

# 超临界流体色谱在手性药物拆分中的应用进展

夏爽<sup>1,2</sup>, 袁圆<sup>1,2</sup>, 潘桂湘<sup>1\*</sup>, 王晓明<sup>1</sup>

(1. 天津中医药大学, 天津市现代中药重点实验室 省部共建国家重点实验室培育基地, 天津 300193;  
2. 天津国际生物医药联合研究院, 天津 300457)

**[摘要]** 美国 FDA 规定, 新的手性药物上市之前必须要对其左旋体和右旋体进行有效的拆分, 并分别进行药效和毒性试验。近年来, 手性药物在市场中所占比重与日俱增, 但手性药物结构相似、分离困难, 因此手性拆分目前仍是药物分析工作的一个难点。超临界流体色谱 (Supercritical fluid chromatography, SFC) 是 20 世纪 80 年代逐渐发展和完善起来的一种以超临界流体作为流动相的色谱分析技术, 具有简单、快速、高效、经济和环保的特点, 其固定相和检测方式多样, 可开展手性药物的分析、半制备及制备等工作, 因而在手性药物拆分中得到越来越多的应用。本文将从超临界流体色谱的流动相、手性固定相及其在手性药物拆分中的应用三个方面进行简单的综述, 以利于 SFC 操作时进行流动相、固定相的选择和色谱条件优化。

**[关键词]** 超临界流体; 超临界流体色谱; 手性固定相; 手性拆分

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0217-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120217

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150428.1021.011.html>

**[网络出版时间]** 2015-04-28 10:21

## Recent Advances of Supercritical Fluid Chromatography as a Tool for Chiral Drugs Separation

XIA Shuang<sup>1,2</sup>, YUAN Yuan<sup>1,2</sup>, PAN Gui-xiang<sup>1\*</sup>, WANG Xiao-ming<sup>1</sup> (1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology and Medicine, Tianjin 300457, China)

**[Abstract]** The Food and Drug Administration (FDA, USA) has issued a guidance that only the therapeutically active enantiomer of a chiral drug be brought to market. Recently, chiral molecules occupy a large proportion of therapeutic agents, chiral drugs have similar structure so powerful means of chiral drug detection and separation are needed. Supercritical fluid chromatography (SFC) has several advantages over HPLC: reduced viscosity, which decreases the pressure drop across the column, allowing faster separation; increased diffusivity, which results in sharper peaks and, thus, increased resolution; lower solvent consumption and easy solute recovery, which makes SFC particularly useful in preparative modes. SFC is increasingly used for analytical, semi-preparative and preparative purification of chiral compounds, which makes it has attracted wide interests in the pharmaceutical analysis as a useful separation technique for enantioselective separations. This review focuses mainly on the examples of enantiomer separations by SFC with mobile phases and chiral stationary phases, so as to facilitate the selection of mobile phase and stationary phase and the optimization of chromatographic conditions.

**[Key words]** supercritical fluid; supercritical fluid chromatography; chiral stationary phase; enantioselective separations

目前临床上使用的药物约有 40% ~ 50% 是手性药物<sup>[1]</sup>。手性药物的药效可能是以下几种情况①只有一个对映体具有预期的药理活性, 而另一个则没有作用;②两个对映体具有相同或相近的药理活性;③各对映体药理活性相同

但作用强度不同;④两个对映体药理活性不同, 其中一个可能是其消旋体药物不良反应的根源<sup>[2]</sup>。在药代动力学方面, 手性药物也可能在体内的吸收、分布、代谢和排泄中表现出一定的立体选择性。因此进行手性药物的拆分, 对药物的

**[收稿日期]** 20140627(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81001633, 81173523, 81303182); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09101202); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB723504)

