

· 论 著 ·

5-氟尿嘧啶分子印迹传感器的制备与应用研究*

吴显兰¹, 李柏松², 张继旺¹, 李英杰¹, 李 远^{1△}, 袁永强^{1▲}

(1. 重庆医科大学附属永川医院中心实验室, 重庆 402160; 2. 重庆市疾病预防控制中心 400010)

摘要:目的 研究一种用于检测抗肿瘤药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)血药浓度的方法。方法 以 5-FU 为模板分子,吡咯为单体,采用循环伏安法于玻碳电极上构建一种选择性检测 5-FU 的分子印迹传感器。对分子印迹传感器制备过程中的条件进行优化;以铁氰化钾溶液为探针溶液,使用差分脉冲伏安法(DPV)对分子印迹传感器的性能进行研究。结果 在优化后的实验条件下,5-FU 浓度的负对数在(1×10^{-8})~(1×10^{-3})mol/L 范围内与传感器差分脉冲伏安的峰电流差值呈线性关系,5-FU 的检出限为 0.646×10^{-8} mol/L,在血浆实际样品中测得的 5-FU 回收率为 90%~97%,制得的传感器对 5-FU 具有良好的选择性、稳定性及重现性。结论 该实验构建的传感器具有较低的检测限,操作简便,成本低,选择性好,将来有望用于抗肿瘤药物 5-FU 血药浓度的监测。

关键词:5-氟尿嘧啶; 血药浓度; 吡咯; 电化学传感器; 分子印迹

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.04.005 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)04-0466-04

Preparation and Application of 5-fluorouracil molecularly imprinted Polymer sensor*

WU Xianlan¹, LI Baisong², ZHANG Jiawang¹, LI Yingjie¹, LI Yuan^{1△}, YUAN Yongqiang^{1▲}

(1. Central Laboratory of Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China;

2. the Centers for Disease Control and Prevention of Chongqing, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To develop a method for detecting the concentration of 5-fluorouracil in plasma. Methods A molecularly imprinted electrochemical sensor of 5-fluorouracil was prepared on the surface of glassy carbon electrode by cyclic voltammetry using 5-fluorouracil as template molecule and pyrrole as functional monomer. The preparation condition of sensor was optimized and the performance of the molecularly imprinted electrochemical sensor was measured by differential pulse voltammetry in 1 mmol/LK₃[Fe(CN)₆]-0.1 mol/L KCl solution. Results The negative logarithm of 5-fluorouracil concentration was linear to the DPV peak current in the rang from 1×10^{-8} to 1×10^{-3} mol/L with a detection limits of 0.646×10^{-8} mol/L, under the optimized preparation parameters. The recovery rate was 90%~97% in the plasma contain 5-fluorouracil. Molecularly imprinted electrochemical sensor of 5-fluorouracil has good selectivity, stability and reproducibility. Conclusion The sensor has the advantage of low detection limits, handiness, low cost, good selectivity, the molecularly imprinted electrochemical sensor of 5-fluorouracil can use to detect the clinical plasma concentration of 5-fluorouracil in future.

Key words:5-fluorouracil; plasma concentration; pyrrole; electrochemical sensor; molecularly imprinting

5-氟尿嘧啶(5-FU)是最早应用于肿瘤治疗中的一类抗代谢药物,具有很好的抗肿瘤效果,已广泛用于各种实体肿瘤的治疗,尤其在消化道肿瘤的治疗方面占主导地位,但由于其治疗指数低,半衰期短,吸收不稳定等特点,导致必须长时间静脉给药才能维持一定的血药浓度,且临床有效剂量与中毒剂量十分相近,易发生不良反应^[1-3]。为了达到最佳治疗效果和减少不良反应,在使用 5-FU 治疗时,血药浓度监测成为治疗中的一个特殊、必要的环节;根据 5-FU 血药浓度来调整 5-FU 用药剂量,并使之维持在有效的浓度范围,可以达到进一步提高疗效及减少不良反应的目的^[4-7]。

