

复方天麻颗粒中天麻素在大鼠体内的药动学研究

杨 园, 韩凤梅, 杜 鹏, 陈 勇*

(湖北大学中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘要: 为了研究麦冬、五味子与天麻配伍对大鼠体内天麻素药动学的影响, 分别给 Wistar 大鼠灌胃低、中、高剂量复方天麻颗粒提取物 (剂量分别相当于天麻素 50、100 和 200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 及天麻提取物 (剂量相当于天麻素 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 于不同时间点采集大鼠血浆。血浆样品经甲醇-乙腈沉淀蛋白后, 用液相色谱法测定血浆中天麻素含量。各给药组天麻素平均血药浓度-时间数据用 WinNonlin 5.2.1 药动学软件进行动力学分析, 组间药动学参数用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。结果表明, 低、中剂量复方组天麻素在大鼠体内符合一级吸收非房室模型, 高剂量复方组天麻素在大鼠体内符合零级吸收非房室模型。对比分析大鼠灌胃 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 天麻素的复方天麻颗粒提取物和天麻提取物时的药动学参数, 复方组 $C_{\max}$ 显著变小 ($P < 0.01$)、 $\text{MRT}_{0-\infty}$ 显著延长 ($P < 0.01$), 表明麦冬、五味子与天麻配伍, 可延缓天麻素的吸收, 降低消除速率, 增加体内作用时间。

关键词: 复方天麻颗粒; 天麻素; 药动学

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 04-0484-05

Pharmacokinetics of gastrodin from compound Tianma granule in rats

YANG Yuan, HAN Feng-mei, DU Peng, CHEN Yong*

(Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Traditional Chinese Medicine, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: To study the influence of the compatibility of ophiopogonis tuber and Chinese magnoliavine fruit with gastrodia rhizome on the pharmacokinetics of gastrodin in rat, three dosages of compound Tianma granule extract (equivalent to gastrodin 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and one dosage of Tianma extract (equivalent to gastrodin 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) were administered to rats by intragastric administration separately. Plasma samples were collected at different times and treated with methanol and acetonitrile to precipitate protein. The contents of gastrodin in plasma were determined by HPLC method. The mean plasma concentration-time curves of different medication administration teams were processed with WinNonlin 5.2.1 pharmacokinetic software. The pharmacokinetic parameters of different medication administration teams were analyzed with SPSS statistics 17.0 software. The results indicated that the *in vivo* kinetic process of gastrodin was fitted to first-order absorption un-compartment model at low, middle dosages and zero-order absorption un-compartment model at high dosage of compound Tianma granule extract. By comparison with the pharmacokinetic parameters of gastrodin (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) in Tianma extract, the significant decrease for $C_{\max}$ and significant increase for $\text{MRT}_{0-\infty}$ in compound Tianma granule extract indicated that the compatibility of ophiopogonis tuber and Chinese magnoliavine fruit with *Gastrodia* rhizome can delay the absorption, reduce the elimination rate and prolong the action time of gastrodin *in vivo*.

Key words: compound Tianma granule; gastrodin; pharmacokinetics

中药配伍使用是中医临床用药的重要特点。药物经配伍后, 药物之间会发生某些相互作用, 使其原

有性能有所改变, 产生不同的效果^[1]。开展中药复方药动学研究, 有助于阐明中药复方的组方原理, 了解药物的作用机制^[2]。复方天麻颗粒由天麻、五味子和麦冬组成, 收载于《卫生部药品标准》(中药成方制剂第十二册), 具有健脑安神的功效, 用于失眠健忘,

收稿日期: 2009-08-27.

基金项目: 2008 年湖北省高等学校优秀中青年团队计划项目 (T200807).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-27-88663590, E-mail: cy101610@yahoo.cn

神经衰弱, 以及高血压引起的头昏头痛等症^[3]。天麻为方中君药, 天麻素是天麻的主要活性成分, 具有镇静、安神和镇痛等中枢抑制作用^[4], 临床上主要用于治疗神经衰弱、血管神经性头痛、神经衰弱综合征和恢复脑功能等症^[5]。目前, 天麻素的药代动力学研究已有文献^[6, 7]报道, 但复方天麻颗粒中天麻素的药动学以及配伍对天麻素药动学性质的影响还未见报道。本文研究了低、中、高剂量复方天麻颗粒中天麻素在大鼠体内的药动学过程, 探讨了五味子、麦冬与天麻配伍使用对天麻素体内药动学性质的影响, 为深入研究复方天麻颗粒的配伍规律提供了有价值的实验数据。

