

阿苯达唑聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的制备、性质及其组织靶向性研究

张学农^{1*}, 张 强¹, 温 浩², 王国荃², 孙殿甲²

(1. 北京大学 药学院 药剂系, 北京 100083; 2. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 目的 制备阿苯达唑聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(albendazole polybutyrcyanocrylate nanoparticles, ABZ-PBCA-NP) TDDS 给药系统, 并考察相关特性及组织分布靶向性。方法 种子乳化聚合法制备阿苯达唑纳米粒; 等温吸附法考察纳米粒载药特性; 动态透析法研究 4 种制剂的体外释药动力学; 同位素标记阿苯达唑纳米粒在小鼠脏器组织分布和生物利用度。结果 ABZ-PBCA-NP 体外释药遵循 Higuchi 方程, 加入 PVP 制成的载药纳米粒符合双指数函数。纳米粒的载药方式遵循 Langmuir 吸附方程。小鼠 ig^3H ABZ-PBCA-NP 后, 药物的肝、脾中的靶向指数分别为 11.4 和 3.9, 阿苯达唑纳米粒和混悬剂相对生物利用度分别为 76.0% 和 36.9%。结论 制备纳米粒加入 PVP 可使药物具吸附性和分散性, 纳米粒载体可降低药物与血浆蛋白结合率, 增强药物的肝、脾脏器靶向性和延缓释药。

关键词: 阿苯达唑; 纳米粒; 血浆蛋白结合率; 组织分布; 生物利用度

中图分类号: R943.4; R943.42 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)06-0462-05

Preparation of albendazole polybutyrcyanocrylate nanoparticles and study on its pharmaceutical properties and tissue distribution

ZHANG Xue-nong^{1*}, ZHANG Qiang¹, WEN Hao², WANG Guo-quan², SUN Dian-jia²

(1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100083, China;

2. Xinjiang Medical University, Urumuqi 830054, China)

Abstract: **Aim** To prepare the targeted drug delivery systems (TDDS), albendazole polybutyrcyanocrylate nanoparticles (ABZ-PBCA-NP), its pharmaceutical characters and tissue distributions were simultaneously investigated. **Methods** Albendazole nanoparticles were prepared with the emulsification-polymerization method and the drug-load mechanism of polybutyrcyanocrylate nanoparticles was studied with the equal-temperature adsorption principle. The dialyse dynamic of albendazole from ABZ-PBCA-NP was investigated in four formulations *in vitro*. The tissue distribution of albendazole in different drug vehicles was studied with isotope labelling experiment. **Results** ABZ-PBCA-NP and ABZ-PVP-PBCA-NP fit to the Higuchi and bi-exponent function *in vitro* respectively. The drug loaded in nanoparticles was abide by the Langmuir adsorption equation. Targeting index of albendazole in liver and spleen in mice are 11.4 and 3.9 after ig^3H ABZ-PBCA-NP. The bioavailability of albendazole nanoparticle and suspension are 76.0% and 36.9% respectively. **Conclusion** The absorptive capability of drug was enhance when 4% PVP was added into the nanoparticle, and its release time was lengthen. At the same time, the nanoparticles vehicles increase the albendazole bioavailability.

Key words: albendazole; nanoparticles; plasm protein binding rate; tissue distribution; bioavailability

阿苯达唑(albendazole, ABZ)属广谱抗蠕虫药, 是治疗棘球蚴和泡球蚴病的首选治疗药物之

—^[1-3]。由于 ABZ 疏水性强, 口服生物利用度低, 从而影响其疗效^[4]。胶体型纳米粒(nanoparticles, NP)属于靶向给药系统(TDDS), 具有粒径小, 释药缓慢特点, 在胃肠道内可通过派伊氏旁路转运。当直径小于 200 nm 的粒子进入体内后, 可被淋巴网状内皮系统作为异物吞噬, 尤其是肝枯否氏细胞摄入最高,

收稿日期: 2002-06-22.

基金项目: 新疆维吾尔自治区青年基金资助项目(2000015).