目前氟尿嘧啶血药浓度监测使用最多的方法是高效液相色谱法(HPLC)、紫外分光光度法^[8-13]。高效液相色谱法虽然应用最广,检测结果精准可靠,但对样品纯度要求较高,无法满足大批量样本快速监测的需要。紫外分光光度法虽然简单、操作快速,但检测结果不精确,若有杂质或辅料在该波长有吸收,则结果偏高。分子印迹聚合物具有较强的特异性分子识别能力,且耐高温、高压、酸碱腐蚀,在制备不同传感器方面已得到

广泛应用,由于兼具操作方便,造价低廉,易于自动化等优势,基于电化学聚合法所制备的印迹传感膜近年来得到迅速发展^[14-16]。已有关于氟尿嘧啶的电化学控制释放的相关报道^[17]。但目前无 5-FU 电化学传感器的相关研究。本研究采用循环伏安法,以 5-FU 为模板分子,吡咯为聚合单体,构建测定 5-FU 的分子印迹敏感膜电化学传感器^[18]。整个过程无需衍生化处理,响应快,成本低,选择性良好,可满足氟尿嘧啶的血药浓度监测,有望成为新的监测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 CS350 电化学工作站序列号:CS3501407069(武汉科思特仪器有限公司,用三电极系统行电化学测试;玻碳电极(GCE)为工作电极,银氯化银电极(玻璃型 ϕ 4)为参比电极,铂丝电极[ϕ (0.5×37)mm]为对电极,SB-5200DTDN 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),S20 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司),吡咯(Aladdin 试剂),5-FU 99% aladdin 试剂,铁氰化钾 aladdin 试剂,其余试剂均为分析纯,实验用水均为 2 次蒸馏水。

* 基金项目:重庆市自然科学基金项目(cstc2012jjA10046);重庆市永川区创新能力建设平台项目(Ycstc2014bf5001);重庆医科大学附属永川医院院级重点研究资助项目(YJZD201302)。

作者简介:吴显兰,女,主要从事电化学生物传感器制备与临床检验应用研究。△ 通信作者,E-mail:liyuan_1985999@163.com;

▲ 通信作者,E-mail:sS2yyyq@163.com。

1.2 玻碳电极的预处理 裸玻碳电极依次用 0.30、0.05 μm 粒度的 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 抛光粉研磨抛光,依次用 2 次蒸馏水、无水乙醇、2 次蒸馏水超声清洗 5 min,自然晾干,将电极置入 1 mol/L H_2SO_4 中,采用循环伏安法(扫描范围: $-1\sim 1\text{ V}$, 频率 200 Hz, 速率 100 mV/s)扫描 20 次激活,得到稳定的阴、阳极峰对称的循环伏安图,2 次蒸馏水冲洗干净,将激活电极置入蒸馏水中待用。

1.3 分子印迹膜及非印迹膜的制备 以 5-FU 为模板分子,吡咯为单体,用循环伏安法扫描聚合得到 MIP。将含研磨抛光并激活的电极的三电极系统置入 pH4.2 的含 0.002 5 mol/L 的 5-FU、0.05 mol/L 吡咯的醋酸-醋酸钠缓冲液中,用循环伏安法扫描 10 圈,扫描电压范围 $0\sim 1\text{ V}$,扫描速度 50 mV/s,在玻碳电极上制得含有 5-FU 的分子印迹膜。同样条件下,不加入模板分子 5-FU,制得不含 5-FU 的非印迹膜电极。将制得的含 5-FU 的分子印迹膜电极的三电极系统置入 0.5 mol/L NaOH 溶液中,用循环伏安法扫描 20 圈洗脱模板分子,扫描电压范围 $-0.5\sim 0.9\text{ V}$,扫描速度 50 mV/s,扫描完后 2 次蒸馏水冲洗干净,制得含有 5-FU 分子构型空腔的分子印迹膜。见图 1。

