000)

摘要: 目的 研究格列齐特对氯沙坦钾血浆蛋白结合率的影响。方法 采用平衡透析法并结合 HPLC, 测定未加和加入格列齐特后氯沙坦钾的人血浆蛋白结合率。结果 3 种浓度下, 未加格列齐特时氯沙坦钾的血浆蛋白结合率分别为 97.4%, 97.8%, 98.2%, 与格列齐特合用时, 氯沙坦钾的血浆蛋白结合率依次为 94.1%, 94.8%, 94.9%。结论 氯沙坦钾与格列齐特合用后, 血浆蛋白结合率显著下降($P<0.01$)。

关键词: 氯沙坦钾; 格列齐特; 平衡透析法; 蛋白结合率

中图分类号: R969.1

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2013)09-1017-05

Effect of Gliclazide on Plasma Protein Binding Rate of Losartan Potassium

JIANG Lingyan, CHEN Saizhen*, TIAN Ziyu, XU Lijun, LIN Jiamiao(Department of Pharmacy the Taizhou Central Hospital of Zhejiang, Taizhou 318000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of gliclazide on the plasma protein binding ratio of losartan potassium. **METHODS** The equilibrium dialysis combined with HPLC were employed to determine the concentration of losartan potassium. The plasma protein binding rate of losartan potassium alone or together with gliclazide were determined. **RESULTS** Under three concentrations of drug, the protein binding rate of losartan potassium alone were 97.4%, 97.8%, 98.2%; when together with gliclazide, the protein binding rate of losartan potassium were 94.1%, 94.8%, 94.9%, respectively. **CONCLUSION** The protein binding rate of losartan potassium is decreased in association with gliclazide ($P<0.01$).

KEY WORDS: losartan potassium; gliclazide; equilibrium dialysis; plasma protein binding rate

氯沙坦钾是血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)受体抑制剂, 能特异性地拮抗血管紧张素 I 受体, 且与血管紧张素 I 受体结合特异性强, 通过选择性地阻断 Ang II 与血管紧张素 I 受体的结合, 抑制血管收缩和醛固酮的释放, 从而产生降压作用^[1-2]。氯沙坦钾血浆蛋白结合率 $>98\%$ ^[3], 代谢不良反应少。格列齐特选择性地作用于胰岛 B 细胞, 促进胰岛素分泌, 并提高进食葡萄糖后的胰岛素释放, 使肝糖原生成和输出受到抑制^[4]。本品口服, 在胃肠道迅速吸收, 血浆蛋白结合率为 92% ^[4]。氯沙坦钾与格列齐特血浆蛋白结合率均较高, 因此两者合并用药时, 格列齐特可能影响氯沙坦钾的血浆蛋白结合率, 使氯沙坦钾游离血药浓度升高, 且两者在肝脏中经限速酶 CYP2C9 代谢^[5-7], 可能会使游离血药浓度进一步上升而影响用药安全。目前国内外尚未见两者合用时血浆蛋白结合率相

互影响的文献报道。因此, 进行格列齐特对氯沙坦钾血浆蛋白结合率影响的研究工作。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters2695 高效液相色谱仪(2487 紫外检测器, Empower 色谱工作站, 美国 Waters 公司); TG1650-WS 高速台式离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司); Mettler AE 200-S 电子天平(浙江省科学器材进口有限责任公司); DELTA 320 pH 计(浙江省科学器材进口有限责任公司); XW-80A 涡旋混合器(原上海医科大学仪器厂); 恒温水浴锅(金坛市江南仪器厂); DN 系列氮气吹干仪(上海比朗仪器有限公司); MD-10kD 透析袋(华美生物工程公司)。

1.2 试剂

氯沙坦钾对照品(浙江省食品药品检验所, 批

基金项目: 浙江省药学会医院药学专项科研基金项目(2010ZY22); 台州市科技局项目(102KY10)

作者简介: 蒋玲燕, 女, 硕士 Tel: (0576)88551679 E-mail: lingyanjiang2008@163.com *通信作者: 陈赛贞, 女, 硕士, 主任药师 Tel: (0576)88526226 E-mail: tzczz@126.com

