

## · 药剂与工艺 ·

## 盐酸青藤碱纳米柔性脂质体的制备及其性质研究

韩文霞<sup>1</sup>, 李伟泽<sup>1\*</sup>, 汪兴军<sup>1</sup>, 张寒<sup>1</sup>, 孙艳平<sup>1</sup>, 郝保华<sup>2</sup>

1. 西安医学院, 陕西 西安 710021

2. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069

**摘要:** 目的 制备盐酸青藤碱纳米柔性脂质体, 探索其体外透皮给药的规律与机制。方法 采用薄膜分散法制备以丙二醇为柔软剂的盐酸青藤碱纳米柔性脂质体, 考察卵磷脂、胆固醇与丙二醇对脂质体包封率的影响; 高效液相色谱 (HPLC) 法测定青藤碱的量, 原子力显微镜 (AFM)、透射电镜 (TEM) 和光子相关光谱仪 (PCS) 描述其物理性质。采用双室扩散池法研究其体外透皮给药规律, 透皮给药结束后用扫描电镜 (SEM) 观察皮肤表面结构的变化。结果 卵磷脂、胆固醇和丙二醇的质量分数分别为 3%、0.02%、25% 时, 制备的柔性脂质体对盐酸青藤碱的包封率为 (66±2.3)%; 其外观为圆形或椭圆形, 内部为多层囊泡结构, 粒径为 (170±26) nm, 表面电位为 -(43±3.4) mV。柔性脂质体能够使角质层结构变得紊乱无序, 角质细胞间隙增大而提高皮肤对药物的渗透性。结论 纳米柔性脂质体能够显著提高盐酸青藤碱透皮给药效果, 可作为盐酸青藤碱透皮给药的新型纳米载体。

**关键词:** 盐酸青藤碱; 柔性脂质体; 透皮给药; 薄膜分散法; 包封率

中图分类号: R283.6; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)04-0671-05

## Preparation of sinomenine hydrochloride loaded nano flexible liposomes and their characteristics

HAN Wen-xia<sup>1</sup>, LI Wei-ze<sup>1</sup>, WANG Xing-jun<sup>1</sup>, ZHANG Han<sup>1</sup>, SUN Yan-ping<sup>1</sup>, HAO Bao-hua<sup>2</sup>

1. Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

2. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

**Abstract: Objective** To study the preparation of sinomenine hydrochloride (SH) loaded nano flexible liposomes and investigate the mechanism of the flexible liposomes for enhanced *in vitro* transdermal drug delivery. **Methods** The SH loaded nano flexible liposomes were prepared by film dispersion method, and the effects of concentration of phosphatidylcholine (PSC), cholesterol (CH), and propyleneglycol (PG) on the entrapment efficiency of SH were also investigated. The SH content was determined by HPLC. The physical property was evaluated by the atomic force microscope (AFM), transmission electron microscope (TEM) and photon correlation spectrometer (PCS). The side-by-side diffusion cells were used to evaluate transdermal delivery of SH by nano flexible liposomes. At the end of the transdermal experiment, the treated skin was carefully observed by scanning electron microscopy (SEM). **Results** The SH loaded nano flexible liposomes were prepared by film dispersion method with the PSC (3%), CH (0.02%), and PG (25%); The SH entrapment efficiency was (66±2.3)%. The prepared nano flexible liposomes had a closed spherical or elliptical shape showed by AFM images, the TEM images appeared as multi-lamellar vesicles. The calculated mean size was (170±26) nm, the zeta potential values of -(43±3.4) mV. The SH loaded nano flexible liposomes caused the structure of stratum corneum (SC) layer disturbed and disordered the intercorneocyte domain wider, this increased the skin permeability of drug. **Conclusion** The SH loaded nano flexible liposomes are obviously resulted in a remarkable enhancement of the SH transdermal drug delivery, which could act as a new nanodimensional vehicle for transdermal delivery of SH.

