

硫酸铵梯度法制备莫西沙星脂质体的工艺研究

吴国友^{1,2}, 张 珺^{2,3}, 李艳红^{2,3}, 邸 静^{2,3}, 杨小凤², 阎雪莹³, 王向涛^{2*}

1. 苏州东吴中西医结合医院 药剂科, 江苏 苏州 215000

2. 北京协和医学院药用植物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

3. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 制备具有较高包封率和载药量且体外放置稳定的莫西沙星脂质体。方法 采用硫酸铵梯度法制备包载莫西沙星的脂质体, 以粒径及其分布和包封率、载药量为指标对方剂和工艺进行优化。结果 最佳制备条件为: 空白脂质体中硫酸铵质量浓度 70 mg/mL、磷脂质量浓度 50 mg/mL、脂质体粒径 120 nm 左右、透析时间 5 h、载药时药脂比 2:3、孵育温度 40 °C、孵育时间 30 min。制备得到的莫西沙星脂质体粒径为 (143.00±3.98) nm, 包封率为 (74.56±3.21)%, 载药量为 (26.39±1.88)%。结论 硫酸铵梯度法制备的莫西沙星脂质体包封率较高, 粒径均一, 室温放置稳定性良好。

关键词: 莫西沙星脂质体; 包封率; 载药量; 硫酸铵梯度法

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)06-0855-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.06.010

Preparation of moxifloxacin liposomes by ammonium sulfate gradient method

WU Guo-you^{1,2}, ZHANG Jun^{2,3}, LI Yan-hong^{2,3}, DI Jing^{2,3}, YANG Xiao-feng², YAN Xue-ying³, WANG Xiang-tao²

1. Department of Pharmacy, Suzhou Dongwu Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine, Suzhou 215000, China

2. The Key Laboratory for Chinese Herbal Medicine Material Base and Resource Utilization, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To prepare the moxifloxacin liposomes with high entrapment efficiency, drug loading capacity, and storage stability. **Methods** Ammonium sulfate gradient method was used to prepare moxifloxacin liposomes; the formulation and preparation process was optimized using the particle diameter, size distribution, entrapment efficiency, and drug loading capacity of the resultant liposomes as the evaluating indicators. **Results** The optimal preparation conditions included 70 mg/mL ammonium sulfate, 50 mg/mL HSPC, dialysis time of 5 h, and 120 nm in diameter for the resultant blank liposomes; the drug-lipid ratio was 2:3, and the incubation temperature was at 40 °C for 30 min for drug-loading. The obtained moxifloxacin liposomes were (143.00 ± 3.98) nm in diameter, achieving high entrapment efficiency of (74.56 ± 3.21)% and drug loading capacity of (26.39 ± 1.88)%. **Conclusion** The moxifloxacin liposomes prepared by ammonium sulfate gradient method are with high entrapment efficiency and drug loading, capacity and are stable at room temperature.

Key words: moxifloxacin liposomes; entrapment efficiency; drug loading capacity; ammonium sulfate gradient method

莫西沙星是 20 世纪 90 年代末由德国拜耳公司合成上市的第 4 代氟喹诺酮类抗菌素药物。莫西沙星以其抗菌谱广、抗菌力强、体内分布广、与其他抗菌药物无交叉耐药性、几乎无光敏反应等优点自上市以来得到临床广泛应用^[1], 是第 4 代氟喹诺酮类抗菌素药物中对结核菌最有效的一种, 对 95 种株

肺炎链球菌的敏感度为 95.78%^[2]。莫西沙星早期灭菌活性高, 防突变浓度低, 耐药选择指数低, 组织穿透性好, 在呼吸道黏膜及肺组织中易蓄积, 这些特点使其成为新一代抗结核药物^[3]。至今已上市的莫西沙星制剂为拜耳公司的盐酸莫西沙星注射液和口服片剂。然而莫西沙星在人体半衰期短, 药物体

收稿日期: 2013-07-30

基金项目: 国家重大科技专项课题 (2012ZX10003009-001-002)

作者简介: 吴国友, 男, 主管中药师。Tel: 15950090419 E-mail: lyswgy@sina.com

*通信作者 王向涛, 男, 研究员, 主要从事纳米及缓控释给药系统研究。Tel: (010)57833266 E-mail: xtaowang@163.com

内分布不具选择性,且用药量大,易产生毒副反应;莫西沙星作为抗结核药,在临床治疗上存在治疗周期长、病人顺应性低等问题。故能在肺部滞留并在较长时间内缓慢释放药物的剂型将成为肺结核治疗的新方向。为此首先需要制备出具有一定载药量能较长时间内缓慢释放药物的微米或纳米大小的载药微粒。脂质体作为一种广泛使用的纳米给药系统具有优良的生物相容性、良好的缓释作用和一定的肺部靶向性,并已能够工业化生产^[4]。本实验采用硫酸铵梯度法制备莫西沙星脂质体,并对制备参数进行了考察。