材料与方法

仪器 美国 Agilent 1100 型 HPLC 仪 (配备 DAD 二极管阵列检测器, 四元泵, 自动进样器); 宁波新芝生物科技股份有限公司 JY92-II 型超声波细胞粉碎机; 德国赛多利斯公司 BP211D 电子天平; 德国 SIGMA 2K15C 台式高速离心机; 东京理化器械株式会社 NE-1001 旋转蒸发仪; 韩国 BioTron 公司离心真空浓缩仪。

药品 天麻 (云南)、五味子 (辽宁)、麦冬 (湖北) 购于湖北省德仁堂连锁大药房, 并经本院植化教研室王万贤教授鉴定; 天麻素对照品 (批号: 110807-200205) 购于中国药品生物制品检定所; 分析纯间苯三酚购于上海展云化工有限公司; 色谱纯甲醇和乙腈购于 Tedia 公司; 分析纯磷酸购于天津市红岩化学试剂厂; 肝素 (150 U·mg⁻¹) 购于上海君创生物公司; 100 μg·mL⁻¹ 天麻素储备液 (5.0 mg 天麻素对照品溶于 0.1% 磷酸溶液 50 mL 中); 26 μg·mL⁻¹ 间苯三酚储备液 (2.6 mg 间苯三酚对照品溶于 0.1% 磷酸溶液 100 mL 中)。

实验动物 SPF 级 Wistar 大鼠 (雌雄各半, 体重 200 ± 20 g) 购于湖北省疾病预防控制中心实验动物研究中心, 合格证: SCXK (鄂) 2008-0005。

灌胃样品 将天麻 650 g 粉碎成粗粉, 依据天麻提取物处方制法^[3], 制备天麻提取物 114.4 g。将天麻 650 g、五味子 325 g、麦冬 650 g 依据复方天麻颗粒提取物处方制法^[3], 制备复方天麻颗粒提取物 357.9 g。同上法制得缺少天麻的阴性对照提取物 220.6 g。依据文献^[8]方法, 测得天麻提取物中天麻素含量为 3.70%, 复方天麻颗粒提取物中天麻素的含量为 0.71%。

灌胃剂量 根据目前临床推荐的成人静脉滴注

天麻素剂量 600~800 mg·d⁻¹^[9, 10]和大鼠灌胃天麻素的生物利用度 86.1%^[7], 以及不同种动物的剂量换算及预实验结果, 本实验最终确定大鼠灌胃天麻素单体的低剂量为 50 mg·kg⁻¹, 折算成复方天麻颗粒提取物为 7.04 g·kg⁻¹。按低、中、高剂量比为 1:2:4, 相应天麻素单体的中剂量和高剂量分别为 100 和 200 mg·kg⁻¹, 折算成中剂量的复方天麻颗粒提取物为 14.08 g·kg⁻¹, 天麻提取物为 2.70 g·kg⁻¹, 高剂量的复方天麻颗粒提取物为 28.17 g·kg⁻¹。

色谱条件 Dikma Platisil ODS (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) 色谱柱, 菲罗门保护柱 (4.0 mm × 3.0 mm), 乙腈-0.1%磷酸 (2:98) 流动相, 1.0 mL·min⁻¹ 流速, 检测波长 220 nm, 柱温 28 °C, 进样体积 20 μL, 内标为间苯三酚。

血浆样品 SPF 级 Wistar 大鼠 (体重 200 ± 20 g) 随机分成 5 组, 第 1~4 组每组 8 只, 第 5 组 2 只, 雌雄各半。给药前禁食 12 h, 自由饮水。第 1~3 组分别灌胃复方天麻颗粒提取物, 剂量分别相当于天麻素 50、100 和 200 mg·kg⁻¹, 第 4 组灌胃天麻提取物 (剂量相当于天麻素 100 mg·kg⁻¹), 第五组灌胃缺少天麻的阴性对照提取物。分别于给药后不同时间眼眶取血约 0.5 mL/只, 肝素抗凝, 4 °C、3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离血浆 0.2 mL, -20 °C 保存备用^[11]。精密吸取血浆 100 μL, 依次加入乙腈-0.1%磷酸 (2:98) 50 μL, 内标溶液 50 μL, 涡旋振荡 30 s 后, 加入甲醇-乙腈 (1:4) 0.5 mL, 再涡旋振荡 1 min 后于 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 除蛋白, 取上清液, 45 °C 下于离心真空浓缩仪上挥干, 残渣用流动相 100 μL 溶解, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液 20 μL 进样分析^[12, 13]。

