

原纤维增生更严重, 满布视野; 黄芪干预组肌内胶原纤维数量明显比模型组减少。这提示可以通过抑制胶原纤维的增生, 改善注射性坐骨神经损伤所致的肌萎缩。笔者认为, 由于青霉素对坐骨神经的毒性作用, 腓骨长肌内毛细血管退化, 胶原纤维明显增多, 增生的胶原纤维阻隔了肌纤维的血液供应, 导致骨骼肌萎缩。由于黄芪具有生肌、长期用药无明显不良反应的优势, 是延缓周围神经损伤后骨骼肌萎缩的理想药物^[6-7], 黄芪干预后, 肌内胶原纤维减少, 胶原阻隔逐渐被毛细血管穿越, 血供改善, 肌萎缩逐渐恢复。

REFERENCES

- [1] FATUNDE O J, FAMILUSI J B. Injection-induced sciatic nerve injury in Nigerian children [J]. Cent Afr J Med, 2001, 47(2): 35-38.
- [2] KIM H J, PARK S H. Sciatic nerve injection injury [J]. J Int Med Res, 2014, 42(4): 887-897.
- [3] SEVIM S, KALEGASI H. Sciatic injection injuries in adults: is dipyrone a foe to nerve? [J]. Acta Neurol Belg, 2009, 109(3): 210-213.
- [4] LU Y X, ZHANG X Z, YANG S B. After sciatic nerve injection injury, effect of collagen fiber and NADH-TR of tibialis anterior of rabbit by acupuncture treatment [J]. Anat Res(解剖学研究), 2012, 34(2): 129-134.
- [5] YANG S B, LONG S, YI X D, et al. Effects of acupuncture on gastrocnemius muscle after sciatic nerve injection injury in rabbits [J]. Acta Acad Med Zunyi(遵义医学院学报), 2014, 37(1): 62-66.
- [6] SHI H W, ZHANG H Y, LI X Y, et al. Protective effects of Astragali Radix on cell apoptosis in denervated skeletal muscle in rat [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(11): 984-987.
- [7] LI W B, LIANG B S, LIANG X. Delaying denervated skeletal muscle atrophy by Astragali Radix via the NF-kappaB/MuRfl pathway [J]. Chin J Hand Surg (中华手外科杂志), 2010, 26(1): 48-51.
- [8] CAI D, FRANTZ J D, TAWA N E JR, et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice [J]. Cell, 2004, 119(2): 285-298.
- [9] LEHTO M, DUANCE V C, RESTALL D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistochemical study of the effects of physical activity on repair of the injured gastrocnemius muscle in the rat [J]. J Bone Joint Surg Br, 1985, 67(5): 820-828.
- [10] JIANG G L, GU Y D, ZHANG G L. The effects of clenbuterol on intramuscular collagen metabolism in denervated muscle [J]. Chin J Repair Reconstr Surg(中国修复重建外科杂志), 1998, 12(1): 48-51.

收稿日期: 2014-07-31

荧光光谱法研究顺铂对表柔比星与人血白蛋白结合作用的影响

梁晶, 吴继禹, 杜晓翔, 林观样(温州医科大学附属第一医院, 浙江 温州 325000)

摘要: 目的 研究顺铂对表柔比星与人血清白蛋白(HSA)结合作用的影响。方法 通过荧光光谱法研究顺铂和表柔比星对 HSA 的荧光猝灭光谱, 同步荧光光谱。由 Lineweaver-Burk 双倒数作图法确定反应的解离常数, 根据热力学方程讨论两者间主要的作用力类型。结果 荧光猝灭光谱显示, 顺铂和表柔比星与 HSA 都有荧光猝灭作用。顺铂、表柔比星对 HSA 的猝灭过程为静态猝灭。表柔比星与 HSA 的结合点数为 1, 主要作用力为疏水作用力。顺铂不影响表柔比星对 HSA 的内源荧光猝灭作用, 但能增加表柔比星与 HSA 的结合常数(K_A)。结论 顺铂不影响表柔比星的血药浓度, 但能增加表柔比星与 HSA 的结合力。

