

文章编号: 1001-8689(2020)03-0241-06

## 国产乳酸环丙沙星滴眼液质量分析

史春辉 肖宇 张琼 张肖宁\*  
(黑龙江省药品检验研究中心, 哈尔滨 150080)

**摘要:** **目的** 评价国产乳酸环丙沙星滴眼液的质量现状。**方法** 采用现行法定标准检验结合探索性研究结果, 对市场上 3 家企业生产的 36 批乳酸环丙沙星滴眼液的质量进行比较分析, 通过对含量测定、有关物质及抑菌剂合理性等项目的考察, 结合稳定性试验, 分析不同企业产品的质量差异。**结果** 法定标准检验 36 批乳酸环丙沙星滴眼液, 合格率为 100%; 探索性研究显示, 该品种现行标准多个安全性检查项目缺失、检验方法专属性差、标准不统一。**结论** 国内乳酸环丙沙星滴眼液整体质量一般, 现行质量标准有待提高。

**关键词:** 乳酸环丙沙星滴眼液; 质量分析; 含量测定; 有关物质; 抑菌剂

**中图分类号:** R978.1, R917 **文献标志码:** A

## Quality analysis of domestic ciprofloxacin lactate eye drops

Shi Chun-hui, Xiao Yu, Zhang Qiong and Zhang Xiao-ning  
(Heilongjiang Drug Testing and Research Center, Harbin 150080)

**Abstract Objective** To evaluate the quality of domestic ciprofloxacin lactate eye drops. **Method** Using statutory testing methods combining with the exploratory research, the quality of 36 batches of ciprofloxacin lactate eye drops produced by three enterprises on the market was compared systematically. Through the investigation of the component, related substances, the rationality of bacteriostat and other items, combining with the stability test, quality differences among different enterprise products were analyzed. **Results** 36 batches of ciprofloxacin lactate eye drops were inspected according to the legal standard, and the qualified rate was 100%. The exploratory research showed that the current standard of ciprofloxacin lactate eye drops was lack of several safety inspection items, poor specificity of inspection methods, and inconsistent standards, which lead to inadequate quality control. **Conclusion** The quality of domestic ciprofloxacin lactate eye drops is generally acceptable, and the current quality standard needs to be improved.

**Key words** Ciprofloxacin lactate eye drops; Quality analysis; Component; Related substances; Bacteriostat

收稿日期: 2019-11-19

作者简介: 史春辉, 男, 生于 1987 年, 硕士, 主管药师, 从事药物分析和药品检验工作, E-mail: 444293664@qq.com

\* 通讯作者, E-mail: zhangxiaoning761204@126.com



第一作者: 史春辉, 硕士, 2013 年毕业于哈尔滨工业大学, 就职于黑龙江省药品检验研究中心抗生素室, 从事药物分析和药品检验工作; 曾多次参加国家药品抽检工作和国家药典委员会的药品标准修订工作。



通讯作者: 张肖宁, 女, 生于 1976 年, 沈阳药科大学药物分析学博士, 副主任药师, 黑龙江省药品检验研究中心抗生素室主任, 黑龙江省级领军人才梯队后备带头人; 主持完成多项国家、省、部级科研项目; 获黑龙江省科学技术二等奖。

环丙沙星属于第三代喹诺酮类抗菌药,由德国拜耳医药研发成功,1987年首次在美国、德国和智利上市,目前已成为世界上最被广泛使用的氟代喹诺酮抗生素<sup>[1-2]</sup>。环丙沙星通常以盐酸盐或乳酸盐的形式应用,乳酸盐较盐酸盐的血管局部刺激轻、疼痛减少<sup>[3-5]</sup>。乳酸环丙沙星滴眼液用于敏感菌引起的外眼部感染(如结膜炎等)。主要不良反应为偶有局部一过性刺激症状,可产生局部灼伤和异物感;较少见眼睑水肿、流泪、畏光、视力减低、过敏反应等反应<sup>[6-8]</sup>。

乳酸环丙沙星滴眼液全国共11家企业生产,涉及11个批准文号。现行标准收载于《新药转正》第31册,标准号为WS1-(X-090)-2002Z,另A企业执行国药监局标准YBH37012005,国外药典仅英国药典(BP)有收载。在2019年国家药品抽检中共收集到3个厂家、3个批准文号、2种规格(5mL:15mg和8mL:24mg,按环丙沙星计)的36批样品,其中4批样品来自于生产企业,32批样品来自于经营单位,分别采用低密度聚乙烯滴眼剂瓶和聚氯乙烯滴眼剂瓶包装。基于安全性、有效性及质量可控性等方面考虑,开展探索性研究工作,同时根据研究结果提出相关建议。