**Key words:** sinomenine hydrochloride (SH); flexible liposomes; transdermal drug delivery; film dispersion method; entrapment efficiency

青藤碱是从中药青风藤中提取的一种生物碱, 具有抗炎、抗氧化、镇痛和免疫抑制作用<sup>[1-2]</sup>, 临床上常用于风湿、类风湿的治疗; 其临床治疗效果好, 能明显缓解患者的临床症状, 但其生物半衰期

收稿日期: 2010-06-30

作者简介: 韩文霞, 女, 硕士, 西安医学院医学技术系任教, 研究方向为生物技术与新药开发。Tel: 15829743785 E-mail: wenxiah@yaho.com.cn

\*通讯作者 李伟泽 Tel: (029)86177546 E-mail: weizeli@126.com

较短,口服生物利用度低。因此,在临床上一般需长期口服,且剂量偏大,易引起严重胃肠道不良反应和肝肾损伤,同时对心脏也有一定的毒性<sup>[3]</sup>。故开发其透皮给药制剂具有深远的临床意义<sup>[4-6]</sup>。

柔性脂质体是指在脂质体的双分子层中加入不同的柔软剂使脂质体膜具有优越的柔顺性和变形性,易于通过皮肤上的微孔道而携带药物穿过皮肤。柔性脂质体对药物的包封率高于普通脂质体,其稳定性也远远大于普通脂质体与非离子型囊泡<sup>[7-8]</sup>。柔软剂主要为表面活性剂如聚山梨酯类<sup>[9]</sup>、胆酸盐<sup>[10]</sup>、去氧胆酸盐<sup>[11]</sup>等与小分子醇如乙醇<sup>[12]</sup>、丙二醇<sup>[13]</sup>等,其中以丙二醇为柔软剂的柔性脂质体具有更优越的稳定性和包封率<sup>[14]</sup>。本实验考察了以丙二醇为柔软剂的盐酸青藤碱柔性脂质体的制备及其体外透皮给药特性。

## 1 仪器与材料

HIC—10ASP 高效液相色谱仪(岛津,SPD-10A 检测器),YP—5001 电子精密天平(上海良平仪器仪表有限公司),FJ—200 高速分散匀质机(上海标本模型厂),SK1200H 超声仪(上海科导超声仪器有限公司),透射电镜(TEM, JEM—2000EX, Japan),扫描电子显微镜(SEM, Hitachi 3500 H, Japan),原子力显微镜(Sunnyvale, CA),光子相关光谱仪(ZEM 5002, Malvern, UK),双室扩散池( $V=15\text{ mL}$ ,  $A_e=2.0\text{ cm}^2$ )。

大豆卵磷脂(天津博迪化工股份有限公司),胆固醇(天津博迪化工股份有限公司),盐酸青藤碱对照品(质量分数 $\geq 99\%$ ,西安小草植物科技有限责任公司),丙二醇(天津化学试剂六厂),生理盐水(山东康宁药业有限公司),脂质体消解液(乳化剂 OP-无水乙醇-0.1 mol/L 盐酸 10:100:150),其他试剂均为分析纯,水为双蒸水。Sephadex G-50(南京都莱生物技术有限公司),0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜(上海市新亚净化器件厂)。人尸体皮肤(第四军医大学提供)。

## 2 方法与结果

### 2.1 柔性脂质体的制备

称取处方量的卵磷脂、胆固醇,用适量无水乙醇溶解,转移至茄形瓶中,于 50  $^{\circ}\text{C}$ 、-0.05 MPa 条件下旋转除去乙醇。将丙二醇溶于处方量的生理盐水中,取出 1/3 的水相溶解盐酸青藤碱并于 50  $^{\circ}\text{C}$  预热,然后缓慢滴加到茄形瓶内;50  $^{\circ}\text{C}$ 、旋转 60 min 使脂类膜材脱落进行水合,之后将其转移至具塞三

