

# 头孢匹胺钠脂质体的制备及其理化性质研究

时明<sup>1,2\*</sup>, 朱来清<sup>2</sup>, 孙庆雪<sup>1</sup>, 王金萍<sup>1</sup>, 黄桂华<sup>1#</sup> (1. 山东大学药学院, 济南 250012; 2. 济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272011)

中图分类号 R944; R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4280-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.20

**摘要** 目的: 制备头孢匹胺钠脂质体并进行质量评价。方法: 采用逆相蒸发法制备头孢匹胺钠脂质体, 在单因素考察基础上, 以药脂比(A)、磷脂与胆固醇质量比(B)、有机相(乙醚)与水相体积比(C)、超声时间(D)为因素, 以包封率为考察指标, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表优化最佳处方和工艺, 并进行处方验证; 考察脂质体的形态, 测定其粒径、Zeta电位、包封率、载药量和72 h体外累积释放度并进行模型拟合。结果: 正交试验设计优化的A为1:6、B为5:1、C为4:1、D为5 min, 验证试验证明处方合理; 所得的脂质体为封闭的多层囊状或圆球体, 大小均匀, 平均粒径为 $(7.146 \pm 0.29) \mu\text{m}$ , Zeta电位为 $-11.75 \text{ mV}$ , 包封率为 $(82.10 \pm 4.21)\%$ , 载药量为 $(15.42 \pm 0.67)\%$ ; 72 h体外累积释放度为76.84%, 体外释药行为符合Weibull模型( $r=0.9910$ )。结论: 采用逆相蒸发法制备的头孢匹胺钠脂质体, 包封率较高, 体外释药有明显的缓释效果。

**关键词** 头孢匹胺钠; 脂质体; 制备; 逆相蒸发法; 正交试验; 体外释放

## Preparation and Physicochemical Property of Cefpiramide Sodium Liposome

SHI Ming<sup>1,2</sup>, ZHU Lai-qing<sup>2</sup>, SUN Qing-xue<sup>1</sup>, WANG Jin-ping<sup>1</sup>, HUANG Gui-hua<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Jining Municipal First People's Hospital, Shandong Jining 272011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Cefpiramide sodium liposome, and to evaluate its physicochemical property. METHODS: Cefpiramide sodium liposome was prepared by reverse phase evaporation method. Based on single factor test, the formulation and preparation technology were optimized by  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment with the ratio of drug to lipid (A), the ratio of phosphatides to cholesterol (B), the ratio of organic phase (ether) to water phase (C) and ultrasound time (D) as factors using entrapment efficiency as index. The morphology of the liposome was investigated, and particle size, Zeta potential, entrapment efficiency, drug-loading amount and 72 h accumulative release rate *in vitro* were determined. RESULTS: The optimal formulation was as follows: A was 1:6, B was 5:1, C was 4:1 and D was 5 min. Validation test showed that the formulation was reasonable. Prepared liposome was closed multilayer cystiform or spherical shape, with uniform size. The mean diameter, Zeta potential, entrapment efficiency, drug-loading amount and 72 h accumulative release rate *in vitro* were  $(7.146 \pm 0.29) \mu\text{m}$ ,  $-11.75 \text{ mV}$ ,  $(82.10 \pm 4.21)\%$ ,  $(15.42 \pm 0.67)\%$  and 76.84%, respectively. The drug release of the liposome was consistent with Weibull's model ( $r=0.9910$ ). CONCLUSIONS: Cefpiramide sodium could be encapsulated liposome with higher encapsulation efficiency using reverse phase evaporation method, and the liposome has a good sustained-release property *in vitro*.

**KEY WORDS** Cefpiramide sodium; Liposome; Preparation; Reverse phase evaporation method; Orthogonal experiment; Release *in vitro*

头孢匹胺钠(Cefpiramide sodium, CPMS)为半合成的第4代头孢菌素类抗生素<sup>[1]</sup>, 具有广谱的抗革兰阳性菌和阴性菌的作用, 在临床上广泛用于治疗呼吸道感染、妇科感染等多种细菌感染。由于其水溶性强、难以穿透细胞膜、不能在细胞内聚集, 造成胞内药物浓度较低, 细菌等对药物不够敏感, 治疗细胞内细菌感染效果不佳; 同时, 由于其作用时间短, 每日需2~3次静脉给药, 给患者造成不便。笔者采用逆相蒸发法制备注射用脂质体, 脂质体的膜材采用磷脂, 其生物相容性好, 作为载体将药物包封后, 与细胞膜有较好的亲和作用, 可以成功地将药物送达细胞内部, 从而提高药物的生物利用度和靶向性;