号：2007-10-10，纯度>98%); 苯妥英钠对照品(中国药品生物制品检定所，批号：100210-201002，含量为98.6%); 格列齐特对照品(中国药品生物制品检定所，批号：100269-200603，含量为99.9%); 甲醇(美国TEDIA试剂公司，HPLC级); 乙腈(美国TEDIA试剂公司，HPLC级); 乙酸乙酯(上海化学试剂研究所，分析纯)，水为自制重蒸馏水; 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和氯化钠均为市售分析纯试剂。空白血浆由台州市中心医院提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 空白透析液配制 精密称取磷酸氢二钾 14.11 g，磷酸二氢钾 2.59 g，氯化钠 1.99 g 于 1 000 mL 量瓶中，加蒸馏水溶解，并稀释至刻度，得 pH 7.4 磷酸盐缓冲液^[8]。

2.1.2 标准溶液配制 精密称定氯沙坦钾对照品 25.00 mg，置 100 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，得氯沙坦钾储备液 I，浓度为 0.25 mg·mL⁻¹。从氯沙坦钾储备液 I 中分别精密量取 0.5，1，2，3，4，5 mL 至 25 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，得标准系列 I 溶液。从氯沙坦钾储备液 I 中精密量取 1 mL 于 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，得氯沙坦钾储备液 II，从该储备液 II 中分别精密量取 0.1，0.2，0.4，0.6，0.8 mL 至 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，得标准系列 II 溶液。

2.1.3 格列齐特对照溶液配制 取格列齐特对照品 10.00 mg，精密称定，置于 1 000 mL 量瓶中，用上述空白透析液溶解并稀释至刻度，摇匀，取 1 mL 至 10 mL 量瓶中，得格列齐特对照品溶液 (1.00 μg·mL⁻¹)，于 4 °C 冰箱中保存备用。

2.1.4 内标溶液配制 精密称取苯妥英钠对照品 10.00 mg，置于 100 mL 量瓶中，甲醇定容，取上述溶液 2.5 mL 置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，得苯妥英钠浓度为 25.00 μg·mL⁻¹，作为内标 1 溶液，取内标 1 溶液 1 mL 至 10 mL，甲醇定容，得其浓度为 2.50 μg·mL⁻¹，作为内标 2 溶液。

2.2 透析内液中氯沙坦钾浓度的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱：依利特 C₁₈ 色谱柱 (4.0 mm×200 mm，5 μm); 检测波长 228 nm; 柱温 40 °C; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样 20 μL。流动相：0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 至 3.0) 为流动相 A，乙腈为流动相 B，梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

Tab 1 Gradient elution conditions

时间/min	流动相 A : B
0	33 : 67
5	33 : 67
15	40 : 60
20	40 : 60
23	33 : 67

2.2.2 透析内液(血浆)中样品的处理与测定 取血浆样品 0.5 mL，加内标 1 溶液 20 μL，摇匀，0.2 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液 100 μL，乙酸乙酯 5 mL，涡旋振荡 3 min，3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min，定量转移上清液 4 mL 至另一干燥试管中，50 °C 水浴环境下氮气吹干，残渣溶解于 100 μL 乙腈-水 (1 : 1) 中，涡旋振荡 1 min，转移至 EP 管中，12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，取上清液，进样 20 μL。在上述色谱条件下，空白血浆色谱图、氯沙坦钾对照品和内标色谱图以及氯沙坦钾血浆样品色谱图见图 1。由图可见，内标和氯沙坦钾的保留时间分别为 6.38 min 和 10.23 min，内源性物质对测定无干扰。

