

基于 UPLC-MS/MS 研究去甲乌药碱体外透皮吸收规律

郭承军^{1*}, 张 宁², 张晓丽¹, 迟名锋¹

¹山东省运动康复研究中心, 济南 250101; ²莱西市中医医院, 青岛 266699

摘要:通过研究去甲乌药碱经皮吸收的规律,一方面为去甲乌药碱外用强心制剂开发提供数据支持,另一方面为运动员的用药安全提供实验依据,杜绝因外用中药造成兴奋剂违规事件的发生。首先以 HG 的经皮透过率为考察指标,对溶剂含醇量、接收液 pH、促透剂浓度进行了单因素实验,并通过正交试验获得供给液的最佳工艺参数,应用 UPLC-MS/MS 测得 HG 最大经皮透过量,从而得到最大经皮透过率。结果显示,HG 经皮给药的供给液最佳工艺参数为溶剂 10% 乙醇水溶液,pH 7.0,促透剂氮酮浓度为 0.8%,HG 最大经皮透过率为 $(21.60 \pm 5.70)\%$ 。本文首次系统研究了 HG 透皮吸收规律,并测定了 48 h 最大透皮吸收率,考察了最佳工艺参数,为含 HG 的强心外用药物制剂开发提供初步的数据参考,为运动员安全使用外敷中药提供数据支持。

关键词:去甲乌药碱;超高效液相质谱联用;反兴奋剂;透皮吸收;强心成分

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)Suppl-0081-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.013

Study on the *in vitro* transdermal absorption of higenamine by UPLC-MS/MS

GUO Cheng-jun^{1*}, ZHANG Ning², ZHANG Xiao-li¹, CHI Ming-feng¹

¹Shandong Sports Rehabilitation Research Center, Jinan 250101, China;

²Laixi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qingdao 266699, China

Abstract: To study the law of transdermal absorption of higenamine (HG), on the one hand, it provides data support for the development of the cardiostimulant preparations for external use of HG, on the other hand, it provides an experimental basis for the drug safety of athletes, and eliminate the occurrence of doping violations caused by transdermal use of traditional Chinese medicine. Firstly, the transdermal penetration rate of HG was used as the index, and single-factor experiments were carried out on the alcohol concentration of the solution, pH of extract, and concentration of penetration enhancer. The best process parameters of the supply solution were obtained from the orthogonal test results. The maximum transdermal absorption rate of HG was determined by UPLC-MS/MS. The results showed that the optimum process parameters were solvent of 10% ethanol solution in water, pH 7.0 and 0.8% concentration of penetration enhancer azone. The maximum transdermal absorption rate of HG was $(21.60 \pm 5.70)\%$. In this paper, the 48-hour maximum transdermal transmission rate of HG was systematically studied for the first time, and the optimal process parameters were determined, which provides a reference for the development of HG-containing cardiostimulant drug preparations, provides data support for the safe use of externally applied traditional Chinese medicine by athletes.

Key words: higenamine; UPLC-MS/MS; anti-doping; transdermal absorption; cardiostimulant component

中药外敷给药属于中医外治范畴,历史悠久,可追溯到公元前 1300 年^[1]。临床上很多中药被广泛外用于皮肤科、骨科和消化科等疾病的治疗,特别是对于运动损伤的治疗,中药外敷一直是具有传统特色的一种疗效确切的治疗手段。现代药理活性成分

的研究表明,很多具有抗炎、止痛、祛风湿作用的经典方药含有去甲乌药碱(higenamine, HG)成分^[2-4],在 HG 于 2017 年被 WADA 纳入运动员《禁用物质清单》后^[5],大大限制了此类中药方剂在运动员中的使用。因此,研究 HG 的体外透皮吸收规律,对于运动员安全使用外敷中药,避免出现 HG 的兴奋剂违规具有重要意义。另一方面,HG 作为药理活性明确的非选择性 β_2 受体激动剂,研究其经皮吸收规