**[第一作者]** 夏爽, 在读硕士, 从事体内药物分析研究, Tel: 18322693383, E-mail: xs200805\_happy@163.com

**[通讯作者]** \* 潘桂湘, 博士, 副研究员, 从事体内药物分析研究, Tel: 13652068752, E-mail: guixiangp@163.com

质量控制及药效评价具有重要的意义<sup>[3]</sup>。

超临界流体色谱(SFC)最早由 Klesper E 等人<sup>[4]</sup>在1962年提出,但早期由于设备很难控制超临界流体压力,常导致色谱分离性能不稳定,从而阻碍了该技术的推广和应用<sup>[5]</sup>。近些年来,随着流体传输设计、温度和压力控制等技术的创新,SFC压力得以精准控制,加之超临界流体具有扩散和传质速率快、黏度低的特点,可弥补GC和HPLC手性分析功能上的不足。本文就SFC的流动相、手性固定相及在手性药物拆分中的应用进行了综述。

## 1 超临界流体色谱的流动相

超临界流体是介于气体和液体之间的流体<sup>[6]</sup>,兼有液体和气体的优点。许多物质都能达到超临界流体状态,目前已确定临界参数的物质有1 000多种,如CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>O、C<sub>3</sub>H<sub>12</sub>、SF<sub>6</sub>、CCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>、CHF<sub>3</sub>等。其中以CO<sub>2</sub>最为常用<sup>[7]</sup>,这主要是因为①CO<sub>2</sub>达到临界状态是31.1℃和73.8 bar,较其他许多液体容易达到超临界状态;②CO<sub>2</sub>无毒、不易燃;③CO<sub>2</sub>是一种化学纯度高、稳定且非极性的溶剂;④CO<sub>2</sub>与大多数的LC检测器兼容,并且MS友好;⑤CO<sub>2</sub>是一种绿色溶剂,可以从工业废气中回收,此外CO<sub>2</sub>在室温下是气体状态,样品的分离纯化可以节省大量的能量和时间。

超临界CO<sub>2</sub>流体的极性较低,为了增加流动相对极性化合物的溶解和洗脱能力,常加入一定量的极性溶剂作为改性剂(如甲醇、乙醇、异丙醇及乙腈等)。Miller L<sup>[8]</sup>在用SFC制备分离几个合成化合物的对映异构体时,最初采用甲醇、异丙醇作为改性剂,发现化合物在流动相中的溶解性差、峰形不好,改用二氯甲烷或二氯甲烷与其他改性剂合用,可增大外消旋体的溶解性,提高产率并减少有机溶剂的使用。在分离酸性或碱性化合物时,在流动相中常加入微量的添加剂(如乙酸、三氟乙酸、二乙胺及三乙胺等)以改善色谱峰形,这样既可覆盖固定相表面的活性位点,又可增加流动相的洗脱强度和选择性<sup>[9]</sup>。Ye Y K等<sup>[10]</sup>用Chiralpak AD、AD-H柱分析一些酰胺类化合物的对映异构体时,发现加入少量的脂肪族或芳香胺可以提高分离度。Stringham R W<sup>[11]</sup>用乙磺酸作添加剂成功分离了碱性化合物。

## 2 超临界流体色谱的手性固定相

SFC的手性固定相(CSP<sub>s</sub>)是在HPLC和GC手性固定相的基础上发展起来的,目前市面上有大量商品化的SFC手性固定相可供选择,文献报道的达1 500多种<sup>[12]</sup>,大致分以下几种:大分子键合(聚糖类CSP<sub>s</sub>)、大环类键合(环糊精CSP<sub>s</sub>和大环抗生素CSP<sub>s</sub>)、小分子键合(Pirkle型CSP<sub>s</sub>)。

**2.1 聚糖及其衍生物类手性固定相** 聚糖类CSP<sub>s</sub>是目前应用最广泛的SFC手性固定相,包括直链淀粉衍生物和纤维素衍生物两种<sup>[13]</sup>,载样量大,分离的化合物范围广。具有氢键供受体或者能与羰基形成偶极作用的基团的化合物,如醇类、胺类、氨基酸类以及芳香化合物,均能利用这类CSP<sub>s</sub>进行分离<sup>[14]</sup>。Chiralpak AD, Chiralpak AS, Chiralcel OD及Chiralcel OS是应用较多的聚糖类CSP<sub>s</sub>。