* 通讯作者 Tel: 86-10-62091717; E-mail: zhangxuenong@163.com

从而形成了特异被动靶向性^[5]。本文以阿苯达唑为模型药物,生物降解性氰基丙烯酸正丁酯(butycyanocrylate,BCA)为聚合材料,种子乳化聚合法制备阿苯达唑聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(ABZ-PBCA NP),加入聚维酮制成保护性纳米粒(ABZ-PVP-PBCA NP),分别考察两种制剂的体内外释药特性及 ABZ-PBCA NP 在小鼠中的脏器组织分布靶向性。

材料与方 法

药品及试剂 阿苯达唑粉(杭州制药厂,批号:980312);阿苯达唑标准品(Sigma Chemical Co.); α -聚氰基丙烯酸正丁酯, $\eta = 2 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$, $M_n = 153$ (广州白云医用胶公司);泊洛沙姆(沈阳药科大学制药厂);PVP_{k30},Sephadex G-50,Dextran-70(Sigma Chemical Co.);透析袋(Sigma,DI6 mm);³H-ABZ 由中国农业科学院原子能所标记,放射活度为 $4.33 \times 10^9 \text{ Bq}\cdot\text{mL}^{-1}$,HPLC 测定放化纯度 > 95%。1% ABZ 混悬液(SABZ):将药物加入 2%CMC-Na,600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌 30 min,充分混匀,备用;1% ABZ 溶液(LABZ):将药物用少量冰醋酸溶解,加水至刻度,用 10% NaOH 调节 pH 3.0,备用。2,5-二苯基噁唑(PIG)及 1,4-双(5-苯基噁唑)苯(IGIGP)为上海试剂一厂进口分装。萘、甲酸、过氧化氢、正辛醇及二氧六环等均为分析纯。

仪器 MS7800 型液体闪烁分析仪(Backman),超声波清洗器(上海超声波总厂),100CX-II 电子显微镜(日本日电公司),TU-1221 型紫外分光光度计(北京通用仪器公司),ZRS-8C 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂),DKZ-1 型电热恒温振荡器(上海精密实验设备有限公司)。

动物 昆明种小鼠,由新疆自治区地方病研究所动物室提供(一级清洁动物,医动字第 16002 号),体重(21.20 \pm 0.24) g,♀♂兼用。

阿苯达唑载药纳米粒制备 ABZ-PVP-PBCA-NP:采用种子乳化聚合法^[6]。称取右旋糖酐 70 1.0 g,泊洛沙姆 1 g,加入 2% ABZ 醋酸溶液(pH 3.0)80 mL 中,搅拌溶解,加水至 100 mL,快速注入 BCA 1 g,继续搅拌 12 h,得乳黄色胶体溶液;另取右旋糖酐 70 1.0 g 和 PVP 8 g 加入水 100 mL 于 60 °C 溶解,再加入泊洛沙姆 1 g,醋酸调 pH 3.0,800 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌下注入 BCA 1 g,得乳白色空白 PBCA NP 纳米粒胶体。用 10% NaOH 调节 PBCA NP 至 pH 5.0,注入同体积 2% ABZ 醋酸溶液中,继续搅拌 16 h,透析 24 h,

调节 pH 5.0,得乳白色 ABZ-PVP-PBCA NP。ABZ-PBCA NP:称取 ABZ 2 g,右旋糖酐 70 1.0 g,泊洛沙姆 1 g,加入 80% 醋酸溶液 100 mL,溶解后注入等体积空白纳米粒胶体溶液中,搅拌 16 h,透析 24 h,调节 pH 5.0。

包封率的测定^[7] 取制备的 ABZ-PBCA NP 适量,加 0.9% 氯化钠溶液稀释成 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液,取稀释液 0.5 mL,置 15 cm, ϕ 0.8 cm 的 Sephadex G-50 凝胶柱中,以 0.9% 氯化钠洗脱,分离并收集乳白色流分,得分离液 A。另取稀释液 0.5 mL,用 0.9% 氯化钠液稀释至相同体积,得未分离液 B。分别取 A 和 B 各 0.25 mL 置 25 mL 量瓶中,加冰醋酸 5 mL 溶解,加甲醇至刻度,摇匀,以甲醇为空白对照,在 295 nm 处测定吸光度,计算阿苯达唑含量,并按下式计算包封率。

$$\text{EP}\% = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100; \text{LD}\% = \frac{C_0 - C_1}{C_{\text{BCA}}} \times 100$$

式中 EP:纳米粒的药物包封率;LD:纳米粒的载药量; C_0 :分离前溶液中的 ABZ 浓度; C_1 :分离液流分中的 ABZ 浓度; C_{BCA} :纳米粒中的 BCA 浓度。

