

- Steroid Biochem, 2020, 199: 105548.
- [2] TAMAUCHI S, KAJIYAMA H, UTSUMI F, et al. Efficacy of medroxyprogesterone acetate treatment and retreatment for atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2018, 44(1): 151-156.
- [3] BAIK S, MEHTA F F, CHUNG S H. Medroxyprogesterone acetate prevention of cervical cancer through progesterone receptor in a human papillomavirus transgenic mouse model [J]. Am J Pathol, 2019, 189(12): 2459-2468.
- [4] SUN R, GUO Y, YIN N, et al. Preparation of sterile long-acting injectable medroxyprogesterone acetate microcrystals based on anti-solvent precipitation and crystal habit control [J]. Expert Opin Drug Del, 2019, 16(10): 1133-1144.
- [5] 杨梦瑞, 李鹏, 简凌波, 等. 甲砒霉素纯度标准物质定值研究及其不确定度评估[J]. 农产品质量与安全, 2019, (5): 63-68.
- [6] YANG D Z, SU B, BI Y C, et al. Preparation and certification of a new salvianolic acid a reference material for food and drug research [J]. Natur Prod Biopros, 2020, 10(2): 67-75.
- [7] TANGPAISARNKUL N, TUCHINDA P, WILAIRAT P, et al. Development of pure certified reference material of stevioside [J]. Food Chem, 2018, 255: 75-80.
- [8] 刘金涛, 李玲, 董家吏, 等. 柚皮素标准物质的研制及不确定度评定[J]. 分析测试学报, 2020, 39(2): 190-197.
- [9] 林涛, 耿慧春, 陈兴连, 等. 葫芦巴碱标准物质的研制 [J]. 化学分析计量, 2018, 27(4): 1-5.
- [10] 范培蕾, 赵雨佳, 梁亮, 等. 生物医学标准物质的发展与挑战 [J]. 计量技术, 2019, (10): 58-61.
- [11] 黄海雁. 浅析标准物质的用途及作用 [J]. 科技资讯, 2019, 17(22): 194-195.
- [12] 陈亚飞, 刘明理, 谢晶鑫, 等. 药品标准物质的管理与研制生产质量控制 [J]. 中国药事, 2018, 32(11): 1505-1510.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1527.
- [14] 中国食品药品检定研究院. 化学药品对照图谱集总谱 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 3-7.

枸橼酸爱地那非人肝微粒体代谢产物 鉴定及性别差异*

赵晓悦, 宋俊科, 杜冠华

(北京协和医学院 & 中国医学科学院药物研究所药物靶点研究与新药筛选北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要 目的 研究枸橼酸爱地那非在不同性别来源的人肝微粒体体外代谢孵育体系中的代谢差异。方法 将枸橼酸爱地那非与不同性别来源的人肝微粒体进行体外共孵育, 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪, 鉴定并推测爱地那非在不同性别来源的人肝微粒体中的代谢产物。色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm×1.7 μm), 流动相为乙腈与 0.4% 甲酸溶液, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹。采用电喷雾离子源, 正离子模式检测。结果 结合色谱保留时间和质谱碎片离子信息, 在体外肝微粒体孵育体系中鉴定了原型分子爱地那非, 以及爱地那非经 I 相代谢反应产生的 8 种代谢产物。所有代谢产物均为水溶性分子, 无明显毒性结构。不同性别肝微粒体孵育体系中检测到的代谢产物种类相同。结论 建立了爱地那非的体外肝微粒体孵育体系模型, 初步研究推测不同性别人群对爱地那非的肝脏微粒体代谢过程一致。

关键词 爱地那非; 枸橼酸; 肝微粒体; 代谢产物; 性别差异

中图分类号 R917; R927.1

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2020)11-1491-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2020.11.007

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Metabolites Identity and Gender Differences of Aildenafil Citrate in Human Liver Microsomes

ZHAO Xiaoyue, SONG Junke, DU Guanhua (Beijing Key Lab of Drug Target and Screening Research, Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

