

芍药苷脂质液晶纳米粒制备及体外释放研究

邱玲^{1,2}, 尹蓉莉¹, 申宝德², 张利红², 武娜², 郑娟^{1,2}, 韩晋^{2*}, 袁海龙^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 中国人民解放军第三〇二医院, 北京 100039

摘要: **目的** 制备芍药苷脂质液晶纳米粒(Pae-LLCN), 并考察其体外释药特性。**方法** 以包封率为指标, 采用自发乳化-超声法制备 Pae-LLCN, 用正交试验设计对 Pae-LLCN 的处方进行优化, 用透析法测定 Pae-LLCN 在 24 h 内的累积释放量并绘制释药曲线, 采用透射电镜、纳米粒度仪对其形态和粒径进行考察。**结果** Pae-LLCN 最佳处方为泊洛沙姆 407 (F127) 与甘油单油酸酯(GMO)质量比为 1:10、芍药苷投料量为 40 mg、磷酸盐缓冲液(PBS)的用量为 20 mL, 药物的平均包封率达到 73.72%, 载药量为 14.81%, 粒径(170±16) nm, 体外 24 h 累积释放量为 72.68%。**结论** Pae-LLCN 制备合理可行, 稳定性好, 有良好的缓释作用。

关键词: 芍药苷; 脂质液晶纳米粒; 体外释放; 包封率; 自发乳化-超声法; 正交设计; 透析法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)23-3495-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.23.009

Preparation of paeoniflorin lipid liquid crystalline nanoparticles and its *in vitro* release

QIU Ling^{1,2}, YIN Rong-li¹, SHEN Bao-de², ZHANG Li-hong², WU Na², ZHENG Juan^{1,2}, HAN Jin², YUAN Hai-long²

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. 302 Military Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Abstract: **Objective** To prepare paeoniflorin lipid liquid crystalline nanoparticles (Pae-LLCN), and to study its *in vitro* release behavior. **Methods** Using encapsulation efficiency (EE) as index, the Pae-LLCN were prepared by spontaneous emulsification and ultrasonic method, and the prescription of Pae-LLCN was optimized by orthogonal design. The *in vitro* release of Pae-LLCN within 24 h was measured by dialysis method, afterwards its morphology and particle size were studied by transmission electron microscope (TEM). **Results** The optimal formulation was poloxamer-glycerol monooleate (1:10), paeoniflorin inventory (40 mg), and PBS solution (20 mL). The average EE was 73.72%, the average DL was 14.81%, the size of nanoparticles was (170±16) nm, and the 24 h *in vitro* accumulative release rate was 72.68%. **Conclusion** The optimized process is rational and feasible, and the Pae-LLCN has good stability with better sustained release *in vitro*.

Key words: paeoniflorin; lipid liquid crystalline nanoparticles; *in vitro* release; encapsulation efficiency; spontaneous emulsification and ultrasonic method; orthogonal design; dialysis method

芍药苷(paeoniflorin, Pae)是赤芍总苷和白芍总苷的主要活性成分^[1], 具有抗凝、抗动脉粥样硬化、抗血栓、抗组织损伤、抗炎和免疫调节等药理活性^[2-4], 临床上常用于慢性肝炎、类风湿性关节炎等病的治疗。但是, 芍药苷胃肠吸收差, 体内生物

利用度低, 对温度及光照不稳定。由于肝首过效应、肠道转运体外排蛋白及药物理化性质的影响, 芍药苷口服绝对生物利用度仅为 3%~4%^[5-6]。目前, 有许多剂型如微乳^[7-8]、磷脂复合物^[9]、脂质体^[10]、微囊^[2]等用于提高芍药苷的稳定性和生物利用度。然

收稿日期: 2015-06-15

基金项目: 国家新药创制重大专项(2011ZX09201-201-14, 2012ZX09J12108-04C, 2013ZX09J13109-06C)

作者简介: 邱玲(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。E-mail: 766729415@qq.com

*通信作者 韩晋, 硕士, 博士生导师, 研究方向为中药制剂。Tel: (010)66933225 E-mail: hanjin302emba@163.com

袁海龙, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新型给药系统。Tel: (010)66933367 E-mail: yhlpharm@126.com