形态及粒径分布 采用磷钨酸染色、甲醛和锇酸 2 次固定法制备电镜样本。即用直径 2 mm 的玻璃棒插入热溶的 3% 琼脂浆中,使表面形成约 0.5~1 mm 的薄膜,冷却后将薄膜推下,形成小胶管。吸入待测样液后用热琼脂浆封口,4% 戊二醛固定 2 h,PBS 漂洗,1% 锇酸固定 1 h,环氧树脂包埋,切片,染色,电镜下观察。

载药特性 根据等温吸附原理^[8]。精密称取不同量的 ABZ 置 25 mL 量瓶中,加入 1% 泊洛沙姆和 5% 醋酸溶液各 0.5 mL,再加 1% BCA 溶液至刻度,摇匀,超声振荡 5 min,在 4 °C 冰箱放置 12 h,0.8 μm 微孔滤膜过滤,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心,取上清液测定 ABZ 浓度,计算吸附量。

体外释药试验 分别取 LABZ,SABZ 和 ABZ-PBCA NP 2 mL 装入透析膜中,固定于转篮中,置于 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 250 mL 中,按中国药典 2000 年版二部附录“小杯法”法项下操作。转篮速度 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,水浴温度(37 \pm 1) °C,测定药物的累积释放%。同时,测定 ABZ-PBCA NP 和 SABZ 两种药物不同 pH 生理盐水溶液中 48 h 的累积释药特征。

血浆及组织消化方法 精密称取血浆或组织 0.1 g,置于具塞试管中,加入甲酸 0.5 mL,辛醇 0.25 mL 和双氧水 0.2 mL,消化温度(75 \pm 5) °C,消化时间 1.5 h,冷却,得澄清的消化液。

血液及组织样品中回收率考察 取小鼠 5 只, 眼眶取血 0.2 mL 后处死, 剖取心、肝、脾、肺、肾、胃、脑和肌肉等各 0.1 g, 加入定量的 ³H ABZ 溶液, 按上述方法进行消化。精密取消化液 100 μL 置于闪烁瓶中, 加入 Bray 闪烁液 5.0 mL, 摇匀, 测定放射性计数值 Bq·mL⁻¹。取同量 ³H ABZ, 不加脏器同法处理后测得的 Bq·mL⁻¹ 值为 100%, 比较得 ³H ABZ 在各脏器中的回收率为 91.3% ~ 103.0%。由于各脏器及血中放射量回收率较高, 具可比性, 故未进行淬灭校正。

血浆蛋白结合率测定 取相同血型的健康人混合血浆 2.0 mL 于透析管中, 透析管二端用纱线扎紧, 分别悬于盛有含 0.5% ³H ABZ 溶液和 ³H ABZ-PBCA NP 药物的磷酸缓冲液 10 mL 的具塞玻璃管中, 用残留线段调节袋内外液面在同一水平面。置 (37 ± 1) °C 的水浴振荡器中进行平衡透析 24 h。取样 0.2 mL, 消化处理后加闪烁液, 测定放射强度。以下式计算血浆蛋白结合率。

$$ED \% = \frac{(\text{袋内放射性} - \text{袋外放射性})}{\text{袋内放射性}} \times 100 \%$$

根据 Scatchard 平衡原理公式 $v/[D] = NK - vK$ 推算出相关的结合常数 K 和 N 值^[9]。式中: $[D]$ 为游离药物的摩尔浓度, ED 为结合药物的浓度与血浆蛋白质总浓度; N 为蛋白质与药物的结合点; K 为结合平衡常数。

小鼠体内的组织分布及药代动力学 取体重 (20.2 ± 2.2) g 的健康小鼠 120 只, 随机平均分为 3 组。分别以 3.7×10^8 Bq·kg⁻¹ 的放射量 ig ³H ABZ-PBCA NP, ³H SABZ 和 iv ³H LABZ, 于 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 和 48 h 各处死 5 只小鼠, 取其肝、脾、肾、心、肺、胃、脑、肌肉和血, 称重, 按照样品处理得消化液, 测放射性强度, 并计算各脏器组织及血浆 (以体重 8% 计算全血中药物的总 Bq 值) 的总 Bq 值。