同时, 可延长药物作用时间, 减少用药剂量, 降低药物毒性<sup>[2-3]</sup>, 为CPMS的临床应用提供了一种新的给药系统。

## 1 材料

### 1.1 仪器

RE52-98旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); HS3120超声机(北京医疗设备二厂); TGL-16G-A高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); Vortex-5(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); UV-2102PCS型紫外-可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司); Zetasizer3000粒度分布与电势分析仪(英国Malvern公司); D-800C智能药物溶出仪(天津大学无线电厂)。

### 1.2 药品与试剂

CPMS原料药(批号: 2007101803, 纯度: 98.6%)、CPMS对照品(批号: 070921, 纯度: 100%)均由山东鲁抗医药股份公司惠赠; 注射用大豆磷脂(PC, 上海太伟药业有限公司, 批号:

\* 硕士研究生。研究方向: 药物制剂。电话: 0537-2253394。E-mail: 13518653949@163.com

# 通信作者: 教授。研究方向: 药物新剂型。电话: 0531-88382549。E-mail: hgh2003@126.com

071218);胆固醇(CHOL,上海化学试剂站分装厂,批号:950517);无水乙醚、三氯甲烷、甲醇、氢氧化钠、盐酸、氯化钠等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 CPMS脂质体的制备

2.1.1 制备方法的筛选。根据CPMS的理化性质,分别采用薄膜分散法(Hand shaken method, HSM)、逆相蒸发法(Reverse phase evaporation method, RPEM)、乙醇注入法(Ethanol injection method, EIM)、硫酸铵梯度法(Ammonium sulfate gradient method, ASGM)和醋酸钙梯度法(Calcium acetate gradient method, CAGM)制备CPMS脂质体<sup>[9]</sup>,以包封率为考察指标,筛选制备CPMS脂质体的最佳方法。

薄膜分散法:将PC、CHOL按质量比8:1的比例混匀,加入适量氯仿溶解,减压蒸发,制备磷脂膜后,加入CPMS的pH 7.4 磷酸盐(PBS)缓冲溶液(5 mg/ml),充分水合后制得脂质体。

逆相蒸发法:将PC、CHOL按质量比8:1的比例混匀,加适量乙醚溶解后,加入CPMS的pH 7.4 PBS缓冲溶液(5 mg/ml),油相(O)与水相(W)体积比为5:1,超声3 min,形成油包水乳剂,减压蒸发除去乙醚,达到胶态后,滴加PBS缓冲溶液,水化,在减压下继续蒸发,制得CPMS脂质体。

乙醇注入法:将PC、CHOL按质量比8:1的比例混匀,溶于适量无水乙醇中,所得的类脂溶液缓慢匀速注入恒温60℃的CPMS的PBS缓冲溶液(5 mg/ml)中,油相(含有脂质的乙醇溶液)被水相(CPMS的pH 7.4 PBS缓冲溶液)稀释,油相与水相体积比为5:1。油相在水相中不溶从而迅速形成小的脂质体颗粒,继续恒温搅拌至乙醇完全除尽,得到CPMS脂质体。

硫酸铵梯度法:将PC、CHOL按质量比8:1的比例混匀,加适量氯仿溶解,减压蒸发,制备磷脂膜后,加入硫酸铵溶液,充分水合后得空白脂质体。将空白脂质体置于透析袋中,于0.9%氯化钠注射液(生理盐水)中透析,透析完成后向空白脂质体中加入CPMS的pH 7.4 PBS缓冲溶液(5 mg/ml),在水浴下孵化一定时间,即得。

醋酸钙梯度法:将PC、CHOL按质量比8:1的比例混匀,加适量氯仿溶解,减压蒸发,制备磷脂膜后,加入醋酸钙溶液,混匀得空白脂质体。将空白脂质体置于透析袋中,于生理盐水中透析,透析完成后向空白脂质体中加入处方量CPMS的PBS缓冲溶液(5 mg/ml),在水浴下孵化一定时间,即得。