ABSTRACT Objective To investigate the differences in aildenafil citrate metabolites in liver microsomes from different genders. **Methods** Aildenafil citrate were incubated with human liver microsomes from different gender *in vitro*, and a UPLC/Q-TOF MS method was developed to identify the metabolites of aildenafil in human liver microsomes from different genders. The chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm×1.7 μm) using a gradient elution with the mobile phase consisting of acetonitrile and methanol containing 0.4% formic acid at 0.3 mL·min⁻¹ flow rate. A Micro mass-Q-

Tof Premier mass spectrometer coupled to an ESI source was operated in positive ion mode. **Results** By comparing the retention time and fragment ions, 8 kinds of metabolites, as well as the parent compound, were identified in human liver microsomes from different genders. All metabolites were water-soluble molecules without obvious toxic structure. There were no differences among metabolites of different groups. **Conclusion** The liver microsomal incubation model of aildenafil citrate was established, and the research provided possible reasons that aildenafil citrate had consistent liver metabolic processes in different gender groups.

KEY WORDS Aildenafil, citrate; Liver microsomes; Metabolites; Gender differences

磷酸二酯酶是有多种亚型的一类以磷酸酯为底物的水解酶, V 型磷酸二酯酶 (phosphodiesterase 5, PDE5) 主要分布于阴茎海绵体、肺、大脑、血管平滑肌细胞, 血小板以及心肌细胞, 可特异性水解环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP), 从而调节阴茎和肺等器官或组织中血管平滑肌收缩力, 参与血小板聚集过程, 影响脑内 cGMP 信号传导途径^[1]。2005 年, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准 PDE5 选择性抑制药西地那非用于治疗肺动脉高压, 缓解患者呼吸困难等症^[2]。PDE5 选择性抑制药对于心肌梗死、心力衰竭等多种心血管疾病的治疗和预防作用也受到越来越多的研究和关注。

枸橼酸爱地那非是我国自主研发的一种高效 PDE5 选择性抑制药, 属于化学药品第 1.1 类新药^[3]。与同类药物分子相比, 爱地那非分子对 PDE5 的特异性结合力强, 结构共平面性好, 酯水分配比合理, 有利于药物吸收和分布^[4]。由于爱地那非前期开发主要针对男性勃起功能障碍 (erectile dysfunction, ED) 的临床治疗, 其临床前研究全部使用雄性动物, 临床试验受试者也均为男性^[5-10]。因此, 探究性别差异对爱地那非代谢的影响, 对于爱地那非药理学应用的开发和研究十分必要。

笔者在本研究建立不同性别来源人肝微粒体体外代谢孵育体系模型, 通过超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术, 鉴定爱地那非代谢产物, 探究不同性别别人肝微粒体代谢差异, 以期扩大临床应用范围提供实验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 药品与试剂 人肝 S9, 混合人源肝微粒体, 男性肝微粒体, 女性肝微粒体 [购买自瑞德肝脏疾病研究 (上海) 有限公司, 批号: X008023 (人肝 S9), X038076 (混合人源肝微粒体), MX008064 (男性肝微粒体),

FX008064 (女性肝微粒体)]; 枸橼酸爱地那非原料药 (悦康药业集团股份有限公司, 批号: 019141102,); 其他试剂与溶剂均为市售分析纯。

1.2 仪器 Waters CQUITY UPLC 液相色谱系统, Waters Xevo G2 QTof 质谱仪, Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, Waters, USA); 高速冷冻离心机 (美国 Beckman); Eppendorf 移液器 (德国 Eppendorf); Eppendorf 离心机 (德国 Eppendorf)。

1.3 分析条件 色谱条件: Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相: A 为乙腈, B 为 0.4% 甲酸溶液; 洗脱程序: 0~2 min (10% A), >2~47 min (10% → 100% A), >47~52 min (100% A), >52~55 min (100% → 10% A), >55~60 min (10% A); 流速 0.3 mL · min⁻¹; 进样量为 5 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源, 正离子模式; 离子源温度 100 °C, 脱溶剂气温度 350 °C, 脱溶剂气流速 600 L · h⁻¹, 锥孔气体流速 50 L · h⁻¹, 锥孔电压 30 V, 毛细管电压 3 kV, 质量扫描范围 m/z 50~1200。使用 MassLynx V4.1 进行数据采集与分析。

