

艾纳香咀嚼片处方工艺的优化

谢小丽^{1,2}, 王 凯^{1,2}, 陈振夏^{1,2}, 庞玉新^{1,2,3*}, 官玲亮^{1,2}

(1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室, 海南 儋州 571737; 2. 艾纳香工程技术研究中心, 海南 儋州 571737; 3. 中国中医科学院博士后科研流动站/中药资源中心, 北京 100700)

摘要: **目的** 优化艾纳香咀嚼片处方工艺。**方法** 在单因素试验基础上, 以蔗糖与甘露醇 (1:1)、艾纳香提取物包合物、木糖醇、薄荷脑、山楂粉、*D*-(-) 酒石酸用量为影响因素, 感官评分为评价指标, 正交试验优化处方工艺。**结果** 最佳处方为 85% 蔗糖与甘露醇 (1:1)、9% 艾粉 β -环糊精包合物、0.7% 木糖醇、0.5% 薄荷脑、1% 山楂粉、0.7% *D*-(-) 酒石酸、5% 羟丙基甲基纤维素、1% 硬脂酸镁、0.5% 滑石粉, 所得咀嚼片的外观、口感、硬度、脆碎度、片重差异、含水量均符合《中国药典》要求。**结论** 该方法简单、稳定、可靠, 可用于艾纳香咀嚼片处方工艺。**关键词:** 艾纳香咀嚼片; 处方; 正交试验
中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)03-0592-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.016

Formulation optimization for *Blumea balsamifera* chewing tablets

XIE Xiao-li^{1,2}, WANG Kai^{1,2}, CHEN Zhen-xia^{1,2}, PANG Yu-xin^{1,2,3*}, GUAN Ling-liang^{1,2}
(1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Danzhou 571737, China; 2. Engineering Research Center for *Blumea Balsamifera*, Danzhou 571737, China; 3. Center for Post-doctoral Research, National Resources Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

KEY WORDS: *Blumea balsamifera* chewable tablets; formulation; orthogonal test

艾纳香是菊科植物艾纳香 *Blumea balsamifera* (L.) DC. 的新鲜或干燥地上部分, 其功效最早记载于孙思邈的《备急千金要方》, 用于口臭、体臭的治疗, 随后《本草拾遗》、《开宝本草》、《海药本草》、《本草纲目》等典籍均记载它具有活血消肿、消炎止痛、去恶气等功效^[1], 现代药理研究表明, 艾纳香及其提取物具有抑菌止痒、抗氧化、抗炎镇痛、促创口愈合、促渗透等药理活性^[2-5], 具有作为口腔保健护理产品的开发潜力。但艾纳香及其提取物性味辛、苦、涩, 易挥发, 有一定的刺鼻味道, 作为口腔用药不容易被患者接受。

咀嚼片是一类无需崩解过程、药物溶出迅速、吸收快、生物利用度高、服用方便、易携带保存的片剂。为了更好地将艾纳香功效应用于口腔护理上, 同时又易被消费者接受, 本实验将研制一款口

感清爽、淡甜、略带酸味的艾纳香咀嚼片, 并对其处方进行优化。

1 仪器与材料

1.1 仪器 TDP1.5T 型单冲压片机 (泰州市天泰制药机械厂); YD-I 型片剂硬度测试仪 (天津光学仪器有限公司); SS-II 型片剂脆碎度测试仪 (天津光学仪器有限公司); CPA225D 型分析天平 (德国 Sartorius 公司); KQ-250DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Heraeus MuLti-fuge X3R 型高速冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher 公司); DHG-9035A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); DNP-9052BS-III 型电热恒湿培养箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司); ZGX-300C 型智能光照培养箱 (杭州钱江仪器设备有限公司)。

收稿日期: 2017-05-31
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81374065); 海南省自然科学基金面上项目 (817263)
作者简介: 谢小丽, 女, 研究实习员, 从事南药研究与开发。Tel: (0890) 23301253
* 通信作者: 庞玉新, 博士, 副研究员, 从事南药资源研究与开发。Tel: (0898) 23300268, E-mail: blumeachina@126.com