## 1 仪器及试剂

电子天平(Sartorius BP211D及Ohaus SPS4001F型);酸度计(Mettler Seven Multi S40K);高效液相色谱仪(Thermo UltiMate 3000、AgiLent 1260及Waters e2695);气相色谱仪(AgiLent7890N型)。

乳酸环丙沙星对照品(批号:G174939)购自LGC(Laboratory of the Government Chemist)。氧氟沙星对照品(批号:130454-201206)、环丙沙星对照品(批号:130451-201203)、杂质A对照品(批号:130554-201103)、杂质B对照品(批号:130601-201202)、杂质C对照品(批号:130602-201202)、杂质E对照品(批号:130604-201702)、杂质H对照品(批号:130603-201202)、杂质I对照品(批号:130605-201402)、苯扎溴铵对照品(批号:135051-201401)、羟苯乙酯对照品(批号:100848-201604)均购自中国食品药品检定研究院。环丙沙星杂质-D8对照品(批号:291924)购自Laboratorien Berlin Adlershof GmbH。环丙沙星杂质F对照品(批号:172503-00)购自TrC(Toronto Research Chemicals)。乳酸环丙沙星滴眼液辅料均为企业提供。

乙腈、磷酸为色谱纯,三乙胺、冰醋酸及乙酸

铵均为分析纯。

家兔,普通级,2.0~2.5kg,雌雄各半。

## 2 试验方法

### 2.1 按法定标准检验

检验依据为《新药转正》第31册WS1-(X-090))-2002Z及国药监局标准YBH37012005。

### 2.2 探索性研究

#### 2.2.1 含量测定

采用《中国药典》2015年版二部中盐酸环丙沙星滴眼液HPLC含量测定方法。

供试品溶液的制备 精密量取本品3mL,置100mL量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀。

对照品溶液的制备 取环丙沙星对照品约18mg,置200mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。

系统适用性溶液的制备 取氧氟沙星对照品约10mg和杂质I对照品约20mg,置200mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀;取环丙沙星对照品约10mg,置100mL量瓶中,精密加入上述氧氟沙星对照品和杂质I对照品溶液10mL,再加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。

色谱条件及系统适用性要求 色谱柱为C<sub>18</sub>;流动相为0.025mol/L磷酸溶液(用三乙胺调节pH值至3.0)-乙腈(87:13, V/V);检测波长采用278nm;进样体积20μL。系统适用性溶液色谱图中,环丙沙星约在12min左右出峰,环丙沙星峰与氧氟沙星峰和杂质I峰间的分离度均应大于1.5。

测定法 取供试品溶液和对照品溶液,分别进样,按外标法以峰面积计算供试品中C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>的含量。

#### 2.2.2 有关物质分析<sup>[9-10]</sup>

参考《中国药典》2015年版二部中盐酸环丙沙星滴眼液有关物质HPLC方法,采用加校正因子的主成分自身对照法测定样品中各杂质的含量。

(1)供试品溶液的制备(临用新制)精密量取本品3mL,置20mL量瓶中,用流动相A稀释至刻度,摇匀。

(2)对照溶液的制备 精密量取供试品溶液1mL,置500mL量瓶中,用流动相A稀释至刻度,摇匀。

(3)灵敏度溶液的制备 精密量取对照溶液5mL,置50mL量瓶中,用流动相A稀释至刻度,摇匀。

(4)杂质A对照品溶液的制备 取杂质A对照品适量,加6mol/L氨溶液适量(按每1mg加0.4mL)和水使溶解,再用水稀释制成约含杂质A1.5μg/mL的

溶液。

(5) 系统适用性溶液的制备 取氧氟沙星对照品约 10mg 和杂质 I 对照品约 20mg，置 200mL 量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀；取环丙沙星对照品约 25mg，置 50mL 量瓶中，精密加入上述氧氟沙星对照品和杂质 I 对照品溶液 5mL，再加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀。