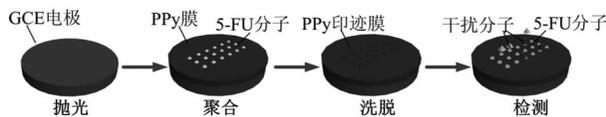


图 1 分子印迹传感器制备原理图

1.4 检测方法 室温条件下将制得的含有 5-FU 分子构型孔穴的分子印迹膜置入浓度为 1×10^{-9} 的 5-FU 溶液中吸附 20 min,使 5-FU 与分子印迹膜的孔穴充分作用,再取出吸附了 5-FU 的分子印迹电极,2 次蒸馏水冲洗干净,自然晾干。置入 1.0 mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]+0.1\text{ mol/L KCl}$ 的探针溶液中,采用差分脉冲伏安法进行检测,检测电压范围 $-0.2\sim 0.5\text{ V}$,电位增量 0.004 V,振幅 0.02 s,频率 5 Hz,检测完后用 2 次蒸馏水清洗干净,以备下一次使用。

2 结果

2.1 分子印迹膜的研制过程图 扫描第 2 圈时电压开始下降,最后降至 1 个固定值。此时将制得的分子聚合膜置入含 1.0 mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]+0.1\text{ mol/L KCl}$ 的探针溶液检测发现电流变化很小;将制得的分子聚合膜按照上述方法洗脱后,置入含 1.0 mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]+0.1\text{ mol/L KCl}$ 的探针溶液检测发现电流升高,但比裸电极的电流低;将洗脱后带有孔穴的印迹分子置入含 $(1\times 10^{-9})\text{ mol/L}$ 5-FU 的 NaOH 溶液吸附 20 min,吸附后表征电流变化,吸附后电流比洗脱后电流低;非印迹电极在聚合、洗脱、吸附过程中电流均无明显变化。将制得的聚吡咯分子印迹膜于电镜下扫描可知,聚吡咯能很好地聚合在玻碳电极上,说明分子印迹膜制备成功。见图 2~4。

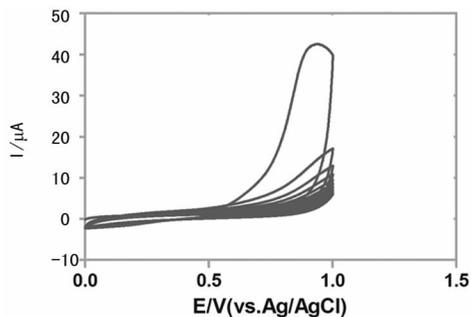


图 2 电聚合循环伏安图

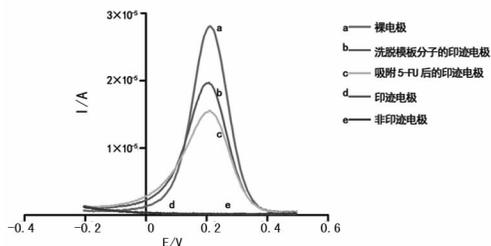


图 3 不同电极的差分脉冲伏安图

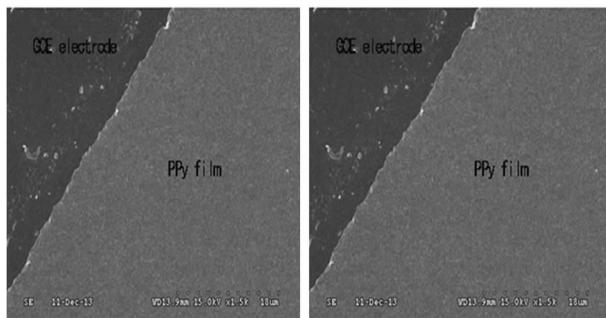
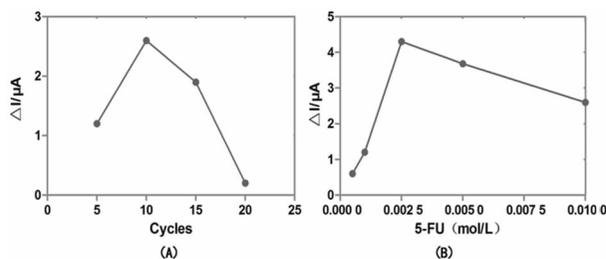


图 4 电镜扫描下的 PPy 膜

2.2 实验条件的优化过程

2.2.1 聚合时间的优化 在聚合过程中,膜的厚度很重要,膜的过厚过薄均会影响样品的检测,制得厚度合适的聚合膜需通过控制聚合时间实现,而聚合时间则可通过改变扫描的圈数实现。图 4(A)所示,当聚合圈数为 10 圈时,表征的差值电流最大,故本实验制备传感器时选择 10 圈为聚合圈数。

