

· 药物代谢 ·

超滤法结合替代对照品 HPLC 测定大蒜辣素 与大鼠及人血浆的蛋白结合率

马雪红¹, 王健¹, 耿晶¹, 李新霞^{1*}, 陈坚²

(1. 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆埃乐欣药业有限公司, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的:测定大蒜辣素与大鼠及人血浆的蛋白结合率,为大蒜辣素的成药性研究提供参考。方法:以羟苯乙酯为替代对照品,采用 C₁₈ 色谱柱,流动相甲醇-1% 甲酸梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,结合超滤法对大蒜辣素与大鼠及健康人血浆的蛋白结合率进行测定。结果:测得 75, 150, 300 mg·L⁻¹ 大蒜辣素溶液与大鼠和人血浆蛋白结合率分别为 23.2%, 19.8%, 28.1% 及 15.5%, 25.8%, 40.0%。结论:大蒜辣素与大鼠及人的血浆蛋白结合率均较低,替代对照品 HPLC 可用于测定大蒜辣素的血浆蛋白结合率。

[关键词] 大蒜辣素; 血浆蛋白结合率; 替代对照品; 羟苯乙酯; 羟苯丁酯; 超滤法

[中图分类号] R969.1; R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0105-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050105

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160120.1455.018.html>

[网络出版时间] 2016-01-20 14:55

Determination of Human and Rat Plasma Protein Binding of Allicin by Ultrafiltration and HPLC with Alternative Reference

MA Xue-hong¹, WANG Jian¹, GENG Jing¹, LI Xin-xia^{1*}, CHEN Jian²

(1. Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Xinjiang Ailexin Pharmaceutical Co. Ltd., Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To determine human and rat plasma protein binding rate of allicin, and provide a reference for research of allicin into medicinal properties. **Method:** With ethylparaben as an alternative reference, C₁₈ column was used, mobile phase was methanol-1% formic acid for gradient elution in a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength was 254 nm. **Result:** With different concentration of allicin including 75, 150, 300 mg·L⁻¹, protein binding rates of allicin in rat and human plasma were 23.2%, 19.8%, 28.1% and 15.5%, 25.8%, 40.0%, respectively. **Conclusion:** Allicin has low level in binding to plasma protein of human and rat. HPLC with ethylparaben as alternative reference can be used to determine plasma protein binding rate of allicin.

[Key words] allicin; plasma protein binding rate; alternative reference; ethylparaben; butylparaben; ultrafiltration

大蒜辣素是大蒜中有效成分^[1],由蒜酶催化蒜氨酸(S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷,alliin)产生,其形

成过程见图 1^[2]。大蒜辣素性质不稳定,体外稳定性研究表明室温下大蒜辣素的半衰期 2~16 h,在大

[收稿日期] 20150626(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260486)

[第一作者] 马雪红,在读硕士,从事药物分析研究,Tel:0991-3929119,E-mail:mxh6867@163.com

[通讯作者] *李新霞,博士,教授,从事天然产物开发及仪器分析研究,Tel:0991-4365034,E-mail:lx6668@163.com

蒜汁或破碎的大蒜中其半衰期 2.4 d, 在大蒜汁的稀释液(1:1)中半衰期 22 d, 表明大蒜辣素在水溶液中较稳定; $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻可使大蒜辣素的半衰期延长至 40 d^[3], 说明大蒜辣素对照品不易获得。