**2.2 环糊精类手性固定相** 环糊精(Cyclodextrins)是由不

同数目的吡喃葡萄糖单元以 $\alpha$ -1,4-糖苷键相连并互为椅式构象的环状寡糖化合物。环糊精分子成桶状,内部是葡萄糖苷高密度电子云形成的疏水阱,边缘排布着多指针样的羟基,各类水溶性及水不溶性的手性药物均能与其形成非对映体复合物<sup>[12]</sup>。环糊精类手性固定相能有效分离烃类、醇类、胺类、卤化物、羧酸、氨基酸、芳香化合物等手性药物。

**2.3 大环抗生素类手性固定相** 大环抗生素类手性固定相是一种新的手性固定相,它含有几个乃至十几个手性中心及众多的功能团(如环状结构、芳香基、氨基及羟基等),目前其应用范围还相对较小。瑞斯托菌素A、万古霉素、替考拉宁及替考拉宁甘元4种类型的固定相已实现商品化<sup>[15]</sup>。

**2.4 Pirkle型手性固定相** Pirkle型手性固定相是通过将单分子层的手性有机分子通过一个连接臂键合到硅胶载体上而制得<sup>[16]</sup>。Pirkle型手性固定相具有柱容量高、对映体选择性好,分子设计性强等优点,已在SFC中得到应用。Pirkle型手性固定相一般只对具有芳香性的手性化合物具有一定的分离能力,极性更强的物质通常在进样前先转化为弱极性的衍生物后再进行分离,因此应用范围受到一定的限制<sup>[17]</sup>。

## 3 超临界流体色谱在手性药物拆分中的应用

**3.1 SFC与HPLC、GC分离性能的比较** HPLC是手性药物拆分应用最广泛的方法,很多学者比较了SFC与HPLC在手性拆分方面的异同。Chennuru L N等<sup>[18]</sup>应用新一代的手性柱ChiralpakIA, ChiralpakIB及ChiralpakIC,比较在LC及SFC两种分离模式下,6种质子泵抑制剂——奥美拉唑、兰索拉唑、雷贝拉唑、泮托拉唑、泰妥拉唑、艾普拉唑的对映选择性。结果显示,在LC及SFC模式下,各对映异构体的洗脱顺序是相同的;3种手性柱的分离效能由高到低是ChiralpakIC > ChiralpakIA > ChiralpakIB。此外,该研究还考察了改性剂及柱温对分离的影响,结果发现2种模式下改性剂为乙醇时分离效果最好,柱温升高→保留时间缩短→分辨率升高,但对映体的选择性影响并不大。Wang Z等<sup>[19]</sup>利用手性SFC及手性LC分别在正相、反相以及极性有机相模式下对Nutlin-3的对映异构体进行分离,结果发现Chiralcel OD为色谱柱的手性SFC分离的选择性和分离效能最好,进一步优化色谱条件后,在75 min内纯化了5 g的外消旋混合物,回收率高于92%。Frenkel J等<sup>[20]</sup>分别用GC、LC及SFC分离了海洋硅藻中的一种二酮哌嗪信息素的2种对映异构体:Cyclo(d-Pro-d-Pro)和Cyclo(l-Pro-l-Pro),GC和LC用不同的环糊精手性固定相均没能实现此对映异构体的分离,SFC以直链淀粉衍生物为手性固定相,异丙醇为改性剂,在4 min内实现了上述2种对映异构体的分离。多数情况下对于同一化合物SFC和HPLC都有较好的分离效能,但是SFC在流动相的流速、分离时间及有机溶剂的消耗方面要明显的优于HPLC,且有时在HPLC难以实现手性分离的情况下,SFC仍能提供较好的分离度。

制备SFC与制备HPLC相比具有如下几个优势:①流动相CO<sub>2</sub>的分子扩散性能高,优化条件速度快;②流动相的黏度低,允许在更快的流速下操作,产量更高;③SFC用于制