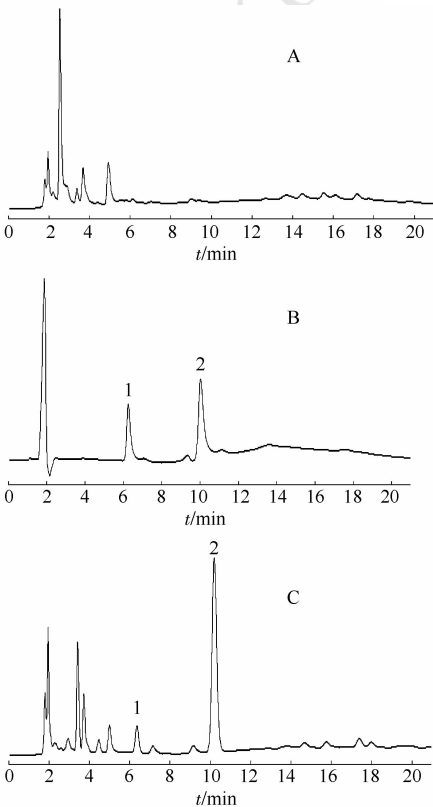


图 1 高效液相色谱图

A-空白血浆; B-氯沙坦钾和内标溶液; C-血浆样品; 1-苯妥英钠; 2-氯沙坦钾

Fig 1 HPLC chromatograms

A-blank plasma; B-losartan potassium and internal standard solution; C-plasma sample; 1-phenytoin sodium; 2-losartan potassium

2.2.3 标准曲线与线性范围 取氯沙坦钾标准系列 I 溶液各 50 μL 置离心试管中, 于氮气流下吹干, 加空白血浆 0.5 mL, 配制成浓度为 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 模拟血浆样品, 按“2.2.2”项下方法操作, 进样分析, 求得回归方程为 $Y=1.9015X-0.2361$, $r=0.9997(n=6)$, 结果表明氯沙坦钾在 0.5~5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.2.4 精密密度试验 取空白血浆 0.5 mL, 按“2.2.3”项下方法操作, 配制成低、中、高 3 种浓度(氯沙坦钾的浓度分别为 0.5, 2.5, 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的模拟血浆样品。每个浓度 5 样本分析, 连续测定 3 d。考察方法的日内与日间精密密度, 结果见表 2。

表 2 透析内液测定结果的精密密度($n=5$)

Tab 2 The RSD of dialysis fluid within the measurement results($n=5$)

氯沙坦钾/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%	
	日内精密密度	日间精密密度
0.5	4.9	6.5
2.5	2.7	9.6
4.0	2.5	7.6

2.2.5 提取回收率 取空白血浆 0.5 mL, 按“2.2.3”项下方法操作, 配制成低、中、高 3 种浓度(氯沙坦钾的浓度分别为 0.5, 2.5, 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的模拟血浆样品。按“2.2.2”项下操作, 3 种浓度氯沙坦钾的提取回收率结果见表 3。

表 3 透析内液样品的回收率($n=5$)

Tab 3 The recovery of Losartan potassium in blank plasma

氯沙坦钾/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
0.5	92.2	5.7
2.5	87.5	3.6
4.0	85.3	2.3

2.2.6 稳定性考察 取空白血浆 0.5 mL, 按“2.2.3”项下方法操作, 配制成低、中、高 3 种浓度(氯沙坦钾的浓度分别为 0.5, 2.5 和 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的模拟血浆样品。按“2.2.2”项下操作, 考察血浆样品-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻藏 7 d, 预处理后室温放置 24 h, 结果表明, 低、中、高 3 种浓度的 RSD 均 $<5\%$, 血浆样品在上述条件下稳定性良好。

2.3 透析外液中氯沙坦钾浓度的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: 依利特 C_{18} 色谱柱 (4.0 mm $\times$ 200 mm, 5 μm); 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液(30:70, 缓冲液 pH=3.0),

等度洗脱; 流速 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长 228 nm; 进样量 20 μL 。

2.3.2 透析外液中样品的处理与测定 取透析外液样品 0.5 mL, 加内标 2 溶液 50 μL , 0.2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠溶液 100 μL , 涡旋混匀后加入乙酸乙酯 5 mL, 涡旋萃取 3 min, 3 500 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 定量转移上清液 4 mL 至另一干燥试管中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴环境下氮气流吹干, 残渣溶解于 100 μL 乙腈-水(7:3)中, 涡旋混匀 1 min, 转移至 EP 管中, 12 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 进样 20 μL 。在上述色谱条件下, 空白透析外液色谱图、氯沙坦钾和内标对照品色谱图和氯沙坦钾透析外液样品色谱图见图 2。由图可见, 内标和氯沙坦钾的保留时间分别为 8.02 min 和 14.80 min, 分离度良好。