1.2 材料 β -环糊精（江苏丰园生物技术有限公司，相对分子质量 1 134.98，含有量 $\geq 98\%$ ）；艾粉（左旋龙脑含有量 $\geq 60\%$ ，中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所，批号 F20130815）；蔗糖（批号 20100004）、淀粉（批号 2012002）（嘉兴市白浪淀粉制品有限公司）；甘露醇（广西南宁化学制药有限责任公司，批号 2010R002399）；木糖醇（山东福田药业有限公司，批号 13011107）；薄荷脑（西安藻露堂药业集团康复医药有限公司，批号 201000006）；*D*-（-）酒石酸（上海紫业化工有限公司，批号 201147717）；阿斯巴甜（西安天正药用辅料有限公司，批号 150630）；羟丙基甲基纤维素（山东光大科技发展有限公司，批号 2012001）。

2 方法与结果

2.1 原料药粉制备 选取艾纳香提取物—艾粉作为主药，由于其味苦涩，常温下易挥发，难溶于水，在制剂加工过程中损失较大，为了提高其水溶性与稳定性、掩盖其苦涩味，本实验采用 β -环糊精包合技术对其进行包合。经前期试验发现，艾粉 β -环糊精包合物最优工艺为室温下采用研磨法，按 β -环糊精与艾粉质量比 4：1 称取，边研磨边加入用乙醇溶解的艾粉，研磨 45 min 后，置于 4℃ 冰箱中冷藏 12 h 后取出，抽滤，再用乙酸乙酯洗涤 3 次，每次超声 15 min 后 3 000 r/min 离心 10 min 以除去未被包合的艾粉，45℃ 烘箱中干燥，测得包合物中左旋龙脑平均载药量为 16.18%^[6]。

2.2 处方筛选

2.2.1 主药用量 目前，在市场上以艾纳香提取物为原料的口腔护理产品中效果最佳的为金喉健喷雾剂^[7]，王建滨、王鸿琳等^[8-9]研究表明其局部治疗口腔溃疡时有良好的止痛和促进愈合作用；吴丽芬等^[10]对艾纳香油的质量标准进行研究，发现其中左旋龙脑含有量范围为 15% ~ 25%，经换算得到金喉健喷雾剂中其含有量在 3 ~ 5 mg/mL 之间，前期实验也得出艾粉 β -环糊精包合物左旋龙脑载药量为 16.18%^[11]。因此，艾纳香咀嚼片主药中左旋龙脑含有量以金喉健喷雾剂为标准进行添加时，即能达到口腔护理的效果，最终确定艾粉 β -环糊精包合物在咀嚼片处方中的添加量在 5% ~ 10% 之间。

2.2.2 黏合剂与润湿剂 通过查阅相关资料^[12-14]发现，羟丙基甲基纤维素（HPMC）和聚乙烯吡咯烷酮（PVP）为咀嚼片常用黏合剂。通过预试验发现，后者所制的咀嚼片含有较大涩味，而且吸湿性强，并且以乙醇为润湿剂时在湿法制粒过程中絮状成团块，制粒困难，故最终选用 HPMC 作为黏合剂，蒸馏水作为润湿剂。

称取一定量 HPMC，加入蒸馏水加热制成 2%、3%、4%、5% HPMC，以其为黏合剂，蔗糖与甘露醇为填充剂，艾粉 β -环糊精包合物为活性物质进行筛选，以软材性状、过筛情况、颗粒形状、压片效果与硬度为指标进行综合评价，结果见表 1，可知以 5% HPMC 为黏合剂效果较好。

表 1 不同浓度 HPMC 对咀嚼片成型的影响
Tab.1 Effects of different concentrations of HPMC on the formation of chewing tablets

指标	2% HPMC	3% HPMC	4% HPMC	5% HPMC
软材性状	不易成团	成团,有分散	易成团,黏合效果适中	握之成团,轻压即散
过筛情况	易过筛	易过筛	易过筛	易过筛
颗粒形状	细粉多	细粉较多	细粉适中	细粉适中
压片效果	松片多	有松片	片剂易成型	片剂易成型
硬度 (kg, $\bar{x} \pm s$)	3.39 $\pm$ 2.17	4.14 $\pm$ 1.09	6.47 $\pm$ 0.74	7.74 $\pm$ 1.32