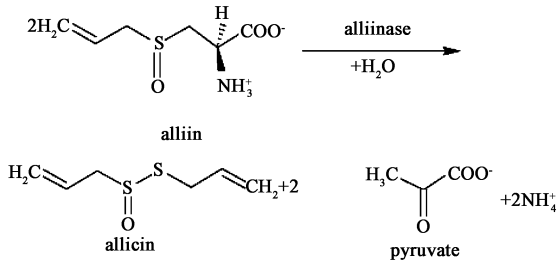


图 1 蒜氨酸与蒜酶的化学反应

Fig. 1 Chemical reaction of alliin and alliinase

文献及部分国家药典中多以替代对照品法测定大蒜药材或提取物中大蒜辣素的含量。欧洲药典(EP8.0)中收录的“garlic powder”中^[4]以大蒜辣素作为大蒜粉的质控指标,以羟苯丁酯为替代对照品 HPLC 测定大蒜辣素的含量,按羟苯丁酯 1 mg 相当于大蒜辣素 8.65 mg 来计算。袁耀佐等^[5]认为欧盟药典方法分析时间长,蒜辣素与羟苯丁酯之间的色谱保留相差太大(大蒜辣素在 5 min 左右出峰时,羟苯丁酯的出峰时间约 23 min),因此选择以羟苯乙酯为替代对照品,测得羟苯乙酯 1 mg 相当于大蒜辣素 4.71 g;建立了流动相甲醇-水等度洗脱测定法,该方法中测定大蒜辣素和内标羟苯乙酯出峰时间分别为 5.693, 8.398 min, 出峰时间较早,缩短了分析时间。目前文献报道测定大蒜辣素含量的方法多为非生物样品测定^[6-12], 而生物样品中定量测定大蒜辣素含量的方法鲜有报道。

测定血浆蛋白结合率的常用方法主要有平衡透析法、超滤法、微透析法、凝胶过滤法等^[13]。平衡透析法及微透析法样品采集时间长,不适用于不稳定性药物的测定;而超滤法^[14]设备简单、操作方便,可实现血浆中游离药物的快速分离,仅十几至几十分钟可收集到足够测定的血浆超滤液。大蒜辣素血浆蛋白结合率的研究尚未见报道,考虑到大蒜辣素的不稳定性,本实验选择超滤法为大蒜辣素血浆蛋白结合率的测定方法,建立替代对照品羟苯乙酯 HPLC 测定生物样品中大蒜辣素的分析方法,测定替代对照品羟苯乙酯与大蒜辣素之间的校正因子,测定大蒜辣素不同种属(大鼠、人)血浆蛋白结合率,为该成分的成药性研究提供参考。

1 材料

AB135-S 型分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公

司), Multifuge X-3R 型低温离心机(美国 Thermo Fisher 公司), 2690 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, 配备 2478 型双波长检测器), Milli-Q 型超纯有机物超纯水机(美国 Millipore 公司)。

聚醚砜超滤离心管(德国 Sartorius 公司, 截留相对分子质量 5 000 Da), 蒜氨酸、蒜酶(新疆埃乐欣药业有限公司, 批号分别为 20140825, 20140421), 羟苯丁酯(德国 ABCR GmbH&Co. KG, 批号 1028679), 羟苯乙酯(上海山浦化工有限公司, 批号 20121201), 无水甲酸(沈阳市新西试剂厂, 批号 20120208), 水为自制去离子水, 乙腈及甲醇均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

SPF 级 SD 大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 由新疆医科大学动物实验中心提供, 合格证号 SCXK(新)2011-0004, 动物使用许可证 SYXK(新)2011-0004, 饲养环境为每天光照 12 h, 温度(21 ± 2) °C, 湿度 40% ~ 45%。人血浆由新疆医科大学第一附属医院体检科提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 替代对照品溶液 精密称取羟苯丁酯 23.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 得 0.23 g · L⁻¹ 对照品溶液。精密称取羟苯乙酯 25.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 得 0.25 g · L⁻¹ 对照品溶液。

2.1.2 大蒜辣素对照溶液 取蒜氨酸对照品溶液和蒜酶溶液各 10 mL 置锥形瓶中, 混匀, 25 °C 水浴反应 30 min, 反应液置超滤离心管中于 10 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 过滤, 取滤液, 经 HPLC 测定, 得 0.43 g · L⁻¹ 大蒜辣素对照溶液。