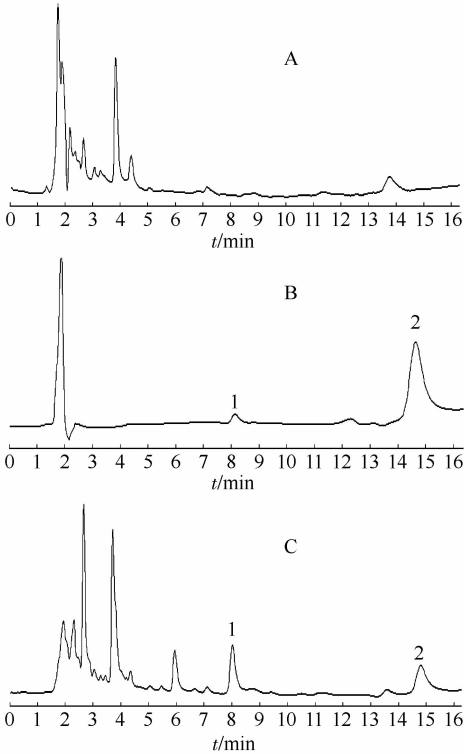


图 2 高效液相色谱图
A-空白透析液; B-氯沙坦钾和内标溶液; C-透析外液样品; 1-苯妥英钠; 2-氯沙坦钾

Fig 2 HPLC chromatograms
A-blank dialysate; B-losartan potassium and internal standard solution; C-dialysate sample; 1-phenytoin sodium; 2-losartan potassium

2.3.3 标准曲线与线性范围 取氯沙坦钾标准系列 II 溶液各 50 μL 分别置于离心试管中, 于氮气流下吹干, 加空白透析外液 0.5 mL, 配制成浓度分别为 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的模拟透析液样品, 按“2.3.2”项下方法操作, 进样分析, 求得回归方程为 $Y=12.934X-0.3898$, $r=0.9992$

($n=5$), 结果表明, 氯沙坦钾在 $0.025\sim 0.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.3.4 精密度试验 取空白透析液 $0.5\ \text{mL}$, 按“2.3.3”项下方法操作, 配制低、中、高 3 种浓度(氯沙坦钾的浓度分别为 0.025 , 0.10 和 $0.16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的模拟透析液样品。每个浓度 5 样本分析, 连续测定 3 d。考察方法的日内与日间精密度, 结果见表 4。

表 4 透析外液样品测定结果的精密度($n=25$)

Tab 4 The RSD of outer dialysis measurement results($n=25$)

氯沙坦钾/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%	
	日内精密度	日间精密度
0.05	4.3	13.8
0.10	11.9	8.8
0.16	3.3	3.3

2.3.5 提取回收率 取空白透析液 $0.5\ \text{mL}$, 按“2.3.3”项下方法操作, 配制低、中、高 3 种浓度(氯沙坦钾的浓度分别为 0.025 , 0.10 和 $0.16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的模拟透析液样品。按“2.3.2”项下方法操作, 3 种浓度氯沙坦钾的提取回收率结果见表 5。

表 5 透析外液样品的回收率($n=3$)

Tab 5 The recovery of outer dialysis measurement results($n=3$)

氯沙坦钾/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
0.05	85.9	6.1
0.10	92.4	5.7
0.16	90.9	6.7

2.3.6 稳定性考察 空白透析液 $0.5\ \text{mL}$, 按“2.3.3”项下方法操作, 配制低、中、高 3 种浓度(氯沙坦钾的浓度分别为 0.025 , 0.1 和 $0.16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的模拟透析液样品。按“2.3.2”项下方法操作, 考察透析液样品在恒温水浴条件下的稳定性: 将低、中、高 3 种不同浓度的含药透析液置于广口瓶中, 于 $37\ ^\circ\text{C}$ 恒温水浴锅中进行透析, 分别在 $0, 2, 4, 8, 12, 24\ \text{h}$ 取样 $0.5\ \text{mL}$, 分析测定, 考察氯沙坦钾缓冲溶液在实验条件下的稳定性。结果表明, 低、中、高 3 种浓度的 RSD 均 $<5\%$, 透析液样品在上述条件下稳定性良好, 氯沙坦钾缓冲溶液在本实验条件下 $24\ \text{h}$ 内保持稳定。