1.4 人肝微粒体孵育体系 孵育体系终体积 1 mL, 其中人肝 S9 或微粒体蛋白质浓度 1 g · L⁻¹, 爱地那非浓度 100 μg · mL⁻¹, 以三羟甲基氨基甲烷盐酸 (Tris-HCl) 缓冲液 (pH 值 = 7.4) 补齐体积。37 °C 预孵 5 min, 加入终浓度 1 mmol · L⁻¹ 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 辅酶溶液启动反应。37 °C 恒温孵育 8 h。到达终点后加入 5 倍体积 (5 mL) 冰乙腈终止反应, 振荡 3 min, 高速离心 10 min, 吸取上清液吹干。复溶后振荡离心, 取上清液进样。对照组不加爱地那非, 以 Tris-HCl 缓冲液代替, 其余同上述处理过程。

1.5 代谢产物的检测和鉴定 ①数据库的建立。使用 ChemDraw 软件绘制爱地那非化合物结构式, 连同微粒体代谢可能发生的所有反应类型 (包括 I 相反应和 II 相反应) 等相关信息一起导入沃特世 UNIFI 科学信息系统平台系统, 形成数据库; ②获得初步鉴定结果。由 UNIFI 软件根据导入的信息自动鉴定识别可能的代谢产物, 并设置过滤器参数对识别结果进行初步

收稿日期 2020-03-20 修回日期 2020-05-12

基金项目 * 国家重点研发计划 (2016YFC1000905)。

作者简介 赵晓悦 (1995-), 女, 山东德州人, 在读博士, 主要研究方向: 药物代谢与amp;新药发现。ORCID: 0000-0002-1050-9105, 电话: 010-63165313, E-mail: zhaoxiaoyue@imm.ac.cn。

通信作者 杜冠华, 博士生导师, 博士, 研究方向: 新药发现与amp;药理学。电话: 010-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn。

筛选,过滤掉响应值 <2000 、精确质量数误差 $>10 \times 10^{-6}$ 的化合物,得到初步的化合物鉴定结果;③人工识别和鉴定。参考已有文献报道,结合爱地那非质谱特征、相对保留时间、精确分子质量、分子式和多级质谱碎片等信息,对初步鉴定结果进行验证核查,得到最终代谢产物鉴定结果。

2 结果

2.1 爱地那非的液相色谱-质谱(LC-MS)表征 采用 LC-MS 方法检测爱地那非色谱和质谱裂解行为。保留时间 13.6 min, 准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 489.227 9, 分子式为 $C_{23}H_{32}N_6O_4S$, 见图 1。爱地那非产生的二级碎片离子有 m/z 377.1311, 312.1585, 284.1281, 113.1099 和 99.0924。爱地那非分子失去哌嗪结构(m/z 113.1099)形成碎片离子 m/z 377.1311, 而后通过 C-S 键裂解形成碎片离子 m/z 312.1585, C-O 键断裂又进一步形成碎片离子 m/z 284.1281。碎片离子 m/z 113.1099 失去烷基产生 m/z 99.0924。这些碎片离子信息可用于后续代谢产物的鉴定和分析。

2.2 爱地那非代谢产物的 LC-MS 表征及性别代谢比较 在 NADPH 存在的体外人肝微粒体孵育体系中, 爱地那非产生了多个代谢产物。图 2 显示了爱地那非在人肝 S9、混合人源肝微粒体、男性肝微粒体、女性肝微粒体孵育体系中代谢 8 h 得到的代谢产物总离子色谱图。由表 1 可知, 混合人源肝微粒体、男性肝微粒体和女性肝微粒体中均检测到了全部 8 种代谢产物; 人

肝 S9 中检测到除 M5 和 M7 以外 6 种代谢产物。表 1 详细总结了爱地那非及其 8 种代谢产物的化学式、准确质量、保留时间、碎片离子信等详细色谱和质谱信息。8 种代谢产物的推测结构和代谢过程如图 3 所示。