2.1.3 大鼠血浆 SD 大鼠经乙醚麻醉后腹主动脉取血, 置于肝素管中, 离心(3 000 r · min⁻¹, 10 min, 下同), 分离上层血浆, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

2.1.4 人血浆 成年健康志愿者取血置于肝素管中, 离心, 分离上层血浆, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

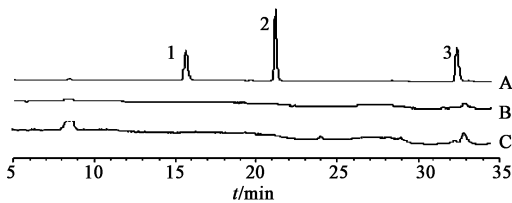
2.2 样品的前处理 取生物样品 0.2 mL 置于离心管中, 加入乙腈 0.6 mL, 涡旋混匀, 加入羟苯乙酯对照品溶液 20 μL, 于 2 °C, 15 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液进样分析。

2.3 大蒜辣素与羟苯乙酯间校正因子的测定

2.3.1 色谱条件 Hpyersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 参照《欧盟药典》8.0, 流动相甲醇(A)-1%甲酸(B)梯度洗脱(0 ~ 6 min, 20% ~ 30% A; 6 ~ 8 min, 30% ~ 35% A; 8 ~ 12 min, 35% A;

12 ~ 18 min, 35% ~ 50% A; 18 ~ 23 min, 50% A; 23 ~ 26 min, 50% ~ 60% A; 26 ~ 28 min, 60% A; 28 ~ 32 min, 60% ~ 65% A; 32 ~ 35 min, 65% ~ 70% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL。

分别取大蒜辣素对照溶液、羟苯丁酯及羟苯乙酯对照品溶液混匀, 经前处理后进样分析; 取空白大鼠血浆和空白人血浆各 0.2 mL, 经前处理后进样分析, 见图 2。结果表明在该色谱条件下, 空白大鼠及人血浆在羟苯丁酯出峰处有干扰, 但在大蒜辣素及羟苯乙酯出峰处均无干扰, 故选择羟苯乙酯为替代对照品。



A. 混合溶液; B. 空白大鼠血浆; C. 空白人血浆; 1. 大蒜辣素; 2. 羟苯丁酯; 3. 羟苯乙酯

图 2 大蒜辣素的 HPLC 专属性考察

Fig. 2 HPLC chromatograms of specificity of allicin

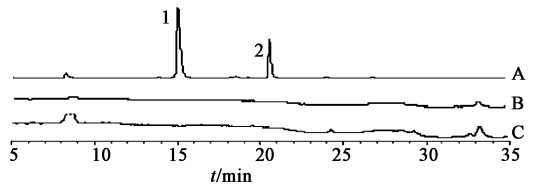
2.3.2 标准曲线的绘制 分别配制羟苯丁酯及羟苯乙酯系列质量浓度的对照品溶液, 分别按《欧盟药典》8.0 和 2.3.1 项下色谱条件测定, 以羟苯丁酯峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得羟苯丁酯在不同条件下的回归方程分别为 $Y = 120\ 942X - 151\ 159$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 90\ 734X - 88\ 843$ ($r = 0.999\ 2$), 表明羟苯丁酯在 2.30 ~ 115 mg·L⁻¹ 线性关系良好。以羟苯乙酯峰面积为纵坐标, 对质量浓度为横坐标进行线性回归, 得在不同条件下的回归方程分别为 $Y = 138\ 714X + 29\ 307$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 112\ 247X + 988.9$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 2.50 ~ 125 mg·L⁻¹。

2.3.3 校正因子的测定 配制低、中、高质量浓度的羟苯丁酯和羟苯乙酯对照品溶液, 分别在《欧盟药典》8.0 及 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算羟苯乙酯对羟苯丁酯的校正因子, 结果表明在 2 种色谱条件下, 羟苯乙酯 1 mg 均相当于羟苯丁酯 1.25 mg; 而在《欧盟药典》色谱条件下, 羟苯丁酯 1 mg 相当于大蒜辣素 8.65 mg, 换算成 2.3.1 项下色谱条件下, 羟苯乙酯 1 mg 相当于大蒜辣素 10.8 mg。