以包封率为考察指标,分别采用被动载药法(薄膜分散法、逆相蒸发法、乙醇注入法)和主动载药法(硫酸铵梯度法、醋酸钙梯度法)制备CPMS脂质体,测得包封率分别为(29.08±4.12)%、(40.10±3.96)%、(23.41±4.05)%、(22.03±3.12)%、(11.64±3.87)%(n=3)。

2.1.2 单因素考察。选择逆相蒸发法制备CPMS脂质体,固定处方和工艺中部分因素不变,改变其中一种组成或工艺,分别考察药脂比(A,1:2、1:4、1:6、1:8、1:10)、PC与CHOL质量比(B,2:1、4:1、6:1、8:1、10:1)、有机溶剂种类[乙醚、二氯甲烷、二氯甲烷-乙醚(1:1,V/V)]、有机相与水相体积比(C,3:1、4:1、5:1、6:1、8:1)和超声时间(D,1、2、3、4、5 min)对包封率的影响,结果见表1。

2.1.3 正交设计优化处方组成。根据单因素考察结果,5个因

表1 单因素试验考察结果(n=3)

Tab 1 Results of single factor test(n=3)

因素	水平	包封率,%	RSD,%
药脂比	1:2	21.92	69.05
	1:4	43.82	
	1:6	71.49	
	1:8	55.15	
	1:10	3.15	
PC与CHOL质量比	2:1	69.71	24.53
	4:1	36.55	
	6:1	52.73	
	8:1	71.49	
	10:1	59.45	
有机溶剂种类	乙醚	75.63	11.86
	二氯甲烷	59.56	
	二氯甲烷-乙醚(1:1,V/V)	68.95	
有机相与水相体积比	3:1	68.04	15.61
	4:1	79.47	
	5:1	71.49	
	6:1	51.57	
	8:1	75.93	
超声时间,min	1	56.18	12.58
	2	70.91	
	3	71.49	
	4	65.37	
	5	79.57	

素对包封率的影响由大到小的顺序为:药脂比>PC与CHOL质量比>有机相与水相体积比>超声时间>有机溶剂种类。因此我们选择对脂质体包封率影响较显著的4个因素作为考察对象,即药脂比(A)、PC与CHOL质量比(B)、有机相与水相体积比(C)、超声时间(D),每个因素选3个水平,以包封率为考察指标,按L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验设计表设计9个处方,优化最佳处方和工艺。影响因素及因素水平取值见表2,正交试验设计及试验结果见表3,正交试验结果极差分析见表4,正交试验结果方差分析见表5。

表2 影响因素及因素水平取值

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	药脂比(A)	PC与CHOL质量比(B)	有机相与水相体积比(C)	超声时间(D),min
1	1:4	2:1	3:1	1
2	1:6	5:1	4:1	3
3	1:8	8:1	5:1	5

表3 正交试验设计及试验结果

Tab 3 Results of orthogonal test

序号	药脂比(A)	PC与CHOL质量比(B)	有机相与水相体积比(C)	超声时间(D),min	包封率,%
1	1	1	1	1	46.25
2	1	2	2	2	69.56
3	1	3	3	3	74.04
4	2	1	2	3	62.75
5	2	2	3	1	67.47
6	2	3	1	2	61.58
7	3	1	3	2	44.28
8	3	2	1	3	69.11
9	3	3	2	1	70.32

表4 正交试验结果极差分析

Tab 4 Results of extreme difference analysis

项目	因素	因素	因素	因素
	药脂比 (A)	PC与CHOL 质量比(B)	有机相与水相 体积比(C)	超声时间 (D),min
K <sub>1</sub>	189.85	153.28	176.94	184.04
K <sub>2</sub>	191.80	206.14	202.63	175.42
K <sub>3</sub>	183.71	205.94	185.79	205.90
R	2.70	17.62	8.56	10.16

表5 正交试验结果方差分析

Tab 5 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方差	F	P
A	0.004	2	0.002	24.616	0
B	0.186	2	0.093	1 281.409	0
C	0.034	2	0.017	235.204	0
D	0.049	2	0.025	340.922	0
误差	0.001	18	$7.24 \times 10^{-5}$		

