

水飞蓟素前体脂质体的制备和大鼠药代动力学的研究

肖衍宇, 宋赞梅, 陈志鹏, 平其能*

(中国药科大学 药剂教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 为了提高水飞蓟素的口服生物利用度, 研制水飞蓟素前体脂质体并对其理化性质进行考察; 研究水飞蓟素前体脂质体的大鼠体内生物利用度。方法 采用薄膜载体沉积法制备水飞蓟素前体脂质体, 通过研究水合后脂质体的包封率、粒径、稳定性来考察其理化性质; 将水飞蓟素前体脂质体在体外进行水合, 再给予大鼠灌胃, 用 RP-HPLC 法测定不同时间血浆中总的和游离的水飞蓟素的浓度, 通过 3P97 程序计算药代动力学参数。结果 用该法制得的前体脂质体包封率可达 90% 以上, 平均粒径为 238.8 nm, 稳定性较好; 药代动力学研究表明水飞蓟素脂质体在体内吸收较快, 生物利用度较高。结论 采用薄膜载体沉积法制备水飞蓟素前体脂质体, 制备工艺简单, 易于工业化生产; 将水飞蓟素制成前体脂质体提高了水飞蓟素的生物利用度。

关键词: 水飞蓟素; 前体脂质体; 生物利用度; 药代动力学

中图分类号: R943.4; R969.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)08 - 0758 - 06

Preparation of silymarin proliposomes and its pharmacokinetics in rats

XIAO Yan-yu, SONG Yun-mei, CHEN Zhi-peng, PING Qi-neng*

(Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Aim To study the preparation of silymarin proliposomes. To study its physicochemical properties, its pharmacokinetic characteristics and bioavailability in rats after oral administration. **Methods** Silymarin proliposomes were prepared by film-deposition on carriers. When the proliposomes were contacted with water to form liposome suspensions, the tests of physicochemical properties including encapsulation efficiency, particle size and stability of the formed liposome suspensions were determined by HPLC, laser-particle-sizer and *etc.* The concentrations of non-conjugated and overall silymarin in plasma of rats and their pharmacokinetic behaviors after oral administration were studied by RP-HPLC. The pharmacokinetic parameters were computed by software program 3P97. **Results** The encapsulation efficiency of silymarin liposomes could be more than 90%, with an average particle size of about 238.8 nm and a very good stability. The high bioavailability of silymarin proliposomes could be gotten by oral administration. **Conclusion** Compared with silymarin, silymarin proliposome is a stable and easily industrialized preparation and did enhance the gastrointestinal absorption of silymarin.

Key words: silymarin; proliposome; bioavailability; pharmacokinetics

水飞蓟素 (silymarin) 是从中药水飞蓟中提取得到的有效部位, 其中包括水飞蓟宾 (silybin)、水飞蓟宁 (silydianin)、水飞蓟亭 (silychristin) 和异水飞蓟宾 (istrosilybin), 其中最主要的活性成分是水飞蓟宾。经药理和毒理研究表明^[1], 水飞蓟素具有明显的保

肝及稳定肝细胞膜作用, 对各种毒物引起的肝脏损害有不同程度的保护和治疗作用。但由于它难溶于水, 脂溶性也差, 口服生物利用度低, 近年来, 提高水飞蓟素生物利用度的制剂研究较多^[2], 如水飞蓟素-环糊精包合物, 水飞蓟素固体分散体, 水飞蓟宾-葡甲胺盐, 水飞蓟宾-二偏琥珀酸酯钠盐和水飞蓟宾-磷脂酰胆碱复合物等, 但未见前体脂质体方面的报道。本研究将水飞蓟素制成用于口服给药的前体脂

收稿日期: 2004-11-09.