2.2.2 模板分子(5-FU)浓度的优化 聚合过程中,合适的 5-FU 浓度有利于聚合时形成更多结合位点,浓度过高过低均可影响聚合效果,故需对 5-FU 浓度进行优化。配置不同浓度的 5-FU,分别为 0.000 5、0.001 0、0.002 5、0.005 0、0.010 0 mol/L,其他条件不变的情况下,用 5 支电极按照上述实验方法制备不同厚度的分子印迹膜,表征制得的分子印迹膜,当 5-FU 浓度为 0.002 5 mol/L 时,差值电流最大,如图 4(B)所示,故选择 0.002 5 mol/L 为 5-FU 的最佳浓度。



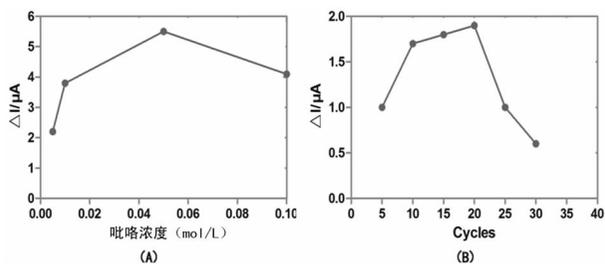
注:A 为聚合时间的优化;B 为模板分子(5-FU)。

图 5 5-FU 分子印迹电化学传感器实验条件优化

2.2.3 单体(吡咯)浓度的优化 吡咯浓度的高低可影响聚合膜的形成,需对吡咯浓度进行优化,配置不同浓度的吡咯,分别为 0.005、0.010、0.050、0.100 mol/L,其他条件不变,4 支电极按照上述实验方法制得不同厚度的分子印迹膜,当吡咯浓度为 0.050 mol/L 时,差值电流最大,如图 5(A)所示,说明吡咯浓度为 0.050 mol/L 时,膜的厚度适中,膜的性能最佳,故选择 0.050 mol/L 为吡咯的最佳浓度。

2.2.4 洗脱时间优化图 本实验采用的洗脱方法为电化学法洗脱,洗脱时间长短可影响聚合膜的效果,故对洗脱时间进行优化非常必要,改变洗脱时循环伏安法的圈数来改变洗脱时间。在其他条件不变的情况下,改变洗脱的圈数,制得不同的

分子印迹聚合物。当洗脱圈数为 20 圈时,差值电流最大,如图 5(B)所示,因此采用 20 圈为洗脱时间。



注:A 为单体(吡咯)浓度的优化;B 为脱时间优化图。

图 6 5-FU 分子印迹电化学传感器实验条件优化

2.2.5 吸附时间的确定 在上述优化条件下制得的分子印迹膜置入一定浓度的 5-FU 溶液中吸附,每隔 5 min 取出,2 次蒸馏水冲洗干净,自然晾干,于探针溶液中用差分脉冲伏安法表征,20min 后峰电流及差值电流趋于稳定,故选择 20 min 为最佳吸附时间。见图 6。

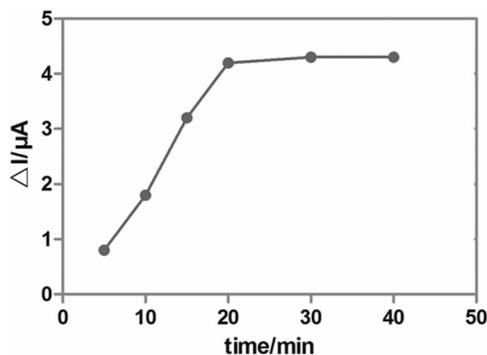


图 7 吸附时间的优化图

2.3 分子印迹传感器的电化学响应及标准曲线 在上述最优条件下制备分子印迹膜,配置不同浓度的 5-FU,用制备的分子印迹膜电极对不同浓度的 5-FU 进行吸附 20 min,对吸附的电极用差分脉冲伏安法进行表征,将洗脱后印迹膜电极的峰电流和吸附不同浓度的 5-FU 印迹膜电极峰电流的差值电流(ΔI),与 5-FU 浓度的负对数作图,可制得测定 5-FU 浓度的标准曲线,5-FU 在(1×10⁻⁸)~(1×10⁻³)mol/L 之间与 ΔI 呈线性关系,线性方程为 Y = -1.27X + 10.41, R² = 0.996, 5-FU 的检出限为(0.646×10⁻⁸)mol/L。见图 7。

