

色谱柱及标准曲线的选择对 HPGPC 法测定 右旋糖酐分子量及分子量分布的影响

程冬

(江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210019)

摘要 目的: 比较不同色谱柱及标准曲线的选择对高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 法测定右旋糖酐分子量及分子量分布的影响。方法: 分别采用 TSK G4000 PWXL、SHODEX OHPAK SB-803 HQ 和 Agilent PL AQUAGEL-OH MIXED-M 3 种色谱柱对样品进行测定, 选择已知分子量的右旋糖酐分子量标准 (套) D1~D8 系列对照品进行标准曲线的组合, 采用 GPC 软件对结果进行分析, 计算分子量及分子量的分布。结果: 3 种色谱柱对右旋糖酐分子量与分子量分布的测定结果有显著差异, 重均分子量 (M_w) 相对偏差达到 3%, 数均分子量 (M_n) 相对偏差达到 12%, 峰位相对分子质量 (M_p) 相对偏差达到 25%, 多分散性 (D) 相对偏差达到 16%; 标准曲线的选择结果比较中, 相对偏差达到 10%。结论: 不同色谱柱及标准曲线的选择对右旋糖酐分子量与分子量分布的测定结果有一定的影响。

关键词: 右旋糖酐; 分子量; 分子量分布; 高效凝胶渗透色谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2020) 02-0367-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.02.23

Influence of different chromatograph columns and standard curves on molecular mass and molecular mass distribution of dextran by HPGPC

CHENG Dong

(Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019, China)

Abstract Objective: To study the influence of different chromatograph columns and standard curves on molecular mass and molecular mass distribution of dextran by high performance gel permeation chromatography (HPGPC). **Methods:** Molecular mass and molecular mass distribution of dextran were determined by HPGPC with TSK G4000 PWXL, SHODEX OHPAK SB-803 HQ and Agilent PL AQUAGEL-OH MIXED-M columns, respectively. Selected dextran standard (set) D1-D8 series of reference materials with known molecular weight for the combination of standard curves, and then compare the results calculated by different series of standard curves that handled with the WATERS GPC softwares. **Results:** There were obvious differences between results of different chromatograph columns. The deviation of weight average molecular mass (M_w) was up to 3%, the number average molecular mass (M_n) and the peak molecular mass (M_p) were up to 12% and 25%, respectively, and the molecular mass distribution width (D) between three columns was up to 16%. The deviation of different series

作者 Tel: 18115988501; E-mail: dillon 2015@126.com

of standard curves was up to 10%. **Conclusion:** There are differences in the determination of molecular mass and molecular mass distribution by different chromatograph columns and standard curves.

Keywords: dextran; molecular mass; molecular mass distribution; high performance gel permeation chromatography

《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》) 2015 年版收录的右旋糖酐 20 和右旋糖酐 40^[1], 均由肠膜状明串珠菌 L-M-1226 号菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 发酵后生成的高分子葡萄糖聚合物经处理精制而得^[2]。右旋糖酐常作为血容量补充药和血浆替代制品中的主要成分^[3-4], 具有调节渗透压、维持血压^[5]、改善循环等作用^[6]。《中国药典》对右旋糖酐品种项下的重均分子量 (M_w) 范围有不同的要求。本文采用高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 法^[7], 参照《中国药典》标准, 对 2 种右旋糖酐的原料进行分子量与分子量分布的测定。《中国药典》推荐使用 TSK G PWXL 和 SHODEX OHPAK SB HQ 色谱柱, 本文对上述 2 种色谱柱以及 Agilent PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱的测定结果进行了比较^[8-9]。同时, 《中国药典》规定选用 4~5 种已知分子量的右旋糖酐对照品制备标准曲线^[10-11], 故本文也比较了标准曲线的选择对测定结果的影响。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪 (配备 Waters 2414 示差检测器, Waters 公司); TSK G4000 PWXL 色谱柱 (TSK 公司); SHODEX OHPAK SB-803 HQ 色谱柱 (SHODEX 公司); Agilent PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱 (Agilent 公司); METTLER XPE-105 十万分之一电子天平 (Mettler 公司); Waters GPC 数据分析软件 (Waters 公司)。