* 通讯作者 Tel: 86 - 25 - 85324872, Fax: 86 - 25 - 83301606,

E-mail: pingqn@cpu.edu.cn

质体,并以水飞蓟宾的含量为指标测定水飞蓟素前体脂质体的大鼠生物利用度和药代动力学。

材料与amp;方法

仪器 高效液相色谱仪 (SPD-10Avp 紫外检测器, LC-10AT 泵); TGL-16C 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); 涡漩混合器 XW-80A (上海医科大学仪器厂); UV-2501 紫外可见分光光度仪 (北京瑞丽分析仪器公司); Zetasizer H-3000 激光粒度测定仪 (英国 Malvern 公司); H-7000 透射电子显微镜 (日本日立公司); METTLER25 型差示扫描量热仪 (瑞士); ZRS-4 智能溶出仪 (天津大学无线电厂)。

药品与试剂 水飞蓟宾对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量 99.8%, 批号 0752-9806); 水飞蓟素原料 (批号 040113, 水飞蓟宾含量 30%, 盘锦格林恩生物资源开发有限公司); 大豆磷脂 (PC, 纯度为 82%, 上海太伟药业有限公司); 胆固醇 (广州南方化玻公司进口分装); 甘露醇 (上海虹光化工厂); 甲醇 (色谱纯, 山东禹王实业有限公司); 其余试剂均为分析醇。

动物 SD 大鼠, 体重 180 ~ 220 g, δ , 由中国药科大学动物中心提供。

水飞蓟素含量测定方法的建立 (1) 吸收波长的选择 将水飞蓟宾、水飞蓟素和空白辅料分别溶于甲醇-水 (体积比 6:4) 中, 在 200 ~ 400 nm 进行紫外扫描, 结果表明水飞蓟宾在 288 nm 有最大的吸收峰, 辅料在此处无干扰。因为水飞蓟宾是水飞蓟素中的主要活性成分, 故最后选定检测波长为 288 nm, 含量以水飞蓟宾计算。(2) 色谱条件 色谱柱为岛津 Shim-pack VP-ODS (4.6 mm \times 150 mm, 淮阴汉邦科技有限公司); 流动相为甲醇-水 (0.05 mol \cdot L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (体积比 55:45:5, 用磷酸调 pH 为 4.0), 流速为 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 288 nm, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ L。(3) 标准曲线的制备 精密称取水飞蓟宾约 5 mg 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解至刻度, 摇匀, 配制成 500 μ g \cdot mL⁻¹ 贮备液备用。精密吸取贮备液适量分别置于 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释成一定浓度的标准溶液, 取 20 μ L 进样。以浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线。

水飞蓟素前体脂质体的制备 称取处方量的大豆磷脂 1.2 g、胆固醇 0.4 g、水飞蓟素 0.4 g 溶于甲醇和乙醚的混合溶剂中, 超声分散 30 s, 制成类脂质溶液, 然后称取过 100 目筛的甘露醇粉末, 置于茄形

瓶中, 分次加入适量的类脂质溶液, 于 (37 \pm 1) $^{\circ}$ C 恒温水浴上减压蒸发至干, 将制得品置真空干燥器中, 于 4 $^{\circ}$ C 干燥过夜, 过 100 目筛, 分装于铝塑袋中, 加热封口, 即得。

水飞蓟素前体脂质体的重组 取前体脂质体 3 g, 加水 10 mL, 室温下以 50 r \cdot min⁻¹ 磁力搅拌 3 min, 即得均匀的脂质体混悬液。

水飞蓟素脂质体包封率的测定 由于水飞蓟素难溶于水, 在水中溶解度为 57 μ g \cdot mL⁻¹, 将水飞蓟素前体脂质体水合时, 未包封的水飞蓟素以沉淀析出, 过滤除去沉淀, 残留在水中的即为已包裹了水飞蓟素的脂质体。因为水飞蓟素在水中溶解度低, 可以忽略不计, 所以测定滤液中水飞蓟素的含量即可计算脂质体的包封率。