角瓶中,高速匀质 10 min,超声(冰水浴,45 W) 5 min,通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜循环 2 次;最后将剩余的水相缓缓加入其中,即得。

### 2.2 葡聚糖凝胶柱法测定包封率

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Nucleosil C<sub>18</sub> (125 mm $\times$  4.6 mm, 5.0  $\mu\text{m}$ ),流动相为甲醇-[水-乙二胺(300:1)](52:48),检测波长 262 nm,体积流量 1.0 mL/min,进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

**2.2.2 线性关系考察** 取盐酸青藤碱对照品用甲醇配制成质量浓度分别为 1.0、3.0、8.0、15.0、25.0  $\mu\text{g/mL}$  的系列对照品溶液,各精密移取 20  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪测定;以峰面积为纵坐标,盐酸青藤碱质量浓度为横坐标,进行线性回归,得回归方程  $A=14\ 791.06\ C+30\ 954.12$ ,  $r=0.999\ 3$ ,表明盐酸青藤碱在 1.0~25.0  $\mu\text{g/mL}$  线性关系良好。

**2.2.3 方法学考察** 取盐酸青藤碱低、中、高(1.0、8.0、25.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 3 个质量浓度的对照品溶液进样分析,各重复 6 次,计算得其日内 RSD 分别为 2.8%、4.3%、2.7%;连续 6 d 进样分析,计算得其日间 RSD 分别为 3.6%、4.4%、4.1%。

将盐酸青藤碱低、中、高(1.0、8.0、25.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 3 个质量浓度的对照品溶液分别与 1.0 mL 空白脂质体混合,得混合对照品溶液,移取 0.25 mL 上 Sephadex G-50 柱,用生理盐水洗脱,收集洗脱液,混匀得到洗脱液;量取 0.4 mL,置 10 mL 量瓶中,加入脂质体消解液至刻度,摇匀,离心(3 000 r/min) 5 min,吸取上清液 20  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪测定,计算得其回收率分别为 98.2%、99.4%、99.1%。

**2.2.4 包封率的计算** 精密量取脂质体样品液 0.25 mL 上柱,用生理盐水洗脱;用 20 mL 量瓶收集有乳光的部分,加入脂质体消解液至刻度,消解至澄清,摇匀。吸取 1 mL 置离心管中,3 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液 20  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪测定,计算包封率(包封率=脂质体包封药量/实际投药量)。

### 2.3 磷脂膜材与丙二醇对柔性脂质体包封率的影响

**2.3.1 卵磷脂对包封率的影响** 固定胆固醇与丙二醇的质量分数分别为 0.02%、20%,盐酸青藤碱为 3.5%;取等梯度质量分数的卵磷脂(1.0%~5.0%),制备盐酸青藤碱柔性脂质体并测定盐酸青藤碱的包封率,结果见图 1。可知,随着卵磷脂质量分数的增加,盐酸青藤碱的包封率也随之增加。卵磷脂质量分数为 3%时,脂质体对药物的包封率显著高于质量分数为 1%与 2%的脂质体( $t$ -test,  $P<0.05$ );

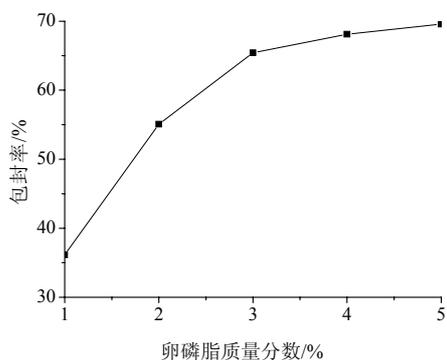


图 1 不同质量分数卵磷脂对脂质体包封率的影响 (n=4)  
Fig. 1 Effects of PSC at different concentrations on entrapment efficiency of liposomes (n=4)

