

葡萄糖修饰脑靶向紫杉醇脂质体包封率测定方法的比较

聂华, 赵莹, 叶小玲, 丘明建, 廖勇涛, 何志龙, 张声源*

(嘉应学院医学院, 广东梅州 514031)

[摘要] **目的:**建立葡萄糖修饰脑靶向紫杉醇脂质体的包封率测定方法,为该制剂的质量控制提供参考。**方法:**采用薄膜分散法制备脂质体。采用 RP-HPLC 测定紫杉醇的含量,流动相甲醇-水(70:30),检测波长 228 nm,流速 0.8 mL·min⁻¹。利用 RP-HPLC 测定胆固醇的含量,流动相甲醇,检测波长 210 nm,流速 1 mL·min⁻¹。采用凝胶柱色谱法、鱼精蛋白沉淀法、滤膜法、透析法分离脂质体与游离药物,比较 4 种方法测定包封率的可行性。**结果:**紫杉醇与胆固醇含量测定方法的专属性、精密性、稳定性和回收率试验均符合测定要求,线性范围分别为 0.4~100,1~500 mg·L⁻¹。4 种方法紫杉醇与脂质体回收率均介于 95%~105%,满足脂质体包封率测定的要求;包封率分别为 74.68%,92.91%,95.14%,95.08%。**结论:**鱼精蛋白沉淀法操作简单、快捷,几乎不受脂质体粒径的影响,适用于紫杉醇脂质体包封率的测定。

[关键词] 脂质体;包封率;紫杉醇;凝胶柱层析法;鱼精蛋白沉淀法;滤膜法;透析法

[中图分类号] R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0015-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230015

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0924.036.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:24

Comparison of Determination for Entrapment Efficiency of Paclitaxel-loaded Brain Targeting Liposomes

NIE Hua, ZHAO Ying, YE Xiao-ling, QIU Ming-jian, LIAO Yong-tao, HE Zhi-long, ZHANG Sheng-yuan*

(Medical College of Jiaying University, Meizhou 514031, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of entrapment efficiency of glucose-modified paclitaxel-loaded brain targeting liposomes. **Method:** The liposomes were prepared by film dispersion method. The content of paclitaxel was detected by RP-HPLC with mobile phase of methanol-water (70:30), detection wavelength at 228 nm and flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The content of cholesterol was determined by RP-HPLC with mobile phase of methanol, detection wavelength at 210 nm and flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The separation of free paclitaxel and liposomes was performed with gel column chromatography, protamine precipitation, filter membrane method and dialysis method to compare their feasibility for determination of entrapment efficiency. **Result:** The specificity, RSD of precision, stability and recovery test of both chromatographic methods for paclitaxel and cholesterol all met the demand of determination. Linear ranges of paclitaxel and cholesterol were 0.4-100, 1-500 mg·L⁻¹, respectively. Recoveries of paclitaxel and liposomes from four methods were all 95%-105%, which met the requirement of determination of entrapment efficiency. Entrapment efficiencies in gel column chromatography, protamine precipitation, filter membrane method and dialysis method were 74.68%, 92.91%, 95.14% and 95.08%. **Conclusion:** Protamine precipitation method is

[收稿日期] 20160122(011)

[基金项目] 广东省医学科研基金项目(A2015629);广东省省级科技计划项目(2014A020221061);广东省医学科研基金项目(A2015354)

[第一作者] 聂华,博士,讲师,从事抗肿瘤药物及其靶向给药系统的研究,Tel:14715048656,E-mail:niehua007@163.com

[通讯作者] *张声源,博士,讲师,从事中药及天然药物活性成分研究,Tel:13750543826,E-mail:medullzhang@yeah.net

hardly affected by particle size of the liposomes, it is suitable for determination of entrapment efficiency of paclitaxel liposomes.