2.4 血浆中大蒜辣素的含量测定

2.4.1 专属性 取大蒜辣素对照溶液和羟苯乙酯对照品溶液混合, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 空白

大鼠血浆和空白人血浆经前处理后进样测定, 见图 3。



1. 大蒜辣素; 2. 羟苯乙酯

图 3 混合溶液 (A), 空白大鼠血浆 (B) 及空白人血浆 (C) 的 HPLC 专属性考察

Fig. 3 HPLC chromatograms of mixed solution (A), blank rat plasma (B) and blank human plasma (C)

2.4.2 线性关系考察 取空白大鼠血浆 200 μL, 分别加入不同质量浓度大蒜辣素溶液 20 μL, 得质量浓度分别为 37.5, 75, 150, 225, 300, 375 mg·L⁻¹ 的系列溶液, 按 2.2 项下方法进行处理后测定, 以大蒜辣素与羟苯乙酯的峰面积比值为纵坐标, 大蒜辣素质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 0.003\ 9X - 0.046\ 6$ ($r = 0.999\ 1$), 表明大蒜辣素在 37.5 ~ 375 mg·L⁻¹ 呈良好线性关系。

2.4.3 定量限与检测限 取大蒜辣素对照溶液适量, 用空白大鼠血浆逐级稀释, 以 S/N = 5 计, 测得大蒜辣素定量限 4.25 mg·L⁻¹; 以 S/N = 3 计算得大蒜辣素检测限 2.05 mg·L⁻¹。

2.4.4 精密度试验 制备低、中、高 (75.0, 150, 300 mg·L⁻¹) 质量浓度样品溶液, 1 d 内重复测定 5 次, 计算不同质量浓度日内精密度的 RSD 分别为 4.8%, 5.6%, 3.6%; 每天测定 1 个分析批, 连续测定 5 d, 计算不同质量浓度日间精密度的 RSD 分别为 7.2%, 9.3%, 6.7%。

2.4.5 重复性试验 制备低、中、高 (75.0, 150, 300 mg·L⁻¹) 质量浓度样品溶液, 每一质量浓度连续测定 5 次, 计算重复性的 RSD 分别为 2.6%, 2.8%, 4.9%。

2.4.6 提取回收率试验 取空白大鼠血浆 15 份, 每份 200 μL, 分别加入乙腈 600 μL, 涡旋混匀 2 min, 离心 (12 000 r·min⁻¹, 2 °C, 10 min, 下同), 取上清液 200 μL, 分别加入低、中、高质量浓度的大蒜辣素对照溶液各 20 μL, 得质量浓度分别为 75.0, 150, 300 mg·L⁻¹ 的样品溶液, 涡旋混匀 2 min, 加入羟苯乙酯对照品溶液 20 μL, 混匀, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 记录大蒜辣素与羟苯乙酯的峰面积比 (R_s), 每个质量浓度平行制备 5 份。另取空白大鼠血浆 15 份, 每份 200 μL, 分别加入低、中、高质量浓

度的大蒜辣素对照溶液各 20 μL , 分别加入乙腈 600 μL , 涡旋混匀 2 min, 加入羟苯乙酯对照品溶液 20 μL , 离心, 取上清液测定, 记录大蒜辣素与羟苯乙酯的峰面积比 (R_f)。以 R_f/R_s 计算大蒜辣素平均提取回收率 90.6%, RSD 6.5%。按上述方法测定羟苯乙酯的提取回收率 90.1%, RSD 3.4%。