1.2 试剂

右旋糖酐分子量标准 (套) 对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号 140637~646-201203 (右旋糖酐 D0 M_p 180, 右旋糖酐 D1 M_p 2 700, 右旋糖酐 D2 M_p 5 250, 右旋糖酐 D3 M_p 9 750, 右旋糖酐 D4 M_p 13 050, 右旋糖酐 D5 M_p 36 800, 右旋糖酐 D6 M_p 64 650, 右旋糖酐 D7 M_p 135 350, 右旋糖酐 D8 M_p 300 600, 右旋糖酐 D2000 M_p 2 000 000); 硫酸钠和叠氮化钠均为分析纯; 超纯水由 Millipore 超纯水系统制备。

1.3 样品

右旋糖酐 20 (批号 TD2001-0319) 和右旋糖酐

40 (批号 TD4001-1019), BOMEI 公司。

2 试验方法

2.1 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱: TSK G4000 PWXL (300 mm × 7.8 mm, 10 μ m), SHODEX OHPAK SB-803 HQ (300 mm × 8.0 mm, 6 μ m), Agilent PL AQUAGEL-OH MIXED-M (300 mm × 7.5 mm, 8 μ m); 检测器: 示差折光检测器, 检测池温度 35 $^{\circ}$ C; 流动相: 0.71% 硫酸钠溶液 (内含 0.02% 叠氮化钠); 流速: 0.5 mL · min⁻¹; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 分别称取右旋糖酐 20、右旋糖酐 40 约 100 mg, 加流动相溶解并定容至 10 mL, 静置过夜待用。

2.2.2 系列对照品溶液 称取已知分子量的右旋糖酐分子量标准 (套) D0~D8 和 D2000 系列对照品适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 10 mg 的溶液, 静置过夜待用。

2.3 线性关系考察

精密量取上述系列对照品溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 采用 GPC 软件对结果进行分析, 绘制标准曲线, 以对照品重均分子量 (M_w) 的对数值 $\lg M_w$ 为纵坐标 (Y), 保留时间 (t) 为横坐标 (X), 线性回归方程: $\lg M_w = a + bt$ 。

2.4 色谱柱的选择

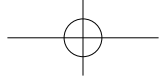
分别采用 TSK G4000 PWXL、SHODEX OHPAK SB-803 HQ 和 Agilent PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱, 对样品进行测定, 考察不同色谱柱对测量结果的影响。

2.5 精密度试验

取右旋糖酐 40 供试品溶液, 采用 TSK G4000 PWXL 色谱柱, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 采用 GPC 软件对结果进行分析, 计算分子量与分子量分布。

2.6 重复性试验

称取右旋糖酐 40 6 份, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液并进样, 采用 TSK G4000 PWXL 色谱柱进行测定, 记录色谱图, 采用 GPC 软件对结果进行分



析,计算分子量与分子量分布。

2.7 稳定性考察

取右旋糖酐 40 供试品溶液,采用 TSK G4000 PWXL 色谱柱,分别于 0、2、4、6、10、14、18、24 h 进样,记录色谱图,采用 GPC 软件对结果分析,计算分子量与分子量分布。

3 结果与讨论

3.1 试验方法学结果

3.1.1 系统适用性 供试品溶液主峰和右旋糖酐 D1~D8 系列对照品溶液主峰保留时间应在右旋糖酐 D0 和 D2000 对照品峰保留时间范围内。理论塔板数按右旋糖酐 D0(葡萄糖)峰计,TSK G4000 PWXL 色谱柱为 11 549;SHODEX OHPAK SB-183 HQ 色谱柱为

13 132; Agilent PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱为 15 530;均不低于 5 000,符合《中国药典》规定。

3.1.2 保留时间 测得右旋糖酐 D0 和 D2000 的保留时间分别为 t_r 和 t_0 ;供试品溶液主峰和右旋糖酐 D1~D8 系列对照品溶液主峰保留时间均在 t_r 和 t_0 之间,符合《中国药典》规定。由图 1 可知,不同色谱柱右旋糖酐 D2000 的峰形有明显的差异,重复多次结果均相同。厂家提供的色谱柱信息显示,由于填料差异,不同色谱柱排阻限分子量不同。TSK G4000 PWXL 色谱柱的排阻限分子量为 1×10^6 ,SHODEX OHPAK SB-183 HQ 色谱柱的为 1×10^5 ,Agilent PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱的为 5×10^5 ,因此对测量结果产生影响。