关键词: 顺铂; 表柔比星; 人血白蛋白; 荧光猝灭

中图分类号: R962 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2015)04-0410-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.006

Fluorescent Spectrometry Study of Influence of Cisplatin in Conjugation Between Epirubicin and Human Serum Albumin

LIANG Jing, WU Jiyu, DU Xiaoxiang, LIN Guanyang(The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the interaction between cisplatin and epirubicin in conjugation of human serum

基金项目: 温州市科技计划项目(S20100050)

作者简介: 梁晶, 女, 主管药师 Tel: (0577)888069551 E-mail: 734302823@qq.com

albumin(HSA). **METHODS** The interaction of cisplatin and epirubicin with HSA was studied by measuring fluorescence quenching spectra, synchronous fluorescence spectra. The binding constants were calculated according to Lineweaver-Burk equation and type of binding force was estimated by the calculation of thermodynamic parameters. **RESULTS** The fluorescence quenching spectra of HSA in the presence of cisplatin and epirubicin showed that both of them quenched the fluorescence of HSA. Cisplatin and epirubicin were static quenching. The binding site numbers of epirubicin was 1. The interaction between epirubicin and HSA was mainly driven by a hydrophobic force. When in the presence of cisplatin, the combining constants (K_A) increased. **CONCLUSION** Cisplatin can increase the combining constants.

KEY WORDS: cisplatin; epirubicin; human serum albumin; fluorescence quenching

表柔比星和顺铂都是常用的抗肿瘤药物^[1],进入人体循环系统后,都与血清白蛋白结合^[2],两者蛋白结合率都较高,但是否有相互作用还不清楚。本研究应用荧光光谱法研究顺铂对表柔比星与人血白蛋白(HSA)结合作用的影响,讨论顺铂影响表柔比星对 HSA 的荧光猝灭机制,考察顺铂对表柔比星与蛋白质结合力的影响,为临床合理用药提供参考。

1 仪器与试剂

RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津); Millipore 超纯水系统(Millipore); 顺铂(齐鲁制药有限公司,批号:2WA2A13030); 表柔比星(辉瑞制药有限公司,批号:130503902); HSA(瑞士杰特贝林生物制品有限公司,批号:4312100168); 其他试剂均为分析纯;实验用水均为二次蒸馏水; HH-4 数显恒温水浴锅(上海江星仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

配制 $6.02 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HSA 标准溶液备用。表柔比星配成 $3.45 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 顺铂原液浓度 $6.67 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 标准液均在 $0 \sim 4^\circ \text{C}$ 冰箱中保存。

2.2 表柔比星对 HSA 荧光光谱的影响

9 支 5 mL EP 管分别加入 3 mL HSA 标准液,再分别加入不同量表柔比星溶液和超纯水使每只 EP 管内液体体积为 3.44 mL。HSA 浓度为 $5.25 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表柔比星浓度为 $0, 2.01 \times 10^{-6}, 5.01 \times 10^{-6}, 9.03 \times 10^{-6}, 1.40 \times 10^{-5}, 2.01 \times 10^{-5}, 2.71 \times 10^{-5}, 3.51 \times 10^{-5}, 4.41 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。荧光仪的激发和发射狭缝均为 5 nm, 激发波长 $\lambda=285 \text{ nm}$, 测定 17°C 和 37°C 下 300~500 nm 顺铂的荧光光谱。以 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$, $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 测定表柔比星的同步荧光光谱。

2.3 顺铂干扰下表柔比星对 HSA 荧光光谱的影响

取一定量顺铂原液与表柔比星溶液混合,使顺铂的浓度分别为 $9.69 \times 10^{-5}, 1.55 \times 10^{-4},$

$1.94 \times 10^{-4}, 2.33 \times 10^{-4}, 2.91 \times 10^{-4}, 3.49 \times 10^{-4}, 3.88 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表柔比星与人血白蛋白浓度同上。测定不同浓度顺铂下,相同荧光光谱条件 17°C 和 37°C 下表柔比星的荧光猝灭光谱和同步荧光光谱。