而,上述制剂都存在一定的局限性,微乳需要药物在油相中有较高的溶解度,磷脂复合物的制备需要有机溶剂且工艺复杂,脂质体则存在载药量低、稳定性差等问题。

脂质液晶纳米粒(lipid liquid crystalline nanoparticles, LLCN)是由一定浓度的两亲性脂质材料和表面活性剂在水中自乳化形成的含双连续水道和脂质区的闭合脂质双层且具有蜂窝状结构的纳米粒子^[11]。因其内部独特的双水道结构和巨大膜表面积,从而能够包封各种极性(亲水性、亲脂性或两亲性)的药物。与其他剂型相比,LLCN具有显著的优点,如制备工艺简单,材料具有生物相容性和黏着性、生物降解,能够增溶、包封、保护药物和促进药物吸收,还可提高药物的稳定性^[11-15]。此外,通过脂质材料的修饰,还可实现靶向给药^[16]。

为了提高芍药苷的稳定性和口服生物利用度,本实验采用自发乳化法联合超声技术法制备芍药苷脂质液晶纳米粒(Pae-LLCN),采用反透析法测定Pae-LLCN的包封率。采用正交设计对方剂进行优化,并对其体外释药性质、形态及粒径分布等进行初步的研究,为进一步的体内吸收评价奠定良好基础。

1 仪器与材料

KQ-500DE型超声数控波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;Winner801纳米粒度分析仪,济南微纳颗粒仪器股份有限公司;78-1型磁力恒温加热搅拌器,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;岛津LC-20AT高效液相色谱仪;透析袋,截留相对分子质量7 000,北京索莱宝科技有限公司。

芍药苷对照品,中国食品药品检定研究院,质量分数>96.4%,批号110736-201438;芍药苷,西安百川生物科技有限公司,质量分数90%,批号150113;甘油单油酸酯(GMO,批号9003-11-6)、泊洛沙姆407(F127,批号9003-11-6)均购自国药集团化学试剂北京有限公司;氢氧化钠(批号20130811)、磷酸二氢钠(批号20120214)均购自北京化工厂;甲醇、乙腈为色谱纯;去离子水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HPLC法测定芍药苷

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Alltima™C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(14:86),体积流量1.0 mL/min;检测波长

230 nm;柱温25℃,进样量10 μL。

2.1.2 溶液的配制 芍药苷对照品溶液的配制:精密称取芍药苷对照品适量,置25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为0.90 mg/mL的储备液。Pae-LLCN溶液的配制:精密量取Pae-LLCN溶液0.2 mL,置10 mL量瓶中,加适量甲醇超声15 min,冷却,加甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。空白辅料溶液的配制:精密量取空白LLCN溶液0.2 mL,置10 mL量瓶中,加适量甲醇超声15 min,冷却,加甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 专属性考察 分别取芍药苷对照品溶液、空白辅料溶液和Pae-LLCN溶液按照色谱条件,进样10 μL,记录色谱图,见图1。辅料对芍药苷的检测没有影响,证明此方法的专属性强。

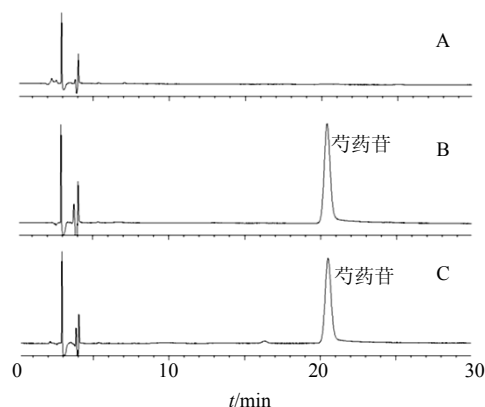


图1 空白辅料溶液(A)、芍药苷对照品(B)和Pae-LLCN供试品(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC of negative reference solution (A), Pae reference substance (B), and Pae-LLCN sample (C)

2.1.4 线性关系考察 精密量取芍药苷对照品储备液,加甲醇稀释得质量浓度为36.00、18.00、9.00、4.50、2.25 μg/mL系列对照品溶液,按“2.1.1”项色谱条件进样10 μL,测定峰面积。以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,得芍药苷回归方程为 $Y=12\,837X-2\,560.3$, $r=0.999\,9$,表明芍药苷在2.25~36.00 μg/mL具有良好线性关系。