2.4.7 样品稳定性试验 制备低、中、高 (75.0, 150, 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 质量浓度样品溶液, 分别置于室温及 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 于 0, 2, 4, 6, 8 h 取样按 2.3.1 项下色谱条件测定, 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下大蒜辣素含量的 RSD 分别为 2.1%, 3.2%, 2.4%; 室温条件下 RSD 分别为 13.9%, 12.6%, 12.2%; 样品置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻 24 h 后于室温下溶解, 经前处理后进样测定, 反复测定 3 次, RSD 分别为 56.1%, 27.3%, 15.7%。表明大蒜辣素样品溶液在 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下较稳定, 不适宜室温保存, 反复冻融对大蒜辣素含量影响大。因此在测定大蒜辣素含量时, 样品应在 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 不宜进行反复冻融, 样品处理后 1 次完成测定。

2.5 大蒜辣素大鼠及人血浆蛋白结合率的测定

2.5.1 超滤条件的确定 取大鼠血浆 0.5 mL 于超滤管内, 分别离心 (6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 2 $^{\circ}\text{C}$) 10, 20, 30, 40 min, 得超滤液, 依据超滤液体积与超滤前总体积之比 0.3~0.6 为宜的标准, 确定超滤条件为在 2 $^{\circ}\text{C}$, 6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min。

2.5.2 超滤膜回收率考察 超滤管中分别加入低、中、高质量浓度的大蒜辣素溶液 400 μL 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏条件下饱和 24 h, 吸出溶液, 用滤纸吸干滤膜, 加入相应浓度的大蒜辣素溶液进行离心, 取超滤液 200 μL 经前处理后进样测定, 结果表明大蒜辣素平均滤膜回收率 > 94%, 提示药物与超滤管结合部分可忽略不计。

2.5.3 蛋白结合平衡时间的选择 取质量浓度 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的含药大鼠血浆适量, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育, 分别于 0, 5, 10, 20, 30 min 量取 0.4 mL 于超滤管内, 离心, 取超滤液 0.2 mL 进行前处理后进样分析。蛋白结合平衡时间结果表明孵育 5 min 后大蒜辣素质量浓度下降明显, 5~20 min 变化不大, 考虑到大蒜辣素的稳定性, 选择 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 5 min 作为平衡时间。

2.5.4 蛋白结合率测定 取质量浓度分别为 75, 150, 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的含药大鼠血浆 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后, 置超滤管内离心, 取超滤液进行前处理后进样分析, 每个质量浓度平行测定 5 份, 按 $\text{PB} = (C_i -$

$C_{\text{ub}})/C_i \times 100\%$ 计算血浆蛋白结合率, 结果见表 1。式中 PB 为血浆蛋白结合率, C_i 为含药血浆中大蒜辣素质量浓度, C_{ub} 含药血浆超滤液中大蒜辣素质量浓度。

表 1 大蒜辣素与大鼠、人血浆的蛋白结合率 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Plasma protein binding rates of allicin in human and rat plasma ($\bar{x} \pm s, n=5$)

大蒜辣素/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	人	大鼠
75	15.5 \pm 1.22	23.2 \pm 5.35
150	25.8 \pm 9.93	19.8 \pm 2.20
300	40.0 \pm 2.67	28.1 \pm 3.75

结果表明大蒜辣素在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下, 与人、大鼠血浆的蛋白结合率均约 20%, 为低度结合率。经 SPSS 17.0 软件统计分析, 低、中、高质量浓度的大蒜辣素人血浆蛋白结合率有极显著性差异, 在 37.5~375 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 无饱和现象, 且随着质量浓度的增大, 结合率增大; 大鼠血浆蛋白结合率在不同质量浓度下无显著性差异。此外, 在相同质量浓度下, 不同种属的血浆蛋白结合率有显著性差异, 大蒜辣素的人血浆蛋白结合率较大。