精密称取前体脂质体粉末 0.5 g 于 10 mL 量瓶中, 用流动相定容, 超声使其完全溶解, 取 20 μ L 进样, 所得峰面积代入标准曲线计算浓度 (A), 同时另取前体脂质体粉末 0.5 g 加水 10 mL, 重组后过 0.45 μ m 的微孔滤膜, 取滤液 2 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相定容, 超声使其完全溶解, 取 20 μ L 进样, 所得峰面积代入标准曲线计算浓度 (B)。按 $EE\% = 100 \times 5B/A$ 计算包封率 (EE), A 代表总的水飞蓟素含量, B 代表脂质体中水飞蓟素含量。

水飞蓟素脂质体的质量评价 (1) 脂质体粒径的测定 取脂质体混悬液适量, 稀释若干倍后, 采用马尔文激光粒度测定仪测定重组后得到的脂质体混悬液的粒径。(2) 脂质体形态的观察 将脂质体混悬液点样于铜网上, 用 2.5% 磷钨酸染色后, 用滤纸吸干染液, 然后用日立 H-7000 透射电镜观察。(3) 脂质体中药物渗漏性考察 测定方法的原理和包封率测定原理一样。将水合后的脂质体混悬液进行释放度试验, 按渗漏百分率 = $(W_0 - W_{4h}) \times 100\%$ 计算, W_0 代表 0 min 时的包封率, W_{4h} 代表 4 h 时的包封率。释放条件: 释放介质为 0.1 mol \cdot L⁻¹ 盐酸 900 mL, 搅拌方法为浆法, 温度为 37 $^{\circ}$ C, 搅拌速度为 50 r \cdot min⁻¹, 于 0 min 和 4 h 定时取样 10 mL, 同时加入同温等量介质, 滤液用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 按“水飞蓟素含量测定方法”进行测定。

水飞蓟素前体脂质体稳定性考察 以水合后脂质体的粒径和包封率为指标, 通过恒温加速试验考察水飞蓟素前体脂质体的稳定性。按市售药品包装, 将 3 批水飞蓟素前体脂质体粉末放置于铝塑袋中, 加热封口后, 于 40 $^{\circ}$ C 及相对湿度 75% 条件下, 考察 3 个月, 每个月取样。

水飞蓟素前体脂质体在大鼠体内生物利用度分析方法的建立 (1)色谱条件 色谱柱为 Shimadzu VP-ODS(4.6 mm × 150 mm, 淮阴汉邦科技有限公司);流动相为甲醇-水-0.5 mol·L⁻¹磷酸二氢钾(体积比 50:50:5,用磷酸调 pH 为 4.0),流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 288 nm,柱温 40 °C,进样量 20 μL。(2)标准溶液的配制 精密称取水飞蓟宾对照品 5 mg,置于 50 mL量瓶中,用甲醇定容制备成 100 μg·mL⁻¹的贮备液备用。精密吸取贮备液适量分别置于 10 mL量瓶中,分别用流动相稀释,配成系列标准溶液。取 20 μL进样。以浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线。(3)大鼠空白血浆的制备 大鼠于眼眶底静脉丛取血约 500 μL,置于涂有肝素的试管中,10 000 r·min⁻¹离心 5 min,分离出空白血浆,于 -20 °C冰箱中保存待测。(4)方法专属性考察 取空白大鼠血浆 100 μL,按“血浆样品处理”项下依法操作。(5)标准曲线的制备 取空白大鼠血浆 100 μL,置于 10 mL带塞试管中,加标准溶液 50 μL,按“血浆样品处理”处理后进样,以峰面积(A)对浓度(C)作图,得到回归方程。