收稿日期:2022-01-21 接受日期:2022-04-29

基金项目:山东省体育局科研攻关项目(鲁体科计字[2019]52号)

*通信作者 Tel:86-531-89657634; E-mail: guochj28@126.com

律,对于外用安全长效强心药物的开发,也具有重要价值。

本文以离体鼠皮为介质,研究药物的体外透皮吸收规律,是与人体皮肤较为接近的一种常用的研究方法,但鼠皮由于取皮部位、个体差异、脱毛方式等的影响,药物的透皮吸收率差异较大。如 Leng 等^[6]研究了盐酸川芎嗪在 BALB/c 裸鼠、KM 小鼠、SD 大鼠皮肤上的透过情况,通过比较同一种动物背部及腹部皮肤的透皮效果,发现背部皮肤的透皮吸收效果更好。因此,为考察 HG 的最大透皮吸收率,保证试验结果的平行性、可重复性。本实验以离体鼠皮背部两侧同一部位的皮肤作为介质,采用氮酮为促透剂^[7],应用 UPLC-MS/MS 测定 HG 的透皮吸收量,绘制透皮吸收的浓度-时间曲线,并计算累积透过率。

1 材料与方法

1.1 仪器

超高效液相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司,质谱仪 Agilent Ultivo-QQQ6465B、色谱仪 Agilent UPLC 1260 Infinity II); ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(Agilent, 50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); MSE-1600 型透皮吸收仪(天津市正通科技有限公司); WND-100 型高速中药粉碎机(浙江省兰溪市伟达电器有限公司); AUW220D 型分析天平(上海越平科学仪器有限公司); KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); YC-RO-MB 型超纯水机(济南利富得净水设备有限公司); XK96-A 型快速混匀器(江苏姜堰市新康仪器厂)。

1.2 材料

大鼠,雄性,质量 120 ~ 200g(山东中医药大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(鲁)20140007); HG 对照品(批号:Z28J11B116887,纯度:≥98%,上海源叶生物科技有限公司);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);氮酮(天津市科密欧化学试剂有限公司);生理盐水(山东齐鲁药业有限公司批号:7B20070808);甲醇(LC-MS 级, Fisher 公司);水为超纯水(自制);其他所用试剂均为分析纯。所有动物实验操作由山东中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准文号:SDUTCM20200617001)。

1.3 方法

1.3.1 仪器条件

色谱条件:色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm);流动相:A 相为

0.1% 甲酸甲醇溶液,B 相为 0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱程序见表 1;流速:0.2 mL/min;柱温:40 °C;进样量:1 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

| 时间 Time (min) | A (%) | B (%) |
|------------------|-------|-------|
| 0 | 9 | 91 |
| 6 | 9 | 91 |
| 7 | 90 | 10 |
| 10 | 90 | 10 |
| 11 | 9 | 91 |

质谱条件:电喷雾离子源(AJS ESI);正离子扫描;多重反应监测(MRM)采集模式;干燥气温度:325 °C;干燥气流速:10 L/min;雾化气压力:20 psi;鞘气温度:200 °C;鞘气流速:10 L/min;母离子:272.1,碎裂电压:120 V。子离子类型及碰撞能量见表 2。

表 2 子离子类型及碰撞能量

Table 2 Product ion types and collision energy

| 离子类型 Ion type | 子离子 Product ion (<i>m/z</i>) | 碰撞能量 Collision energy (V) |
|------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 定性离子 Qualified ion | 255 | 12 |
| 定性离子 Qualified ion | 161 | 18 |
| 定量离子 Quantified ion | 107 | 22 |