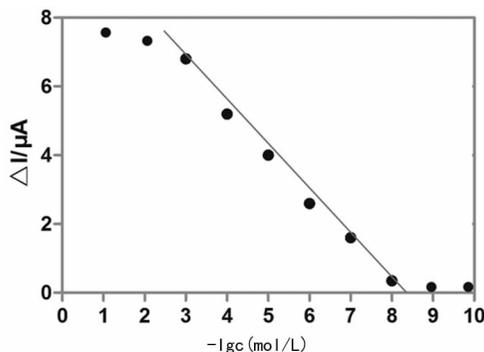


图 8 差值电流与 5-FU 浓度负对数的关系曲线

2.4 分子印迹膜的选择性 为验证分子印迹传感器的选择性,选择与氟尿嘧啶结构相似的替加氟,以及抗代谢类的抗肿瘤药物甲氨蝶呤、硫唑嘌呤进行实验,按照上述制备分子印迹传感器的方法制备 4 支分子印迹膜电极及 4 支非分子印迹膜电极,分别配置(1×10⁻⁵)mol/L 浓度的氟尿嘧啶、替加氟、甲

氨蝶呤、硫唑嘌呤,将 4 支分子印迹膜和 4 支非分子印迹膜电极分别于上述溶液中吸附 20 min,取出晾干,以铁氰化钾为探针溶液,采用差分脉冲伏安法对其进行测定,5-FU 的响应电流最大,故该印迹膜对 5-FU 的选择性较好。见图 8。

2.5 分子印迹传感器的重现性与稳定性 将已制得的分子印迹传感器对 5-FU 进行检测,检测后洗脱、晾干再进行检测,反复进行 20 次检测,每次检测的电流基本不变,说明制得的分子印迹传感器的重现性较好。另将制得的分子印迹传感器放置于空气中 10 d,10 d 内每隔 2 d 对传感器进行一次检测,10 d 后的检测电流可达到初始电流的 98% 以上,结果表明制得的 5-FU 分子印迹传感器重现性及稳定性均较好。见图 9。

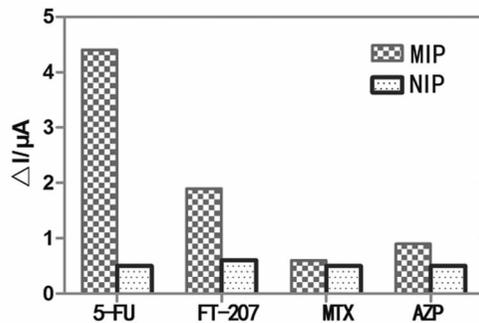


图 9 分子印迹传感器的选择性

2.6 样品分析 取健康者血浆,分别加入(1×10⁻⁵)、(1×10⁻⁶)、(1×10⁻⁷) mol/L 的 5-FU,将制得的分子印迹膜电极置入各个浓度中吸附 20 min,再以铁氰化钾为探针溶液,采用差分脉冲伏安法进行测定,可得出响应电流,每个浓度平行测定 3 次,取平均值,根据其线性方程计算回收率,回收率为 90%~97%,RSD 为 2.5%~10.5%,可以满足实际样品测定,而实际 5-FU 的血药浓度范围为(19×10⁻⁵)~(28×10⁻⁵) mol/L,可以用于血药浓度监测。见表 1。

表 1 血浆中 5-FU 的回收率

样品	加标量 (mol/L)	标准电流 (μA)	实测电流 (μA)	回收率 (%)	RSD (%)
血清	1×10 ⁻⁵	4.00	3.80	95	5.0
	1×10 ⁻⁶	2.73	2.66	97	2.5
	1×10 ⁻⁷	1.52	1.36	90	10.5