2.2.3 填充剂 通过单因素试验，分别采用甘露醇、淀粉、蔗糖、木糖醇、乳糖及其 1：1 配比的混合物作为填充剂，5% HPMC 作为黏合剂，以制粒效果、压片效果、硬度、脆碎度与口感为指标进行综合评价，结果见表 2。由表可知，以甘露醇、蔗糖为填充剂时的各项指标均优于其他项，并且蔗糖味淡甜，甘露醇咀嚼时有凉爽感，同时无颗粒感与粗糙感，有助于改善艾粉苦涩口感，故选择两者作为填充剂。

2.2.4 矫味剂 艾粉被包合后，虽已掩盖了原料

药的辛辣苦涩之味，增加了水溶性，但其 β -环糊精包合物无臭无味，作为口腔用药也不易被患者接受，故加入矫味剂可使咀嚼片风味更受欢迎。本实验选择木糖醇、薄荷脑、山楂粉、*D*-（-）酒石酸、阿斯巴甜的混合物分别进行配伍试验，由于矫味剂所占比例较小，对制粒、压片与硬度的影响不大，故主要以色泽和口感为评价指标进行筛选，结果见表 3，最终确定以薄荷脑与木糖醇为清凉剂，山楂粉与 *D*-（-）酒石酸为酸味剂。

表 2 填充剂筛选结果
Tab. 2 Results of filler screening

辅料	制粒效果	压片效果	硬度 (kg, $\bar{x} \pm s$)	脆碎度/%	口感
甘露醇	制粒容易,但细粉较多	有松片	—	—	—
淀粉	制粒困难,不易成团,细粉多	松片多	5.54 ± 2.3	不合格	粗糙感
蔗糖	制粒容易,颗粒条状	有裂片	12.94 ± 3.3	0.23	淡甜,入口顺滑,硬度大
木糖醇	制粒较难,吸湿性强,难过筛	—	—	—	—
乳糖	制粒容易,颗粒均匀	易成型	8.63 ± 0.8	不合格	稍有粉粒感与粗糙感
甘露醇:淀粉	易成团,制粒困难	有松片	—	—	—
甘露醇:蔗糖	制粒容易,颗粒均匀	易成型	7.49 ± 1.3	0.47	淡甜,稍有清爽感,入口顺滑,硬度适中
甘露醇:乳糖	制粒容易,颗粒有条状	有黏冲现象	11.15 ± 1.07	0.77	粉粒感稍强,难咀嚼
蔗糖:乳糖	制粒容易,颗粒均匀	有裂片	10.54 ± 2.73	0.21	硬度大
蔗糖:淀粉	制粒容易,颗粒少	可压性不好	13.30 ± 2.03	0.61	有粉粒感,难咀嚼
乳糖:淀粉	制粒困难,颗粒少,细粉多	可压性不好	4.12 ± 1.27	不合格	—

表 3 矫味剂筛选结果
Tab. 3 Results of flavoring agent screening

辅料	色泽	口感
薄荷脑: <i>D</i> -(-)酒石酸:阿斯巴甜	乳白色,色泽均一	清凉感过重,酸味重,甜腻
木糖醇: <i>D</i> -(-)酒石酸	乳白色,色泽均一	不够清爽,酸味重
薄荷脑:山楂粉	浅褐色,色泽均一	淡甜,清凉感过重,酸味淡
木糖醇:山楂粉	浅褐色,色泽均一	清凉感不足,酸味淡
木糖醇:山楂粉: <i>D</i> -(-)酒石酸	淡黄色,色泽均一	清凉感不足,甜味、酸味适中
薄荷脑:木糖醇:山楂粉: <i>D</i> -(-)酒石酸	淡黄色,色泽均一	清凉可口,淡甜,酸味适中