数据分析 灌胃给药后天麻素的血药浓度-时间数据采用 WinNonlin 5.2.1 药代动力学软件按非房室模型进行处理, 计算药动学参数。采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析, 低、中、高剂量复方组间天麻素药动学参数的对比分析采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 结合均值间多重比较 (multiple comparisons); 中剂量复方组和天麻提取物组间天麻素药动学参数的对比分析采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 结合 Dunnett 双侧检验 (2-side)。

结果

1 方法专属性

按“血浆样品”项操作, 图 1 是不同来源样品的色谱分离图。结果表明, 血浆中的内源性杂质不干扰天麻素的测定, 内标与天麻素峰形良好, 保留时间分

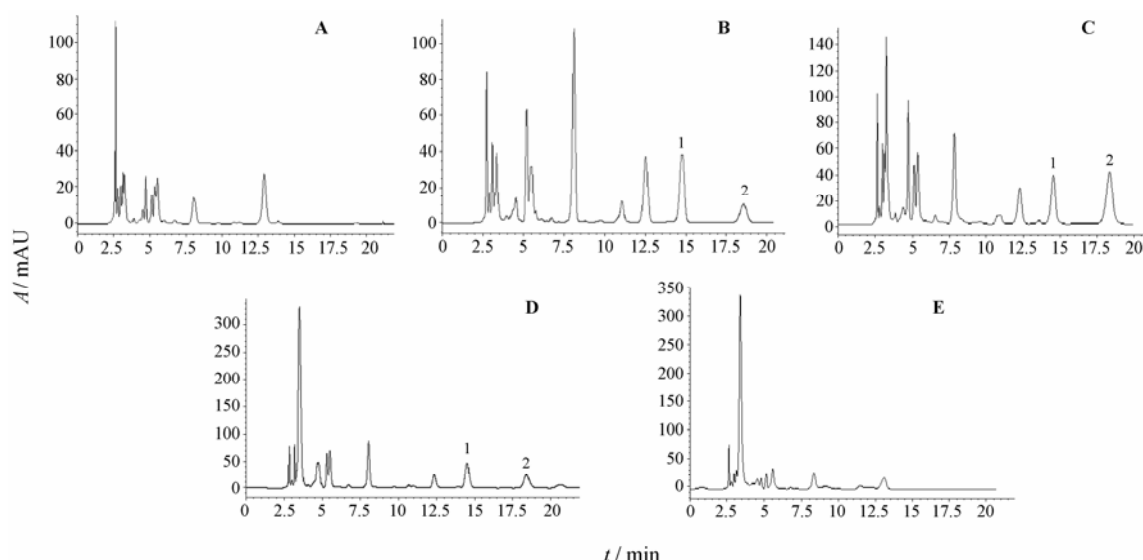


Figure 1 HPLC chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with gastrodin and internal standard phloroglucinol (B), rat plasma sample obtained after ig Tianma extract (C), rat plasma sample obtained after ig compound Tianma granule extract (D), rat plasma sample obtained after ig negative control of Tianma (E). Peak 1: Phloroglucinol; Peak 2: Gastrodin

别为 14.55 和 18.32 min。

2 标准曲线

取空白血浆 100 μL , 加入不同浓度天麻素系列对照溶液 50 μL 和 26 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标溶液 50 μL , 配制如下浓度梯度天麻素血浆样品: 60, 30, 12, 2.4, 0.48, 0.24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每一浓度平行做 3 份, 按“血浆样品”项操作, 建立标准曲线。以血浆样品中待测物浓度为横坐标 (x), 待测物与内标的峰面积比值 (y) 为纵坐标作图, 求得天麻素标准曲线 $y = 0.0413x - 0.0262$ ($r^2 = 0.9997$), 线性范围为 0.24~60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 信噪比 $S/N = 10$ 时定量限为 0.24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($RSD = 12.12\%$)。