1 材料

1.1 试药与仪器

莫西沙星原料药(武汉远程共创科技有限公司,质量分数 $\geq 98\%$,批号 121215,规格 100 g);莫西沙星对照品(德国拜耳公司,质量分数 $\geq 98\%$,批号 C064Z211,规格 1 g);注射用氢化卵磷脂(HSPC,上海东尚实业有限公司,批号 256259-1);胆固醇(北京化学试剂公司,批号 971103);Brij-78(Sigma 公司);高效液相色谱所用试剂为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

Ultimate 3000 Series 高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司);Malvern Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度仪、Zetasizer Nano—ZS 动态光散射仪(英国 Malvern 公司);截留相对分子质量为 3 500 的透析袋(泽奥生物技术有限公司)。SymmetryShield™ RP18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);旋转蒸发器(上海振洁实验设备有限公司)。

2 方法与结果

2.1 包封率的测定

2.1.1 莫西沙星脂质体与游离药物的分离 以 Sephadex-G50 柱(25 cm \times 15 mm)分离脂质体中未包封的游离药物和载药脂质体,上样量 0.2 mL,以 160 mmol/L NaCl 溶液为洗脱液,体积流量 1 mL/min。收集洗脱液,每份 2 mL,共 40 份。将洗脱液分别过微孔滤膜后 HPLC 法测定莫西沙星的质量浓度^[5]。以洗脱体积为横坐标,峰面积为纵坐标绘制流出曲线,见图 1。结果表明莫西沙星脂质体通过凝胶柱后,脂质体和莫西沙星游离药物完全分离。

2.1.2 加样回收率的测定 配制低、中、高 3 个不同质量浓度的莫西沙星溶液,分别与空白脂质体混合,移取 0.2 mL 上柱,按照洗脱曲线收集游离莫西

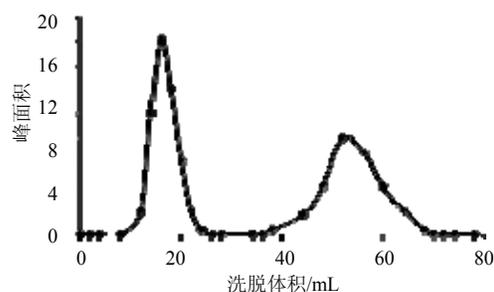


图 1 莫西沙星脂质体洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of moxifloxacin liposomes

沙星,进行 HPLC 法测定,计算凝胶柱的加样回收率。结果低、中、高 3 个加入量的加样回收率分别为(98.32 \pm 0.78)%、(99.13 \pm 0.69)%、(99.07 \pm 0.69)%。

2.1.3 脂质体包封率的计算 精密称取莫西沙星脂质体 0.2 mL,上样到葡聚糖凝胶柱,以 160 mmol NaCl 溶液洗脱。收集游离药物部分 40 mL,冻干,残渣用流动相溶解定容至 5 mL,微孔滤膜滤过后进样测定,计算游离药物量。另取 0.2 mL 莫西沙星脂质体溶液,加入适量乙醇充分破坏,HPLC 测定总莫西沙星的质量浓度,计算脂质体的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (1 - m_1/m_2) \times 100\%$$

$$\text{载药量} = (m_2 - m_1) / (m_3 - m_1) \times 100\%$$

m_1 为游离的莫西沙星的药物质量, m_2 为分离前脂质体中莫西沙星总药量, m_3 为纳米粒总质量

2.2 脂质体制备方法的选择

根据前期实验结果,固定 HSPC、胆固醇和 Brij-78 质量比为 20:4:1,药脂比为 1:4,分别采用乙醇注入法、薄膜分散法、逆向蒸发法、硫酸铵梯度法 4 种方法制备莫西沙星脂质体。

(1) 乙醇注入法:脂质材料的乙醇溶液通过注射针快速注入莫西沙星水溶液中,40 $^{\circ}$ C 条件下 200 r/min 搅拌直至乙醇全部挥去,即得。

(2) 薄膜分散法:脂质材料溶于三氯甲烷,55 $^{\circ}$ C 水浴旋转蒸发形成薄膜,65 $^{\circ}$ C 条件下以适量莫西沙星水溶液水化,超声处理,即得。