而卵磷脂质量分数为 3%、4%、5% 时, 三者之间差异不显著。结果表明, 在胆固醇和丙二醇用量一定的条件下, 当卵磷脂质量分数超过 3% 时, 脂质体对包封率的影响不再显著。

**2.3.2 胆固醇对包封率的影响** 胆固醇是形成脂质体的重要辅料, 对于脂质体膜的稳定性和流动性具有显著的调节作用, 进而影响着脂质体对药物的包封率。固定卵磷脂与丙二醇的质量分数分别为 3%、20%, 盐酸青藤碱为 3.5%; 取等梯度质量分数的胆固醇 (0.01%~0.025%), 制备盐酸青藤碱柔性脂质体并测定盐酸青藤碱的包封率; 并与空白胆固醇的脂质体进行对比, 结果见图 2。可知, 随着胆固醇质量分数的增加, 盐酸青藤碱的包封率也随之逐渐增加。胆固醇质量分数为 0.02% 时, 脂质体对药物的包封率显著高于不加胆固醇的脂质体和胆固醇质量分数为 0.01% 与 0.015% 的脂质体 ( $t$ -test,  $P < 0.05$ ); 而胆固醇质量分数超过 0.02% 时, 脂质体对包封率的影响不再显著。

**2.3.3 丙二醇对包封率的影响** 丙二醇是溶解范围

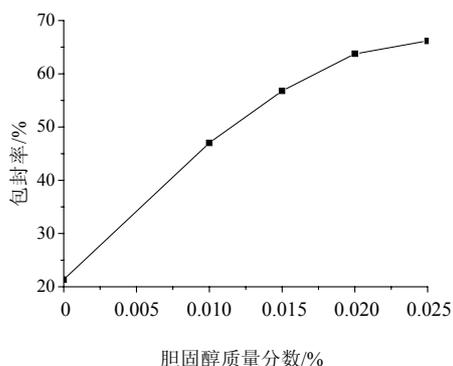


图 2 不同质量分数胆固醇对脂质体包封率的影响 (n=4)  
Fig. 2 Effects of CH at different concentrations on entrapment efficiency of liposomes (n=4)

极为广泛的非挥发性的半极性溶剂, 研究表明以丙二醇为柔软剂比以乙醇为柔软剂的柔性脂质体具有更好的稳定性和包封率<sup>[14]</sup>。固定卵磷脂与胆固醇的质量分数分别为 3%、0.02%, 盐酸青藤碱为 3.5%; 取等梯度质量分数的丙二醇 (10%~30%), 制备盐酸青藤碱柔性脂质体并测定盐酸青藤碱的包封率, 结果见图 3。可知, 当丙二醇质量分数达到 25% 时, 脂质体对药物的包封率达到最大, 且明显高于丙二醇质量分数低于 25% 的脂质体 ( $t$ -test,  $P < 0.05$ ); 当丙二醇质量分数超过 25% 时, 脂质体对青藤碱的包封率开始降低。

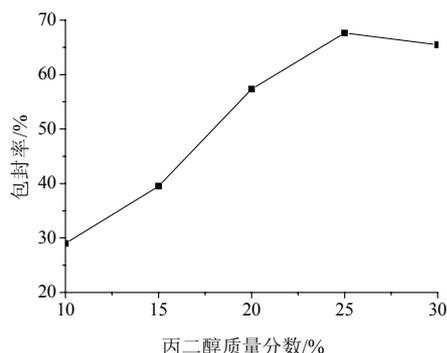


图 3 不同质量分数丙二醇对脂质体包封率的影响 (n=4)  
Fig. 3 Effects of PG at different concentrations on entrapment efficiency of liposomes (n=4)

**2.3.4 柔性脂质体的处方确定与制备** 根据上述试验结果进行综合分析, 确定盐酸青藤碱纳米柔性脂质体的制备处方: 卵磷脂、胆固醇、丙二醇、盐酸青藤碱的质量分数分别为 3%、0.02%、25%、3.5%, 其余为生理盐水。按此处方制备盐酸青藤碱纳米柔性脂质体 3 批, 4 °C 保存。