(6) 色谱条件及系统适用性要求 色谱柱为  $C_{18}$ ；流动相 A 为 0.025mol/L 磷酸溶液 (用三乙胺调节 pH 值至 3.0)- 乙腈 (87:13)，流动相 B 为乙腈，按表 1 进行线性梯度洗脱，流速为 1.5mL/min。检测波长采用 278 和 262nm；进样体积 20 $\mu$ L。系统适用性溶液色谱图中 (278nm)，环丙沙星约在 12min 左右出峰，环丙沙星峰与氧氟沙星峰和杂质 I 峰间的分离度均应大于 1.5。灵敏度溶液色谱图中 (278nm)，环丙沙星

表 1 有关物质流动相梯度洗脱表

Tab. 1 The gradient elution table of related substances' mobile phase

时间 /min	流动相 A	流动相 B
0 → 16	100%	0
16 → 53	100% → 40%	0 → 60%
53 → 54	40% → 100%	60% → 0
54 → 65	100%	0

峰峰高的信噪比应大于 10。

(7) 测定法 取供试品溶液和对照溶液，分别进样，以 278 和 262nm 为检测波长，杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E 和杂质 I 峰的相对保留时间分别约为 0.6、0.7、1.2、0.3 和 1.1。

2.2.3 药物在 365nm 紫外光照下的稳定性

参考 ChP2015 四部通则 9001 “原料药物与制剂稳定性试验指导原则”，将样品置于紫外分析仪内，保持与 365nm 紫外光源相同距离进行光照，分别于 1、2、3、4 和 5d 取样，照有关物质探索性研究项下的色谱条件，测定紫外光照后相关杂质含量的变化。同时，测定各厂家滴眼剂瓶在 365nm 紫外光照下滴眼剂瓶的透光率，并依据《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》<sup>[11]</sup>，对经 365nm 紫外光照 5d 后的乳酸环丙沙星滴眼液的眼部刺激作用进行考察。

2.2.4 抑菌剂浓度及其合理性探讨<sup>[12]</sup>

参考 ChP2015 对盐酸环丙沙星滴眼液中苯扎溴铵和羟苯乙酯的测定方法，测定乳酸环丙沙星滴眼液中苯扎溴铵和羟苯乙酯的含量。参考 ChP2015 四部通则 1105 和 1121，测定乳酸环丙沙星滴眼液的抑菌效力，并模拟其处方对抑菌剂的有效浓度进行考

察。

3 试验结果

3.1 按法定标准检验的结果和检验中发现的问题

表 2 为各企业抽取样品的分布情况，按法定标准检验，36 批样品均符合规定。但由于标准老旧，法定标准存在检验项目缺失和检验方法专属性差等问题，WS1-(X-090)-2002Z 标准中没有有关物质检查项，YBH37012005 标准中的有关物质检查项为等度洗脱，且其仅控制最大单个杂质及杂质总量，缺少对特定杂质 A、B、C、D 和 E 的控制；含量测定采用 UV 对照品法，易受羟苯乙酯等辅料的干扰。此外，

表 2 样品的分布情况

Tab. 2 Distribution of sample

生产企业	规格	批次	抽样比例 /%
A	8mL:24mg(按环丙沙星计)	10	27.8
B	8mL:24mg(按环丙沙星计)	23	63.9
C	5mL:15mg(按环丙沙星计)	3	8.3

本品为多剂量眼用制剂，从安全性考虑，需考察渗透压摩尔浓度及抑菌剂的合理性。

3.2 探索性研究结果

针对法定标准中的问题开展研究。

3.2.1 含量测定

采用 HPLC 方法测定乳酸环丙沙星的含量，按环丙沙星 ( $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ ) 计算，本次抽取的 36 批样品的标示量均在 90.0%~110.0% 范围。由含量的 95% 置信区间图可以看出，36 批样品的 HPLC 含量测定以 96.0% 为中心，偏离理论中心点 2.18%；3 家企业的样品含量在 92.1%~101.2% 范围 (95% 置信区间) 内，主要集中在 94.1%~98.0% 区间；不同厂家间样品含量差异较大 (图 1)。比较法定检验 (UV 测定) 与