(3) 逆相蒸发法:脂质材料用二氯甲烷-异丙醚(1:1)溶解,按油相、水相体积比 6:1 加入莫西沙星水溶液,磁力搅拌待形成稳定 W/O 型剂,减压旋转蒸发除去有机溶剂呈凝胶态,加适量水相于 55 $^{\circ}$ C 继续减压旋转得脂质体悬液,室温超声 1 min

匀化, 即得。

(4) 硫酸铵梯度法: 脂质材料溶于三氯甲烷, 薄膜分散法备脂质薄膜, 530 mmol/L 硫酸铵水化, 水化液经过高压均质, 制得空白脂质体, 以适量 160 mmol/L NaCl 室温下透析, 1 h/次, 共 3 次, 40 °C 条件下加入一定量莫西沙星孵育载药, 即得。

不同方法制得的脂质体的包封率和载药量结果见表 1。可知硫酸铵梯度法制备的脂质体包封率和载药量均远高于其他方法, 因此选择硫酸铵梯度法制备脂质体。

表 1 不同制备方法制备莫西沙星脂质体的包封率和载药量的比较 ($n=3$)

Table 1 Comparison on entrapment efficiency and drug loading capacity of moxifloxacin liposomes prepared with different methods ($n=3$)

| 制备方法 | 包封率/% | 载药量/% |
|-------|------------|------------|
| 乙醇注入 | 20.42±4.45 | 3.40±0.74 |
| 薄膜分散 | 24.67±3.88 | 4.11±0.65 |
| 逆相蒸发 | 19.87±4.00 | 3.31±0.67 |
| 硫酸铵梯度 | 78.36±2.60 | 13.05±0.43 |

2.3 硫酸铵梯度法制备莫西沙星脂质体的影响因素考察

按照 HSPC、胆固醇和 Brij-78 质量比为 20:4:1, 精密称取 HSPC、胆固醇和 Brij-78 适量, 加入适量三氯甲烷完全溶解, 旋转蒸发除去有机溶剂, 使形成一层均匀薄膜, 再继续蒸发 30 min 左右使溶剂完全挥发。加入一定质量浓度的硫酸铵溶液适量, 65 °C 条件下水化分散 5 min, 60 °C、80 MPa 高压匀质 4 次, 得到粒径均一、有淡蓝色乳光的空白脂质体, 将空白脂质体转移到透析袋中, 在 160 mmol/L NaCl 中透析 5 h, 即得有淡蓝色乳光的硫酸铵梯度空白脂质体, 然后加入精密称取的莫西沙星, 40 °C 水浴孵化 30 min 并间歇振摇, 即得莫西沙星脂质体, 室温下保存, 备用。

2.3.1 硫酸铵质量浓度的选择 固定磷脂质量浓度 50 mg/mL、药脂比 2:3、载药孵育温度 40 °C、孵育时间 30 min, 制备脂质体, 分别考察不同硫酸铵质量浓度 (30、50、70、80 mg/mL) 对脂质体包封率的影响, 见表 2。

结果显示脂质体包封率随着硫酸铵质量浓度的增加先增大后减小, 以 70 mg/mL 磷脂质量浓度制备所得的脂质体包封率最高。

表 2 硫酸铵不同质量浓度对包封率和载药量的影响 ($n=3$)

Table 2 Effects of ammonium sulfate at different concentration on entrapment efficiency and drug loading capacity ($n=3$)

| 硫酸铵/(mg·mL ⁻¹) | 包封率/% | 载药量/% |
|----------------------------|------------|------------|
| 30 | 45.09±2.56 | 15.66±0.89 |
| 50 | 60.20±3.24 | 20.83±1.13 |
| 70 | 73.18±3.46 | 25.44±1.20 |
| 80 | 53.76±3.08 | 18.67±1.06 |

2.3.2 磷脂浓度的选择 固定药脂比 2:3、孵育温度 40 °C、孵育时间 30 min、硫酸铵质量浓度 70 mg/mL, 制备脂质体, 分别考察不同磷脂质量浓度 (40、50、60、80 mg/mL) 对脂质体包封率的影响, 见表 3。

表 3 磷脂不同质量浓度对包封率和载药量的影响 ($n=3$)

Table 3 Effects of phospholipid at different concentration on entrapment efficiency and drug loading capacity ($n=3$)

| 磷脂/(mg·mL ⁻¹) | 包封率/% | 载药量/% |
|---------------------------|------------|------------|
| 40 | 55.48±3.56 | 19.27±1.24 |
| 50 | 72.38±4.23 | 25.13±1.47 |
| 60 | 67.78±3.43 | 23.53±1.19 |
| 80 | 63.56±3.98 | 22.07±1.38 |