3 结果

3.1 顺铂、表柔比星对 HSA 荧光光谱的猝灭现象

由于顺铂和表柔比星在 HSA 的激发波长 285 nm 与发射波长 355 nm 处均有吸收,且浓度高,因此其猝灭行为中包含有“内滤光效应”^[3]。如果吸收值 ≤ 0.3 时,“内滤光效应”可用以下公式 $F_c = F_0 \times e^{-(A_1 + A_2)/2}$ 予以校正,其中 F_c 和 F_0 分别为校正后和测量到的荧光强度, A_1 和 A_2 是溶液在激发和发射波长处的吸收值,以下所用荧光强度均为校正后的荧光值^[4]。

固定 HSA 的浓度不变,在本实验条件下,当激发光波长为 285 nm 时, HSA 荧光发射峰位置在 354 nm 附近,见图 1。顺铂与表柔比星在 HSA 荧光发射出峰位置附近区域无荧光发射峰。固定顺铂浓度,随着表柔比星浓度的增加, HSA 的内源荧光强度有规律地降低,而它的发射峰的峰位及峰形基本保持不变,这说明表柔比星对 HSA 的荧光有猝灭现象,二者之间存在相互作用。

在 HSA 中加入不同浓度顺铂后,表柔比星对 HSA 的荧光强度有规律地降低,发射峰的峰位及峰形基本保持不变,说明顺铂并未影响表柔比星对 HSA 的荧光猝灭作用。

3.2 顺铂、表柔比星对 HSA 荧光猝灭方式的确定

由实验数据分别作出 HSA 的 Stern-Volmer 曲线和 Lineweaver-Burk 双倒数曲线^[5-6],并对实验数据线性拟合得到 K_{sv} 和 K_{LB} 。图 2 和表 1 的结果显示,顺铂对 HSA 荧光的猝灭速率常数 $> 2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, K_{sv} 随着温度的升高而降低,提示顺铂与 HAS 是动态猝灭^[7]。表柔比星对 HSA 荧光的猝灭速率常数 $> 2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 加入顺铂后,表柔比星的猝灭速率常数 K_q 仍 $> 2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,由此可见表柔比星对 HSA 体系的

荧光猝灭作用主要是由于它与HSA彼此结合而引起的静态猝灭,而顺铂不影响表柔比星对HSA的猝灭方式。但是当顺铂存在时,表柔比星的KLB值随温度升高,其原因可能是由于顺铂的存在,温度的升高增加了有效碰撞和加剧电子转移过程^[8],使表

柔比星与HSA的结合反应达到平衡时的量增加。

依据公式 $F_0/F=1+K_{sv}[Q]$ ^[9], 其中 F 为有猝灭剂时BSA的荧光强度, F_0 为无猝灭剂时HSA的荧光强度, $[Q]$ 为猝灭剂浓度, K_{sv} 为动态猝灭常数, 作图, 见图2。