[Key words] liposomes; entrapment efficiency; paclitaxel; gel column chromatography; protamine precipitation method; filter membrane method; dialysis method

脑胶质瘤是由于大脑和脊髓胶质细胞癌变所产生的、最常见的原发性颅脑肿瘤,这类患者的生存时间一般 <1 年^[1-2]。目前,临床用于治疗脑胶质瘤的药物极其有限且疗效不理想,故该疾病的新药开发吸引了国内外研究人员的广泛关注,但由于药物难于跨越血脑屏障(blood brain barrier, BBB)进入大脑,新药开发常以失败告终^[3]。利用葡萄糖转运蛋白(GLUT)的介导作用,将葡萄糖配基偶联于脂质体表面,可实现药物跨 BBB 转运,使药物浓集于脑部肿瘤,同时减少药物在其他脏器的分布,达到提高药物治疗指数、减少毒副作用的目的^[4]。前期采用酶法,在非水相中合成胆固醇-葡萄糖缀合物(CHS-SE-GLU),将 CHS-SE-GLU 修饰于脂质体表面,制备出葡萄糖化脑靶向载紫杉醇脂质体(GLU-LP)。通过小鼠体内组织分布研究发现,相对于普通脂质体,经 CHS-SE-GLU 修饰的脂质体能显著增加入脑药物的积蓄量。

GLU-LP 制备过程中,包封率是评价脂质体质量的重要指标,也是其发挥疗效的关键。脂质体常见的包封率测定方法有凝胶柱色谱法^[5]、鱼精蛋白沉淀法^[6]、滤膜法^[7]、透析法^[8]等,不同测定方法有各自的适用范围,应根据药物及脂质体的理化性质进行选择。本实验利用薄膜分散法制备脑靶向 GLU-LP,采用凝胶柱色谱法、鱼精蛋白沉淀法、滤膜法、透析法测定其包封率,并对测定方法进行方法学考察,以寻找最适合的 GLU-LP 包封率测定方法,为该制剂的制备工艺研究提供可靠的评价指标。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司), B15 型高压均质机(加拿大 Avestin 公司), Zetasizer Nano ZS90 粒度测定仪(英国马尔文仪器有限公司), Scientz-II D 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司), BS110S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。胆固醇(CHS), 氢化大豆磷脂(HSPC)和二硬脂酰磷脂酰甘油钠(DSPG-Na)均为注射级,均购自上海艾维特有限公司;胆固醇-葡萄糖缀合物(CHS-SE-GLU, 自制,质量分数 > 95%), 紫杉醇(PTX, 大连美仑生物技术有限公司, 质量分数 > 99%), 葡聚糖凝胶 G-50 和鱼精蛋白

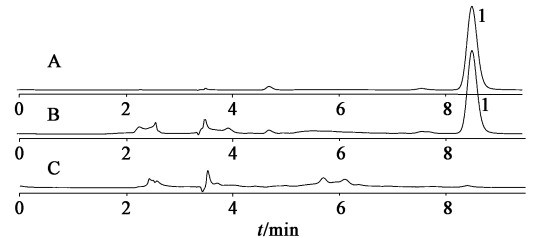
(美国 Sigma-Aldrich 公司), MD34 透析袋(截留相对分子质量 $0.8 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^4$, 上海百赛生物技术有限公司), 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备^[9] 按处方量称取 HSPC, CHS, CHS-SE-GLU, DSPG-Na, PTX 等材料溶于适量无水三氯甲烷中, 真空旋转蒸发除去有机溶剂, 得均匀脂膜, 置真空干燥器内干燥过夜。加入一定体积的水溶液, 真空 50 °C 下水化 30 min, 探头超声 5 min, 高压均质(60, 180 MPa 各 3 次), 得葡萄糖化脑靶向载紫杉醇脂质体(GLU-LP), 于 4 °C 保存。

2.2 PTX 的含量测定

2.2.1 色谱条件 XBridge Peptide BEH C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 甲醇-水(70:30), 检测波长 228 nm, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 柱温 35 °C。理论板数按 PTX 峰计算 > 3 000。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 空白脂质体; 1. 紫杉醇

图 1 葡萄糖化脑靶向载紫杉醇脂质体中紫杉醇的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of paclitaxel in glucose-modified paclitaxel-loaded brain targeting liposomes

2.2.2 溶液的制备 精密称定 PTX 对照品适量, 加乙醇定容得 100 mg·L⁻¹ 对照品溶液。取 GLU-LP 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加乙醇破乳并定容至透明澄清, 得供试品溶液。取空白脂质体 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加乙醇破乳并定容至透明澄清, 得空白样品溶液。