备,有机溶剂的用量很少,流动相的主要成分  $\text{CO}_2$ ,在常压下就可以挥发出去,解决了制备 HPLC 溶剂残留的问题,适于一些功能性产品的制备<sup>[21]</sup>。Toribio L 等<sup>[22]</sup>用半制备 SFC 分离阿苯达唑亚砷的 2 个对映异构体,采用 Chiralpak AD(10 mm × 250 mm)手性柱,考察不同进样体积对产率和纯度的影响,最终选择最大载样量进样。Toribio L 等<sup>[23]</sup>用半制备 SFC 分离奥美拉唑对映异构体,采用 Chiralpak AD(10 mm × 250 mm)手性柱,考察 2 种改性剂(乙醇和异丙醇)、进样体积及进样浓度对对映异构体产率的影响,结果发现 25% 乙醇为改性剂分离效果较好,浓度过载的效果要好于体积过载。以上研究表明制备 SFC 的进样方式,对产率和纯度具有很大的影响。

**3.2 SFC 色谱条件的优化** SFC 溶剂的洗脱强度取决于超临界流体  $\text{CO}_2$  的密度与改性剂的极性,而  $\text{CO}_2$  的密度与压力和温度直接相关。Toribio L<sup>[24]</sup>等用 Chiralpak AD-直链淀粉-三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)柱考察了流动相及柱温对唑类化合物对映异构体分离的影响,结果表明,醇型改性剂的分离效能优于乙腈;化合物芳环及二氧戊环的数量越多,在 Chiralpak AD 的保留越强;柱温升高,手性分离的选择性降低。Huang J 等<sup>[25]</sup>采用 SFC 对 6 个新型的 1-取代苯基-4-[3-(吡啶-4-氧基)-2-羟丙基]-哌嗪类的消旋体进行手性拆分,分别考察了 3 种键合型多糖手性固定相(Chiralpak I A, Chiralpak I B, Chiralpak I C)、改性剂(乙腈、甲醇、异丙醇、乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃)、柱压以及柱温等对分离的影响,结果显示,改性剂组成是影响分离时间的重要因素;柱温对分离时间的影响较小,但能明显影响对映异构体的分离选择性。戴涛等<sup>[26]</sup>进行了齐留通对映体的 SFC 分离,从 5 种手性柱中筛选出分离效果最佳的色谱柱,并在该柱上考察改性剂的种类和含量、温度及背压对分离度的影响,其留通对映体的最佳分离度是 11.5,该方法显著缩短了分离时间并提高了分离度。Bhavyasri K 等<sup>[27]</sup>通过填充柱 SFC 分离了氯吡格雷对映异构体,从 11 种手性柱中筛选出了分离效能最好的 Chiralcel OD-H 柱,并研究了改性剂、进样溶剂、温度、压力及流体的密度对分离的影响,结果发现改性剂的种类及在流动相中的含量,对分离效果的影响要比温度及压力的影响大。Lakshmi Maddala V 等<sup>[28]</sup>运用 SFC 分离并制备孟鲁司特的 S-对映异构体,考察了不同色谱柱及流动相对分离的影响,最终采用半制备柱 Chiral AS-H(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相  $\text{CO}_2$ -2 丙醇(85:15),制得 S-孟鲁司特,经 FT-IR, ESI-MS, HPLC 和  $^1\text{H-NMR}$  确证,其纯度达 98%。Wang C<sup>[29]</sup>等用 10 根手性柱分离 11 个手性药物的对映异构体,以 20% 的甲醇为流动相,考察压力(100,125,150,175,200 bar)对分辨率的影响,结果显示压力从 100 bar 升到 200 bar 分辨率仅变化了 6%。由上述实例可见,改性剂对分离效果的影响要比温度及压力的影响大;柱温对分离时间的影响较小,但能最大程度的影响对映异构体的分离选择性;压力对分离度的影响较小。