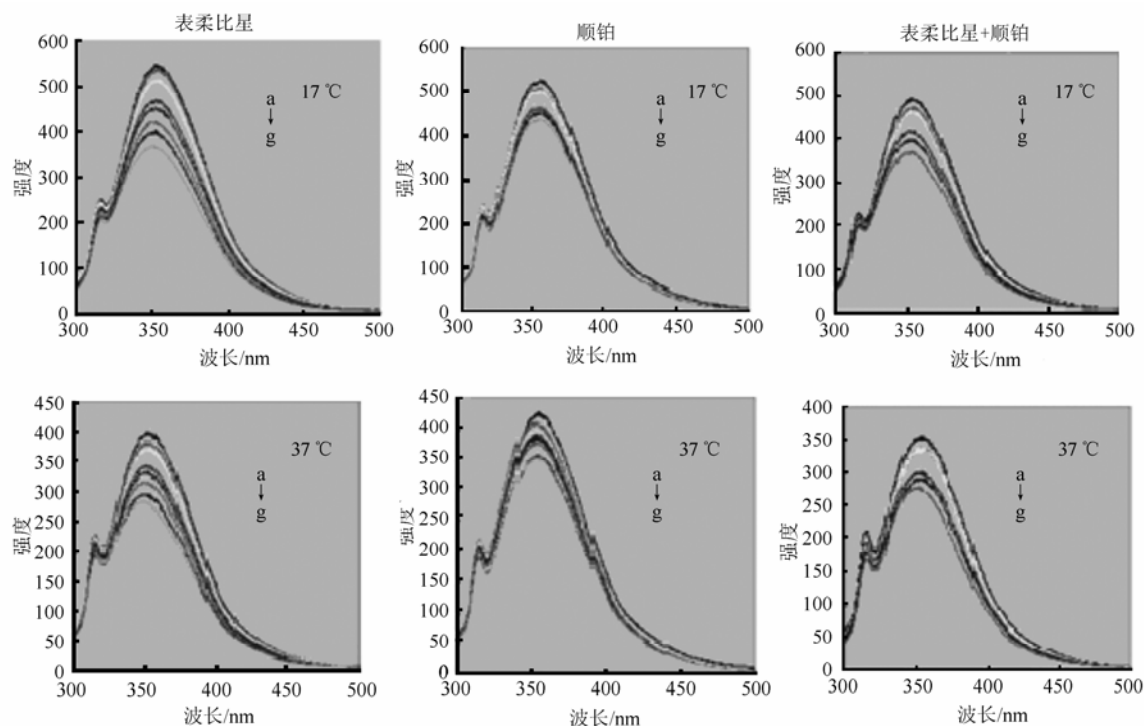


图1 顺铂、表柔比星与HSA相互作用的荧光光谱

a→g: 顺铂浓度分别为 9.69×10^{-5} , 1.55×10^{-4} , 1.94×10^{-4} , 2.33×10^{-4} , 2.91×10^{-4} , 3.49×10^{-4} , 3.88×10^{-4} mol·L⁻¹。

Fig. 1 The fluorescence spectrum of cisplatin and epirubicin interaction with HAS

a→g: contertration of cisplatin solution were 9.69×10^{-5} , 1.55×10^{-4} , 1.94×10^{-4} , 2.33×10^{-4} , 2.91×10^{-4} , 3.49×10^{-4} , 3.88×10^{-4} mol·L⁻¹.