2.2.5 润滑剂 目前,常用的润滑剂有硬脂酸镁、滑石粉、微粉硅胶等,但市场上尚无同时兼具助流、润滑和抗黏作用的润滑剂。为了使咀嚼片能同时具有上述 3 种作用,在国内经常将硬脂酸镁与滑石粉配合应用^[15-16],故本实验选择其作为润滑剂。然后,采用单因素试验筛选润滑剂用量,将不同比例润滑剂加入制备好的颗粒中混匀,再进行压片,以片剂压片效果与其光洁度为评价指标进行考察,结果见表 4,最终确定润滑剂用量为 1.5% 硬脂酸镁与滑石粉比例 2 : 1。

表 4 润滑剂用量筛选结果
Tab. 4 Results of lubricant consumption screening

润滑剂/%	压片效果	片剂光洁度
1	圆整,有黏冲	表面光滑度稍差
1.5	圆整,无黏冲	表面光滑度好
2	圆整,无黏冲,出现裂片现象	表面光滑度较好

2.3 处方工艺确定

2.3.1 感官评定 选择 10 位身体健康、味觉正常的志愿者进行试吃,并按表 5 评分标准进行评分,然后计算总分。

表 5 感官质量评分
Tab. 5 Scores for sensory quality

外观	口感	硬度/kg	脆碎度/%	片重差异/%	评分
淡黄色均匀,表面光滑	酸甜协调,可口,嚼后清凉,并带有淡淡的艾粉味	6 ~ 8	< 0.5	± 3	4 ~ 5
浅褐色或色泽不均匀,光滑度稍差	酸甜基本协调,清凉感较重或较淡	8 ~ 11 或 3 ~ 5	0.5 ~ 1	- 5 ~ - 3 与 3 或 3 ~ 5	2 ~ 3
褐色或色泽不一,光滑度差	酸甜不协调,清凉感过重或不足	< 3 或 > 11	≥ 1	< - 5 或 > 5	0 ~ 1

2.3.2 处方用量 根据单因素试验结果,确定处方由蔗糖与甘露醇 (1 : 1)、艾纳香提取物包合物、木糖醇、薄荷脑、山楂粉、*D*-(-)酒石酸、5% HPMC、硬脂酸镁与滑石粉 (2 : 1) 组成,其

中填充剂、原料药、矫味剂用量对咀嚼片外观、口感、片重差异等指标的影响较大。然后,采用 6 因素 3 水平试验,按照 $L_{18}(3^7)$ 正交表进行试验,根据表 5 评分筛选最佳处方工艺,结果见表 6 ~ 8。

表 6 因素水平
Tab. 6 Factors and levels

水平	A 蔗糖与甘露醇(1 : 1)/%	B 艾粉包合物/%	C 木糖醇/%	D 薄荷脑/%	E 山楂粉/%	F <i>D</i> -(-)酒石酸/%
1	65	5	0.3	0.3	0.5	0.3
2	75	7	0.5	0.5	1	0.5
3	85	9	0.7	0.7	1.5	0.7

表 7 试验设计与结果
Tab. 7 Design and results of tests

试验号	A	B	C	D	E	F	G(空白)	感官评分
1	1	1	1	1	1	1	1	8
2	1	2	2	2	2	2	2	15
3	1	3	3	3	3	3	3	11
4	2	1	1	2	2	3	3	14
5	2	2	2	3	3	1	1	11
6	2	3	3	1	1	2	2	13
7	3	1	2	1	3	2	3	12
8	3	2	3	2	1	3	1	22
9	3	3	1	3	2	1	2	18
10	1	1	3	3	2	2	1	14
11	1	2	1	1	3	3	2	12
12	1	3	2	2	1	1	3	13
13	2	1	2	3	1	3	2	10
14	2	2	3	1	2	1	3	17
15	2	3	1	2	3	2	1	18
16	3	1	3	2	3	1	2	10
17	3	2	1	3	1	2	3	16
18	3	3	2	1	2	3	1	20
K_1	12. 167	11. 333	14. 333	13. 667	13. 667	12. 833	15. 500	
K_2	13. 833	15. 500	13. 500	15. 333	16. 333	14. 667	13. 000	
K_3	16. 333	15. 500	14. 500	13. 333	12. 333	14. 833	13. 833	
R	4. 166	4. 167	1. 000	2. 000	4. 333	2. 000	2. 500	