2.1.5 精密度考察 精密吸取质量浓度为18.00 μg/mL的对照品溶液,连续进样6次,每次10 μL,按“2.1.1”项色谱条件测定峰面积。计算精密度,其RSD为0.33%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性考察 取同一批号Pae-LLCN(批号

20150410)6份,精密量取0.2 mL于10 mL量瓶中,加适量甲醇破乳,冷却,加甲醇定容至刻度,摇匀,过0.45 μm 滤膜,取续滤液,按“2.1.1”项色谱条件,测定峰面积,计算Pae-LLCN中芍药苷的量,其RSD为1.32%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性考察 取同一批号Pae-LLCN(批号20150410),按“2.1.6”项下方法制备样品溶液,分别于0、1、2、4、8、12、24 h按照上述色谱条件测定峰面积,考察稳定性,其RSD为0.70%,表明样品在24 h内稳定。

2.1.8 加样回收率考察 精密量取已测定(1.763 mg/mL)的同一批Pae-LLCN(批号20150410)样品溶液0.1 mL,各6份,置10 mL量瓶中,分别加入0.2 mL芍药苷对照品储备液,按“2.1.6”项下方法制备供试品溶液。按“2.1.1”项色谱条件测定峰面积,计算加样回收率,结果芍药苷的平均加样回收率为100.25%,RSD为1.70%,表明方法准确性良好。

2.1.9 Pae-LLCN包封率和载药量的测定 本实验采用反透析法测Pae-LLCN的包封率^[17-18]。取6 mL Pae-LLCN于烧杯中,用去离子水稀释至200 mL。取6 mL去离子水置于透析袋中,两端扎紧,100 r/min恒温磁力搅拌。透析8 h,精密吸取透析袋内溶液1 mL,过0.45 μm 滤膜,HPLC测定游离药物质量浓度($C_{\text{游离}}$)。取0.2 mL Pae-LLCN用甲醇破乳,过0.45 μm 滤膜,HPLC测定芍药苷总质量浓度($C_{\text{总浓度}}$),计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = [C_{\text{总浓度}} \times 6 - C_{\text{游离}} \times (200 + 6)] / (C_{\text{总浓度}} \times 6)$$

$$\text{载药量} = M_1 / (M_1 + M)$$

M_1 为Pae-LLCN中药物的量, M 为载体总量

2.2 Pae-LLCN的制备

取100 mg GMO、40 mg芍药苷溶解在2 mL无水乙醇,形成前体溶液;称取10 mg F127溶于20 mL pH5.0磷酸盐缓冲液(PBS)溶液中,作为水相。在搅拌条件(500 r/min)下,将前体溶液缓慢滴加至水相中,室温 $[(25 \pm 2)^\circ\text{C}]$ 持续搅拌4 h挥去乙醇,得粗分散液;经间断超声5 min(80 W,10次,每次间隔25 s,间隔期内样品放置0 $^\circ\text{C}$ 水浴内)进一步分散,得到Pae-LLCN分散液。

2.3 Pae-LLCN的单因素考察

以Pae-LLCN的包封率为考察指标,按“2.2”项制备Pae-LLCN,对影响Pae-LLCN制备较大的因素进行单因素考察。

2.3.1 表面活性剂F127与GMO质量比的考察 固定GMO的用量(100 mg)、药物芍药苷的用量30 mg,PBS溶液40 mL,选取表面活性剂F127与GMO的质量比为1:4、1:5、1:10、1:20,按“2.2”项方法制备Pae-LLCN,测得包封率分别为28.08%、42.10%、56.35%、32.18%。结果表明,随着表面活性剂用量的增加,包封率呈现先增大后减小的趋势,表面活性剂F127与GMO的质量比在1:10时包封率最大。

2.3.2 药物芍药苷投料量的考察 固定GMO的用量(100 mg),PBS溶液40 mL,表面活性剂F127-GMO的质量比为1:10,选取芍药苷是GMO质量分数为20%、30%、40%、50%,按“2.2”项制备Pae-LLCN,测得包封率分别为46.22%、50.92%、58.36%、38.13%。结果表明,药物投料量过大或过低包封率都较低,在40%时包封率最大。