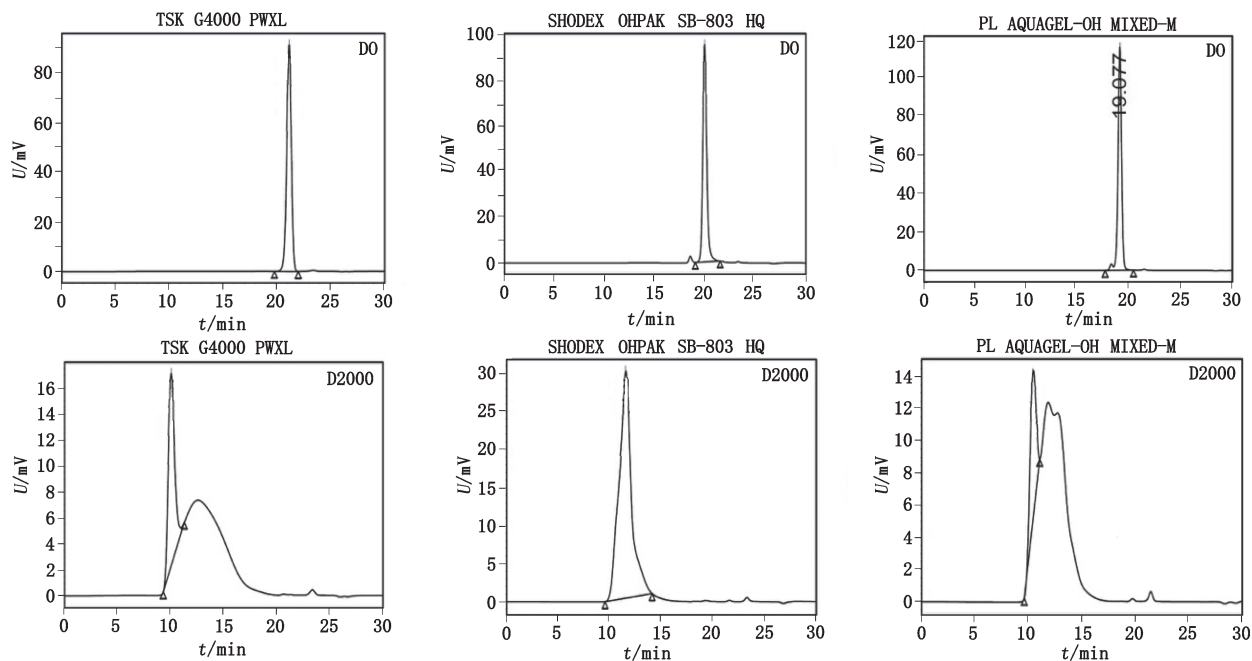


图 1 不同色谱柱葡萄糖(D0)和葡聚糖 2000(D2000)的 HPGPC 色谱图

Fig. 1 HPGPC chromatogram of D0 and D2000 with different chromatograph columns

3.1.3 精密度 取右旋糖酐 40 供试品溶液,连续进样 6 次,重均分子量(M_w)分别为 34 207、34 227、34 277、34 206、34 202、34 299,平均值为 34 236, RSD 为 0.12%。

3.1.4 重复性 称取右旋糖酐 40 供试品 6 份,分别制备成供试品溶液并进样,重均分子量(M_w)分别为 34 810、34 381、34 254、34 569、34 243、34 588,平均值为 34 474, RSD 为 0.64%。

3.1.5 稳定性 取右旋糖酐 40 供试品溶液,分别于 0、2、4、6、10、14、18、24 h 进样,重均分子量

(M_w)分别为 34 463、34 294、34 284、34 230、34 240、34 170、34 223、34 196,平均值为 34 263, RSD 为 0.27%。

3.2 标准曲线对测定结果的影响

《中国药典》2015 年版选用 4~5 个已知分子量的右旋糖酐对照品制备标准曲线,测定右旋糖酐分子量与分子量分布,本文对右旋糖酐 D1~D8 共 8 个已知分子量的对照品进行了比较^[12]。《中国药典》规定右旋糖酐 20 的重均分子量(M_w)应为 16 000~24 000,右旋糖酐 40 的应为 32 000~42 000。右旋糖

酐 D8 对照品的重均分子量 (M_w) 为 300 600, 分子量取对数值后对标准曲线点的分布影响较大, 并且该对照品峰形较差, 导致保留时间漂移, 影响线性, 所以本试验在选择标准曲线时舍去该对照品^[13]。