表 8 方差分析
Tab. 8 Analysis of variance

因素	离均差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
A	52. 778	2	2. 714	19. 000	>0. 05
B	69. 444	2	3. 571	19. 000	>0. 05
C	3. 444	2	0. 177	19. 000	>0. 05
D	13. 778	2	0. 709	19. 000	>0. 05
E	49. 778	2	2. 560	19. 000	>0. 05
F	14. 778	2	0. 760	19. 000	>0. 05
误差	19. 44	2	—	—	—

由此可知, 各因素对处方的影响程度依次为 $R_E > R_B > R_A > R_D = R_F > R_C$, 在保证咀嚼片压片质量的前提下, 因素 E 对片剂外观与口感影响最显著, 其次是填充剂与原料药。由直观分析可知, 最优处方组合为 $A_3B_2C_3D_2E_2F_3$ 或 $A_3B_3C_3D_2E_2F_3$, 由于 7%、9% 艾粉包合物对处方各项指标影响不大, 故选择两者均可, 但考虑到原料药加入量增大时, 咀嚼片功效也会提高, 同时方差分析表显示各因素间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。因此, 最终确定最优处方为 85% 蔗糖与甘露醇 (1 : 1)、9% 艾纳香提取物包合物、0. 7% 木糖醇、0. 5% 薄荷脑、1% 山楂粉、0. 7% $D-$ (-) 酒石酸, 再以 5% HPMC 为黏合剂, 1% 硬脂酸镁与 0. 5% 滑石粉为润滑剂。

2. 4 验证试验 根据最优处方制备 1 000 片咀嚼

片, 其处方为 212. 5 g 蔗糖、212. 5 g 甘露醇、45 g 艾粉 β -环糊精包合物、3. 5 g 木糖醇、5 g 山楂粉、3. 5 g $D-$ (-) 酒石酸、2. 5 g 薄荷脑、适量 5% HPMC、5 g 硬脂酸镁、2. 5 g 滑石粉。先将蔗糖、甘露醇、木糖醇、 $D-$ (-) 酒石酸与薄荷脑研碎, 过 250 目筛备用, 再按正交试验确定的处方量称取原料药及内加辅料, 按等量递增法混合均匀, 加入适量 5% HPMC 制成软料, 20 目筛制粒, 45 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 40 min 后, 18 目筛整粒, 然后加入外加辅料混匀, 压片, 片剂硬度控制在 7 kg 左右, 片重约为 0. 5 g, 制备 5 批咀嚼片, 按 2015 年版《中国药典》规定抽样测定, 以外观检查、硬度、脆碎度、片重差异、含水量为检查项目, 结果见表 9。由表可知, 咀嚼片外观、口感、硬度、脆碎度、片重差异、含水量均符合相关要求, 而且制备工艺简单可行。

3 讨论

在处方筛选过程中, 蔗糖与甘露醇既可作为填充剂, 又可作为甜味剂, 其中后者溶解时吸热, 故不仅具有爽口的甜味, 还可作为咀嚼片清凉剂, 配合木糖醇与薄荷脑使用时可使咀嚼片达到清爽的口感, 同时由于两者均带有甜味, 再加阿斯巴甜时反而显得腻味, 故未再加甜味剂。对于酸味感而言, 只用 $D-$ (-) 酒石酸酸味浓, 只用山楂粉酸味淡,