2.2.3 标准曲线的制备 精密称取 PTX 适量, 加乙醇配制成 1.0 g·L⁻¹ 储备液。精密移取该储备液适量, 配制成 0.4, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 mg·L⁻¹ 系列溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y =$

23 868X + 1 257.4 ($R^2 = 0.9999$), 线性范围 0.4 ~ 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 精密度试验 取 PTX 对照品溶液适量, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算 PTX 峰面积的 RSD 1.1%, 表明仪器精密度良好。

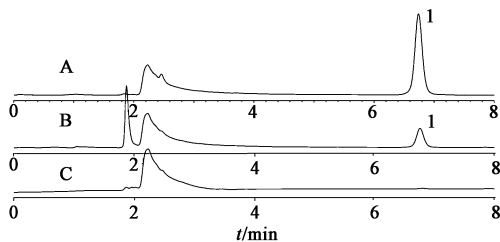
2.2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算 PTX 峰面积的 RSD 2.3%, 表明供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

2.2.6 重复性试验 取同一批样品, 按 2.2.2 项下方法制备 6 份 GLU-LP 供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算 PTX 峰面积的 RSD 0.7%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 回收率试验 分别精密移取 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PTX 对照品溶液 0.25, 0.50, 0.75 mL, 加至 0.5 mL 空白脂质体溶液中, 用乙醇破乳并定容至 10 mL, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算回收率 98.60% ~ 99.20%, RSD 均 < 2.0%。

2.3 CHS 的含量测定

2.3.1 色谱条件 XBridge Peptide BEH C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm), 流动相甲醇, 检测波长 210 nm, 流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 10 μL , 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数按 CHS 峰计 > 3 000。见图 2。



A. 对照品; B. 供试品; C. 空白脂质体; 1. 胆固醇

图 2 葡萄糖化脑靶向载紫杉醇脂质体中胆固醇的 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of cholesterol in glucose-modified paclitaxel-loaded brain targeting liposomes

2.3.2 溶液的制备 精密称定 CHS 对照品适量, 用乙醇定容至 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 得对照品溶液。供试品溶液及空白样品溶液的制备同 2.2.2 项下方法。

2.3.3 标准曲线的制备 精密称取 CHS 适量, 用乙醇配制成 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液。精密移取该储备液适量, 配制成 1, 5, 25, 50, 100, 250, 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 系列对照品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 2310.9X + 772.52$ ($R^2 = 1.00$), 线性范围 1 ~ 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3.4 精密度试验 取 CHS 对照品溶液, 按 2.3.1

项下色谱条件连续进样 6 次, 计算 CHS 峰面积的 RSD 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算 CHS 峰面积的 RSD 1.9%, 表明供试品溶液在 24 h 保持稳定。

2.3.6 重复性试验 取同一批样品, 按 2.3.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算 CHS 峰面积的 RSD 1.1%, 表明该方法重复性良好。

2.3.7 回收率试验 分别精密移取 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CHS 对照品溶液 0.25, 0.5, 0.75 mL, 分别加入空白脂质体和 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PTX 对照品溶液各 0.5 mL, 用乙醇破乳并定容至 10 mL, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算 CHS 回收率 98.53% ~ 100.80%, RSD 均 < 2.0%。

2.4 包封率的测定

2.4.1 凝胶柱色谱法^[10] 取 GLU-LP 适量, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 精密量取滤液 0.5 mL 加至用空白脂质体预饱和的葡聚糖凝胶 G-50 柱 (内径 1.2 cm, 柱高 10 cm), 加水 10 mL 洗脱, 加 40% 乙醇洗脱, 按每管 2 mL 收集样品; 另取适量 PTX 溶于 10% 乙醇作为游离 PTX 溶液, 按上述相同方法上柱分离。样品真空旋转蒸发干, 加乙醇溶解并定容, 进样分析, 见图 3。结果 2 ~ 5 管为脂质体包封的 PTX, 6 ~ 10 管为游离 PTX, 说明游离 PTX 与 GLU-LP 可通过葡聚糖凝胶 G-50 柱达到基本分离。