完整标准曲线以右旋糖酐 D1~D7 为参考, 为保证线性范围, D1 和 D7 同时保留。在 D2~D6 中任选 3 个, 共计有 10 种情况。由表 1 可知, TSK G4000 PWXL 色谱柱在选择右旋糖酐 D1、D2、D5、D6、D7 (D12567) 5 个对照品为标准曲线时, r^2 最大, 线性最

好; SHODEX OHPAK SB-803 HQ 和 PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱在选择右旋糖酐 D1、D2、D4、D5、D7 (D12457) 5 个对照品为标准曲线时, r^2 最大, 线性最好。《中国药典》对右旋糖酐 20 和右旋糖酐 40 的重均分子量范围有明确规定, 因此选择了与 2 种待测样品分子量最接近的几个对照品 (右旋糖酐 D4 分子量为 13 050、D5 为 36 800、D6 为 64 650) 制备标准曲线, 即右旋糖酐 D1、D4、D5、D6、D7 (D14567) 5 个对照品。

表 1 不同色谱柱选择不同对照品的标准曲线表

Tab. 1 Different standard curves with different chromatograph columns

对照品 (reference substance)	TSK G4000 PWXL		SHODEX OHPAK SB-803 HQ		PL AQUAGEL-OH MIXED-M	
	标准曲线 (standard curve)	r^2	标准曲线 (standard curve)	r^2	标准曲线 (standard curve)	r^2
D1~D8	$Y = -0.31X + 9.73$	0.978 1	$Y = -0.35X + 9.41$	0.984 2	$Y = -0.42X + 10.80$	0.990 3
D1~D7	$Y = -0.34X + 10.26$	0.980 4	$Y = -0.33X + 9.03$	0.995 2	$Y = -0.40X + 10.45$	0.994 5
D14567	$Y = -0.34X + 10.35$	0.979 5	$Y = -0.33X + 9.03$	0.994 7	$Y = -0.40X + 10.47$	0.994 2
D13457	$Y = -0.34X + 10.25$	0.973 7	$Y = -0.32X + 8.90$	0.997 6	$Y = -0.39X + 10.31$	0.995 2
D13467	$Y = -0.33X + 10.18$	0.979 5	$Y = -0.33X + 9.02$	0.994 5	$Y = -0.40X + 10.40$	0.993 6
D13567	$Y = -0.34X + 10.32$	0.981 5	$Y = -0.33X + 9.01$	0.994 5	$Y = -0.40X + 10.43$	0.993 9
D12567	$Y = -0.35X + 10.44$	0.990 0	$Y = -0.33X + 9.06$	0.995 8	$Y = -0.40X + 10.50$	0.995 8
D12467	$Y = -0.34X + 10.28$	0.986 4	$Y = -0.33X + 9.05$	0.995 5	$Y = -0.40X + 10.46$	0.995 2
D12457	$Y = -0.34X + 10.36$	0.980 4	$Y = -0.32X + 8.94$	0.998 7	$Y = -0.40X + 10.36$	0.997 0
D12357	$Y = -0.34X + 10.32$	0.981 8	$Y = -0.32X + 8.92$	0.998 1	$Y = -0.39X + 10.34$	0.996 2
D12367	$Y = -0.34X + 10.24$	0.987 8	$Y = -0.26X + 7.91$	0.984 9	$Y = -0.40X + 10.44$	0.994 7
D12347	$Y = -0.33X + 10.18$	0.977 2	$Y = -0.32X + 8.90$	0.997 5	$Y = -0.39X + 10.28$	0.995 6

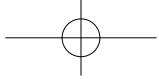
表 2 对 3 种色谱柱选择 D12567、D12457、D14567 标准曲线时重均分子量 (M_w) 测定结果与 D1~D7 标准曲线进行比较。数据结果显示, 选择不同标准曲线

对测定结果有一定影响, 相对偏差达到 10%。采用 D14567 作为标准曲线计算结果时更接近完整标准曲线 D1~D7 的结果, 相对偏差较小。

表 2 各色谱柱不同标准曲线的重均分子量 (M_w) 测定结果相对偏差比较表

Tab. 2 The deviation of M_w of different standard curves with different chromatograph columns

色谱柱 (chromatograph column)	右旋糖酐 (dextran)				相对偏差 (relative deviation) /%		
		D1~D7	D12567	D12457		D14567	相对偏差 (relative error) /%
TSK G4000 PWXL	T20	22 111	20 645	—	6.63	21 574	2.43
	T40	42 632	40 978	—	3.88	42 157	1.11
SHODEX OHPAK SB-803 HQ	T20	23 656	—	21 288	10.01	22 333	5.60
	T40	39 246	—	37 685	3.98	39 975	1.86
PL AQUAGEL-OH MIXED-M	T20	23 338	—	22 197	4.89	23 103	1.01
	T40	40 958	—	38 697	5.52	40 659	0.73