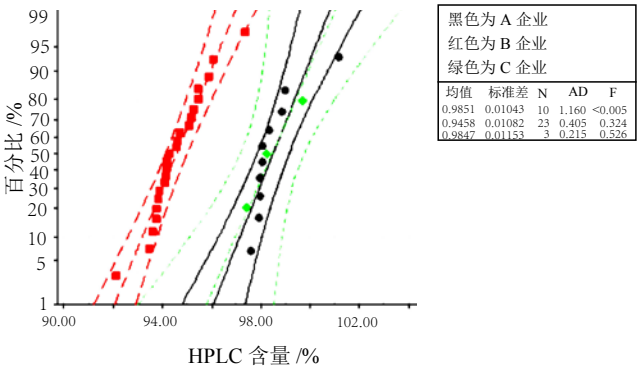
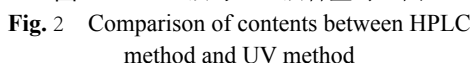


图 1 95% 置信区间图 (HPLC 法含量测定)

Fig. 1 95% confidence interval diagram (content determination by HPLC)



### 3.2.2 有关物质

1: 未知杂质, 2: 杂质 C, 3: 氧氟沙星, 4: 环丙沙星, 5: 羟苯乙酯, 6: 溶剂

**Fig. 3** Typical chromatogram of sample solution (related substance of B company)

序号	生产厂家	批号	杂质 C/%	其他最大杂质 I/%	杂质和 I/%
1	A 企业	1810108	0.03	0.05	0.19
2	A 企业	1902110	0.03	0.05	0.27
3	B 企业	18032101	0.04	0.04	0.18
4	B 企业	18032302	0.04	0.03	0.22
5	A 企业	1810108	0.03	0.05	0.16
6	B 企业	19012301	0.06	0.06	0.22
7	A 企业	1810108	0.03	0.05	0.20
8	B 企业	18093001	0.05	0.20	0.43
9	A 企业	1810108	0.03	0.05	0.19
10	B 企业	19012301	0.06	0.06	0.26
11	B 企业	18071401	0.04	0.04	0.24
12	B 企业	18093001	0.05	0.20	0.44
13	B 企业	19012301	0.06	0.06	0.23
14	B 企业	19032001	0.05	0.16	0.43
15	B 企业	18093001	0.05	0.20	0.44
16	B 企业	19012301	0.08	0.09	0.32
17	B 企业	19012301	0.06	0.06	0.26
18	B 企业	19032001	0.06	0.17	0.44
19	A 企业	1810108	0.03	0.03	0.21
20	B 企业	19032001	0.09	0.26	0.43
21	B 企业	19012301	0.05	0.05	0.21
22	B 企业	19032001	0.05	0.16	0.46
23	A 企业	1810108	0.03	0.04	0.23
24	B 企业	18071401	0.03	0.03	0.21
25	B 企业	19032001	0.05	0.16	0.49
26	A 企业	1810108	0.03	0.05	0.35
27	C 企业	1904291E	0.03	0.05	0.31
28	C 企业	1904291E	0.03	0.05	0.32
29	B 企业	19032001	0.06	0.16	0.44
30	B 企业	19012301	0.06	0.06	0.33
31	B 企业	19032001	0.05	0.16	0.35
32	C 企业	1904291E	0.04	0.05	0.21
33	B 企业	19042501	0.05	0.10	0.27
34	B 企业	18093001	0.05	0.19	0.53
35	A 企业	1902110	0.03	0.05	0.19
36	A 企业	1902110	0.03	0.05	0.16

### 3.2.3 药物在 365nm 紫外光照下的稳定性

氟喹诺酮类药物的光降解和光毒性作用主要与光线中的 UVA (320~400nm) 有关, 365nm 是 UVA 紫外光源中最具特征性的 UVA 波长, 经该波长照射样品的动物光毒性结果与临床光毒性反应具有良好相



关性<sup>[13]</sup>。

试验表明，所有厂家的样品暴露在紫外光源下均可发生不同程度的光降解，杂质 C 及其他杂质均显著增加 (图 4)，增幅最大的为 A 企业产品，其杂质 C 含量由 0.03% 增加至 4.66%；其他最大单个杂质由 0.03% 增加至 0.79%；杂质总量由 0.21% 增加至 5.96%。B 企业产品杂质 C 的含量由 0.05% 增加至 2.27%；其他最大单个杂质的含量由 0.16% 增加至 0.24%；杂质总量由 0.43% 增加至 2.99%。C 企业产品杂质 C 的含量由 0.04% 增加至 1.86%；其他最大单个杂质的含量由 0.05% 增加至 0.35% 杂质总量由 0.21% 增加至 2.77%。