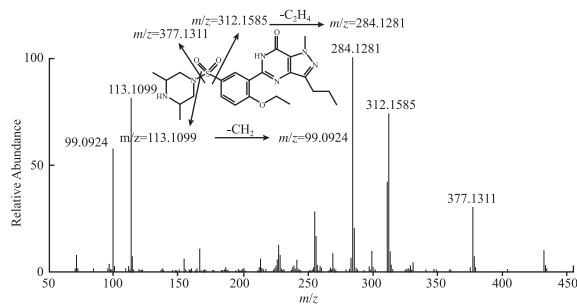
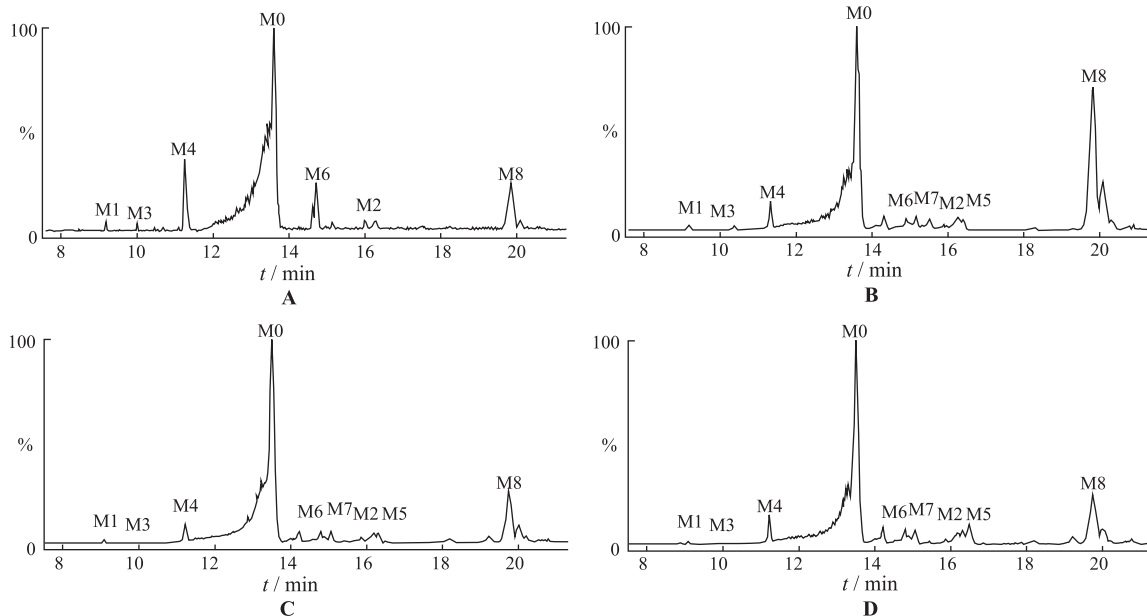


图 1 爱地那非的 MS/MS 谱图及可能的质谱裂解途径

Fig.1 MS/MS spectra and its proposed fragmentation pathway for aildenafil

2.3 爱地那非代谢产物的 LC-MS 鉴别 M1 和 M2 为爱地那非的羟基化产物。M1 和 M2 的准分子离子峰 m/z 505.2228 比原准分子离子高 15.9949 Da, 分子式为 $C_{23}H_{32}N_6O_5S$, 表明原分子中引入了一个氧原子。M1 的二级质谱解析中包括碎片离子 m/z 487.2310 ($C_{23}H_{31}N_6O_4S, -H_2O$), 375.1121, 310.1525, 282.1216, 113.1055, 99.0945。其中 m/z 375.1121 ($C_{17}H_{19}N_4O_4S$),



A.人肝 S9 代谢;B.混合人源肝微粒体代谢;C.男性肝微粒体代谢;D.女性肝微粒体代谢。

图 2 爱地那非体外代谢 8 h 色谱图

A.human liver S9;B.mixed human liver microsomes;C.male liver microsomes;D.female liver microsomes.