1.3.2 供给液的制备

称取 HG 对照品 3 mg,精密称定,加指定溶剂定容至 50 mL,调节 pH,加入氮酮作为促透剂充分混匀,作为供给液。

1.3.3 透皮接收液的选择

接收液是模拟体液环境配制而成,但 HG 在水中的溶解度低,必须加入一定量的乙醇以增加溶解性,但为最大限度地减少与体液环境的差异,减少对离体皮肤组织的影响,一般乙醇浓度以不超过 30% 为佳^[8]。经预试验测定发现 HG 在乙醇-生理盐水(20:80)中溶解性较好。

1.3.4 供试品溶液的制备

供给池精密加入供给液 1 mL,接收池内精密加入接收液 5 mL,密封,体系温度恒定后,开启搅拌并

计时,于 2、4、6、8、24、48 h 从取样管精密吸取接收液 0.1 mL,用流动相稀释至 1 mL,作为供试品溶液。每次取样后及时补加 0.1 mL 等温接收液并排除接收池中的气泡。每组平行三份。

1.3.5 离体鼠皮的制备

取雄性大鼠,称重,按 0.015 mL/g 的剂量腹腔注射 4% 水合氯醛,待麻醉完全后固定四肢,以腹中线为起点剥离大鼠背部皮肤,用剃毛刀、脱毛剂除去背部毛发,剥离皮下脂肪组织和黏膜,用生理盐水冲洗干净,用滤纸吸干鼠皮表面的生理盐水,用直径 1.5 cm 的打孔器于背部中点中线两侧对称位置取 2 块鼠皮,平铺于洁净玻璃板,生理盐水冲洗,保鲜膜包裹,-25 °C 冷冻,备用^[9-11]。

1.3.6 扩散装置与介质

将自然解冻的鼠皮固定在 Franz 扩散池的供给池和接收池之间,角质层面向供给池侧,有效渗透面积约 0.785 cm²,接收池体积 5 mL,供给池体积为 3 mL,接收液为乙醇-生理盐水(20:80),水浴温度

(37.0 ± 0.5) °C,磁转子 400 r/min 恒速搅拌。

1.3.7 透皮吸收率的计算

通过下列公式计算累积透过量(Q)以及累积透过率(K)^[12,13]。

$$Q = V_{\text{总}} C_n + \sum C_{n-1} V_{\text{取}}$$

$$K = Q/W_{\text{供}}$$

式中, $V_{\text{总}}$ 为扩散池接收室体积, C_n 为第 n 个取样点测得的接收液中药物浓度, C_{n-1} 为第 $n-1$ 个取样点测得的接收液中药物浓度, $V_{\text{取}}$ 为取样体积, $W_{\text{供}}$ 为供给液中 HG 的质量。

2 结果

2.1 HG 透皮吸收关键工艺参数考察

2.1.1 空白干扰试验

取空白溶剂 50 mL,调节 pH,加入氮酮作为促透剂充分混匀,按“1.3.4”项下方法制得空白对照溶液。另取 HG 对照品溶液、供试品溶液,照“1.3.1”项下方法依法进样,记录色谱图。结果显示空白对照在 HG 峰处无干扰(见图 1)。