进一步分析发现，A 企业的低密度聚乙烯药用滴眼剂瓶在 365nm 紫外波长的透光率分别是 B 企业和 C 企业的 20 和 50 倍，是棕色滴眼剂瓶的 100 倍 (表 4)。提示各企业应该采取有效的避光措施。

此外，365nm 紫外光照 5d 后的乳酸环丙沙星滴眼液 (A 企业，批号：1810108)，对家兔眼部显示明显刺激，兔眼呈现弥漫性混浊、虹膜清晰可见、血管充血呈鲜红色，虹膜纹理清晰，瞳孔对光反应灵敏，个别有少量分泌物和轻微水肿，未经照射的产品单次给药及连续给药 5d 的刺激性评分与 0.9% 氯化钠注射液组无统计学差异。提示其光降解产物对眼部具有刺激性。为了避免光毒性的发生，建议企业采用切实有效的避光措施。

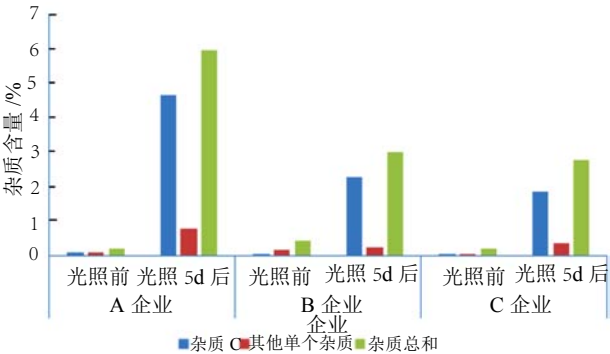


图 4 各企业光照前后有关物质含量变化  
Fig. 4 Changes of relevant substance content before and after illumination

表 4 365nm 波长下透光率结果  
Tab. 4 Transmittance results at 365nm

序号	样品名称	365nm 透光率 /%
1	A 企业滴眼剂瓶	50.7858
2	B 企业滴眼剂瓶	2.5635
3	C 企业滴眼剂瓶	1.0315
4	棕色滴眼剂瓶	0.5103

3.2.4 抑菌剂浓度及其合理性探讨

A 企业及 C 企业均以苯扎溴铵作为抑菌剂，其处方标示浓度分别为 0.12mg/mL 和 0.10mg/mL，B 企业以羟苯乙酯作为抑菌剂，其处方标示浓度为 0.5mg/mL。

测定各企业样品的抑菌剂含量，结果表明，A 企业样品中苯扎溴铵的含量分布在处方含量的 83.9%~88.2%，C 企业样品中苯扎溴铵的含量分布在 81.5%~84.9%。B 企业样品中羟苯乙酯的含量分布在处方含量的 93.3%~98.5%。36 批样品均可满足中国药典 (ChP2015)、美国药典 (USP)、英国药典 (BP)、人用药品技术要求国际协调理事会 (ICH) 及欧盟对滴眼剂中抑菌剂含量的一般要求 (80.0%~120.0%)。由于检测到 A 企业及 C 企业的抑菌剂苯扎溴铵的含量均相对较低，应关注滴眼液瓶是否对其具有吸附作用。

按 ChP2015 四部通则 1105 及 1121 要求评价各企业样品的抑菌效力<sup>[12,14-15]</sup>。结果表明，A 企业和 C 企业样品抑菌效力均可达到 A 级，而 B 企业样品抑菌效力仅能达到 B 级。提示采用苯扎溴铵作为抑菌剂较羟苯乙酯更合理。

进一步评价苯扎溴铵作为抑菌剂浓度的合理性。A 企业和 C 企业处方接近，按照处方工艺配制苯扎溴铵浓度分别为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 和 0.12mg/mL 的乳酸环丙沙星滴眼液。经抑菌效力测定实验得到如下结论：苯扎溴铵浓度为 0 时，供试品抑菌效力不足以达到 B 级；苯扎溴铵浓度为 0.02mg/mL 时，供试品抑菌效力可达 B 级；苯扎溴铵浓度为 0.04mg/mL 时，供试品抑菌效力几乎可达到 A 级；苯扎溴铵浓度为 0.05mg/mL 及以上时，供试品抑菌效力均可好的达到 A 级。A 企业供试品处方中苯扎溴铵浓度为 0.12mg/mL，C 企业供试品中苯扎溴铵浓度为 0.10mg/mL，按抑菌剂的最低有效原则，两企业处方中的抑菌剂浓度均偏高。