2.7 检测方法比较 本方法与其他方法比较,具有更低的检出限,可检测出更低浓度的 5-FU,具有更宽的线性范围,可检测更宽的 5-FU 浓度,更加适用于 5-FU 血药浓度的监测。见表 2。

表 2 不同方法检测血浆 5-FU 结果比较

检测方法	线性范围(mol/L)	最低检出限 (mol/L)	参考文献
高效液相色谱法	(3.69×10 ⁻⁶)~(4.72×10 ⁻⁴)	3.69×10 ⁻⁶	[19]
紫外分光光度法	(3.26×10 ⁻⁵)~(1.63×10 ⁻⁴)	3.26×10 ⁻⁵	[20]
本方法	(1.00×10 ⁻⁸)~(1.00×10 ⁻³)	0.646×10 ⁻⁸	

3 讨论

首先,在制备分子印迹传感器的聚合过程中,需要对其进行电化学聚合,可在电极表面形成致密不导电的聚合膜,阻止吡咯的进一步氧化,从而使得循环伏安法的电压逐渐减小,最

后为固定值。通过把制得的分子聚合膜进行洗脱、吸附后表面显示,聚合后电流小,而洗脱后电流有所升高,但比裸电极的电流低,说明通过电化学洗脱后,在电极表面形成带有空腔的印迹分子,由于其具有空腔,探针溶液可经过空腔自由进出,在电极表面形成氧化还原反应,从而产生电流,与聚合膜比较,其电流升高;但由于只是些孔穴,进出的探针分子比裸电极少,从而形成的电流比裸电极的电流低。吸附后电流比洗脱后电流低,说明溶液中的 5-FU 分子与分子印迹膜的孔穴结合,导致孔穴数量减少,进出孔穴的探针分子减少,电极表面的氧化还原反应相应减少,从而电流相应降低。非印迹电极由于在裸电极表面形成一层致密的聚吡咯膜,经洗脱后不能形成空腔印迹膜,故探针分子不能达到电极表面发生氧化还原反应,不能产生相应的电流变化。

其次,在制备分子印迹膜过程中,影响膜的制备的因素众多,因此需对实验条件进行逐一优化,在聚合时间上:聚合时间过短,聚合膜太薄,形成的空腔印迹分子太少,影响对样品的检测;聚合时间过长,形成的聚合膜过厚,不易洗脱,形成的空腔分子也较少,同样影响分子印迹膜的电流响应;故需通过实验确定聚合时间。合适的 5-FU 浓度有利于聚合时形成更多结合位点,浓度过低,可能导致单体直接聚合形成聚合膜,从而影响传感器的性能;浓度过高,会阻碍单体与模板分子的有效结合,所以对 5-FU 浓度进行优化。洗脱时间太短,导致洗脱不彻底,一些模板分子并未被释放出来,有效的印迹位点较少,洗脱时间太长,则导致洗脱过度,甚至会导致聚吡咯被一起洗脱,形成的有效位点仍少,故需对洗脱时间进行优化。本实验结果表明,随着时间的延长,峰电流逐渐减小,差值电流逐渐增大,表明印迹分子的孔穴逐渐被模板分子(5-FU)占据,20 min 后,电流不再减小,差值电流不再增大,趋于稳定,说明此时印迹分子的孔穴已完全被模板分子占据,峰电流及差值电流均不再变化,故确定 20 min 为洗脱时间。

本研究分子印迹传感器是基于分子形象记忆现象制得,整个聚合过程将模板分子与单体通过立体结构形成的特异性识别位点进行固定,模板分子被去除后在分子印迹聚合膜上留下与模板分子相匹配的孔穴,可识别特异的模板分子,故具有良好的选择性。为了验证此传感器的选择性,本研究进行了验证选择性实验,结果显示 5-FU 的响应电流最大,说明 5-FU 分子与印迹膜的孔穴匹配,吸附于印迹膜的 5-FU 较多,而甲氨蝶呤和硫唑嘌呤响应电流很小,说明这 2 种物质和分子印迹膜上的孔穴结构不匹配,而替加氟响应电流较其他 2 种物质稍大,其原因为替加氟与 5-FU 结构较为相似,有少量替加氟吸附于分子印迹膜上。

本实验结果证实,制得的传感器线性范围广,检出限低,回收率高,制备简单,操作方便,稳定性、重现性及再生性好,在监测 5-FU 血药浓度方面具有较高的应用价值。

参考文献

[1] Shinji K, Asuka H, Mayu T, et al. Effects of a bolus injection of 5-fluorouracil on dihydropyrimidine dehydrogenase activity in rats receiving continuous infusion of 5-fluorouracil[J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2016, 29(5):1-7.