大鼠血浆样品的处理方法 由于水飞蓟宾在血液中大部分以葡糖醛酸结合型存在,游离型含量很低,为了更准确地考察水飞蓟素前体脂质体在大鼠体内的生物利用度,本文同时测定了血液中游离的与总的水飞蓟宾(即游离型和结合型的水飞蓟宾)的含量。(1)水飞蓟宾总血浆浓度的测定 精密移取血浆样品 100 μL置于 10 mL带塞试管中,加入 1%盐酸溶液 100 μL,再加入磷酸盐缓冲液(pH 5.0) 0.5 mL和酶溶液(β-葡糖醛酸酶溶液,酶的活性相当于 90 U) 20 μL,混匀,于 37 °C水浴振荡 22 h,取出,加入碳酸钠溶液(1 mol·L⁻¹) 100 μL,硼酸盐缓冲溶液(pH 8.0) 500 μL,混匀后再加入乙醚 4 mL萃取,于 40 °C水浴下空气吹干,残渣用流动相 100 μL溶解,4 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液 20 μL进样。(2)游离水飞蓟宾血浆浓度的测定 精密移取血浆样品 100 μL置于 10 mL带塞试管中,加入碳酸钠溶液(1 mol·L⁻¹) 100 μL,硼酸盐缓冲溶液(pH 8.0) 500 μL,混匀后再加入乙醚 4 mL萃取,于 37 °C水浴下空气吹干,残渣用流动相 100 μL溶解,4 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液 20 μL进样。

给药与取样 取 6 只大鼠禁食 12 h 后,将水飞蓟素前体脂质体细粉水合后形成脂质体混悬液,以

9.1 mg·kg⁻¹(以水飞蓟宾计)灌胃,给药后按 0.17, 0.33, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 和 10 h 取血,按“血浆样品处理”后进样测定,代入标准曲线计算水飞蓟宾的血药浓度,血药浓度-时间数据经 3p97 药代动力学计算程序处理。

结果

1 标准曲线的制备

从图 1 可见,水飞蓟宾有两个同分异构体,分别为 SA 和 SB,两峰保留时间分别在 10 和 11 min 左右,SA 和 SB 两峰之间的分离度 R > 2.5。

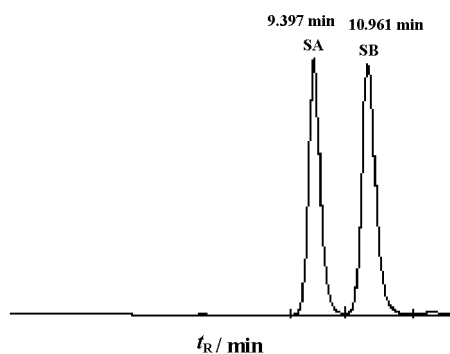


Figure 1 Chromatograms of silybin

选用近似流动相配比甲醇-水(体积比 5.5:4.5)配制水飞蓟素原料样品,色谱图见图 2,由图可见原料中水飞蓟宾的两个同分异构体与其他成分分离良好。

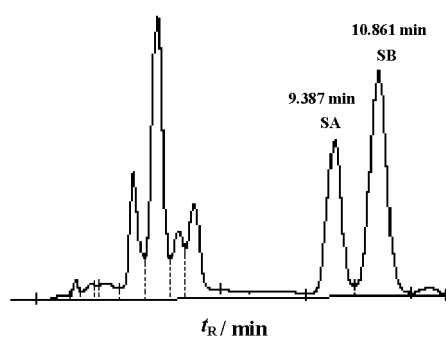


Figure 2 Chromatograms of silymarin

水飞蓟宾含量的线性回归方程为: $A = 22.464C + 0.0111$, $r = 0.9999$,线性范围 1 ~ 115 μg·mL⁻¹。高、中、低 3 个浓度的平均回收率分别为 99.73%, 99.63% 和 99.05%, 日内精密密度 RSD 分别为 0.44%, 0.09% 和 0.63%, 日间精密密度 RSD 分别为 0.66%, 0.43% 和 1.38%, 均符合要求,最低检测限为 0.5 ng·mL⁻¹。