4 讨论

4.1 影响本品质量的主要因素

(1) 质量标准不完善：标准不统一；缺少抑菌剂、渗透压摩尔浓度等安全性检验项目，WS1-(X-090)-2002Z 中缺少有关物质项；YBH37012005 中有关物质项检验方法专属性差，限度设置不合理；薄层鉴别和含量测定方法专属性差。该品种为老品种，质量标准相对滞后，不能满足对产品质量的有效控制<sup>[16]</sup>，亟待完善。

(2) 处方工艺: 通过抑菌效力、模拟使用过程中微生物污染、抑菌剂测定等项目的考察, 发现本品存在抑菌剂苯扎溴铵添加过量, 羟苯乙酯不适宜用作该品种抑菌剂的情况, 提示企业应结合产品抑菌效力试验结果和抑菌剂毒性, 按照最低有效原则, 选择合理的抑菌剂种类和浓度, 以提高产品的安全性。

#### 4.2 影响本品质量的次要因素

(1) 包装材料的透光性可能增加杂质产生的风险, 导致光毒性的发生。

(2) 3 个厂家的产品标签均未标明抑菌剂种类和标示量, 不利于临床医生正确选择及合理使用滴眼剂。

#### 4.3 其他

国家药品抽验显示, 该品种 11 家企业中仅抽到 3 家企业的样品, 72.7% 的药品批准文号闲置。多数批准文号闲置造成的不仅是社会资源的浪费, 而且企业长期不生产, 偶尔生产会存在质量风险, 在药品生产、不良反应监测以及上市药品的再评价等方面, 都不利于监督管理。

#### 参考文献

- [1] Domagala J M, Heifetz C L, Marland P H, *et al.* 1-Substituted 7-[3-(ethylamino)methyl]-1-pyrrolidinyl]-6,8-difluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acids[J]. *J Med Chem*, 1988, 31(5): 991- 996.
- [2] 李眉, 戚建军, 郭惠元. 我国喹诺酮类抗感染药物的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 1999, 30(6): 280-287.
- [3] 白建伟, 王雨生, 王海燕. 差示紫外分光光度法测定乳酸环丙沙星滴眼液的含量 [J]. 解放军药学学报, 2004, 20(5): 358-359.
- [4] 孙忠实, 史亦丽, 孙小芳. 国家新药新制剂总览西药卷 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 102
- [5] 张敬石, 严宝霞. 0.5% 盐酸环丙沙星与 0.2% 乳酸环丙沙星药代动力学性质的比较 [J]. 中国药学杂志, 1994, 29(7): 413-415.
- [6] 王俊东. 环丙沙星滴眼液治疗外眼细菌感染性疾病的疗效评价 [J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(14): 126-127.
- [7] 肖顺林, 叶云, 邓代全, 等. 乳酸环丙沙星滴眼液的制备及药效学研究 [J]. 泸州医学院学报, 1998, 21(4): 337-338.
- [8] Kang Y C, Hsiao C H, Yeh L K, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ocular infection in Taiwan: clinical features, genotyping and antibiotic susceptibility[J]. *Medicine*, 2015, 94(42): e1620.
- [9] 胡昌勤. 对抗生素药品评价性抽验基本思路与方法的思考 [J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(1): 1-11.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S](2015 年版二部). 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 906-908.
- [11] 国家食品药品监督管理总局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 2014: 65-67.
- [12] 史春辉, 肖宇, 于琦, 等. 国产乳酸环丙沙星滴眼液中抑菌剂使用合理性分析 [J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(3): 311-314, S1
- [13] 刘春, 刘进前, 袁征宇, 等. MRX-I、利奈唑胺和氟喹诺酮类药物的光稳定性比较研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(6): 424-428.
- [14] 顾珉, 扈春萍. 贝美前列素滴眼液的抑菌效力研究 [J]. 中国药品标准, 2014, 15(6): 442-445.
- [15] 刘广文, 丁勃. 溴芬酸钠滴眼液抑菌效力研究 [J]. 中国医药科学, 2016, 6(9): 45-49.
- [16] 胡昌勤. 2015 年版《中国药典》有关抗生素的增修订及其质量控制方向 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(20): 1764-1769.