结果

1 粒径大小及分布

从电镜图片测定 500 个粒子方向径, SAS 程序统计, 结果 1% ABZ-PBCA NP 平均粒径 (123 ± 25) nm, 包封率为 (81 ± 7)%, 载药量为 (57 ± 4)%; 1% ABZ-PVP-PBCA NP 平均粒径为 (114 ± 14) nm, 包封率为 (88 ± 6)%, 载药量为 (58 ± 6)%, 跨距为 0.80, 粘度为 3.7 mPa·s。

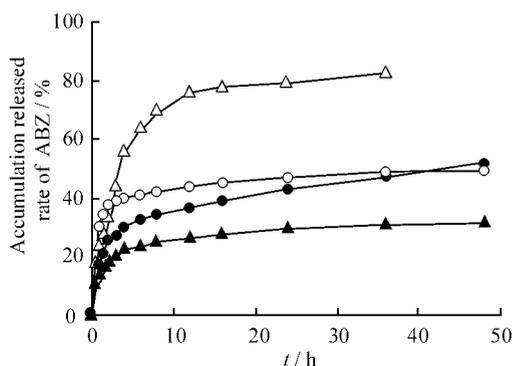
2 吸附药物方式

将 PBCA NP 体外吸附阿苯达唑数据代入

Freundlich 经验公式与 Langmuir 吸附等温式, 经回归处理得 Freundlich 经验公式: $y = 0.5481 C_i^{0.3181}$; $r = 0.9896$; Langmuir 吸附等温式: $C_i/y = 1.729 C_i + 0.2630$ $r = 0.9968$, 由相关系数可知, PBCA NP 载药方式更符合 Langmuir 吸附理论。

3 释药规律

分别测定 LABZ, SABZ, ABZ-PBCA NP 和 ABZ-PVP-PBCA NP 保护胶体, 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸为释放介质 48 h 内药物的累积释药, 结果见图 1。



△ —△ LABZ; ○ —○ ABZ-PBCA NP; ● —● ABZ-PVP-PBCA NP; ▲ —▲ SABZ

Figure 1 Release profiles of ABZ from four vehicles in 0.1 mol·L⁻¹ HCl

ABZ: Albendazole; PBCA: Polybutycyanocrylate; PVP: Polyvinyl pyrrolidone; NP: Nanoparticles

将上述 4 种剂型 ABZ 累积溶出 % 时间数据进行 Higuchi、单指数和二项指数模型嵌合, 结果见表 1。

Table 1 Criteria for goodness of fitting in 0.1 mol·L⁻¹ HCl

Sample	Fitting equiton	r ²	AIC
ABZ-PBCA NP	$Q = 1 - [54.76 \exp(-0.084t) + 46.21 \exp(-0.002t)]$	0.9884	-43.28
ABZ-PVP-PBCA NP	$Q = 0.1016t^{1/2} + 0.084$	0.992	-54.32
LABZ	$\log(1 - Q) = -0.0655t + 1.987$	0.9642	-67.46
SABZ	$\ln \ln(1 - Q) = 0.5831 \ln t - 2.711$	0.982	-58.37

AIC: Akaike's information criterion

其中, ABZ-PBCA NP 和 ABZ-PVP-PBCA NP 的累积释药分别遵循二项指数函数和 Higuchi 方程函数; ABZ 溶液和混悬剂分别符合单指数函数和 Weibull 函数。

4 正常人血浆的蛋白结合率

³H ABZ 和 ³H ABZ-PBCA NP 的正常人体血浆蛋白结合率结果见表 2。

Table 2 ^3H ABZ and ^3H ABZ-PBCA NP protein binding by bank plasma

Concentration / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	^3H ABZ/ %	^3H ABZ-PBCA NP/ %
0.50	82 ± 8	39 ± 4
1.00	86.6 ± 2.0	41.5 ± 2.9
1.50	89.9 ± 2.9	44 ± 5
2.00	90 ± 4	44 ± 3
3.00	90.7 ± 2.2	49 ± 5

以平衡后的袋内外数据为依据,采用 Scatchard 理论计算 ^3H ABZ 的人体蛋白的结合常数。以 v/D 对 K 回归得方程为: $v/D = 0.0968K - 2.6668$ $r^2 = 0.9872$,即正常人体 ABZ 的血浆蛋白结合常数 $K = 0.0968$, $N = 1.667$,即 1 分子的血浆蛋白可与 2 ~ 3 个分子药物结合。