3 讨论

本文建立了已替代对照品羟苯乙酯测定大鼠及人血浆中大蒜辣素含量的方法, 为后续对大蒜辣素进行药理学及体内分布代谢研究提供一定的基础, 并且测得了在该色谱条件下, 羟苯乙酯 1 mg 相当于大蒜辣素 10.8 mg。药物血浆蛋白结合率是药代动力学的重要参数之一, 会影响药物在体内的分布、排泄和代谢速率, 对药物的消除半衰期也有影响, 更重要的是其与药物的药理作用强度密切相关, 本文测定了不同质量浓度的大蒜辣素在大鼠及人的血浆蛋白结合率, 可为后续大蒜辣素成药性研究奠定基础。

目前大蒜辣素已是公认的大蒜发挥药效作用的活性成分, 有学者认为大蒜辣素是可能的硫化氢 (H_2S) 供体药物^[15], 而 H_2S 是继内源性一氧化氮、一氧化碳之后, 研究人员所关注的第 3 个气体信号分子^[16], 研究表明体内含硫氨基酸代谢产生的 H_2S 可对神经系统和心血管系统起调节作用, 因此对影响大蒜辣素成药性因素之一的血浆蛋白结合率测定有非常重要的意义。

[参考文献]

[1] 常军民, 向阳, 王岩, 等. 蒜酶催化蒜氨酸反应产物的 HPLC-MS 分析[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 485-486.

- [2] 赵东升,李新霞,张海波,等. 以大蒜辣素为指标研究大蒜质量标准 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33 (9): 1587-1592.
- [3] Block E, Ahmad S, Catalfamo J L, et al. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: structural, mechanistic, and synthetic studies [J]. Am Chem Soc, 1986, 108 (22): 7045-7055.
- [4] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia 8. 0 [S]. Strasbourg: Council of Europe, 2013; 1254.
- [5] 袁耀佐,顾洁,杭太俊,等. 用替代对照品羟苯乙酯高效液相色谱方法测定大蒜辣素 [J]. 分析化学, 2008, 36 (8): 1083-1088.
- [6] Miron T, Shin I, Feigenblat G, et al. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercapto-pyridine with thiosulfonates [J]. Anal Biochem, 2002, 307 (1): 76-83.
- [7] 黄洪勇,唐辉,崔利娜,等. 4-巯基嘧啶紫外分光光度法测定大蒜中硫代亚磺酸酯的含量 [J]. 中草药, 2007, 26 (7): 798-802.
- [8] 唐辉,黄洪勇,陈坚,等. 4-巯基嘧啶紫外法定量测定鲜蒜中蒜辣素 [J]. 食品科技, 2007 (4): 183-186.
- [9] Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, et al. A spectrophotometric assay for allicin and alliinase (alliin lyase) activity: reaction of 2-nitro-5-thiobenzoate with thiosulfonates [J]. Anal Biochem, 1998, 265 (2): 317-325.
- [10] 丁良,于朝云,杨慧,等. 大蒜油中大蒜辣素的薄层扫描法测定 [J]. 中成药, 2007, 29 (2): 305-306.
- [11] 赵东升,李新霞,张海波,等. 以大蒜辣素为指标研究大蒜质量标准 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33 (9): 1587-1592.
- [12] Herwig J, Bernd M, Karl K. Allicin characterization and its determination by HPLC [J]. Planta Med, 1987, 53 (6): 559-562.
- [13] 刘睿,谢跃生,潘桂湘,等. 药物血浆蛋白结合率测定方法的研究进展 [J]. 天津中医药, 2007, 24 (6): 526-528.
- [14] 景春杰,陈晓辉,刘璇,等. 丹酚酸 B 与大鼠血浆蛋白结合率的测定 [J]. 药学学报, 2010, 45 (3): 343-346.
- [15] Gloria A, Giuseppe L, Robert W, et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic [J]. PANS, 2007, 104 (46): 17977-17982.
- [16] 黄晓伟,姚玲玲,姚泰,等. 外源性 H₂S 在大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 复旦大学: 医学版, 2008, 35 (2): 216-219.

[责任编辑 刘德文]