2 不同载体和溶剂对前体脂质体制剂的影响

分别用不同的载体和溶剂制备水飞蓟素前体脂质体,并观察水飞蓟素前体脂质体的水合情况,结果发现用四氢呋喃为溶剂时,水合效果很差,一直都有不溶解的颗粒存在;用无水乙醇为溶剂时,因水飞蓟素在无水乙醇中的溶解度很小,溶解水飞蓟素所需的乙醇量很大使得制备时间很长以及成本较高;采用氯化钠、山梨醇为载体时,和甘露醇相比,在磷脂用量一定的条件下相同量的载体制备得到的产品外观很黏,不具备一定的流动性。经大量预试验,最后选用了甘露醇为载体,甲醇和乙醚的混合溶剂为制备溶剂。

3 水飞蓟素脂质体包封率的测定

经测定水飞蓟素脂质体包封率为 $(91.6 \pm 0.7)\%$ 。

4 水飞蓟素脂质体的质量评价

4.1 脂质体粒径测定和形态观察

马尔文激光粒度测定仪测定结果显示,水飞蓟素前体脂质体水合后,93.8%的脂质体粒径 < 398.6 nm,脂质体的平均粒径为 238.8 nm,多分散指数为 0.376。

在透射电镜下可以观察到,水合后的脂质体基本上是类椭圆状的单室脂质体。

4.2 脂质体中药物渗漏性考察

由释放试验结果得到,0 min 水飞蓟素前体脂质体的包封率为 90.87%,而 4 h 时的包封率为 88.35%,通过渗漏率公式结算,4 h 内水飞蓟素脂质体中水飞蓟素的渗漏率为 2.52%。由此可以推测,水飞蓟素脂质体在胃肠道中 4 h 内是稳定的,药物渗漏量很少,具有良好的稳定性。

5 水飞蓟素前体脂质体稳定性考察

3 批水飞蓟素前体脂质体进行恒温加速试验,避光密闭放置 3 个月后,外观仍疏松、均匀、饱满,加水重建后仍能得到均匀的脂质体混悬液,粒径和包

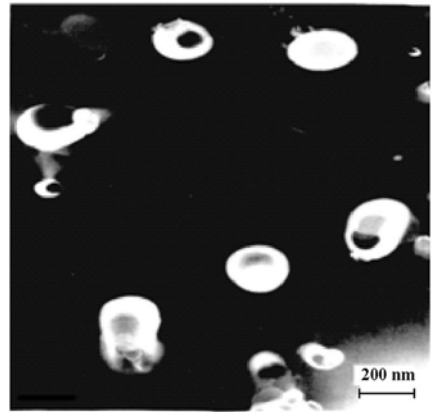


Figure 3 Transmission electron micrograph of silymarin liposomes

封率结果见表 1。由表中结果可知,40 °C 放置 3 个月脂质体的粒径、包封率基本无变化。

Table 1 Stability of silymarin proliposomes under the temperature of 40 °C ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Time / mon	Average size / nm	Entrapment efficiency / %
0	241.2	91.6 \pm 0.7
1	250.7	90.9 \pm 1.2
2	253.1	88.5 \pm 0.4
3	259.4	88.8 \pm 0.8

6 大鼠体内生物利用度分析方法的建立

6.1 方法专属性考察

在设定液相条件下,血浆中杂质不干扰样品的测定,水飞蓟宾双峰的保留时间分别为 12.3 和 13.4 min。由图 4 可见,水飞蓟宾双峰分离效果较好且出峰时间适宜。