**3.3 SFC 二维色谱技术** 传统的一维色谱技术峰容量不

足、分辨率与灵敏度较低、峰重叠现象严重,而二维色谱技术具有高通量、高峰容量、高分辨率等优点,在复杂样品分析方面具有较大的优势。二维色谱分为离线和在线两类。在离线模式中,将第一维的组分依次收集,并分别进入第二维进一步分离。离线模式操作简单,每一维分离条件可独立优化。在线模式是将第一维馏分中感兴趣的组分直接切入第二维进行分离,或者利用特殊的接口交替收集第一维的组分,并按一定的频率进入第二维进行分离。根据第一维馏分是否全部转移到第二维,二维色谱可分为传统二维色谱技术和全二维色谱<sup>[30]</sup>。2DSFC 在手性药物的分离和分析方面要优于 HPLC,因为 SFC 能更好的解决第一维和第二维的溶剂兼容性问题。Alexander A J 等<sup>[31]</sup>用非手性柱/手性柱串联的 SFC/MS 分离了手性药物合成产物的 4 个异构体(包括两对对映异构体),均能实现基线分离,这种方式能明显提高各对对映异构体及同分异构体之间的分离度,并且与单根色谱柱分析相比没有明显增加分析时间。Zeng L 等<sup>[32]</sup>建立了一种 2D SFC/SFC/MS 纯化药品以及分析对映异构体的方法,此系统整合了非手性分析和手性分析 2 个独立的过程,一次运行就可以完成从复杂混合物中分离药物的外消旋体以及对映异构体的分析。

#### 4 小结

SFC 简单、快速、高效、经济和环保,虽然不能完全取代 GC 和 HPLC,但却是此二者的一个重要补充技术。SFC 已逐渐应用于药物研发中手性药物的分析、半制备及制备过程。目前,已有大量的 SFC 手性固定相研发和应用,以聚糖类手性固定相应用最为广泛。随着色谱技术的不断发展以及人们对绿色环保的追求,超临界流体色谱在手性药物的分析方面必将越来越受到药物分析工作者的青睐。

#### [参考文献]

- [1] 李阳, 罗素琴, 刘乐乐, 等. 手性药物的合成与拆分的进展[J]. 内蒙古医科大学学报, 2014, 36(1):74-78.
- [2] 张怡评, 洪专, 方华, 等. 超临界流体色谱分离技术应用研究进展[J]. 中医药导报, 2012, 18(7):89-91.
- [3] 武洁, 冯芳. 超临界流体色谱法分离手性药物[J]. 药学进展, 2004, 28(7):300-304.
- [4] Klesper E, Corwin A H, Turner D A, et al. High-pressure gas chromatography above critical temperature [J]. J Org Chem, 1962(27):700-701.
- [5] Bronz I. Yesterday, today and tomorrow of supercritical fluid extraction and chromatography [J]. J Am Chem Soc, 2012, 3(12):867-869.
- [6] 李娴, 解新安. 超临界流体的理化性质及应用[J]. 化学世界, 2010, 51(3):179-182.
- [7] Saito M. History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development [J]. J Biosci Bioeng, 2013, 115(6):590-599.
- [8] Miller L. Use of dichloromethane for preparative