Fig.2 Chromatograms of the *in vitro* metabolism of aildenafil at 8 h

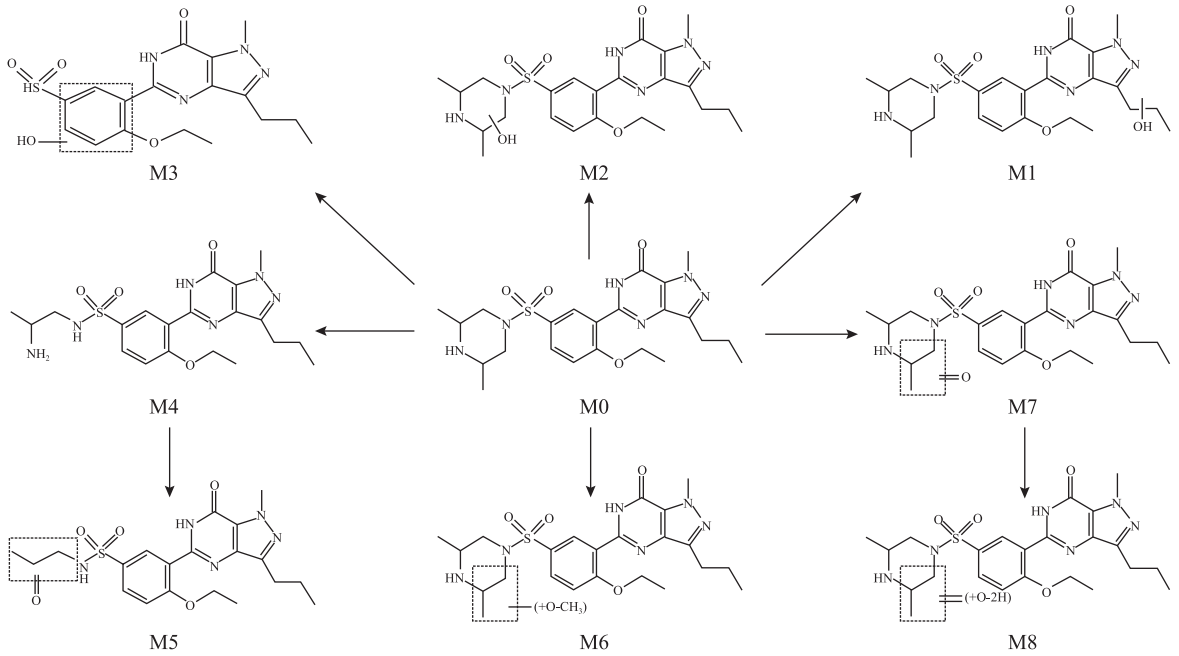


图 3 爱地那非在体外人肝微粒体中的代谢途径

Fig.3 Proposed metabolic pathways of aildenafil in human microsomes *in vitro*

表 1 爱地那非及其在人肝微粒体中代谢产物的质谱表征

Tab.1 LC-MS/MS characterization of aildenafil and its metabolites identified in human liver microsomes

代谢产物	名称	保留时间/min	分子式	理论分子	检测分子	离子碎片	反应体系			
				量(m/z)	量(m/z)		人肝 S9	男性肝微粒体	女性肝微粒体	混合人源肝微粒体
M0	Parent	13.6	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	489.2279	489.2277	377.1311, 312.1585, 284.1281, 113.1099, 99.0924	+	+	+	+
M1	hydroxylation	9.2	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S	505.2228	505.2220	487.2310, 375.1121, 310, 1525, 282, 1216, 113, 1055, 99.0945	+	+	+	+
M2	hydroxylation	16.3	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S	505.2228	505.2226	487.2266, 432.1837, 377.1272, 312.1657, 284.1281, 111.0959	+	+	+	+
M3	de-piperazine ring and hydroxylation	9.9	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₅ S	393.1227	393.1237	365.1019, 284.1348	+	+	+	+
M4	N,N'-deisopropylation	11.3	C ₂₀ H ₂₈ N ₆ O ₄ S	449.1966	449.1961	432.1795, 377.1311, 312.1694, 284, 1315	+	+	+	+
M5	Deamination and hydroxylation of M4	16.4	C ₂₀ H ₂₅ N ₅ O ₅ S	448.1649	448.1652	377.1311, 311.1547, 283.1222	-	+	+	+
M6	hydroxylation and de-methylation	14.9	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₅ S	491.2071	491.2067	449.2035, 432.1753, 377.1272, 311.1511, 284.1349	+	+	+	+
M7	hydroxylation and dehydrogenation	15.2	C ₂₃ H ₃₀ N ₆ O ₅ S	503.2071	503.2058	377.1351, 311.1582, 284.1349, 111.0916	-	+	+	+
M8	dehydrogenation of M7	19.9	C ₂₃ H ₂₈ N ₆ O ₅ S	501.1915	501.1911	377.1271, 311.1490, 284.1262	+	+	+	+