2.4 蛋白结合率测定方法与评价

2.4.1 实验方法 将沸水煮后冲洗过的透析袋(长约 $9\ \text{cm}$)一段折叠, 结扎, 将 $2\ \text{mL}$ 空白血浆加入

袋中, 留一小段空气, 多余空气排出, 并将其另一端折叠后, 扎紧, 放置悬浮于盛有 $20\ \text{mL}$ 含药透析液的广口瓶中, 调节透析袋的高度, 使其内外液保持同一水平, 并避免透析袋贴壁。放置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 的恒温水浴锅中使其平衡, 透析结束后, 用 10% 高氯酸溶液检查透析外液有无蛋白漏出, 有漏出者作废。分别测定透析袋内血浆药物浓度(总浓度 D_t)和透析外液中药物浓度(游离药物浓度 D_f), 根据下式计算药物的血浆蛋白结合率^[8]。

$$\text{血浆蛋白结合率}=(D_t-D_f)/D_t\times 100\%$$

2.4.2 平衡时间考察 配制 3 种不同浓度的血浆样品, 每个浓度 3 样本分析, 分别于 $4, 8, 12, 16, 20, 24\ \text{h}$ 结束实验, 分别测定袋内外氯沙坦钾的浓度, 计算其血浆蛋白结合率。结果表明, 氯沙坦钾在 $37\ ^\circ\text{C}$ 下透析达到平衡至少需要 $20\ \text{h}$ 。

2.4.3 透析膜对药物的吸附作用 将透析袋内加入 $2\ \text{mL}$ (设体积为 V_1)空白磷酸盐缓冲液, 将其放入盛有 $20\ \text{mL}$ (设体积为 V_2)药物浓度为 C_A 的含药透析液的广口瓶中, $37\ ^\circ\text{C}$ 下放置 $20\ \text{h}$ 至达到平衡, 测定透析袋外药物浓度 C_E , 透析膜对药物的吸附率 X 用下式计算^[9]。

$$X=[C_A\times V_2-C_E\times (V_1+V_2)]/C_A\times V_2\times 100\%$$

结果表明, 透析膜对药物有微量的吸附, 低、中、高 3 种浓度下吸附率的结果分别为 2.80% , 2.74% , 2.92% , 对测定结果没有显著影响。

2.5 蛋白结合率的影响

按蛋白结合率实验方法分别测定加入格列齐特前后 3 种不同浓度下氯沙坦钾的血浆蛋白结合率, 结果见表 6。采用成对 t 检验进行统计分析, 结果显示 $P<0.01$, 表明格列齐特对氯沙坦钾的血浆蛋白结合率有显著性差异, 加入格列齐特后, 氯沙坦钾的血浆蛋白结合明显降低。

3 讨论

平衡透析法是一种较为经典的蛋白结合率测定方法, 操作简单, 不需要贵重仪器, 但也容易受到一些因素的影响: 在实验前将半透膜(经蒸馏水冲洗)浸泡于试验用缓冲溶液中降低其脆性, 同时除去可能粘附于上面的杂质, 从而减少半透膜对氯沙坦钾的吸附。实验过程中严格控制透析液的 pH 值, 透析内液与外液的液面保持在同一水平以避免体积迁移的干扰; 透析过程在磨口广口瓶的密封环境中进行, 尽量减少由于液体的蒸发导

表 6 格列齐特对 3 种氯沙坦钾血浆蛋白结合率的影响

Tab 6 The protein binding rate of losartan potassium under three different concentrations in association with gliclazide