5 药物体内分布

以 ig ^3H SABZ 为对照,测定不同时间点 ^3H ABZ-PBCA NP 各组织脏器中的放射性强度,计算 4 h 内肝、脾等重要脏器组织药物总量,结果见图 2。

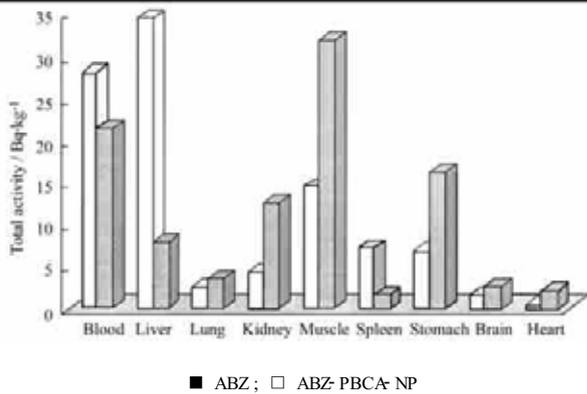


Figure 2 Distribution of ^3H ABZ in mice tissues 4 h after ig ^3H ABZ-PBCA NP and ^3H SABZ

两种剂型 ig 给药后 45 min 及 8 h,肝脏中 ABZ 分布占总量的 28.44% 和 30.93%,4 h 达到高峰,占总量的 58.6%,与混悬剂比较其肝组织分布量显著增大。

6 组织靶向性的定量评价

采用靶向性指数(TI)、选择性指数(SI)和相对摄取率(r_c)评价 ^3H SAB 和 ^3H ABZ-PBCA NP 组织靶向性,结果见表 3。

从表 3 中可知,纳米粒药物在肝、脾中的靶向指数分别为 11.4 和 3.9,选择性指数为混悬剂的 4.9 和 4.0 倍。肝和脾放射性之和占体内药物总量的 46.5%,显示了纳米粒的淋巴系统的靶向特性。与混悬剂对照,纳米粒可降低其他组织中的药物分别

总量,脑中相对摄入量为 ABZ 混悬剂 44.0%,提高药物疗效的同时,降低药物不良反应。

Table 3 Drug targeting parameters in tissues of mice after ig ^3H ABZ-PBCA NP and ^3H ABZ suspension ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Tissue	Parameter		
	TI	SI	r_c
Blood	3.3 ± 0.5	2.8 ± 0.4	1.20 ± 0.21*
Liver	11.4 ± 2.3	4.9 ± 0.4	2.1 ± 0.3**
Spleen	3.9 ± 0.8	4.0 ± 0.6	1.70 ± 0.19**
Brain	1.37 ± 0.16	1.24 ± 0.26	0.44 ± 0.05**

TI: Targeting index; SI: Selective index; r_c : Relative extraction

7 非隔室模型参数

iv ^3H LABZ 溶液、 ig ^3H ABZ-PBCA NP 和 ^3H SABZ,测定血中药物放射强度,其经时过程见图 3。

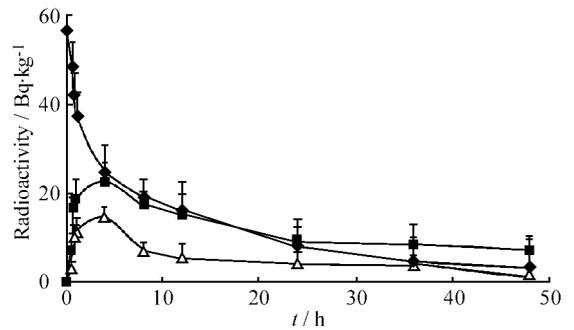


Figure 3 Radioactivity-time curve of ABZ in mice plasma after iv ^3H LABZ, ig ^3H ABZ-PBCA NP and ^3H SABZ

采用统计矩法计算相关非隔室模型参数和绝对生物利用度,结果见表 4。

Table 4 Parameters calculated with statistical moment

Parameter	^3H LABZ	^3H ABZ-PBCA NP	^3H SABZ
$AUC_{0-8h}/h \cdot \text{Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$	647.3	492.2	239.0
MRT/h	50.8	110.3	32.4
VRT/h ²	204.9	169.9	171.5
K/h^{-1}	0.0199	0.008	0.03
$F/\%$		76.0	36.9

非隔室模型参数结果显示,ABZ-PBCA NP 纳米粒 ig 的生物利用度为 76.0%,MRT 为 110.3 h,而同量 ABZ 混悬剂的生物利用度为 36.9%,MRT 为