结果显示脂质体包封率随着磷脂质量浓度的增加先增大后减小, 以 50 mg/mL 磷脂质量浓度制备得到的脂质体包封率最高。磷脂质量浓度高于 50 mg/mL 造成包封率下降的原因可能是磷脂质量浓度过高, 黏度也随之增加, 造成在高压均质过程中机器中黏附残留较多, 即磷脂利用率降低, 同时所得脂质体粒径分布变宽, 故选择 50 mg/mL 磷脂质量浓度制备脂质体。

2.3.3 空白脂质体粒径对包封率影响考察 固定药脂比 2:3、孵育温度 40 °C、孵育时间 30 min、硫酸铵质量浓度 70 mg/mL、磷脂浓度 50 mg/mL, 通过控制均质压力制备不同粒径脂质体。考察不同粒径 (150、128、85、63、49 nm) 空白脂质体对包封率的影响, 见表 4。

结果随着粒径增大, 包封率先增加后减少, 在 120 nm 左右时包封率最高, 故选择通过调节高压均质压力和均质次数将空白脂质体粒径控制在此范围内。

表 4 空白脂质体粒径对包封率的影响 (n=3)

Table 4 Effects of different particle diameters on entrapment efficiency (n=3)

| 空白脂质体粒径/nm | 包封率/% |
|------------|------------|
| 49 | 30.18±1.21 |
| 63 | 42.35±2.14 |
| 85 | 58.78±3.23 |
| 128 | 74.68±3.81 |
| 150 | 53.56±2.38 |

2.3.4 透析时间对脂质体包封率的影响 固定药脂比 2:3、孵育温度 40 °C、孵育时间 30 min、硫酸铵质量浓度 70 mg/mL、磷脂质量浓度 50 mg/mL，制备脂质体，考察制备空白脂质体时不同透析时间(2、3、5、16、48 h，每隔 60 min 换液 1 次)对包封率的影响，见图 2。

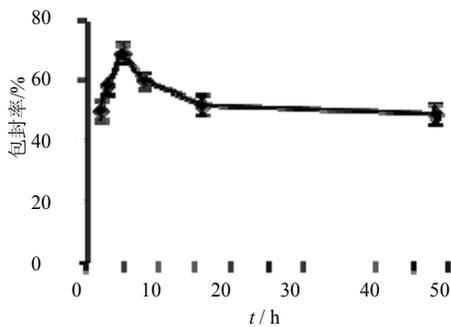


图 2 空白脂质体透析时间对包封率的影响

Fig. 2 Effect of dialysis time on entrapment efficiency of liposomes

结果显示透析时间为 5 h 时包封率最高，透析时间过短时硫酸铵梯度较小，不利于提高包封率，且脂质体外水相中硫酸铵的存在影响莫西沙星的装载；而透析时间过长可能会造成脂质体内水相硫酸铵泄露，故选择 5 h 进行透析除外相中硫酸铵制备空白脂质体。

2.3.5 载药孵育温度对脂质体包封率的影响 固定药脂比 2:3、孵育时间 30 min、硫酸铵质量浓度 70 mg/mL、磷脂质量浓度 50 mg/mL，制备脂质体，考察载药时不同孵育温度(30、40、50、60 °C)对包封率的影响，见表 5。

结果显示随着孵育温度的增加，包封率先增加后降低，孵育温度为 40 °C 时脂质体包封率最高。温度过低无法为药物跨膜提供足够的能量，温度过高使得膜的流动相增加而引起药物泄露。

表 5 孵育温度对包封率和载药量的影响 (n=3)

Table 5 Effects of incubation temperatures on entrapment efficiency and drug loading capacity (n=3)

| 孵育温度/°C | 包封率/% | 载药量/% |
|---------|------------|------------|
| 30 | 11.89±1.41 | 4.13±0.48 |
| 40 | 35.05±1.98 | 12.17±0.69 |
| 50 | 26.78±2.73 | 9.30±0.95 |
| 60 | 23.60±2.18 | 8.19±0.76 |

2.3.6 孵育时间对脂质体包封率的影响 固定药脂比 2:3、孵育温度 40 °C、孵育时间 30 min、硫酸铵质量浓度 70 mg/mL、磷脂质量浓度 50 mg/mL，制备脂质体，考察不同孵育时间(20、30、40、60 min)对包封率的影响，结果见图 3。