## 2.4 柔性脂质体的物理性质

**2.4.1 包封率** 所制备纳米柔性脂质体中盐酸青藤碱的包封率为 (66±2.3)%。

**2.4.2 外观形状** 将盐酸青藤碱柔性脂质体稀释液滴于洁净的云母片上, 自然晾干, 原子力显微镜 (频率 100~200 kHz) 下观察, 盐酸青藤碱纳米柔性脂质体外观为圆球型或椭圆球型立体结构, 结果见图 4。

**2.4.3 结构** 取适量脂质体稀释液样品滴于铜载网上, 用滤纸吸去多余的样品液, 晾干; 将铜载网置于 1.5% 的磷钨酸溶液中进行负染色, 用滤纸吸去多余的染色液, 自然晾干, 透射电镜 (加速电压 2 kV, 分辨率 0.2 nm) 观察, 结果见图 5。可知, 盐酸青藤碱纳米柔性脂质体内部为具有同心圆的“指纹状”多层囊泡结构。

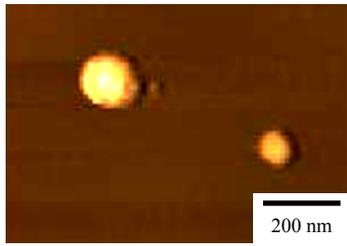


图 4 盐酸青藤碱柔性脂质体的原子力显微镜图  
Fig. 4 AFM image of SH loaded nano flexible liposomes

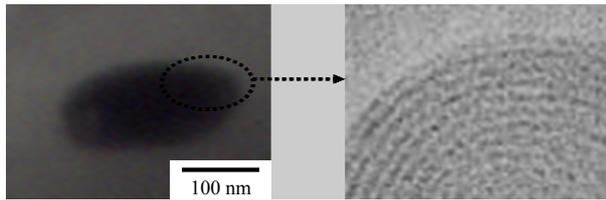


图 5 盐酸青藤碱柔性脂质体的透射电镜图  
Fig. 5 TEM images of SH loaded nano flexible liposomes

**2.4.4 表面电位与粒径** 取适量脂质体稀释液样品，注入光子相关光谱仪测定粒径与表面电位。结果表明所制备的盐酸青藤碱纳米柔性脂质体的粒径为  $(170 \pm 26)$  nm，表面电位为  $-(43 \pm 3.4)$  mV。

**2.5 盐酸青藤碱纳米柔性脂质体的体外透皮给药**

**2.5.1 体外透皮给药** 将人尸体皮肤夹于双室扩散池，角质层朝供给池，真皮层朝接收池；扩散池固定在调温恒控磁力搅拌器上，保持恒温在  $(32 \pm 0.5)$  °C；在供给池中分别加入盐酸青藤碱柔性脂质体与含药量相同的药物水溶液 15 mL 作为供给液，在接收池中加入 15 mL 双蒸水作为接收液，并以恒定的速度搅拌。每隔 3.0 h 取样 0.1 mL，并补加等量的新鲜接收液，共取 8 个样品，每个重复 3 次。样品经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜滤过，取  $20 \mu\text{L}$ ，注入液相色谱仪测定。药物累积渗透量 ( $\Delta M$ ) 随时间的变化情况见图 6。

$$\Delta M = \sum CV/A_e$$

$V$  为接收液的体积 (mL)， $C$  为接收液中药物的质量浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )， $A_e$  为扩散池的有效面积 ( $\text{cm}^2$ )

24 h 时，盐酸青藤碱纳米柔性脂质体的药物累积渗透量约为盐酸青藤碱水溶液的 3 倍，二者之间差异显著 ( $t$ -test,  $P < 0.05$ )，表明盐酸青藤碱以纳米柔性脂质体为透皮给药载体时，与药物水溶液相比，能显著促进盐酸青藤碱的透皮吸收，从而提高其透皮给药效果。