由表4可见,以包封率为考察指标,极差(R)反映各因素对指标影响的程度,R越大,影响程度越大。本试验4个因素R值排列为B>D>C>A,可见PC与CHOL质量比对CPMS脂质体的包封率影响最大,各因素最优水平组合为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即最佳处方组成为:药脂比为1:6,PC与CHOL质量比为5:1,有机相与水相体积比为4:1,超声时间为5 min。

由表5可见,4个因素对CPMS脂质体的包封率的影响均为显著(P=0),各因素最优水平组合为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,和以上分析结果相同。

2.1.4 验证试验。按照最佳处方、工艺制备3批CPMS脂质体,以平均粒径、跨度、包封率作为考察指标,考察最佳处方的稳定性,结果见表6。

表6 验证试验结果(n=3)

Tab 6 Results of validation test(n=3)

批次	粒径, μm	跨度	包封率, %
第1批	6.930	1.53	86.92
第2批	7.471	0.71	79.12
第3批	7.037	1.27	80.27

由表6可见,3批脂质体的重现性都较好,说明通过正交试验设计优化的处方合理,制备工艺稳定。

## 2.2 CPMS脂质体含量测定方法的建立

2.2.1 检测波长的确定。精密称取CPMS对照品25.0 mg,置于100 ml量瓶中,用蒸馏水溶解并稀释至刻度制备浓贮备液(250 μg/ml)。精密量取浓贮备液3.0 ml于25 ml量瓶中,加水稀释至刻度,制成30.0 μg/ml标准溶液,以蒸馏水为空白,用紫外分光光度计于200~400 nm波长范围内扫描,在271 nm波长处有最大吸收峰。分别称取PC、CHOL等辅料适量,加甲醇溶解并定量稀释成相同倍数的溶液,同法操作,辅料在271 nm波长处几乎无干扰。由此选择271 nm为检测波长。紫外扫描图谱见图1。

2.2.2 标准曲线的建立。精密称取CPMS对照品适量,置于100 ml的量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度制备浓贮备液。精密量取浓贮备液适量,加水稀释制成质量浓度分别为5.14、10.28、15.42、20.56、25.70、30.84 μg/ml的系列标准溶液,于271 nm波长处测定吸光度,以吸光度(A)为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标,求得回归方程为 $A=0.023\ 297c-0.008\ 200$ ( $r=0.999\ 2$ ),表明CPMS在5.14~30.84 μg/ml检测质量浓度范围

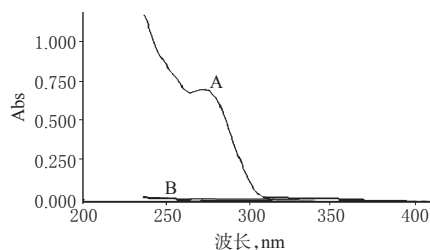


图1 紫外扫描图谱

A. CPMS; B. 辅料溶液

Fig 1 UV scanning spectrum

A. CPMS; B. adjuvant solution

内与吸光度线性关系良好。

2.2.3 回收率与精密度测定。按处方量的80%、100%、120%称取CPMS原料药适量,分别加处方比例的辅料,加入甲醇溶解后,用生理盐水定容,摇匀,制成质量浓度分别为8.0、10.0、12.0 μg/ml的样品溶液,于271 nm波长处测定吸光度,计算回收率。精密量取浓贮备液,配制低、中、高(5.14、20.56、30.84 μg/ml)3个质量浓度的标准溶液,同日内测定5次,考察日内精密密度;每日分别测定1次,连续测定5 d,考察日间精密密度。结果表明,高、中、低3个质量浓度的平均回收率在95%~104%之间,RSD<3.0%(n=3);日内RSD<2.0%(n=5),日间RSD<2.0%(n=5)。

## 2.3 CPMS脂质体载药量测定

精密吸取CPMS脂质体1 ml,加甲醇至10 ml使其破乳完全,然后用pH 7.4 PBS缓冲溶液稀释至50 ml,在271 nm波长处测定吸光度,计算脂质体中CPMS的含量,结果详见表7。

表7 包封率和载药量测定结果(%)

Tab 7 Results of entrapment efficiency and drug-loading amount(%)

项目	第1次	第2次	第3次	平均值	RSD
载药量	16.17	15.22	14.88	$15.42 \pm 0.67$	4.34
包封率	86.92	79.12	80.27	$82.10 \pm 4.21$	5.13