3.3 色谱柱对测定结果的影响

采用 TSK G4000 PWXL、SHODEX OHPAK SB-803 HQ、PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱,对 2 种右旋糖酐的分子量与分子量分布进行测定,标准曲线

选择 D14567,采用 GPC 软件,对样品的重均分子量(M_w)、数均分子量(M_n)、峰位相对分子质量(M_p)和多分散性(D)进行分析,结果见表 3。

表 3 不同色谱柱测定右旋糖酐分子量与分子量分布结果比较表

Tab. 3 The comparison of molecular mass and molecular mass distribution of dextran with different chromatograph columns

右旋糖酐 (dextran)	测定结果 参数 (result parameters)	TSK G4000 PWXL		SHODEX OHPAK SB-803 HQ		PL AQUAGEL-OH MIXED-M		平均值 (average)
		测定值 (detected value)	相对偏差 (relative deviation)/%	测定值 (detected value)	相对偏差 (relative deviation)/%	测定值 (detected value)	相对偏差 (relative deviation)/%	
T20	M_w	21 574	2.09	22 333	1.35	22 197	0.74	22 035
	M_n	11 841	7.89	13 547	5.38	13 178	2.51	12 855
	M_p	12 648	17.84	17 480	13.54	16 057	4.30	15 395
	D	1.82	6.05	1.65	4.06	1.68	1.98	1.72
T40	M_w	42 157	3.00	39 975	2.33	40 659	0.66	40 930
	M_n	16 220	11.56	20 032	9.22	18 772	2.35	18 341
	M_p	19 073	24.98	30 384	19.52	26 811	5.46	25 423
	D	2.61	15.72	2.00	11.63	2.17	4.09	2.26

从表 3 可以看出,不同色谱柱对测定结果有一定的影响。在右旋糖酐 20 和右旋糖酐 40 的测定中,TSK G4000 PWXL 色谱柱重均分子量(M_w)相对偏差达到 3%,PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱重均分子量相对偏差均在 1% 以内;TSK G4000 PWXL 色谱柱数均分子量(M_n)相对偏差达到 12%,PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱数均分子量相对偏差均在 3% 以内;峰位分子量(M_p)结果中,TSK G4000 PWXL 色谱柱相对偏差达到 25%,PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱的均在 6% 以内;TSK G4000 PWXL 色谱柱多分散性(D)相对偏差达到 16%,PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱的均在 5% 以内。PL AQUAGEL-OH MIXED-M 色谱柱在 3 种色谱柱中测定结果相对平均偏差最小。由表 3 结果进一步分析得出,采用 TSK G4000 PWXL 色谱柱和 SHODEX OHPAK SB-803 HQ 色谱柱时,右旋糖酐 20、右旋糖酐 40 随着分子量的增大,测定结果相对偏差变大。

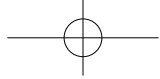
3.4 结论

本文研究表明,测定右旋糖酐分子量与分子量分布时,选择的标准曲线 r^2 最佳,测定结果偏差不一定最小,应同时考虑标准曲线所选对照品与待测样品的分子量的一致性^[14-15],从而消除偏差。不同色谱柱的选择对右旋糖酐分子量与分子量分布的测

定结果也有一定的影响,因此,对右旋糖酐原料及其相关制剂进行质量控制时,需要选择合适的色谱柱及适宜的标准曲线,从而获得良好的测定结果。《中国药典》规定系统适用性理论塔板数按葡萄糖峰计应不低于 5 000,本试验各色谱柱均符合规定,但结果却有一定的差异,样品的色谱峰形影响保留时间,故而对测定结果影响较大。因此,建议在测定右旋糖酐分子量及分子量分布时,将待测样品中右旋糖酐峰的理论塔板数等参数也加入系统适用性考察,从而更加准确地测定待测样品的分子量与分子量分布。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 168
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 168
- [2] 张九花,常国炜,马步,等. 右旋糖酐制备及其应用研究进展[J]. 甘蔗糖业, 2018(2): 52
ZHANG JH, CHANG GW, MA B, et al. Progress in preparation and application of dextran[J]. Sugar Canes, 2018(2): 52
- [3] 郭代红,崔巍,孟潇. 血容量扩充药及其临床应用[J]. 药物流行病学杂志, 2003, 12(4): 188
GUO DH, CUI W, MENG X. Blood volume extender and its clinical application[J]. Chin J Pharmacoevidemiol, 2003, 12(4): 188