6.2 标准曲线的制备

由试验可得,总药物浓度标准曲线为 $C = 47.253A + 13.293$, $r = 0.9896$,线性范围 0.1 ~ 2.6

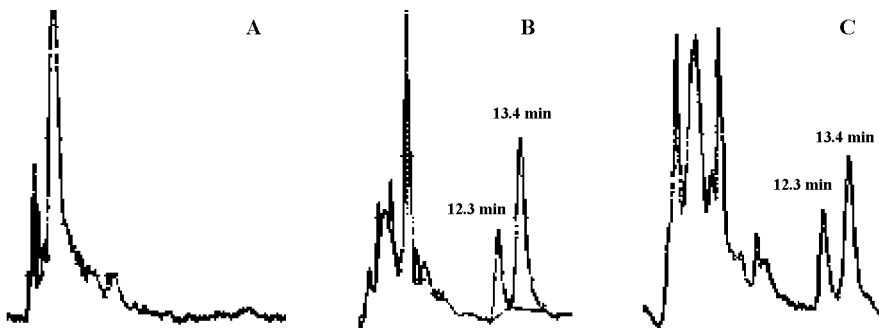


Figure 4 Typical chromatograms of silymarin. A: Blank rat plasma; B: Blank rat plasma spiked with silymarin; C: A sample after *po* administration of silymarin liposomes

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。高、中、低 3 个浓度的平均回收率分别为 82.40%, 83.49% 和 81.24%, 日内精密度 RSD 分别为 2.56%, 3.74% 和 3.12%, 日间精密度 RSD 分别为 4.07%, 4.83% 和 5.27%; 游离药物标准曲线为 $C = 48\ 286A + 9\ 946$, $r = 0.994\ 6$, 线性范围 $0.05 \sim 1.0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。高、中、低 3 个浓度的平均回收率分别为 81.24%, 80.42% 和 85.37%, 日内精密度 RSD 分别为 3.21%, 3.87% 和 3.36%, 日间精密度 RSD 分别为 5.86%, 5.79% 和 6.48%, 均符合要求, 最低检测限为 $40\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

6.3 药代动力学结果分析

大鼠灌胃给予水飞蓟素脂质体混悬液血药浓度经时过程见图 5。

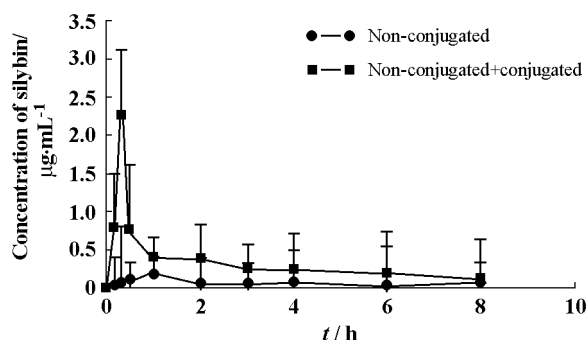


Figure 5 Mean plasma concentration-time curves of non-conjugated and total silybin in rats after po adm inistration of silymarin liposomes ($n = 6$)

6.3.1 房室模型的药代动力学参数

将大鼠灌胃给予水飞蓟素脂质体混悬液血浓数据进行 3P97 程序模拟, 得出水飞蓟素前体脂质体的体内过程呈一级吸收二室模型, 药代动力学参数见表 2。

Table 2 The main pharmacokinetic parameters of silymarin proliposomes in rats ($n = 6$)

Parameter	Non-conjugated	Total
K_{21} / h^{-1}	0.14	0.50
K_{12} / h^{-1}	0.23	0.84
$A / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.52	8.42
$T_{1/2\ \alpha} / \text{h}$	0.59	0.08
$B / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.03	0.34
$T_{1/2\ \beta} / \text{h}$	2.86	6.53
K_a / h^{-1}	2.16	70.95
K_e / h^{-1}	0.08	1.90
$T_{\text{max}} / \text{h}$	1	0.33
$C_{\text{max}} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.19	2.28
$\text{AUC} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	3.14	4.06
$\text{CL}(\text{s}) / \text{F} / \text{mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}$	0.73	0.57
$V / \text{F}(\text{c}) / \text{mg} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}$	0.68	0.30

6.3.2 非房室模型的药代动力学参数

非房室模型的药代动力学参数见表 3。

Table 3 The main pharmacokinetic parameters of silymarin proliposomes with non-model in rats ($n = 6$)