2.3.3 分散相用量的考察 固定药物芍药苷的投料量40 mg、GMO 100 mg,表面活性剂F127与GMO的质量比1:10,选取pH 5.0 PBS溶液用量为10、20、30、40 mL,按“2.2”项制备Pae-LLCN,测得包封率分别为30.42%、71.23%、60.36%、51.28%。结果表明,分散相用量为20 mL时包封率最佳。

2.4 正交试验设计优化Pae-LLCN处方

在单因素实验考察的基础上,选取对Pae-LLCN包封率影响较为显著的3个因素设为自变量:药物芍药苷投料量(A)、表面活性剂F127与GMO质量比(B)、分散相用量(C),每个因素设定3个水平,具体因素水平见表1,实验设计结果见表1,方差分析结果见表2。

由表1可知,3个因素中,各因素的作用主次顺序为A>B>C;方差分析表明,A(芍药苷投料量)、B(F127与GMO质量比)为主要影响因素,具有显著性($P < 0.05$),最终确定最佳处方为A₃B₂C₁,即F127与GMO质量比为1:10(具体用量分别为10、100 mg),芍药苷投料量40 mg,分散相(PBS溶液)用量为20 mL。

2.5 验证实验

按照优化的处方剂量制备3批(批号20150410、20150420、20150430)Pae-LLCN(F127与GMO质量比1:10,芍药苷投药量40 mg,PBS溶液20 mL),测定3批Pae-LLCN的包封率分别为75.23%、72.50%、73.42%,平均包封率为73.72%,RSD为1.90%,与预测值接近,表明工艺稳定可行。

表1 Pae-LLCN 处方优化 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果
Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal design and results of Pae-LLCN prescription optimization

试验号	A/%	B	C/mL	D(空白)	包封率/%
1	20 (1)	1 : 20 (1)	20 (1)	(1)	40.16
2	20 (1)	1 : 10 (2)	30 (2)	(2)	53.03
3	20 (1)	1 : 5 (3)	40 (3)	(3)	45.05
4	30 (2)	1 : 20 (1)	30 (2)	(3)	50.62
5	30 (2)	1 : 10 (2)	40 (3)	(1)	62.23
6	30 (2)	1 : 5 (3)	20 (1)	(2)	55.83
7	40 (3)	1 : 20 (1)	40 (3)	(2)	60.35
8	40 (3)	1 : 10 (2)	20 (1)	(3)	76.51
9	40 (3)	1 : 5 (3)	30 (2)	(1)	65.56
K_1	138.24	151.13	172.50	167.95	
K_2	168.68	191.77	169.21	169.21	
K_3	202.42	166.44	167.63	172.18	
R	64.18	40.64	4.87	4.23	

表2 Pae-LLCN 处方优化正交试验方差分析
Table 2 Variance analysis of orthogonal test for Pae-LLCN prescription optimization

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	687.117	2	218.479	$P < 0.01$
B	280.846	2	89.299	$P < 0.05$
C	4.115	2	1.308	
D(误差)	3.145	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

2.6 Pae-LLCN 的形态、粒径、包封率及载药量的测定

取 Pae-LLCN 适量, 用蒸馏水稀释, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 用激光粒度仪测定其粒径为 $(170 \pm 16) \text{ nm}$ 附近, 见图 2, 多分散指数为 0.189 ± 0.011 , Zeta 电位为 $(-38.6 \pm 5) \text{ mV}$ 。按“2.1.9”项下方法测定 Pae-LLCN 包封率及载药量, 结果显示 Pae-LLCN 的包封率为 73.72%, 载药量为 14.81%。取 Pae-LLCN 加适量蒸馏水稀释, 滴加在覆盖碳膜的铜网上, 干燥后拍摄透射电镜照片, Pae-LLCN 为大小均一、圆整度较好的球形粒子, 见图 3。

2.7 体外释放度测定

参考文献方法^[19], 以 pH 5.0 的 PBS 为释放介质, 对 Pae-LLCN 进行体外释药研究。精密吸取 5 mL Pae-LLCN, 置于已处理好的透析袋中, 加入到 100 mL 释放介质中, 于 37°C 水浴以 120 r/min 动态透析, 分别在 0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、10、