3 精密度和稳定性

取空白血浆制备天麻素低、中、高 3 种浓度 (0.48, 12 和 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 质量控制 (QC) 样品, 每个浓度平行做 5 份, 按“血浆样品处理”项操作, 每个样品测定一次, 于 1 个工作日内完成, 计算日内精密度。同样的 QC 样品连续重复 3 天, 计算日间精密度。日内相对标准偏差 (RSD) 分别为 6.47%、0.84% 和 1.46%, 日间 RSD 分别为 9.59%、8.11% 和 6.64%。同时, 考察了上述 3 个浓度质控样品在不同保存条件下的稳定性。血浆样品室温放置 15 h, 天麻素的 RSD 分别为 2.93%、1.72% 和 0.15%; 血浆样品处理后室温放置 12 h, 天麻素的 RSD 分别为 1.32%、3.32% 和 1.03%。血浆样品处理后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5 d, 天麻素的 RSD 分别为 6.64%、0.72% 和 1.40%。血浆样品冷冻-解冻循环 2 次, 天麻素的 RSD 分别为 7.18%、1.92% 和 3.27%。

4 提取回收率和方法回收率

配制天麻素低、中、高 3 种浓度 (0.48, 12 和 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) QC 样品, 按照“血浆样品”项下操作, 测定样品的色谱峰面积, 并与相应浓度对照溶液直接进样的色谱峰面积相比, 计算样品的提取回收率, 每个浓度平行做 5 份。天麻素低、中、高 3 种浓度 QC 样品的提取回收率分别为 78.09% ($RSD = 3.62\%$)、82.22% ($RSD = 3.28\%$) 和 87.38% ($RSD = 3.12\%$)。内标溶液经同样处理, 提取回收率为 88.75% ($RSD = 1.44\%$)。将以上各个样品进样后所得峰面积值代入回归方程计算浓度, 所得浓度与实际浓度的比值即为方法回收率。天麻素低、中、高 3 种浓度 QC 样品的方法回收率分别为 99.96% ($RSD = 7.68\%$)、103.54% ($RSD = 1.76\%$) 和 96.03% ($RSD = 0.77\%$)。

5 血药浓度经时曲线及药动学参数

大鼠灌胃低、中、高 3 个剂量复方天麻颗粒提取物的平均血药浓度-时间曲线见图 2, 中剂量复方组和含相同剂量天麻素的天麻提取物组的平均血药浓度-时间曲线见图 3。所得实验数据采用 WinNonlin 5.2.1 药代动力学软件进行处理, 按非房室模型进行曲线拟合, 所得药动学相关参数见表 1。

讨论

灌胃不同剂量复方天麻颗粒提取物后, 天麻素的药动学参数存在一定的差异。低、中剂量组间天麻素的 $T_{1/2}$ 、 $MRT_{0-\infty}$ 、 CL/F 无显著性差异, $AUC_{0-\infty}$ 随给药剂量增加线性增大; 高剂量组与中剂量组相

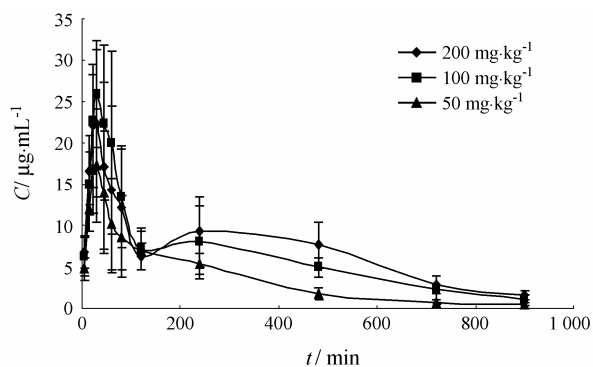


Figure 2 Mean plasma concentration-time curves of gastrodin in rats after ig compound Tianma granule extract at three dosage levels

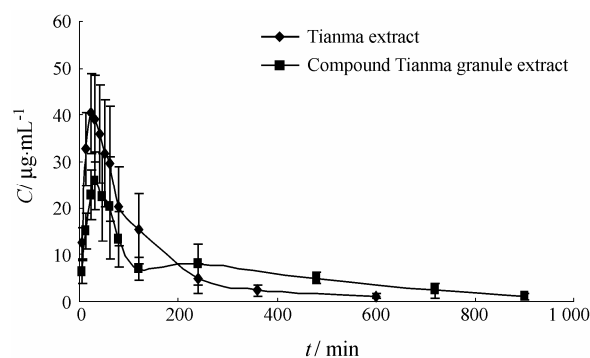


Figure 3 Mean plasma concentration-time curves of gastrodin in rats after ig Tianma extract and compound Tianma granule extract at one dosage level (100 mg·kg⁻¹)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of gastrodin after ig three dosage levels of compound Tianma granule extract and one dosage level of Tianma extract in rats