序号	对照组(不含格列齐特)				实验组(含格列齐特 1.0 μg·mL ⁻¹)			
	透析外液浓度/ μg·mL ⁻¹	透析内液浓度/ μg·mL ⁻¹	蛋白结合率/ %	$\bar{x} \pm s$ /%	透析外液浓度/ μg·mL ⁻¹	透析内液浓度/ μg·mL ⁻¹	蛋白结合率/ %	$\bar{x} \pm s$ /%
1	0.062 1	2.312	97.3	97.4±0.1	0.114 2	1.777	93.6	94.1±0.4
	0.060 9	2.241	97.3		0.106 3	1.867	94.3	
	0.061 2	2.375	97.4		0.107 3	1.878	94.3	
2	0.074 8	3.152	97.6	97.8±0.2	0.126 5	2.653	95.2	94.8±0.4
	0.073 2	3.253	97.7		0.133 5	2.504	94.7	
	0.065 4	3.271	98.0		0.139 1	2.465	94.4	
3	0.070 4	4.183	98.3	98.2±0.2	0.163 6	3.136	94.8	94.9±0.1
	0.072 3	4.102	98.2		0.158 7	3.208	95.1	
	0.080 7	4.039	98.0		0.160 4	3.202	95.0	

致体积减少而带来透析液浓度的改变。另外药物与血浆蛋白结合存在个体差异，因此本试验中采用混合血浆来消除不同个体血浆蛋白组成和含量上的差异。

血浆蛋白分子量为69 kD，根据相关文献报道^[9]，透析袋截留分子量为30 kD时，杂质峰较多，基线噪音大，考虑到血浆中内源性物质透析到外液中，影响血浆蛋白对药物的结合能力。因此，本实验采用截留分子量为10 kD的透析袋，结果表明效果良好。

氯沙坦钾的血浆蛋白结合率约为97%，与文献报道>98%存在差异，究其原因，可能与透析膜的微量吸附有一定关系。

药物只有在游离状态下才能从血液向组织转运，并在作用部位发生作用。研究结果表明，格列齐特与氯沙坦钾均为高蛋白结合率药物，两者合用时，格列齐特能使氯沙坦钾的血浆蛋白结合率有所降低，从而使血浆中氯沙坦钾游离浓度升高。因此在临床合理用药中，对于伴有肝功能损害患者可以考虑适当减少剂量或者延长给药时间间隔。

REFERENCES

[1] PETER B, CHINDLER S. Differences in pharmacology and

their translation into differences in clinical efficacy – a comparison of the renin angiotensin blocking agents irbesartan and losartan [J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(4): 521-535.

[2] YASAR U, FORSLUND-BERGENGREN C, TYBRING G, et al. Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype [J]. Clin Pharmacol Ther, 2002, 71(1): 89-98.

[3] ZHANG J, CHEN S X. Pharmacokinetics and clinical application of angiotensin II receptor antagonist [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2004, 23(2): 111-115.

[4] SUI Y F, ZOU M J, CHEN G, et al. Influence of warfarin sodium on pharmacokinetics of gliclazide in rats [J]. Chin J Pharm(中国药理学杂志), 2010, 8(9): 131-137.

[5] YAO Y, WEI W H, ZHONG D F, et al. The metabolism of CYP2C9 and CYP2C19 for gliclazide by homology modeling and docking study [J]. Eur J Med Chem, 2009, 44(2): 854-861.

[6] BAE J W, CHOI C I, KIM M J, et al. Frequency of CYP2C9 alleles in Koreans and their effects on losartan pharmacokinetics [J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(10): 1303-1308.

[7] SHAO H, REN X M, WANG D W, et al. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on pharmacokinetics and pharmacodynamics of gliclazide in healthy Chinese Han volunteers [J]. J Clin Pharm Therap(临床药理学与治疗学杂志), 2010, 35(3): 351-360.

[8] LIU X, CHEN X H, BI K S, et al. Determination of plasma protein binding rate of arbidol [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2007, 26(2): 115-119.

[9] LU C L, JIANG X H, ZHOU J, et al. The effects of amoxicillin on plasma protein-binding rate of glimepiride [J]. West Chin J Pharm Sci(华西药理学杂志), 2003, 18(4): 246-250.

收稿日期: 2013-01-01