## 2.4 CPMS脂质体包封率测定<sup>[4]</sup>

2.4.1 CPMS脂质体中游离药量的测定。精密量取0.1 ml的含药脂质体混悬液,置于离心管中,加0.2 ml生理盐水稀释,离心(离心半径为8 cm,15 000 r/min)20 min,取上清液0.1 ml,稀释一定倍数,以生理盐水为空白,测定吸光度,计算脂质体中游离CPMS的量( $m_{\text{游}}$ )。

2.4.2 CPMS脂质体中总药量的测定。精密量取0.1 ml的含药脂质体混悬液,加0.9 ml甲醇破乳,用生理盐水稀释一定倍数;空白脂质体同法操作,作为空白。测定吸光度,计算脂质体中总药量( $m_{\text{总}}$ )。

2.4.3 包封率的测定。利用测得的游离药物量和总药量,按照下面的公式计算包封率和载药量,结果详见表7。

$$\text{载药量} = \frac{m_{\text{总}} - m_{\text{游}}}{m_{\text{处方总量}}} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \frac{m_{\text{总}} - m_{\text{游}}}{m_{\text{游}}} \times 100\%$$

## 2.5 CPMS脂质体的质量考察

2.5.1 形态观察。按照最佳制备工艺条件制备3批脂质体混悬液,稀释至一定倍数后,滴至专用铜网上,用1.5%磷钨酸染色后,自然晾干,于透射电子显微镜下观察形态,结果见图2。



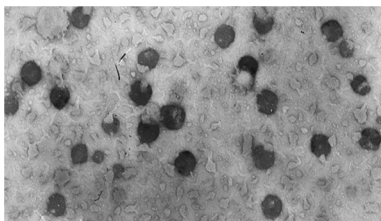


图2 CPMS脂质体透射电镜照片( $\times 1\,000$ )  
Fig 2 TEM photos of CPMS liposome( $\times 1\,000$ )

2.5.2 粒径分布及表面电位测定。取CPMS脂质体适量,分别用生理盐水稀释后,采用激光粒度分析仪测定粒径和Zeta电位。结果显示,优化处方制备的CPMS脂质体平均粒径为 $(7.146 \pm 0.29) \mu\text{m}$ ;在生理pH条件下,Zeta电位为 $-11.75 \text{ mV}$ ,粒度分布见图3。

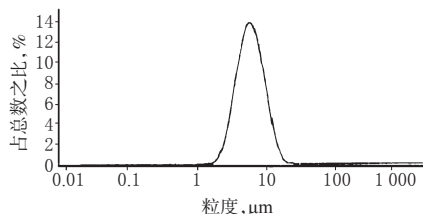


图3 CPMS脂质体粒径分布图

Fig 3 Particle size distribution of CPMS liposome

## 2.6 体外释放度试验

按照最佳制备工艺条件制备3批脂质体混悬液,以 $16.67 \mu\text{g/ml}$  CPMS溶液为对照,采用动态膜透析法进行体外释药试验<sup>[3]</sup>。精密吸取2 ml CPMS脂质体(含CPMS  $16.67 \text{ mg}$ ),装入处理过的透析袋内,将袋口扎紧,固定于转篮中,置于300 ml PBS(pH 7.4)缓冲溶液中,试验在漏槽条件下进行,按2010年版《中国药典》(二部)附录“小杯法”项下测定。温度控制在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,转速为50 r/min,定时吸取5 ml透析液,并及时补充等量恒温的PBS(pH 7.4)缓冲溶液。样品经稀释过滤后,于271 nm波长处测定吸光度,代入标准曲线方程,计算质量浓度及体外累积释放度,结果图4。

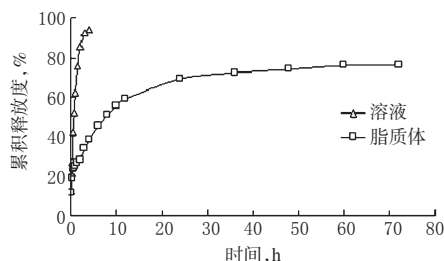


图4 CPMS溶液与脂质体的体外释放动力学曲线( $n=3$ )

Fig 4 Release kinetic profile of CPMS solution and liposome in vitro( $n=3$ )