310.1525(C₁₇H₁₇N₄O₂), 282.1216(C₁₅H₁₃N₄O₂) 比原分子的离子碎片 m/z 377.1311(C₁₇H₂₁N₄O₄S), 312.1585(C₁₇H₁₉N₄O₂), 284.1281(C₁₅H₁₅N₄O₂) 低 2 Da(-2H), 表明羟基的引入位置是吡唑吡啶结构中的丙基侧链。碎片离子 m/z 113.1055, 99.0945 与原分子相同, 表明 M1 中哌嗪结构完整。而与 M1 不同的是, M2 中碎片离子 m/z 377.1272, 312.1657, 284.1281 与原分子相同, 而 m/z 111.0959(C₆H₁₁N₂) 比原分子的碎片离子 m/z 113.1099(C₆H₁₃N₂) 低 2 Da, 表明 M2 的羟基化发生在哌嗪结构中。

M3 为爱地那非中的 N-S 键断裂并引入羟基的产物。M3 的准分子离子峰 m/z 393.1227, 比原准分子离子低 96.1052 Da, 元素组成为 C₁₇H₂₀N₄O₅S, 且不存在碎片离子 m/z 113.1099 和 99.0924, 表明哌嗪环丢失, 吡唑吡啶结构中引入一个羟基。M3 的碎片离子 m/z 365.1019 元素组成为 C₁₅H₁₇N₄O₅S, 表明苯环上 C-O 键断裂, 丢失 C₂H₄ 结构。碎片离子 m/z 312.1657 和 284.1348 与原分子相同, 表明羟基在 C-S 键断裂后裂解, 推测羟基被引入到与 C-S 键相邻的碳中。

M4 为爱地那非的 N-N'脱烷基产物。M4 的准分子离子峰 m/z 449.1966 比原准分子离子低 40.0313 Da, 元素组成为 $C_{20}H_{28}N_6O_4S$, 表明原分子丢失了 C_3H_4 结构。M4 的二级质谱中存在碎片离子 m/z 377.1311, 312.1694, 和 284.1315, 而不存在 m/z 113.1099 和 99.0924, 表明哌嗪环结构破坏(N,N'-脱异丙基)。

M5 为 M4 脱氨基并发生羟基化的产物。M5 的准分子离子峰 m/z 448.1649 比 M4 的准分子离子低 1.0371 Da, 元素组成为 $C_{20}H_{25}N_5O_5S$, 表明在 M4 分子基础上发生脱氨基变化的同时又引入一个羟基。通过碎片离子 m/z 377.1311, 311.1547, 283.1222 的存在推断羟基的引入位置在破坏后的哌嗪结构中。

M6 为爱地那非的羟基化和去甲基产物。M6 的准分子离子峰 m/z 491.2071 比原准分子离子高 1.9792 Da, 元素组成为 $C_{22}H_{30}N_6O_5S$, 表明丢失甲基(- CH_2)并引入氧原子。M6 的二级质谱中存在碎片离子 m/z 377.1272, 311.1511 和 284.1349, 而不存在 m/z 113.1099 和 99.0924, 表明在哌嗪结构中发生了羟基化和甲基丢失。