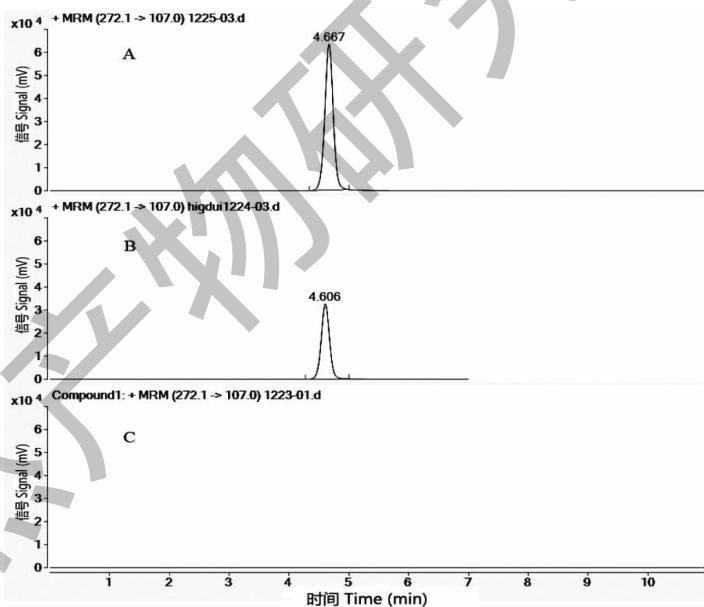


图 1 空白干扰试验

Fig. 1 Blank interference test

注:A. 供试品;B. 去甲乌药碱对照品;C. 空白溶剂 Note:A. Sample;B. HG standard;C. Solvent blank

2.1.2 单因素考察

首先对影响 HG 透皮吸收率的关键参数供给液溶剂含醇量、供给液 pH、促透剂用量等进行了单因素考察^[14,15]。

2.1.2.1 不同乙醇浓度对 HG 透过率的影响

称取 HG 对照品 4 份,每份各 3 mg,精密称定,

分别用蒸馏水、10% 乙醇、20% 乙醇、30% 乙醇作为溶剂定容至 50 mL,调节 pH 为 6,加入 0.6% 氮酮作为促透剂充分混匀,作为供给液。按“1.3.4”项下方法制得供试品溶液。按“1.3.1”项下方法依法测定峰面积,并计算接收液中 HG 的含量及 HG 的累积透皮吸收率。以乙醇浓度为横坐标,以 48 h 的

HG 透皮吸收率为纵坐标绘制曲线,结果见图 2。

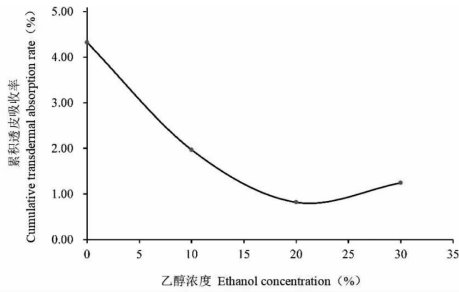


图 2 不同乙醇浓度对 HG 透皮吸收率的影响

Fig. 2 Effect of different ethanol concentrations on the transdermal absorption rate of HG

由图 2 可知,随着乙醇浓度的增加,透皮吸收率表现出先减后增的趋势,当乙醇浓度为 0 时透皮吸收率达到最大值。因此选取乙醇浓度为 0、10%、20% 作为正交试验提取溶剂浓度的三个水平进行研究。

2.1.2.2 不同溶液 pH 对 HG 透过率的影响

称取 HG 对照品 5 份,每份各 3 mg,精密称定,用 20% 乙醇定容至 50 mL,调节 pH 分别为 3、4、5、6、7,加入 0.6% 氮酮作为促透剂充分混匀,作为供给液。按“1.3.4”项下方法制得供试品溶液。按“1.3.1”项下方法依法测定峰面积,并计算接收液中 HG 的含量及 HG 的经皮累积透过率。以 pH 值为横坐标,以 48 h 的 HG 经皮累积透过率为纵坐标绘制曲线,结果见图 3。

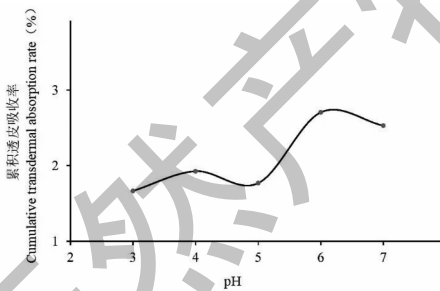


图 3 不同溶液 pH 对 HG 透皮吸收率的影响

Fig. 3 Effect of different solutions pH on the transdermal absorption rate of HG

由图 3 可知,随着溶液 pH 的增加,透皮吸收率表现出先增后减,再增再减的趋势,当 pH 为 6 时透皮吸收率达到最大值。因此选取溶液 pH 为 5、6、7 作为正交试验提取溶剂 pH 的三个水平进行研究。