**2.5.2 皮肤的扫描电镜观察** 实验结束后，将皮肤用蒸馏水冲洗干净，置于 3%戊二醛中固定 24 h，干燥、镀金膜，再置于扫描电镜下观察，结果见图 7。

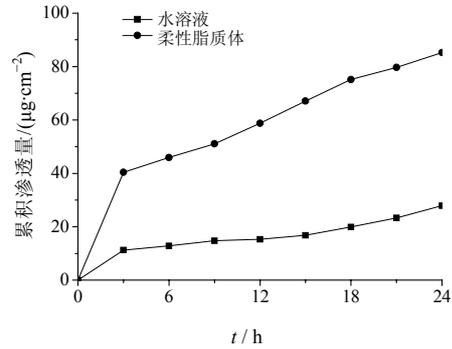
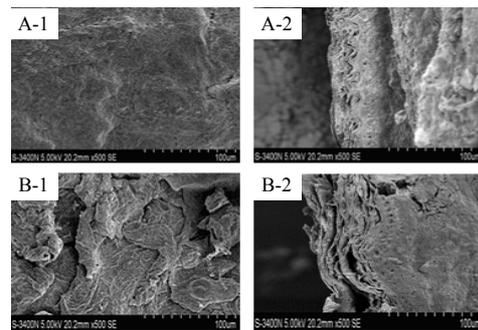


图 6 盐酸青藤碱的累积渗透量 ( $n=3$ )  
Fig. 6 Cumulative permeable amount of SH ( $n=3$ )



1-皮肤表面的 SEM 图 2-皮肤纵切面的 SEM 图  
1- SEM images of skin surface 2- SEM images of longitudinal section of skin

图 7 皮肤接触药物水溶液 (A) 和柔性脂质体 (B) 后的扫描电镜图

Fig. 7 SEM images after skin contact: water solution (A) and flexible liposomes (B)

可知，药物水溶液透皮给药后皮肤角质层细胞结合相对紧密，皮肤表面平整光滑，无明显细胞脱落。药物纳米柔性脂质体透皮给药后皮肤表面粗糙不平，角质层结构疏松紊乱；角质层细胞出现明显脱落，细胞间隙增大。

**3 讨论**

本实验制备了以丙二醇为柔软剂的盐酸青藤碱纳米柔性脂质体。发现柔性脂质体对盐酸青藤碱的包封率随着卵磷脂质量分数的增加而增加，到达一定程度后增加不再显著，其原因可能是脂质体混悬液属于热力学不稳定体系，当卵磷脂质量分数增加到一定程度时，脂质体小颗粒之间的碰撞机率增大，易发生融合与析出。

胆固醇质量分数增加，使较多胆固醇分子掺入到卵磷脂分子中，与磷脂分子间隔排列致使脂质体粒径增加而导致内水相体积增大，水溶性药物包封率增大；胆固醇也使磷脂膜表面微量黏度增加，降低磷脂膜对于水溶性药物的透过性，并减弱脂质体聚集而在

一定程度上避免脂质融合析出, 增加其稳定性<sup>[15]</sup>。

随着丙二醇质量分数增加, 药物的包封率先增加后降低。丙二醇是一个溶解范围极为广泛的双亲性共溶剂, 丙二醇分子掺入到磷脂膜材中降低了脂质体双分子层内的疏水性, 增加其亲水性, 因此可使部分亲水性药物分子进入其中而增大包封率。但当丙二醇质量分数增大到一定程度时, 则磷脂膜柔性过大可以形成粒径更小的脂质体, 在相同磷脂用量条件下小粒径脂质体使内水相减少导致包封率降低; 另外, 随着丙二醇用量增加, 可能使脂质体磷脂膜稳定性降低, 部分脂质体被破坏而导致药物泄露<sup>[16]</sup>。