Parameter	Non-conjugated		Total	
	$T_{(0-8\ \text{h})}$	$T_{(0-\infty)}$	$T_{(0-8\ \text{h})}$	$T_{(0-\infty)}$
$\text{AUC}(\text{s}0) / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	2.08	2.85	12.43	13.21
$\text{AUMC}(\text{sl}) / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^2$	4.51	13.77	33.68	74.11
MRT / h	2.17	4.83	2.71	5.61

讨论

前体脂质体^[3] (proliposome) 是指将脂质吸附于极细的水溶性载体上, 如粉末氯化钠、山梨醇或其他聚合糖类, 以增加脂质分散的表面积, 当这种“前体脂质体”与水接触时, 脂质溶胀而载体迅速溶解, 在水相中形成脂质体混悬液。通过这种方式可以解决普通脂质体的聚集、沉降、融合、渗漏和高温灭菌等稳定性问题。前体脂质体的制备方法有多种, 例如薄膜载体沉积法^[4]、喷雾干燥法^[5,6]、冷冻干燥法^[7]、粉末床研磨法^[8]、流化床法^[9]、真空旋转法^[10]等, 本文选择采用薄膜载体沉积法制备水飞蓟素前体脂质体。

载体选择的依据是根据前体脂质体的定义, 即极细的水溶性载体, 使用前过筛到一定的粒径。载体最后的选择还是看试验的结果, 例如外观是否成粉末状, 还是很黏; 是否容易水合等。

在进行大鼠生物利用度试验时, 作者同时考察了水飞蓟素原料的药代动力学。试验结果表明给予水飞蓟素原药的混悬液时, 水飞蓟宾总血浆浓度和游离水飞蓟宾血浆浓度都在检测限以下, 无法测定, 而给予水飞蓟素脂质体时, 体内吸收很迅速, 20 min 血浆中总药物浓度就达峰值, 1 h 时血浆中游离药物也达峰值, 且总药物浓度 C_{max} 和游离药物 C_{max} 分别为 2.28 和 $0.19\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由药代动力学数据可知, 将水飞蓟素制备成脂质体改善了水飞蓟素的体内吸收情况。

本文成功的制备了稳定的、包封率较高的水飞蓟素前体脂质体, 且制备工艺简单, 易于工业生产。

References

- [1] Sun TM, Li XI. Advances in the research of pharmacology of silymarin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(3): 229 - 231.
- [2] Zhong YQ, Liu SK, Chen GS, et al. The current study about high bioavailability preparations of silymarin [J]. J

- Pharm Pract* (药学实践杂志), 2003, **21**(3): 139 - 140.
- [3] Ping QN. *Modern Pharmaceutics* (现代药剂学) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1998. 599 - 600.
- [4] Xia MS, Huang LY, Yin LL. Study on the preparation and pharmacokinetics of nimodipine proliposomes [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2002, **17**(2): 98 - 103.
- [5] Chen QI, Huang YU, Gu XQ, *et al.* A study on the preparation of proliposome by the spray drying method [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1997, **14**(3): 166 - 169.
- [6] Chu MQ, Gu HC. The study on the preparation of tanshonones proliposomes by the spray drying method [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, **37**(1): 32 - 35.
- [7] Zhai GX, Zhao Yan. Study on the proliposomal preparation of low molecular weight heparin [J]. *Acta Acad Med Shandong* (山东医科大学学报), 2001, **39**(3): 218 - 220.
- [8] Ye ZW, Liang WQ. Preparation of interferon-containing liposomes by the powder bed grinding method [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)* [浙江大学学报(医学版)], 2002, **31**(6): 433 - 436.
- [9] Yang ZJ, Hino T, Kawashima Y. Studies on the size of rehydrated new liposome from scutellaria proliposome [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1993, **24**(3): 161 - 164.
- [10] Wei NN, Lu B. Preparation, morphology and *in vitro* release of chitosan coated liposomes of fluorouracil for colon targeting [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2003, **38**(1): 53 - 56.