2.1.2.3 不同促透剂用量对 HG 透过率的影响

称取 HG 对照品 5 份,每份各 3 mg,精密称定,用 20% 乙醇定容至 50 mL,调节 pH 至 6,分别将 0、

0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 氮酮作为促透剂充分混匀,作为供给液。按“1.3.4”项下方法制得供试品溶液。按“1.3.1”项下方法依法测定峰面积,并计算接收液中 HG 的含量及 HG 的经皮累积透过率。以乙醇浓度为横坐标,以 48 h 的 HG 透皮吸收率为纵坐标绘制曲线,结果见图 4。

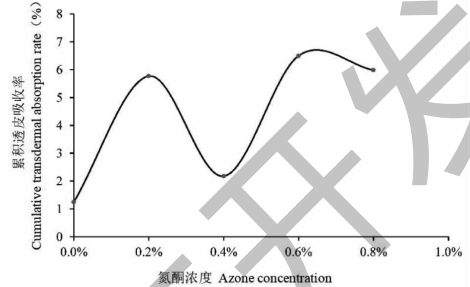


图 4 不同促透剂浓度对 HG 透皮吸收率的影响

Fig. 4 Effect of different penetration enhancers on the transdermal absorption ratio of HG

由图 4 可知,随着促透剂浓度的增加,透皮吸收率表现出与溶液 pH 对透皮吸收率的影响相似,当促透剂浓度为 0.6% 时透皮吸收率达到最大值。因此选取 0.4%、0.6%、0.8% 作为正交试验促透剂氮酮浓度的三个水平进行考察。

(3) 正交试验^[16]在上述单因素考察的基础上,以 HG 经皮累积透过率为评价指标,对主要影响因素:溶剂(A)、pH(B)、氮酮浓度%(C),通过 $L_9(3^4)$ 正交表进行进一步优化考察。取出的接收液经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过后,按“1.3.1”项下方法测定,记录峰面积。按照“1.3.7”项下公式计算 48 h 累积透过量(Q)以及经皮累积透过率(K)。重复测定 3 次,取平均值。因素水平见表 3,结果见表 4,方差分析见表 5。

表 3 因素水平
Table 3 Factor-level

| 水平 Level | 因素 Factor | | |
|-------------|-----------------|------|-------------------------------|
| | A 溶剂 Solvent | B pH | C 氮酮浓度 Azone concentration |
| 1 | 水 | 5 | 0.4% |
| 2 | 乙醇-水(10:90) | 6 | 0.6% |
| 3 | 乙醇-水(20:80) | 7 | 0.8% |

由表 5 方差结果可以看出:溶剂含醇量是影响 HG 经皮吸收的主要因素,其次分别为促透剂浓度和 pH。由正交试验结果,确定本品最佳提取工艺为 $A_2B_3C_3$,即 HG 对照品加 10% 乙醇充分溶解,调节

表 4 去甲乌药碱透皮吸收工艺考察 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 4 $L_9(3^4)$ orthogonal test result of investigation on HG transdermal absorption process

| 试验号 Test No. | 因素 Factor | | | | 累积透过量 Cumulative quantity of penetration (g) | 累积透皮吸收率 Cumulative transdermal absorption rate (%) |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---|---|
| | A | B | C | D | | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5.900 | 8.194 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 9.915 | 16.979 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 15.808 | 18.819 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 10.833 | 12.596 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 10.794 | 19.003 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 8.889 | 15.649 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 6.548 | 9.021 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 3.227 | 5.290 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 7.503 | 12.433 |
| K_1 | 43.992 | 29.811 | 29.103 | 39.630 | | |
| K_2 | 47.248 | 41.272 | 42.007 | 41.648 | | |
| K_3 | 26.744 | 46.900 | 46.842 | 36.675 | | |
| K_1^2 | 1 935.296 | 888.696 | 846.985 | 1 570.537 | | |
| K_2^2 | 2 232.374 | 1 703.378 | 1 764.588 | 1 734.556 | | |
| K_3^2 | 715.242 | 2 199.610 | 2 194.173 | 1 345.056 | | |
| $R = (K_1^2 + K_2^2 + K_3^2) / 3$ | 1 627.637 | 1 597.228 | 1 601.915 | 1 550.049 | | |
| $S = R - \bar{R}$ | 80.945 | 50.536 | 55.224 | 3.358 | | |