本实验制备的盐酸青藤碱纳米柔性脂质体其外观为圆形或椭圆形, 内部为多层囊泡结构; 粒径为 $(170 \pm 26)$  nm, 且分布均匀, 表面电位为 $-(43 \pm 3.4)$  mV。一般而言, 当表面电位的绝对值高于30 mV时, 纳米制剂就具有较好的稳定性。而本实验制备的纳米柔性脂质体的表面电位的绝对值显著高于30 mV, 表明盐酸青藤碱纳米柔性脂质体表面存在大量的净电荷, 脂质体颗粒彼此间的静电排斥力较大, 因此, 极大地提高了纳米制剂的稳定性。

盐酸青藤碱制备成以丙二醇为柔软剂的纳米柔性脂质体, 与药物水溶液相比, 能显著提高盐酸青藤碱的透皮给药效果。其促进药物透皮吸收的机制可能是柔性脂质体扰乱了角质层的紧密排列, 使角质层结构变得疏松、无序从而提高皮肤对药物的渗透性。有研究表明柔性脂质体不仅能够促进并携带包封的水溶性药物透过角质层, 也能够促进未包封的水溶性药物进入角质层和深层皮肤<sup>[17]</sup>。

纳米柔性脂质体是一种新型透皮给药载体, 将盐酸青藤碱制备成纳米柔性脂质体透皮给药, 能够克服口服制剂的不良反应并提高其附加值。因此, 盐酸青藤碱纳米柔性脂质体具有广阔的应用前景。

#### 参考文献

- [1] 刘继红, 李卫东, 滕慧玲, 等. 青藤碱治疗类风湿性关节炎免疫作用和机制 [J]. 药学学报, 2005, 40(2): 127-131.
- [2] 刘刚, 王辉, 张先洲, 等. 青藤碱清除氧自由基和抗脂质过氧化作用 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 84-87.
- [3] 孔庆峰, 李军. 青藤碱研究新进展 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(20): 1573-1576.
- [4] 郝保华, 王彦玲, 李伟泽, 等. 青藤碱电离巴布剂电致孔透皮给药的药动学研究 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1060-1062.
- [5] 甄小龙, 刘婷, 杨文婧, 等. 青藤碱水凝胶贴剂的微针经皮给药的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 892-896.
- [6] 许海玉, 张铁军, 赵平, 等. 中药缓控释制剂的研究现状及研发思路 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 30-35.
- [7] 罗淑青, 刘晓星, 梁文权, 等. 药物经皮给药新型载体的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2006, 24(5): 257-260.
- [8] 王森, 欧水平, 朱卫丰, 等. 柔性脂质体在中药经皮给药制剂中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 30-34.
- [9] Mustafa M A E, Ossama Y A, Viviane F N, et al. Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery [J]. *Int J Pharm*, 2006, 322(1/2): 60-66.
- [10] Kim A, Lee E H, Choi S H, et al. *In vitro* and *in vivo* transfection efficiency of a novel ultradeformable cationic liposome [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(2): 305-313.
- [11] Gupta P N, Mishra V, Singh P, et al. Tetanus toxoid-loaded transfersomes for topical immunization [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(3): 295-301.
- [12] Godin B, Touitou E. Mechanism of bacitracin permeation enhancement through the skin and cellular membranes from an ethosomal carrier [J]. *J Controlled Release*, 2004, 94(2/3): 365-379.
- [13] Elsayed M M A, Abdallah O Y, Naggar V F, et al. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research [J]. *Int J Pharm*, 2007, 332(1/2): 1-16.
- [14] Elsayed M M A, Abdallah O Y, Naggar V F, et al. Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery [J]. *Int J Pharm*, 2006, 322(1/2): 60-66.
- [15] López-Pinto J M, González-Rodríguez M L, Rabasco A M. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2005, 298(1): 1-12.
- [16] Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 675-711.
- [17] Verma D D, Verma S, Blume G, et al. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 55(3): 271-277.