32.4 h,表明纳米粒作为药物载体能显著提高生物利用度,延长体内作用时间。

讨论

种子乳化聚合制备纳米粒利用较低 pH 仅有部分 BCA 聚合形成种子纳米粒,同时可将药物包裹在其中。当再加入空白纳米粒时,由于 pH 升高促使聚合反应继续进行,形成的纳米粒可通过吸附和嵌合方式载药,与空白纳米粒的吸附载药相比具有更高的包封率。在溶液中加入 4% PVP 可增大溶液粘度,提高载体的吸附性^[10],其体外释药呈双指数函数,有“爆破”释药特点,同时可提高纳米粒的物理稳定性。

³H ABZ-BCA-NP 的血浆蛋白结合率显著低于游离药物溶液,且随剂量的依赖性较小,可能是由于药物吸附纳米粒表面或部分包裹其中,纳米粒聚合度大,形成了类似蛋白质样结合,具有一定的空间位阻,阻碍了药物与蛋白质之间的结合。同时,由于纳米粒的负电性与药物基团(正电)之间的亲和力大于药物与蛋白质引力^[11],也能有效地防止二者的结合。

采用放射性示踪对阿苯达唑纳米粒小鼠组织分布研究显示,非血管给药肝、脾中药物分布总量均显著地高于对照组。其中肝、脾纳米粒药物在肝、脾中的靶向指数分别为 11.4 和 3.9,具有淋巴系统的靶向性。小鼠 ig 阿苯达唑纳米粒后 4 h,肝脏分布量占给药总量的 58.64%。与³H ABZ 相比较纳米粒的生物利用度为 74.55%,显著地高于 ABZ 混悬剂。在制备中阿苯达唑易溶于含有 BCA 醋酸液,制成纳米粒后载药量较混悬液的可溶性药物浓度显著增大,且纳米粒的分散度远大于混悬液中药物颗粒,在吸收消化道中粘附在粘膜表面,延长药物滞留时间和缓慢释放,多种因素均有利于促进药物吸收和延长药效。因此,体内脏器组织中分布结果显示,纳米粒作为载体提高 ABZ 肝靶向同时可降低其他组织中的药物分别总量,脑中相对摄入量仅为 ABZ 混

悬剂 44.0%。由于包虫病发病部位多集中于肝脏,利用纳米粒靶向特点达到提高疗效和降低中枢毒性作用。

References:

- [1] Mohamed AE, Yasawy MI, Al Karawi MA. Combined albendazole and praziquantel versus albendazole alone in the treatment of hydatid disease [J]. *Hepatogastroenterology*, 1998, **45**(23): 690 - 694.
- [2] Venkatesan P. Albendazole [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1998, **41**(2): 145 - 147.
- [3] Arshady R. *In vivo* targeting of colloidal carriers by novel graft copolymers [J]. *J Mol Recognit*, 1996, **9**(5 - 6): 536 - 542.
- [4] Zhang ZR, Lu W. Study on liver targeting and sustained release hydroxycarbonyl polybutylcyanoacrylate nanoparticles [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1997, **32**(3): 222 - 227.
- [5] Gessner A, Waicz R, Lieske A, et al. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption [J]. *Int J Pharm*, 2000, **196**(2): 245 - 249.
- [6] Zhang XN, Miao ED, WANG GQ, et al. The preparation and release kinetics of albendazole nanoparticles [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2002, **19**(2): 114 - 117.
- [7] Qi XR, Maitani Y, Hou XP, et al. Interactions of insulin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposome [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, **35**(12): 924 - 928.
- [8] Hou XP. *Physic chemistry* (物理化学) [M]. Vol 4. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000. 286 - 293.
- [9] Walk JL. Effects of localized pasteurized haemolytic infection on erythromycin-binding properties of bovine alpha₁-acid glycoprotein, albumin, serum, and tissues chamber fluids [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, **38**(10): 2392 - 2395.
- [10] Oksanen CA, Zografi G. Molecular mobility in mixtures of absorbed water and solid poly(vinylpyrrolidone) [J]. *Pharm Res*, 1993, **10**(6): 791 - 799.
- [11] Lück M, Paulke BR, Schröder W, et al. Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics [J]. *J Biomed Mater Res*, 1998, **39**(3): 478 - 485.