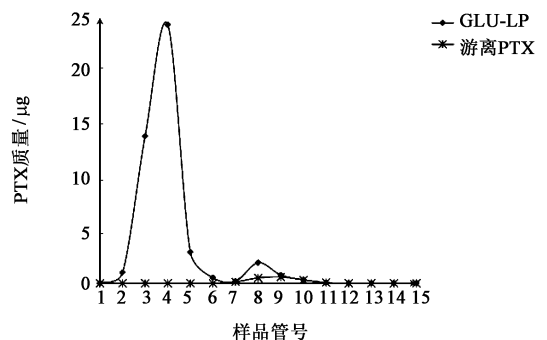


图 3 葡萄糖化脑靶向载紫杉醇脂质体的分离曲线

Fig. 3 Separation curve of glucose-modified paclitaxel-loaded brain targeting liposomes

收集 2 ~ 5 管和 6 ~ 10 管洗脱液, 分别合并后旋转蒸发至干, 加乙醇定容至 5 mL, 制得样品 S_1 与 S_3 , 分别进样分析, 记为 C_1 (脂质体包封的 PTX 质量浓度) 和 C_3 (游离 PTX 质量浓度); 另取 GLU-LP 0.5 mL, 加乙醇定容至 5 mL, 制得样品 S_2 , 进样分析, 记

为 C_2 (脂质体溶液中 PTX 总质量浓度), 按 $C_1/C_2 \times 100\%$ 计算包封率, 按 $(C_1 + C_3)/C_2 \times 100\%$ 计算 PTX 回收率。

脂质体回收率参照程晓波等^[11]报道的方法并作适当修改。将样品 S_1 和 S_2 , 按 2.3.1 项下色谱条件测定。将脂质体溶液 (S_2) 中胆固醇的总质量与分离后脂质体溶液 (S_1) 中胆固醇质量分别记为 m_2 与 m_1 , 按 $m_1/m_2 \times 100\%$ 计算脂质体回收率。

2.4.2 鱼精蛋白沉淀法^[6] 取 GLU-LP 溶液 0.1 mL 于锥形离心管中, 加水稀释至 1.1 mL, 混匀, 于 $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。吸取上清液 1 mL, 加入鱼精蛋白 1 mg, 混匀, $1\ \text{万}\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 移去上清液, 沉淀加水清洗 2 次, 将上清液与清洗液合并, 旋转蒸发至干, 加乙醇溶解并定容至 1 mL, 得样品, 进样分析; 最后所得脂质体沉淀加乙醇溶解并定容至 1 mL, 得样品, 进样分析; 另取 GLU-LP 溶液 0.1 mL, 加乙醇破乳并定容至 1 mL, 得样品, 进样分析, 按 2.4.1 项下方法计算包封率、脂质体回收率和 PTX 回收率。

2.4.3 滤膜法^[7] 称取处方量磷脂和 PTX, 加水 5 mL, 探头超声, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 测定 PTX 溶解度, 记为 C_{PTX} 。取 GLU-LP 溶液, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 精密吸取续滤液 0.1 mL, 加乙醇破乳并定容至 1 mL, 得样品 S_4 , 进样测定, 记为 C_4 ; 另精密吸取 GLU-LP 溶液 0.1 mL, 加乙醇破乳并定容至 1 mL, 得样品 S_5 , 进样测定, 记为 C_5 , 按 $[(C_4 \times 10 - C_{\text{PTX}})/(C_5 \times 10)] \times 100\%$ 计算包封率和回收率, 按 $C_4/C_5 \times 100\%$ 计算 PTX 回收率。按 2.4.1 项下方法计算脂质体回收率。

2.4.4 透析法^[8] 精密移取 GLU-LP 0.5 mL 于透析袋内, 两端用透析夹夹紧后, 置于 150 mL 的 0.5% 聚山梨酯-80 透析液中, 室温下磁力搅拌, 透析 12 h, 完全转移透析袋内溶液于 5 mL 量瓶中, 加乙醇定容, 得样品, 进样分析。另取 GLU-LP 0.5 mL 于 5 mL 量瓶, 加乙醇定容并破乳至澄清透明, 得样品, 进样分析。将透析液旋转蒸发至干, 加乙醇溶解并定容至 5 mL, 得样品, 进样分析。按 2.4.1 项下方法计算包封率、脂质体回收率和 PTX 回收率。