表 9 制备工艺验证试验结果

Tab. 9 Results of verification tests for preparation

序号	检查项目	随机抽检样品	标准要求	检验结果
1	外观	100 片	表面应完整光洁,色泽均一,杂色点(0.15 ~ 0.18 mm) <5% ;麻面 <5% ;不得有严重特殊异物及花斑	淡黄色,形状完整,表面光洁,边缘整齐,色泽均一,无杂斑,无异物
2	口感	若干片	不得有苦涩、刺激性气味	味甜甜,略带酸味,凉爽,嚼完后口腔中具有艾纳香淡淡风味
3	硬度	20 片	参照 2010 年版《中国药典》二部附录 I A 片剂硬度测定方法测定,硬度测定值应该在 6 ~8 kg 范围内,小于 6 kg 和大于 8 kg 的应不多于 2 片,并不得有 1 片超过 10 kg 或小于 1 kg	平均硬度为 7.06 kg,硬度小于 6 kg 为 1 片,检测出硬度超过 10 kg 或小于 1 kg 的片剂
4	脆碎度	3 批,每批若干	参照 2010 年版《中国药典》二部附录 XG 片剂脆碎度检查法,精密称重,减失质量不得超过 5% ,且不得检出断裂、龟裂及粉碎的片剂	3 批平均脆碎度为 0.53% ,均检测出裂片与碎片
5	片重差异	20 片	2010 版《中国药典》第一部附录 I 制剂通则 I D 片剂项下检查,与平均片重比较,质量差异限度 ±5% ,超出的不得多于 2 片,并不得有 1 片超出	质量差异限度为 -3.28% ~3.52%
6	含水量	3 批,每批若干	限度 1 倍 3% ~5%	平均含水量为 3.93%

片剂颜色深,故对两者进行减量调配;对于清爽感而言,只用木糖醇清爽度不够,只用薄荷脑清爽度过重,而且咀嚼片都是薄荷味道,完全掩盖了艾纳香的芳香味,同时木糖醇除了有一股淡淡清凉味与甜味外,主要是防龋特性好。因此,通过减量添加薄荷脑、加入少量木糖醇来使咀嚼片达到清爽口感,并且咀嚼后还有淡淡的艾纳香原味。

同时,本实验对原料和辅料均进行了微粉化处理,经放大实验发现,该生产工艺制备的艾纳香咀嚼片均符合《中国药典》要求,而且通过湿法制粒压片得到的片剂外形美观、可压性好,可在医药工业中广泛应用。

参考文献:

[1] 庞玉新,谢小丽,陈振夏,等.艾纳香本草考证[J].贵州农业科学,2014,42(6):10-13.

[2] Osaki N, Koyano T, Kowithayakorn T, *et al.* Sesquiterpenoids and plasmin-inhibitory flavonoids from *Blumea balsamifera*[J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(3): 447-449.

[3] Noor A, Khozirah S, Ridzuanl M, *et al.* Antiplasmodial properties of some Malaysian medicinal plants [J]. *Trop Biomed*, 2007, 24(1): 29-35.

[4] 李琴山,刘洋.黔产艾纳香黄酮抗氧自由基的研究[J].安徽农业科学,2013,41(19):8449-8450.

[5] 范佐旺,王丹,庞玉新,等.艾纳香油对大鼠深Ⅱ度烫

伤的治疗研究[J].中医药信息,2014,31(6):93-96.

[6] 谢小丽,王凯,庞玉新,等.正交试验法优选艾粉β-环糊精包合方法及其工艺[J].中国现代中药,2016,18(3):348-352.

[7] 王偈瓯.金喉健喷雾剂质量标准提升研究[D].贵阳:贵阳医学院,2015.

[8] 王建滨,关晓兵,刘萍,等.金喉健喷雾剂局部治疗复发性口腔溃疡近期疗效观察[J].北京口腔医学,2007,15(1):42-43.

[9] 王鸿琳,马林,黄颐玉,等.金喉健局部喷雾治疗口腔溃疡效果初步观察[J].中国医院用药评价与分析,2008,8(12):940-942.

[10] 吴丽芬.艾纳香提取物质量标准与GC指纹图谱的研究[D].广州:广东药学院,2015.

[11] 陈振夏,谢小丽,庞玉新,等.艾粉β-环糊精包合物的质量标准研究[J].中国医院用药评价与分析,2016,16(6):728-731.

[12] 吕东南,白先群.药用辅料在制剂中的应用概述[J].华夏医学,2001,6(14):986-988.

[13] 刘海波.药用辅料的选用研究[J].中外医疗,2006(12):52-54.

[14] 唐福林.药用新辅料在中药制剂中的应用[J].实用中医内科杂志,2013,27(1):131-132.

[15] 崔福德.药剂学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2011:117-118.

[16] 张兆旺.中药药剂学[M].北京:中国中医药出版社,2003:409-410.