[2] 孙维彤,陈倩倩,张娜,等. 5-氟尿嘧啶前体药物研究进展[J]. *生命的化学*, 2014, 34(2):269-274.

[3] 杨贤,葛卫红. 5-氟尿嘧啶剂量选择研究进展[J]. *中国药*

房, 2013, 28(40):3838-3840.

[4] 蔡讯,薛鹏,宋卫峰,等. 氟尿嘧啶血药浓度监测在进一步提高晚期结直肠癌以氟尿嘧啶为基础的化疗中的作用[J]. *中华肿瘤杂志*, 2012, 34(1):39-43.

[5] Ma Y, Lin Y, Zou B, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analyses of 5-Fluorouracil in east-asian patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. *Clinical Pharmacokinetics*, 2016, 20(8):1-12.

[6] 李刚,王继红,王珊,等. 氟尿嘧啶治疗妇科滋养细胞肿瘤剂量的个体化研究[J]. *河南大学学报(医学版)*, 2013, 14(4):270-272.

[7] 蔡讯,薛鹏,宋卫峰,等. 氟尿嘧啶血药浓度监测在进一步提高晚期胃癌化疗疗效及减少不良反应预测中的作用[J]. *肿瘤*, 2011, 31(10):930-936.

[8] Marangon E, Posocco B, Mazzega E, et al. Development and validation of a High-Performance liquid Chromatography-Tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of irinotecan and its main metabolites in human plasma and its application in a clinical pharmacokinetic study [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2):194586.

[9] 邓斌,任斌,黎曙霞,等. 高效液相色谱法测定人体 5-氟尿嘧啶血药浓度[J]. *中国药房*, 2002, 13(6):350-351.

[10] 姚水宝,杨水新. 高效液相色谱法测定人血清中 5-氟尿嘧啶的浓度[J]. *中国药房*, 2001, 12(4):227-228.

[11] 钱瑾,吴慧哲,詹丽芬. 高效液相色谱法测定大鼠体内 5-氟尿嘧啶的血药浓度及药代动力学研究[J]. *中国医科大学学报*, 2006, 35(1):36-37.

[12] Woo YA, Kim GH, Jeong EJ, et al. Simultaneous determination of doxifluridine and 5-fluorouracil in monkey serum by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 75(2):487-492.

[13] 王嫦鹤,郭欢迎,吴沛佳,等. 氟尿嘧啶注射液含量测定方法的研究[J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(7):558-561.

[14] 郭秀春,王继磊,王海辉,等. 分子印迹电化学传感器[J]. *化学研究*, 2016, 19(1):1-11.

[15] 吴莹. 分子印迹电化学传感器的研究[D]. 长春:吉林大学, 2014.

[16] Peng YY, Wu ZB, Liu ZG. An electrochemical sensor for paracetamol based on an electropolymerized molecularly imprinted o-phenylenediamine film on a multi-walled Carbon nanotube modified glassy Carbon electrode[J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(15):5673-5681.

[17] 黄华,刘柏峰. 氟尿嘧啶的电化学控制释放[J]. *分析化学*, 1996, 24(2):130-134.

[18] 李永舫. 导电聚吡咯的研究[J]. *高分子通报*, 2005, 13(4):51-57.

[19] 叶丽卡,谢志红,陈瑞卿. 高效液相色谱法测定人血浆中 5-FU 的浓度[C]. 广州:广东省药师周大会, 2012.

[20] 刘英,蒋雪涛,鲁莹. 紫外分光光度法测定 5-氟尿嘧啶微乳的含量研究[J]. *中国新药杂志*, 2000, 9(7):464-465.