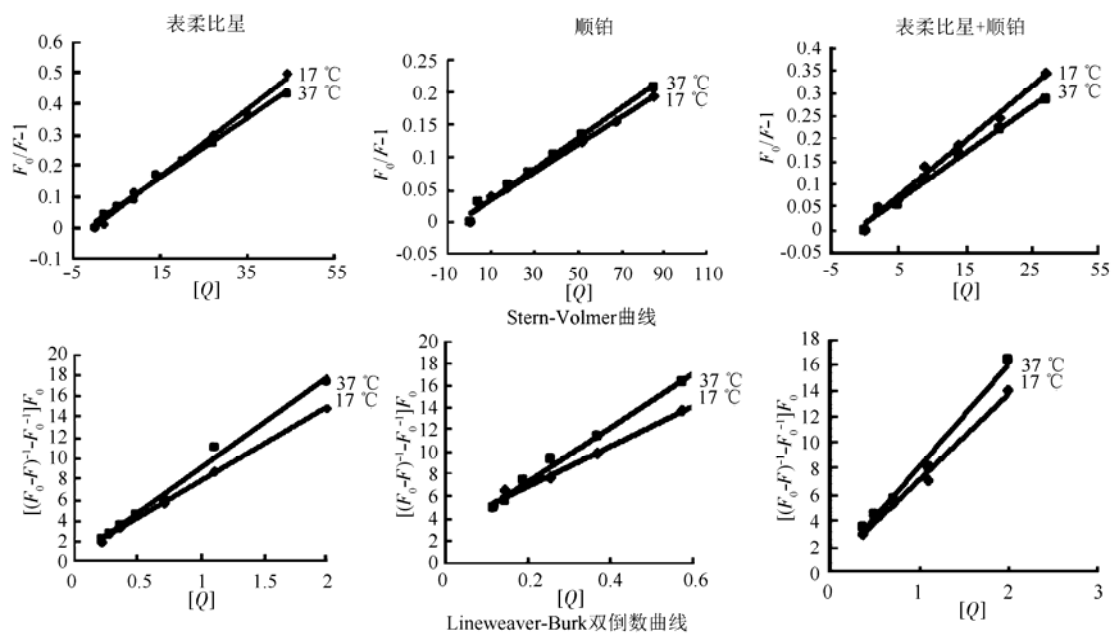


图2 顺铂和表柔比星的Stern-Volmer和Lineweaver-Burk方程拟合图

Fig. 2 Stern-Volmer and Lineweaver-Burk fitting chart of cisplatin and epirubicin

表 1 图 2 拟合曲线得到的 KLB 和 K_{SV}

Tab. 1 KLB and K_{SV} from fig.2 curve

药 物	T/℃	$K_{SV}/L \cdot mol^{-1}$	$Kq/L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$	R^2	KLB/ $L \cdot mol^{-1}$	R^2
顺 铂	17	2.10×10^2	2.10×10^{10}	0.990 6	5.53×10^2	0.990 5
	37	2.00×10^2	2.30×10^{10}	0.990 4	4.07×10^2	0.991 5
表柔比星	17	1.08×10^4	1.08×10^{12}	0.992 8	1.41×10^4	0.997 6
	37	9.70×10^3	9.70×10^{11}	0.993 2	1.15×10^4	0.991 4
表柔比星+顺铂($1.55 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	17	1.02×10^4	1.02×10^{12}	0.996 1	1.22×10^4	0.999 0
	37	9.00×10^3	9.00×10^{11}	0.991 2	8.24×10^4	0.991 1
表柔比星+顺铂($1.94 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	17	1.21×10^4	1.21×10^{12}	0.990 3	1.50×10^4	0.990 7
	37	1.03×10^4	1.03×10^{12}	0.990 8	1.86×10^4	0.990 4
表柔比星+顺铂($2.33 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	17	1.29×10^4	1.29×10^{12}	0.996 1	4.40×10^3	0.990 6
	37	9.80×10^3	9.80×10^{11}	0.992 5	5.19×10^3	0.992 0
表柔比星+顺铂($2.91 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	17	1.01×10^4	1.01×10^{12}	0.991 5	1.22×10^4	0.995 9
	37	9.50×10^3	9.50×10^{11}	0.992 8	7.74×10^4	0.999 5

3.3 顺铂对表柔比星与 HSA 作用力的影响

根据公式 $\Delta G = -RT \ln K_A^{[10]}$, $\ln(k_2/k_1) = (1/T_1 - 1/T_2)/\Delta H^{[11]}$, $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$ 计算热力学参数^[12], 结果见表 2。可知 $\Delta G < 0$, $\Delta S > 0$, $\Delta H > 0$, 因此推断表柔比星与 HSA 之间的作用力主要是疏水作用力; 当加入顺铂后, 表柔比星与 HSA 之间的作用力仍