由图4可知,CPMS溶液在2 h已基本释放完全,其体外释放符合一级动力学数学模型( $r=0.986\,4$ );而CPMS脂质体在72 h释放达到平衡,累积释放度为76.84%,表现出了缓释效果。将CPMS脂质体的体外释药数据分别采用一级动力学方程、Higuchi方程、Weibull方程与双相动力学方程相拟合,结果Weibull模型更优( $r=0.991\,0$ )。所以将CPMS制成脂质体,可以达到缓释的效果。

## 3 讨论

在制备载药脂质体时,根据药物装载的机制不同,可分为被动载药法与主动载药法两大类<sup>[6]</sup>。传统上,人们采用最多的方法是被动载药法,如薄膜分散法、逆相蒸发法、乙醇注入法。对于脂溶性的、与磷脂膜亲和力和高的药物,被动载药法较为适用;而对于两亲性药物,其油水分配系数受介质pH和离子强度的影响较大,包封条件较小的变化就有可能使包封率有较大的变化,且包封率都不高,因此常选择主动载药法。因为CPMS结构式中含有氨基和酚羟基,预测其可能具有弱碱性或弱酸性,所以在试验中考察了硫酸铵梯度法(适合于弱碱性药物<sup>[6]</sup>)和醋酸铵梯度法(适合于弱酸性药物<sup>[7]</sup>)制备CPMS脂质体,但结果包封率均不高,即主动载药法不适合CPMS脂质体的制备。相比较而言被动载药法中的逆相蒸发法的包封率较高,这可能与CPMS在pH 7.4 PBS缓冲溶液中有较高的溶解度有关。

脂质体常见的给药途径是静脉注射给药,进入体内即被巨噬细胞作为外界异物而吞噬。微粒经静脉注射后,在体内的分布首先取决于微粒的粒径大小,通常粒径在 $2.5 \sim 10 \mu\text{m}$ 时,大部分积聚于巨噬细胞<sup>[8]</sup>。本文方法制备的脂质体粒径分布在 $(7.146 \pm 0.29) \mu\text{m}$ 之间,符合设计要求。

逆相蒸发法将PC等膜材溶于有机溶剂中,加入待包封药物的水溶液进行短时超声,形成稳定的W/O型乳剂,然后减压蒸发除去有机溶剂以制备脂质体的方法。常用的有机溶剂为二氯甲烷和无水乙醚,适合于包封水溶性药物及大分子生物活性物质。CPMS水溶性较好,因此,本试验采用逆相蒸发法制备CPMS脂质体,并获得了较高的包封率(82.10%)。

Zeta电位与体系的稳定性密切相关,测定Zeta电位可以预测脂质体贮存体系的稳定性。通常高Zeta电位的体系由于电荷相互排斥,很少出现粒子聚集,体系稳定。本试验制备的CPMS脂质体Zeta电位为 $-11.75 \text{ mV}$ ,说明体系稳定性较差,须增加其贮存稳定性,后续研究拟进一步设计采用冷冻干燥后保存的方法。

## 参考文献

- [1] 李端.药理学[M].5版.北京:人民卫生出版社,2006:363.
- [2] Budai M, Szogyi M. Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes[J]. *Acta Pharm Hung*, 2001, 71(1):114.
- [3] Langer M, Karl TE. Liposome-based drug delivery system[J]. *Pol J Pharmacol*, 1999, 51(3):211.
- [4] 郭伟英,吴迪.人参总皂苷和枸杞多糖的溶解特性与脂质体包封率的关系研究[J]. *中国药房*, 2011, 22(35):3 300.
- [5] 赵广波,白靖,王静,等.盐酸伊立替康脂质体载药方式的研究进展[J]. *中国药房*, 2011, 22(37):3 536.
- [6] 王绍宁,邓意辉,严志,等.硫酸铵梯度法制备盐酸环丙沙星脂质体的影响因素[J]. *沈阳药科大学学报*, 2003, 20(2):93.
- [7] 王伟,周建平,任逢晓,等.双氯芬酸钠脂质体凝胶的制备及其药动学和刺激性评价[J]. *中国药理学杂志*, 2007, 42(16):1 236.
- [8] 李学涛,田景振,张玉娟.靶向制剂的研究进展[J]. *食品与药品*, 2006, 8(2):13.

(收稿日期:2013-04-27 修回日期:2013-07-12)