M7 为爱地那非的羟基化和脱氢产物。M7 的准分子离子峰 m/z 503.2071 比原准分子离子高 13.9792 Da, 元素组成为 $C_{23}H_{30}N_6O_5S$, 表明结构上引入一个羟基并脱去两个氢原子。M7 的碎片离子 m/z 111.0916 比原分子的碎片离子 m/z 113.1070 ($C_6H_{13}N_2$) 低 2.0154 Da, 其他碎片离子 m/z 377.1351, 311.1582 和 284.1349 与原分子相同, 表明在哌嗪结构上发生脱氢变化并引入了氧原子

M8 为 M7 的脱氢产物。M8 的准分子离子峰 m/z 501.1915 比 M7 的准分子离子低 2.0156 Da, 元素组成为 $C_{23}H_{28}N_6O_5S$, 表明在结构上失去两个氢原子。M8 的二级质谱结构与 M7 相比缺少碎片离子 m/z 111.0916, 说明失去的氢原子来源于哌嗪结构, 脱氢变化后哌嗪结构被破坏。

3 讨论

研究表明,西地那非在小鼠体内的免疫调节作用存在药动学和药效学相关的性别依赖性差异^[11]。因此,在爱地那非的开发过程中,性别差异性研究十分重要。

本研究采用 UPLC-Q-TOF MS 法,最终共鉴定代谢产物 8 种,均为水溶性,无明显毒性结构的 I 相代谢产物。其中 M7(羟基化并脱二氢产物)和 M8(M7 进一步脱氢产物)为首次报道的代谢产物。

3 种不同性别人肝微粒体孵育体系检测到的代谢产物种类一致,表明爱地那非在不同性别人群肝脏微

粒体代谢过程中不存在代谢产物差异。由此推测,不同性别的人群对爱地那非的肝脏代谢过程一致,女性患者在服药过程中,不会因肝微粒体代谢过程而增加未知副作用。人肝 S9 样品中发现 6 种代谢产物,多为相对含量较高的代谢产物,推测这与人肝 S9 中酶成分较肝微粒体更为复杂,酶含量相对较低有关。

开展爱地那非的药物代谢性别差异研究,可以帮助阐明药物的毒副作用,对于药动学、药效学和药物的安全性评价等研究具有重要意义,为新适应证的开发提供了数据支持,同时为体外实验的结果外推至体内试验提供了理论支持。

参考文献

- [1] PIAZ V D, GRAZIANO A, VERGELLI C, et al. PDE5 inhibitors and their applications [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17 (24): 2564-2587.
- [2] ANDERSSON K E. PDE5 Inhibitors-pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175 (13): 2554-2565.
- [3] 吴友良. 枸橼酸爱地那非治疗勃起功能障碍的药动学、安全性及有效性研究 [J]. *中国药房*, 2013, 24 (2): 128-130.
- [4] 贺占举, 张凯, 金杰, 等. 枸橼酸爱地那非治疗勃起功能障碍的安全性和有效性研究 [J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12 (12): 1080-1083.
- [5] 赵侠, 孙培红, 周颖, 等. 健康男性多次口服爱地那非片的药代动力学和安全性 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2009, 25 (2): 120-123.
- [6] 赵侠, 孙培红, 周颖, 等. 枸橼酸爱地那非片 I 期临床耐受性研究 [J]. *中国新药杂志*, 2008, 17 (17): 1535-1538.
- [7] 赵侠, 孙培红, 周颖, 等. 健康男性空腹和进食后口服爱地那非片的单次药动学研究 [J]. *中国新药杂志*, 2008, 17 (19): 1707-1710.
- [8] XIAO C, TANG M, LI J, et al. Determination of sildenafil, vardenafil and aildenafil in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction-back extraction based on ionic liquid and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 931: 111-116.
- [9] WANG J, JIANG Y, WANG Y, et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to determine the pharmacokinetics of aildenafil in human plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44 (1): 231-235.
- [10] LI Y, WU L, GU Y, et al. Metabolism of aildenafil *in vivo* in rats and *in vitro* in mouse, rat, dog, and human liver microsomes [J]. *Drug Test Anal*, 2014, 6 (6): 552-562.
- [11] KARAKHANOVA S, YANG Y, LINK J, et al. Gender-specific immunological effects of the phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil in healthy mice [J]. *Mol Immunol*, 2013, 56 (4): 649-659.