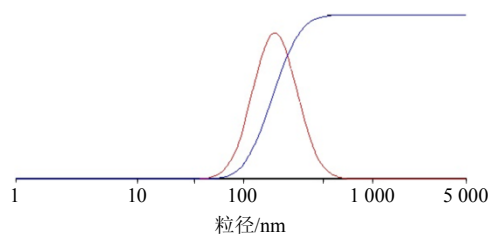


图2 Pae-LLCN 的粒径分布图

Fig. 2 Size distribution of Pae-LLCN

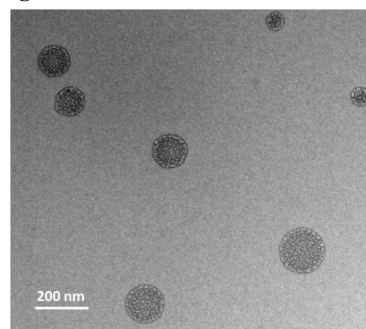


图3 Pae-LLCN 透射电镜图

Fig. 3 TEM photographs of Pae-LLCN

12、24 h 吸取 1 mL 释放介质 (同时补加等量、同温的释放介质), HPLC 法测定芍药苷的质量浓度, 计算 Pae-LLCN 的累积释放量。制备芍药苷水溶液 (药物芍药苷质量浓度与 Pae-LLCN 中的相当), 按上述方法计算游离药物的累积释放量 (图 4)。结果表明游离药物 8 h 释放量接近达到 100%, 而 Pae-LLCN 24 h 累积释放量为 72.68%, 释药速率缓慢, 表明芍药苷制成 Pae-LLCN 后具有一定的缓释效应。

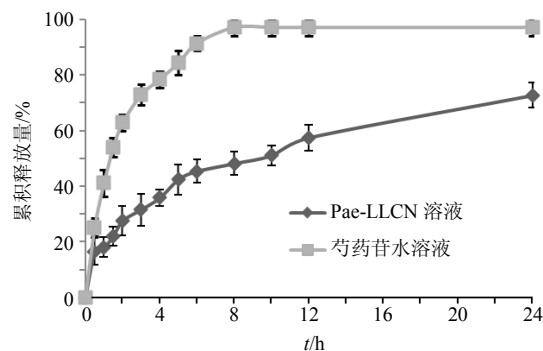


图4 Pae-LLCN 和芍药苷溶液释放曲线 ($n = 3$)

Fig. 4 Accumulative release of Pae-LLCN and paeoniflorin solution ($n = 3$)

采用零级、一级、Higuchi 模型对脂质液晶的体外释药数据进行拟合。得到的回归方程如下: 零级方程 $Y = 2.6649t - 20.286$ ($r = 0.8981$); 一级方程 $Y = -0.0502t + 4.4056$ ($r = 0.9684$); Higuchi 方程 $Y = 14.827t^{1/2} + 5.1439$ ($r = 0.9892$), 从方程的相

关系数 r 值可知, Pae-LLCN 的体外释药以 Higuchi 模型拟合最好。

3 讨论

文献报道^[20], 芍药苷在酸性条件下稳定, 其主要以分子形式存在, 而在过酸或碱性条件下, 其结构被破坏, 主要以离子形式存在。芍药苷在 pH 5.0 PBS 溶液中的溶解度最大, 故选择 pH 5.0 PBS 溶液作为水相制备 Pae-LLCN 和体外释放介质。

自乳化法制备所得的 Pae-LLCN 粒径及分布偏大, 为了获得更小粒径的 Pae-LLCN, 本研究选择自乳化法联合超声技术制备 Pae-LLCN。预试验发现, 超声时间及温度对 Pae-LLCN 的包封率影响较大。连续超声时间过长, 超声破碎程度过大会导致药物泄漏, 且超声时间过长会导致体系温度上升, 引起部分 GMO 的溶解, 破坏液晶结构, 最终导致包封率的下降; 而超声时间太短, 则不足以获得较小粒径分布的 Pae-LLCN。因此, 本研究选择间断超声间断超声 5 min (80 W, 10 次, 每次间隔 25 s), 间隔期内样品放置 0 °C 水浴内控制温度的升高以获得合适粒径的 Pae-LLCN。