表现为以疏水作用力为主。

3.4 顺铂对表柔比星的结合常数和结合位点数的影响

按 Lineweaver-Burk 双倒数曲线测算结合常数和结合位点数, 结果见表 3 和表 4。可知结合位点数均为 1, 结合常数随顺铂浓度增加而增大。

表 2 顺铂对表柔比星与 HSA 之间热力学参数的影响

Tab. 2 Effect of cisplatin on thermodynamic parameters of epirubicin with HSA

药 物	T/℃	$K_A/10^3 L \cdot mol^{-1}$	$\Delta G/KJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta S/J \cdot mol^{-1}$	$\Delta H/KJ \cdot mol^{-1}$
表柔比星	17	7.54	-21.50	96.81	6.59
	37	8.99	-23.50	97.02	6.59
表柔比星+顺铂($1.55 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	17	10.67	-22.40	128.86	14.99
	37	15.92	-24.90	128.62	14.99
表柔比星+顺铂($1.94 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	17	9.16	-22.00	117.28	12.03
	37	12.63	-24.40	117.46	12.03
表柔比星+顺铂($2.33 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	17	16.48	-23.40	111.94	9.08
	37	21.00	-25.70	112.14	9.08
表柔比星+顺铂($2.91 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	17	35.84	-25.30	185.73	28.59
	37	76.90	-29.00	185.68	28.59

表 3 17℃表柔比星与 HSA 的结合常数和结合位点数

Tab. 3 The binding constant and the number of binding sites of epirubicin with HAS at 17 °C

药物	n	$K_A/10^3 L \cdot mol^{-1}$	R^2
表柔比星	0.960 5	7.54	0.992 6
表柔比星+顺铂 ($1.55 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	1.002 4	10.67	0.991 9
表柔比星+顺铂 ($1.94 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	0.997 9	9.16	0.994 0
表柔比星+顺铂 ($2.33 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	1.052 0	16.48	0.989 5
表柔比星+顺铂 ($2.91 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	1.130 4	35.84	0.998 9

表 4 37℃表柔比星与 HSA 的结合常数和结合位点数

Tab. 4 The binding constant and the number of binding sites of epirubicin with HAS at 37 °C

药物	n	$K_A/10^3 L \cdot mol^{-1}$	R^2
表柔比星	0.978 1	8.99	0.993 8
表柔比星+顺铂 ($1.55 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	1.032 4	15.92	0.996 7
表柔比星+顺铂 ($1.94 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	1.019 5	12.63	0.990 4
表柔比星+顺铂 ($2.33 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	1.073 3	21.00	0.986 2
表柔比星+顺铂 ($2.91 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$)	1.196 8	76.90	0.992 7

2.2 顺铂干预下表柔比星对 HSA 构象的影响

固定激发波长和发射波长的间距为 $\Delta\lambda$ ，同步扫描激发和发射单色器可得到同步荧光光谱。在蛋白质的同步荧光光谱中， $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 时，表现出酪氨酸残基的荧光光谱， $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 时则表现出色氨酸残基的荧光光谱。固定 HSA 浓度逐渐增大表柔比星的浓度，记录 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 和 60 nm 时的同步荧光光谱。色氨酸的最大发射波长与其所处环境有关，从图 5 可以看出，随着表柔比星浓度的增大，色氨酸残基的最大发射波长发生了红移，证明 HSA 腔内疏水环境的极性增大，肽链的伸展程度有所增加，蛋白质的构象发生了改变。然后设定 $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ ，此时同步荧光光谱仅表现出酪氨酸残基的荧光，实验结果见图 5。在图 5 中最大发射波长没有随表柔比星浓度的增大发生明显的改变。这表明表柔比星对酪氨酸残基所处微环境的影响较小，由此可以判定表柔比星与 HSA 的结合位点应该是在 HSA 的色氨酸残基附近。当加入不同浓度顺铂时，表柔比星的同步荧光光谱无改变。