注: $\bar{R} = (\sum_{i=1}^9 y_i) / 9 = 1 546.692$ 。

表 5 透皮吸收率方差分析

Table 5 ANOVA of HG transdermal absorption rate

| 方差来源 Variance source | 离均差平方和 SSD | 自由度 DF | 方差 VAR | F 值 F value | 显著性 Significance | 最佳水平 Best-level |
|-------------------------|---------------|-----------|-----------|----------------|---------------------|--------------------|
| A | 80.945 | 2 | 40.473 | 24.105 | $P < 0.05$ | A_2 |
| B | 50.536 | 2 | 25.268 | 15.049 | $P < 0.1$ | B_3 |
| C | 55.224 | 2 | 27.612 | 16.446 | $P < 0.1$ | C_3 |
| D | 3.358 | 2 | 1.679 | - | - | - |

注: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$; $F_{0.1(2,2)} = 9.00$ 。

pH 7.0, 加入浓度为 0.8% 的促透剂氮酮充分混匀, 即得。

2.2 最佳工艺参数验证试验

称取 HG 对照品 3 mg, 精密称定, 按所选最佳工艺条件制备供给液, 平行测定 3 份, 依法测定其接收液中 HG 含量, 按“1.3.7”项下方法计算透皮吸收率, 并绘制累积透皮吸收率曲线。结果表明, HG 的最佳透皮吸收率为 $(21.60 \pm 5.70)\%$; 随着给药时间的延长, HG 的累计透皮吸收率随之增加, 0 ~ 12 h 的透过速率基本一致, 12 ~ 24 h 透过速率有明显加快, 24 ~ 48 h 透过速率减缓。结果见表 6 和图 5。

表 6 HG 累积透皮吸收率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Cumulative transdermal absorption rate of HG ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 透皮吸收时间 Time of transdermal absorption (h) | 累积透皮吸收率 Cumulative transdermal absorption rate (%) |
|--|---|
| 0 | 0 |
| 2 | 0.13 ± 0.07 |
| 4 | 0.56 ± 0.30 |
| 6 | 1.24 ± 0.57 |
| 8 | 2.18 ± 0.87 |
| 12 | 3.82 ± 1.32 |
| 24 | 10.87 ± 3.04 |
| 48 | 21.60 ± 5.70 |

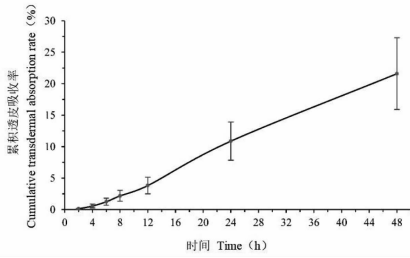


图5 48 h 累积透皮吸收曲线

Fig. 5 Cumulative curve of transdermal absorption in 48 h

3 讨论与结论

本文以离体鼠皮为介质,以 Franz 扩散池模拟人体经皮给药过程,在单因素考察的基础上,进行了正交试验设计,对影响 HG 透皮吸收的关键参数进行了优选,得到了 HG 在最优条件下的 48 h 的最大累积透皮率。但鼠皮与人体皮肤存在较大差异。我们将参考 Llewelyn 等^[17]的研究方法,在此基础上进一步研究 HG 经活体皮肤的吸收规律。