Parameter	Compound Tianma granule extract			Tianma extract
	Low dosage	Middle dosage	High dosage	Middle dosage
K_e/min^{-1}	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001
$T_{1/2}/\text{min}$	239.335 ± 91.011	225.596 ± 63.422	205.708 ± 40.256	181.163 ± 52.607
$T_{\max}/\text{min}$	26.875 ± 8.623	42.125 ± 15.054	36.000 ± 20.518	34.500 ± 13.370
$C_{\max}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	18.563 ± 6.765	$28.402 \pm 6.934^{**}$	25.452 ± 8.565	42.801 ± 10.150
$C_{\max}/D/\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.371 ± 0.135	$0.284 \pm 0.069^{**}$	0.127 ± 0.043	0.428 ± 0.102
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{min}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$3\,454.156 \pm 555.689$	$5\,901.409 \pm 1\,441.174$	$6\,697.938 \pm 1\,474.494$	$5\,440.519 \pm 1\,042.700$
$\text{AUC}_{0-\infty}/D/\text{min}\cdot\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	69.083 ± 11.114	59.014 ± 14.412	33.490 ± 7.372	54.405 ± 10.427
$V_z/F/\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$	$4\,974.575 \pm 1\,565.221$	$5\,808.772 \pm 2\,025.594$	$9\,235.037 \pm 2\,177.858$	$4\,872.312 \pm 1\,155.346$
$\text{CL}/F/\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	14.928 ± 2.833	18.070 ± 4.653	31.222 ± 6.322	19.222 ± 4.426
$\text{MRT}_{0-\infty}/\text{min}$	278.780 ± 33.734	$337.129 \pm 96.482^{**}$	377.366 ± 47.593	171.853 ± 42.337

$n = 8$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$ vs middle dosage of Tianma extract

比, V_z/F 、 CL/F 显著变大, $T_{1/2}$ 、 $\text{MRT}_{0-\infty}$ 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 随给药剂量增加无显著变化。因此, 推测天麻素在 50~100 mg·kg⁻¹ 剂量时在大鼠体内为线性动力学过程, 剂量在 200 mg·kg⁻¹ 以上时则为非线性动力学过程^[14]。另外, 低、中、高等 3 剂量复方组天麻素的最大血药浓度与剂量的比值 ($C_{\max}/D$) 随给药剂量增大而明显减小, 血药浓度曲线下面积和给药剂量的比值 ($\text{AUC}_{0-\infty}/D$) 亦由 69.08 减小至 33.49 min·g·mL⁻¹, 说明天麻素在大鼠体内的吸收随给药剂量增大出现了饱和现象^[15]。

对比分析大鼠灌胃 100 mg·kg⁻¹ 天麻素的复方天麻颗粒提取物和天麻提取物时的药动学参数, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 和 $T_{\max}$ 无显著差异, 但复方组 $C_{\max}$ 显著变小 ($P < 0.01$)、 $\text{MRT}_{0-\infty}$ 显著延长 ($P < 0.01$), $T_{1/2}$ 、 V_z/F 虽无显著性差异, 但亦增大了约 20%, 表明复方成分对天麻素的吸收、分布、消除均有一定程度的影响。复方组天麻素的达峰浓度显著降低 ($P < 0.01$), $\text{AUC}_{0-\infty}$ 无显著差异, 说明配伍延缓了天麻素的吸收, 但对其生物利用度

无较大影响。复方组 V_z/F 相对提高, 说明配伍有促进天麻素体内分布的趋势。 $T_{1/2}$ 相对延长、 $\text{MRT}_{0-\infty}$ 显著延长, 说明配伍后可以降低天麻素的消除速率, 增加其在体内作用时间, 这可能与复方中五味子抑制了大鼠体内 CYP3A 活性, 从而减缓了天麻素在体内的代谢消除有关^[16-18]。同时, 研究结果也提示, 临床中为使天麻素的血药浓度达到有效治疗浓度, 应控制复方天麻颗粒的给药剂量和给药间隔时间。