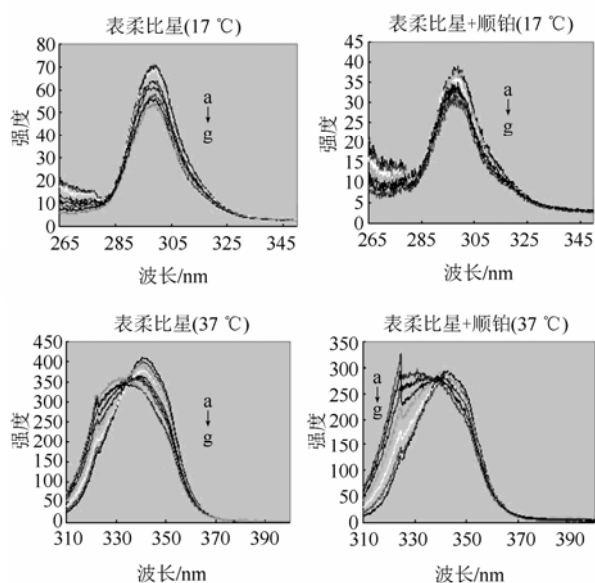


图 5 不同浓度的顺铂对表柔比星同步荧光光谱的影响

a→g: 顺铂浓度分别为 $0.05 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.08 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.10 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.12 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.15 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.18 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.20 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Fig. 5 Effect of different concentration of cisplatin at synchronous fluorescence spectra of epirubicin

a→g: concentration of cisplatin solution were $0.05 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.08 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.10 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.12 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.15 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.18 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.20 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

本实验利用荧光光谱，研究表柔比星与 HSA 的相互作用。表柔比星对 HSA 内源荧光的猝灭方式主要为静态猝灭，与 HSA 只有一个结合位点，主要作用力为静电引力，同步荧光扫描时酪氨酸残基的最大发射波长保持不变，而色氨酸残基的最大发射波长红移。

实验中发现，当加入顺铂后，表柔比星与 HSA 的结合位点数保持为 1，表柔比星与 HSA 的作用力类型不变，但它们间的结合常数随顺铂浓度增大而增大。使表柔比星不易从 HSA 解离，两者合用后，可能会影响表柔比星的体内代谢。

PREFERENCES

- [1] 殷明. 药理学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 8.
- [2] CARTER D C, CHANG B, HO J X, et al. Preliminary crystallographic studies of four crystal forms of serum albumin. [J]. Eur J Biochem, 1994, 226(3): 1049-1052.
- [3] FOGLI S, DONESI R, INNCCENTI F, et al. An improved HPLC method for therapeutic drug monitoring of daunorubicin, idarubicin, doxorubicin, epirubicin, and their 13-dihydro metabolites in human plasma [J]. Ther Drug Monit, 1999, 21(3): 367-375.
- [4] 何品刚, 刘祥萍, 余慧, 等. 电致化学发光法测定药剂中盐酸阿霉素的含量[J]. 分析化学, 28(9): 1062-1065.
- [5] YANG Z J, LIU S H, YE J N, et al. Voltammetric determination of doxorubicin hydrochloride with wax-impregnated graphite electrode [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 1996, 24(4): 471-474.
- [6] HU M, YANG X, JIN W J, et al. Studies on the style of interaction of pirarubicin with DNA by fluorescence spectra [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 1999, 34(8): 608-612.
- [7] YAN Y, PEI R H, YAN H T. Interaction between warfar in and bovine serum album in detected by spectrometry [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2008, 43(12): 1224-1227.
- [8] WEN X D, LI P, QIAN Z M, et al. Interaction between three antioxygenic micromolecules and bovine serum albumin [J]. Acta Chem Sin(化学学报), 2007, 65(5): 421-429.
- [9] ZHAO J, WANG Z, WU Q H, et al. Interaction between strychnine and bovine serum albumin [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2006, 41(7): 666-670.
- [10] LI R, DAI B C, ZHAO Y D, et al. Application and development of spectroscopy methodologies in the study on non-covalent interactions reactions [J]. Spectroscopy Spectr Anal(光谱学和光谱分析杂志), 2009, 29(1): 240-243.
- [11] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein associations: forces contributing to stability [J]. Biochemistry (生物化学杂志), 1981, 20(11): 3096-3102.
- [12] WANG C, WU Q H, LI C R, et al. Interaction of tetrandrine with human serum albumin: a fluorescence quenching study [J]. Analytic Sci, 2007, 23(4): 429-433.

收稿日期: 2014-04-26