以 Pae-LLCN 的包封率为指标, 运用单因素和正交试验结合设计, 优化 Pae-LLCN 的处方。实验结果表明, 表面活性剂 F127 用量的增加, 包封率呈先增大后减小的趋势, 可能是 F127 在一定范围内可参与脂质液晶结构的组装并支撑整个骨架; 用量过高, 可能导致 LLCN 结构破坏或者晶型转变。药物的投料量增加, 包封率呈先增大后减小的趋势, 可能是因为药物对 LLCN 的脂质双分子层结构有影响, 导致 LLCN 晶型转变。分散相用量在一定范围内对 LLCN 的包封率有显著的影响。分散相用量少, LLCN 浓度高, 样品容易聚集, 稳定性下降; 用量多, 浓度低, 样品易泄漏。优化所得 Pae-LLCN 处方及制备工艺合理可行, 稳定性好, 为进一步的体内外吸收评价奠定了良好基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 董自亮, 卢君蓉, 高飞, 等. 芍药苷微囊的制备及其体外释药研究 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1756-1760.
- [3] 杨星钢, 张立波, 潘卫三, 等. 芍药苷大鼠在体肠吸收动力学的研究 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(11): 854-857.
- [4] 崔广智. 芍药苷抗抑郁作用的实验研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 231-233.
- [5] 王春, 魏伟. 芍药苷药物代谢动力学研究进展 [J].

中国药理学通报, 2014, 30(12): 1646-1650.

- [6] Takeda S, Isono T, Wakui Y, *et al.* Absorption and excretion of paeoniflorin in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1995, 47(12A): 1036-1040.
- [7] 王春, 魏伟, 杨昭毅, 等. 芍药苷微乳溶液在大鼠在体肠的吸收动力学研究 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(2): 181-185.
- [8] 聂欣欣, 姜玲, 魏伟, 等. 芍药苷微乳体外经皮渗透性的研究 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(12): 1155-1158.
- [9] 朱延焱, 田伟强, 黄绳武. 芍药苷磷脂复合物的制备及表征 [J]. 中国药业, 2013, 22(1): 24-26.
- [10] 唐燕, 张丹, 孟祥林, 等. 白芍总苷脂质体对荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(21): 2547-2551.
- [11] 吴红兵, 霍东风, 蒋新国. 脂质立方液晶纳米粒作为药物载体的研究进展 [J]. 药学学报, 2008, 43(5): 450-455.
- [12] Lancelot A, Sierra T, Serrano J L. Nanostructured liquid-crystalline particles for drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, 11(4): 547-564.
- [13] Swarnakar N K, Thanki K, Jain S. Enhanced antitumor efficacy and counterfeited cardiotoxicity of combinatorial oral therapy using Doxorubicin-and Coenzyme Q10-liquid crystalline nanoparticles in comparison with intravenous adriamycin [J]. *Nanomedicine*, 2014, 10(6): 1231-1241.
- [14] Avachat A M, Parpani S S. Formulation and development of bicontinuous nanostructured liquid crystalline particles of efavirenz [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 126(12): 87-97.
- [15] Linkevičiūtė A, Misiūnas A, Naujalis E, *et al.* Preparation and characterization of quercetin-loaded lipid liquid crystalline systems [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 128(2): 296-303.
- [16] Spillmann C M, Naciri J, Algar W R, *et al.* Multifunctional liquid crystal nanoparticles for intracellular fluorescent imaging and drug delivery [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(7): 6986-6997.
- [17] 钟萌, 尹华峰, 滕永真, 等. 反透析法测定阿奇霉素囊泡的包封率 [J]. 光谱实验室, 2012, 29(5): 2940-2943.
- [18] 熊非, 朱家壁, 王维, 等. 灯盏花素纳米脂质体包封率测定方法研究 [J]. 药学学报, 2004, 29(5): 755-757.
- [19] 张丹, 廖芳, 周洁, 等. Box-Behnken Design-响应面优化法优化芍药总苷脂质体的制备工艺及体外释放研究 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 359-364.
- [20] 李东芬, 尹蓉莉, 吕懿平, 等. 芍药苷油水分配系数的测定及 pH 对其的影响 [J]. 中药与临床, 2011, 2(4): 21-23.