自 HG 被 WADA 纳入运动员禁用物质清单以来,由于检出的需要,UPLC-MS/MS 逐渐成为 HG 微量成分检测的标准方法,本文采用的方法即是我们经过方法学验证的自建方法(待发表),该方法可应用于天然药物、生物标本如血液、尿等的 HG 微量分析测定。

本文首次对去甲乌药碱经皮给药的透过速率及透过率进行了系统研究,确定了最佳工艺参数及 48h 最大透皮吸收率。结果表明,以 10% 乙醇水溶液为溶剂,pH 7.0,促透剂氮酮浓度为 0.8% 时,有最大的透皮速率与吸收率,在 48 h 内最大透皮吸收率可达到 $(21.60 \pm 5.70)\%$,为运动员安全使用外敷中药提供初步的参考数据,也为开发 HG 的外用强心药物提供初步的实验支持。但本研究应用的纯度接近 98% HG 纯品,含 HG 的中药透皮吸收规律是否与之一致,还有待进一步的研究。

参考文献

- Zhu QW, Liang BW. A discussion on the historical development of transdermal administration of traditional Chinese medicine [C]//China Association of Traditional Chinese Medicine. The 7th Annual Conference of Chinese Medicine External Treatment of China Association of Traditional Chinese Medicine(第七届中华中医药学会中医外治学术年会论文汇编),2011:47-54.
- Ruan Z, Qin WY, Liu ML, et al. Research on the formulation

- rules of external prescriptions for the treatment of gouty arthritis based on data mining[J]. Chin J Med Emerg(中国中医急诊),2019,28:2088-2090.
- Bai M, Chen J, Miao MS. Analysis of clinical external use rules of Bai Fuzi based on data mining[J]. China Pharm(中国药师),2020,23:671-675.
- Pan DL, Zhang HF. Determination of higenamine in Weiyangning pills by HPLC[J]. Open J Nat Sci,2020,9(1):48-53.
- World Anti-Doping Agency. Minimum required performance levels for detection and identification of non-threshold substances [EB/OL]. (2017-05-17) [2021-07-18]. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-td2017mrpl-en_0.pdf.
- Leng Y, Wang H. A permeation action of ligustrazine hydrochloride on the skin of three kinds of SPF laboratory animals [J]. Chin J Comp Med(中国比较医学杂志),2004,14(5):276-279.
- Liang YT, Liu XY, Pan JL, et al. Influence of different transdermal absorption enhancers on the *in vitro* transdermal absorption of BB cream [J]. J China Pharm(中国药房),2020,31:590-594.
- Tian L, Zhang S, Lin HQ, et al. Research progress in transdermal diffusion test of transdermal drug delivery system *in vitro* [J]. J China Pharm(中国药房),2012,23:2761-2764.
- Wang AG, Gu FS, Zheng KL, et al. *In vitro* transdermal absorption study of Shenxiao san poultice [J]. Drugs Clin(现代药物与临床),2021,36:1812-1816.
- Yu Q, Zhang RR, Shen YX, et al. Study on transdermal absorption and anti-inflammatory activity of Huanglian ointment *in vitro* [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志),2021,41:1625-1630.
- Zhang YY, Xu YF, Wang H, et al. Study on the transdermal effect of oil protein polypeptides of toadstool [J]. Chin Agric Sci Bull(中国农学通报),2021,37(8):33-38.
- Guo M, Liu J, Qiao HQ. Study on paeonol as an indicator substance in *in vitro* transdermal absorption test [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志),2018,38:1620-1623.
- Zhao Q, Zhang RT, Zhang JW, et al. *In vitro* percutaneous absorption of Fructus Evodiae powder and its main active ingredients [J]. Acta Chin Med(中医学报),2019,34:1730-1734.
- Li L, Wang DX. Effects of azone on the penetration of dysmenorrhea paste [J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究),2000,8(3):48-49.