2.4.5 样品测定 取制备好的 GLU-LP 样品溶液, 按上述 4 种方法测定包封率和回收率, 结果见表 1。

3 讨论

药物和脂质体回收率是评价包封率测定方法可信度的重要指标。现有文献多采用浊度法测定脂质体的回收率^[12-14], 但脂质体的粒径大小及其分布会

表 1 葡萄糖修饰靶向紫杉醇脂质体的包封率测定 ($n=4$)

Table 1 Entrapment efficiencies of glucose-modified paclitaxel-loaded brain targeting liposomes with different methods ($n=4$) %

测定方法	PTX 包封率	RSD	PTX 回收率	RSD	CHS 回收率	RSD
凝胶柱层析	74.68	2.9	97.49	2.6	97.23	3.0
鱼精蛋白沉淀	92.91	2.0	96.57	1.8	97.54	4.0
滤膜	95.14	0.2	97.01	0.2	97.57	2.9
透析	95.08	2.3	101.46	2.6	98.10	1.9

影响测量结果的准确性, 因此不能真实地反映脂质体的回收率。CHS 是脂质体膜材的重要组成部分, 分子中的羟基与磷脂头基结合指向亲水区, 甾醇环则与磷脂 2 条疏水长链紧密镶嵌, 因而能在脂质体中稳定存在。通过测定 CHS 的质量浓度就能准确反映脂质体浓度, 根据分离前后 CHS 浓度变化就能准确评价脂质体的回收率^[11]。本文采用 4 种方法测定 PTX 与脂质体回收率, 均介于 95% ~ 105%, 满足脂质体包封率测定的要求。

凝胶柱色谱法是根据脂质体与游离药物分子质量和粒径大小的差异进行分离, 脂质体粒径较大先被洗脱, 游离的药物粒径较小后被洗脱, 从而达到分离的目的。PTX 由于在水中的溶解度很小, 非常容易发生粒子团聚从而析出结晶^[15]。在利用凝胶柱分离游离药物时, 发现 PTX 结晶粒径较大, 不被凝胶柱保留, 几乎与脂质体同时出凝胶柱, 影响了测量结果的准确性。故首先采用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜除去未包封于脂质体内的 PTX 结晶, 然后上柱分离。由表 1 可知, 凝胶柱色谱法包封率测得值 (74.68%) 远低于其他 3 种方法的测量值。研究报告凝胶柱分离所用时间较长, 对样品的稀释程度大, 可能会造成脂质体内药物渗漏, 推测样品在洗脱时, 由于脂质体体系被剧烈稀释, 造成脂质体不稳定, 使脂质体双层膜中的 PTX 释放出来并吸附于凝胶柱上, 造成测量结果偏低^[16]。

鱼精蛋白沉淀法是利用鱼精蛋白中大量带正电荷精氨酸与带负电荷或中性的脂质体产生絮凝作用, 再通过离心将脂质体和游离药物分离的方法。本文制备的脂质体 Zeta 电位约 $-30\ \text{mV}$, 可被鱼精蛋白所吸附而凝聚成大颗粒沉淀物。考虑到 PTX 结晶可能在离心时与脂质体同时沉淀, 故首先采用低速离心法移去 PTX 结晶。通过比较低速离心前后上清液中 CHS 含量变化 ($<1\%$), 可知脂质体在低转速时不会发生沉淀。为了验证测定方法的准确性, 取一定量 PTX, 加入空白脂质体, 按 2.4.2 项下

方法处理,最后对脂质体沉淀进行测量,结果在色谱图上几乎得不到 PTX 色谱峰。该结果表明 PTX 结晶已被低速离心去除,而且鱼精蛋白不会与游离 PTX 发生聚集沉淀,因而该方法测定的是脂质体内部 PTX 的含量,测定结果相对准确。

滤膜法是利用 PTX 在脂质体体系中存在的 3 种形式(游离态、结晶态和包封态)来加以分离。验证试验发现,往脂质体溶液中加入处方量 PTX,探头超声、过膜,取续滤液破乳测定,发现 PTX 含量并未明显增加(加样回收率 < 2%),而 CHS 含量也未明显减少(透过率 > 97%),说明结晶态 PTX 粒径较大,可被 0.22 μm 微孔滤膜截留,脂质体和游离 PTX 粒径 > 150 nm,可透过微孔滤膜。一定条件下,游离态 PTX 在含磷脂的水合体系中饱和浓度为定值,可通过测量求得。该方法需脂质体粒径 < 150 nm,而且微孔滤膜孔径要求较精密,否则易造成脂质体的吸附而导致测量结果的偏差。