- [4] 黄文起. 人工胶体液代用品分类和临床应用[J]. 中国实用外科杂志, 2007, 27(8): 599
HUANG WQ. Classification and clinical application of artificial colloidal fluid substitutes[J]. Chin J Pract Surg, 2007, 27(8): 599
- [5] 尹秀英. 右旋糖酐 40 葡萄糖注射液对透析中低血压的疗效[J]. 当代医学, 2016, 22(20): 42
YING XY. Effect of dextran 40 glucose injection on hypotension during dialysis[J]. Contemp Med, 2016, 22(20): 42
- [6] 黎珍. 探究低分子右旋糖酐辅助治疗急性脑梗死的临床效果[J]. 临床医药文献杂志, 2018, 5(44): 98
LI Z. To explore the clinical effect of low molecular dextran in the treatment of acute cerebral infarction[J]. J Clin Med, 2018, 5(44): 98
- [7] 焦旭雯, 梁蔚阳. HPGPC 法测定麦芽糖铁糖浆分子量与分子量分布[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(10): 131
JIAO XW, LIANG WY. Determination of molecular weight and weight distribution in iron Maltose Syrup by HPGPC[J]. Chin J Biochem Pharm, 2015, 35(10): 131
- [8] 赵峡, 杨海, 宋乐天, 等. 不同色谱柱和 GPC 软件对灰树花倍他葡聚糖相对分子质量测定的影响[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(8): 1143
ZHAO X, YANG H, SONG LT, *et al.* Influence of different chromatograph columns and GPC softwares on relative molecular mass determination of *Grifola frondosa* beta-glucan[J]. Chin J Pharm Anal, 2007, 27(8): 1143
- [9] 焦旭雯, 梁蔚阳, 陈华. 右旋糖酐铁相对分子质量及其分布的探析[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(12): 2266
JIAO XW, LIANG WY, CHEN H. Discussion on relative molecular mass and relative molecular mass distribution of iron dextran[J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(12): 2266
- [10] 李楠, 李卓, 张燕, 等. 高效分子排阻色谱法同时测定白及多糖分子量及含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(10): 1801
LI N, LI Z, ZHANG Y, *et al.* Determination of molecular weight and content of *Bletilla striata* glucomannan by high performance size exclusion chromatography[J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(10): 1801
- [11] 宋玉娟, 任丽萍, 范慧红. 玻璃酸钠分子质量与分子质量分布测定[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(12): 2430
SONG YJ, RENG LP, FAN HH. Determination of molecular weight and molecular weight distribution of sodium hyaluronate[J]. Chin J Pharm Anal, 2010, 30(12): 2430
- [12] 万丹晶, 陈妙芬, 陈钢. 右旋糖酐铁注射液峰位相对分子质量和重均相对分子质量的 HPGPC 测定[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 708
WAN DJ, CHEN MF, CHEN G. HPGPC determination of iron dextran peak relative molecular mass and weight mean relative molecular mass in iron dextran injections[J]. Chin J Pharm Anal, 2007, 27(5): 708
- [13] 范慧红, 刘金秀, 徐康森. 高效凝胶渗透色谱法在右旋糖酐铁质控中的应用[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(4): 254
FAN HH, LIU JX, XU KS. Application of high performance gel permeation chromatography in iron control of dextran[J]. Chin J Pharm Anal, 2000, 20(4): 254
- [14] 王其宇. HPGPC 法在右旋糖酐原料药生产质控中的应用[J]. 安徽化工, 2001(3): 45
WANG YQ. Application of HPGPC method in quality control of dextran API production[J]. Anhui Chem Ind, 2001(3): 45
- [15] 于栋伟, 李楠, 孙燕, 等. 高效分子排阻色谱-蒸发光散射检测法测定右旋糖酐分子量及其分布[J]. 苏州大学学报医学版, 2012, 32(5): 600
YU DW, LI N, SUN Y, *et al.* Determination of molecular weight and distribution of dextran by HPSEC-ELSD[J]. Suzhou Univ J Med Sci, 2012, 32(5): 600

(本文于 2019 年 11 月 27 日修改回)