灌胃复方天麻颗粒提取物时, 天麻素的药-时曲线出现双峰现象。但天麻素单体对大鼠给药没有发现双峰现象, 也不存在肠肝循环^[7], 天麻提取物对大鼠给药也未见双峰现象。药物的吸收出现多峰存在多种原因, 如肠肝循环、多部位吸收、体内再分布、胃-肠循环、蛋白竞争等^[19]。由于天麻素的血浆蛋白结合率较低, 因此蛋白结合不会引起双峰现象。与单独灌胃天麻提取物相比, 复方提取物中天麻素的 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 无显著差异, $C_{\max}$ 显著变小、 $\text{MRT}_{0-\infty}$ 显著延长, V_z/F 虽无显著性差异, 但亦有明显增大, 说明复

方中其他成分对天麻素的体内分布产生了影响,引起药物在某些组织器官的蓄积及缓慢释放,这可能是引起其出现双峰的原因之一。

References

- [1] Qiu QL. The elements of impact of drugs function in Chinese compatibility [J]. Chin Med Mod Distance Edu China (中国中医药现代远程教育), 2007, 5: 25–26.
- [2] Cao LX, Dun BS. Discussion the pharmacokinetics research of Chinese medicine prescription from specificity of Chinese compatibility [J]. Shaanxi Chin Med (陕西中医), 2008, 29: 96–98.
- [3] China Pharmacopoeia Committee. Ministry of Health of the People's Republic of China Standards for Chinese Medicine Formulations Volume XII (中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第十二册) [S]. Beijing: China Pharmacopoeia Committee, 1997: 114.
- [4] Den SX, Mo YQ. Gastrodin pharmacological research I, the sedative and anticonvulsant of gasterodigenin and aglycones [J]. Yunnan Plant Res (云南植物研究), 1979, 1: 66.
- [5] Lu GW, Zhou YJ, Mo QZ. ³H-gastrodin absorption, distribution, metabolism and excretion in rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1985, 20: 167–172.
- [6] Liu KX. Gastrodin physiological disposal in rats [J]. J Dalian Med Coll (大连医学院报), 1988, 1: 62–66.
- [7] Cheng G, Hao XH, Liu GL, et al. Pharmacokinetics of gastrodin in rats [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2003, 38: 127–129.
- [8] Zhang L, Wang GQ. Determination of gastrodin in compound Tianma granules by HPLC [J]. Anhui Med Pharm (安徽医药), 2006, 10: 919–920.
- [9] Tan LX, Chen XF, Li JF. The efficacy of gastrodin treatment vertebrobasilar insufficiency [J]. J Chin Clin Med (中华临床医药), 2002, 3: 56–57.
- [10] Liu JS, Tan ZS, Cui LB, et al. The clinical observation of cervical vertigo after iv gastrodin injection [J]. Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care (中国中西医结合急救杂志), 2002, 9: 8.
- [11] Zheng XH. The Study of the Neuroprotective Gastrodin During Effects and Related Mechanisms of Cerebral Ischemia (天麻素抗脑缺血作用及相关机制研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007.
- [12] Zhang W, Sheng YX, Zhang JL. Determination and pharmacokinetics of gastrodin and *p*-hydroxybenzylalcohol after oral administration of *Gastrodia elata* Bl. extract in rats by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometric method [J]. Phytomedicine, 2008, 15: 844–850.
- [13] Luo J, Wu ZL, Wang HX. Pharmacokinetic study of gastrodin injection [J]. Pharm J PLA (解放军药学报), 2006, 22: 391–39.
- [14] Liu YM, Lin AH, Chen H, et al. Study on pharmacokinetics of scutellarin in rabbits [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2003, 38: 775–778.
- [15] Ruiz-Carretero P, Merino-Sanjuán M, Nacher A, et al. Pharmacokinetic models for the saturable absorption of cefuroxime axetil and saturable elimination of cefuroxime [J]. Eur J Pharm Sci, 2004, 21: 217–223.
- [16] Yan TH. Inhibitory effect of *Schisandra* composition on the activity of CYP3A4 [J]. World Notes Tradit Chin Med (国外医药中医中药分册), 2004, 26: 125.
- [17] Iwata H, Tezuka Y, Kadota S, et al. Identification and characterization of potent CYP3A4 inhibitors in *Schisandra* fruit extract [J]. Drug Metab Dispos, 2004, 32: 1351–1358.
- [18] Pei B, Cai Y, Liao XH, et al. Study effects of deoxyschizandrin on rat liver CYP3A4 [J]. Liver (肝脏), 2006, 11: 261–263.
- [19] Wei FH, Wang YG, Luo JB. Study multi-peak phenomenon of pharmacokinetic [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2005, 40: 1772–1774.