透析法利用了小分子物质在溶液中可通过半透膜,而脂质体不能通过半透膜的性质。由于 PTX 在水中溶解度很小,故透析介质采用 0.5% 聚山梨酯-80 水溶液,以达到增溶的目的。通过不同时间点取透析介质监测 PTX 的含量变化,发现 12 h 左右透析袋内外游离药物的浓度基本达到平衡,与文献报道的结果基本一致^[8]。继续透析至 24 h,包封率下降至约 70%,说明长时间透析易造成脂质体不稳定,导致测量结果的偏差。

上述 4 种包封率测定方法是利用脂质体与游离药物粒径大小差异而进行分离的。凝胶柱色谱法由于稀释效应造成 PTX 脂质体泄漏,而且脂溶性游离 PTX 不易从葡聚糖凝胶柱上洗脱下来,故该方法不适用于脂溶性药物的分离^[17];滤膜法受脂质体粒径影响较大,需粒径小于微孔滤膜最小截留范围;透析法耗时较长,而且长时间透析易造成脂质体中药物泄漏;相对其他 3 种方法,鱼精蛋白沉淀法操作简单快捷、重复性好,几乎不受脂质体粒径影响,适合负电荷或中性脂溶性药物脂质体包封率的测定。本文研究结果将用于指导 GLU-LP 制备工艺、稳定性及药物释放动力学等后续工作,可为理化性质类似的药物脂质体的包封率测定提供一定参考。

[参考文献]

[1] Ying X, Wen H, Lu W, et al. Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals[J]. J Control Release, 2010,

141(2):183-192.

[2] Kieran M W, Walker D, Frappaz D, et al. Brain tumors: from childhood through adolescence into adulthood[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(32):4783-4789.

[3] Mittal S, Pradhan S, Srivastava T. Recent advances in targeted therapy for glioblastoma [J]. Expert Rev Neurother, 2015, 15(8):935-946.

[4] 李海姣,樊维,李贤坤,等. 靶向脂质体配体葡萄糖-胆甾偶联物的设计与合成[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(3):251-253.

[5] 高晓黎,季兴梅. 葡聚糖凝胶柱色谱法测定脂质体包封率的条件筛选[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(7):515-517.

[6] Shieh M, Chu I, Lee C, et al. Liposomal delivery system for taxol[J]. J Ferment Bioeng, 1997, 83(1):87-90.

[7] 柯学,王长江,严菲. 滤膜法测定多西紫杉醇脂质体的包封率[J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(4):314-316.

[8] 王占一,戴博,王玉海,等. 石榴皮总多酚脂质体制备工艺参数的统计学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5):33-37.

[9] Nie H, Zheng P J, Luo L H, et al. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of novel galactosyl ligands for selective targeting of liposomes to the asialoglycoprotein receptor [J]. Biocatal Biotransfor, 2015, 33(2):130-139.

[10] 鲁会侠,冯锁民. 紫杉醇脂质体药物包封率的测定[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(10):778-780.

[11] 程晓波,王春玲,苏钰清,等. 浊度法与膜材测定法在评价脂质体柱回收率上的对比研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(2):92-99, 153.

[12] 王娜,邓英杰,王敏,等. 洛莫司汀脂质体包封率的测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(6):447-450.

[13] 赵菊香,程怡,吴琼,等. 苦参素空间稳定脂质体的包封率测定和体外释放度考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3):4-7.

[14] 秦晶,陈大为,乔明曦,等. 微柱离心法测定阿魏酸脂质体的包封率[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(14):1116-1117.

[15] 许伯慧,李晓霞,孟璐,等. 齐墩果酸脂质体包封率的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23):86-90.

[16] 李红茹,李淑芬. 脂质体中药物包封率的测定方法[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11):1844-1848.

[17] 孙维彤,黄桂华,叶杰胜,等. 鱼精蛋白凝聚法测定脂质体和纳米脂质体包封率[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(22):1716-1720.

[责任编辑 刘德文]