- supercritical fluid chromatographic enantioseparations [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1363(10):323-330.
- [9] De Klerck K, Mangelings D, Clicq D, et al. Combined use of isopropylamine and trifluoroacetic acid in methanol containing mobile phases for chiral supercritical fluid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1234(20):72-79.
- [10] Ye Y K, Lynam K G, Stringham R W, et al. Effect of amine mobile phase additives on chiral subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1041(1):211-217.
- [11] Stringham R W. Chiral separation of amines in subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases and acidic additives [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1070(1/2):163-170.
- [12] De Klerck K, Mangelings D, Vander Heyden Y, et al. Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2012, 69:77-92.
- [13] Speybrouck D, Corens D, Argouillon J M, et al. Screening strategy for chiral and achiral separations in supercritical fluid chromatography mode [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 12(11):1250-1263.
- [14] 唐敏, 林汉森, 郑澄, 等. 多糖及其衍生物色谱手性固定相的研究进展 [J]. *今日药学*, 2010, 20(1):7-15.
- [15] Plotka J M, Biziuk M, Morrison C, et al. Pharmaceutical and forensic drug applications of chiral supercritical fluid chromatography [J]. *Trends Analyt Chem*, 2014, 56:74-89.
- [16] Holzheuer W B, Wong M M, Webster G K, et al. Evaluation of Pirkle stationary phases in chiral method development screening for compounds of pharmaceutical interest [J]. *Curr Pharm Anal*, 2009, 5(1):10-20.
- [17] 张俊俊. 多糖衍生物及 Pirkle 型手性固定相的制备及分离性能 [D]. 武汉: 武汉工程大学, 2013.
- [18] Chennuru L N, Choppari T, Duvvuri S, et al. Enantiomeric separation of proton pump inhibitors on new generation chiral columns using LC and supercritical fluid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(18):3004-3010.
- [19] Wang Z, Jonca M, Lambros T, et al. Exploration of liquid and supercritical fluid chromatographic chiral separation and purification of Nutlin-3—A small molecule antagonist of MDM2 [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45(5):720-729.
- [20] Frenkel J, Wess C, Vyverman W, et al. Chiral separation of a diketopiperazine pheromone from marine diatoms using supercritical fluid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 951-952(1):58-61.
- [21] Welch C J, Leonard W R, DaSilva J O, et al. Preparative chiral SFC as a green technology for rapid access to enantiopurity in pharmaceutical process research [J]. *LC GC North America*, 2005, 23(1):16-29.
- [22] Toribio L, Nozal M J, Bernal J L, et al. Use of semipreparative supercritical fluid chromatography to obtain small quantities of the albendazole sulfoxide enantiomers [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1011(1):155-161.
- [23] Toribio L, Alonso C, Del Nozal M J, et al. Semipreparative enantiomeric separation of omeprazole by supercritical fluid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1137(1):30-35.
- [24] Toribio L, Bernal J L, Martín M T, et al. Effects of organic modifier and temperature on the enantiomeric separation of severalazole drugs using supercritical fluid chromatography and the Chiralpak AD column [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(1):152-158.
- [25] Huang J, Yuan M. Separation of substituted phenylpiperazine derivatives with immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases by supercritical and subcritical fluid chromatography [J]. *J Chin Pharmaceu Sci*, 2013, 22(3):244-250.
- [26] 戴涛, 黄珺珺, 季红, 等. 超临界流体色谱拆分齐留通对映体 [J]. *华西药理学杂志*, 2012, 27(1):67-69.
- [27] Bhavyasri K, Rambabu D, Prasad P S S, et al. Separation of Enantiomers of Clopidogrel on Chiral Stationary Phases by Packed Column Supercritical Fluid Chromatography [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 4(1):51-55.
- [28] Lakshmi Maddala V, Kumar Kakumani K, Rao Chimalakonda K, et al. Isolation and Characterization of S-Enantiomer in Montelukast [J]. *Am J Anal Chem*, 2013, 4(1):56-61.
- [29] Wang C, Zhang Y. Effects of column back pressure on supercritical fluid chromatography separations of enantiomers using binary mobile phases on 10 chiral stationary phases [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1281(15):127-134.
- [30] 沈保家, 秦昆明, 刘启迪, 等. 二维色谱技术及其在中药领域中的应用 [J]. *中国科学: 化学*, 2013, 43(11):1480-1489.
- [31] Alexander A J, Staab A. Use of achiral/chiral SFC/MS for the profiling of isomeric cinnamitrile/hydrocinnamitrile products in chiral drug synthesis [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(11):3835-3838.
- [32] Zeng L, Xu R, Zhang Y, et al. Two-dimensional supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for the enantiomeric analysis and purification of pharmaceutical samples [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(20):3080-3088.

[责任编辑 顾雪竹]