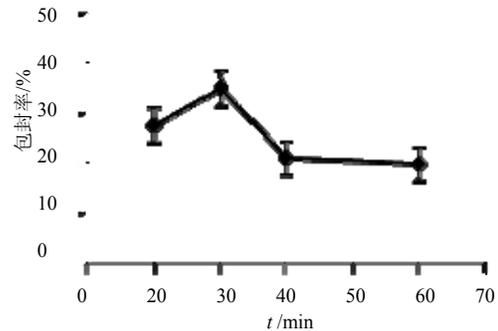


图 3 孵育时间对包封率的影响

Fig. 3 Effect of incubation time on entrapment efficiency

结果显示孵育时间以 30 min 最佳。时间过短则药物没有足够的时间跨膜进入内水相，过久反而会造成药物的泄露。

2.3.7 药脂比对脂质体包封率的影响 固定孵育温度 40 °C、孵育时间 30 min、硫酸铵质量浓度 70 mg/mL、磷脂质量浓度 50 mg/mL，制备脂质体。考察不同药脂比(1:2.5、1:1.88、1:1.5)对包封率和载药量的影响，见表 6。

表 6 药脂比对包封率和载药量的影响 (n=3)

Table 6 Effect of drug to lipid ratio on entrapment efficiency and drug loading capacity (n=3)

| 药脂比 | 包封率/% | 载药量/% |
|--------|------------|------------|
| 1:2.8 | 86.95±4.06 | 19.32±0.90 |
| 1:1.88 | 77.38±2.99 | 23.10±0.89 |
| 1:1.5 | 74.56±3.21 | 25.95±1.11 |

结果显示,随着药脂比的增加,包封率有下降趋势,但载药量提高。药脂比 1:1.88、1:1.5 时,在包封率上几乎无异,但后者载药量较高,故最终选择药脂比为 1:1.5 (即 0.67) 来制备脂质体。

2.3.8 验证试验 以包封率、载药量为指标参数,考察硫酸铵梯度法制备莫西沙星脂质体的影响因素,优化处方得到最佳制备工艺为:空白脂质体的磷脂质量浓度为 50 mg/mL、硫酸铵质量浓度 70 mg/mL、空白脂质体粒径 120 nm 左右、除外水相硫酸铵的透析时间 5 h,载药条件为药脂比 2:3、孵育温度 40 °C、孵育时间 30 min。按照此法制备得到高包封率、载药量的莫西沙星脂质体,包封率为 (74.56±3.21)%,载药量为 (26.39±1.88)%。

2.4 脂质体粒径及 Zeta 电位测定

按最佳工艺制备莫西沙星脂质体,室温条件下取脂质体溶液以注射用水稀释一定倍数后,于纳米粒度仪的专业样品池中,测定脂质体粒径分布、平均粒径及 Zeta 电位。结果显示脂质体粒径均一,平均粒径为 (143.00±3.98) nm, PDI 为 0.102,分布较窄,见图 4。Zeta 电位为 (4.32±0.98) mV。

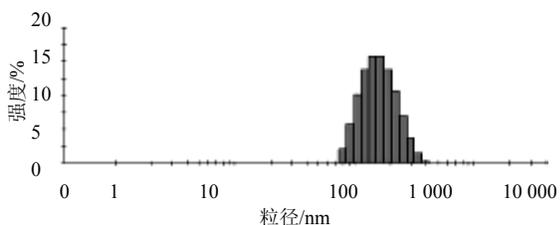


图 4 莫西沙星脂质体的粒径分布

Fig. 4 Size distribution of moxifloxacin liposomes

2.5 脂质体稳定性考察

将制备好的脂质体于室温下放置,一定时间取样品测定粒径和包封率,结果显示室温下稳定性良好,30 d 内粒径没有发生明显变化,包封率略微下降,见表 7。

表 7 莫西沙星脂质体的稳定性考察结果 (n=3)

Table 7 Stability of moxifloxacin liposomes (n=3)

| 时间/d | 包封率/% | 粒径/nm |
|------|------------|-------------|
| 1 | 74.05±3.26 | 142.24±1.09 |
| 7 | 72.18±2.69 | 144.07±1.21 |
| 15 | 71.82±2.80 | 143.87±1.75 |
| 30 | 70.69±1.81 | 144.39±1.98 |

3 讨论

莫西沙星是水溶性小分子药物,而脂质体对水溶性小分子药物的包封率和载药量一直都很低。考虑到莫西沙星呈现一定弱碱性,本研究尝试采用 pH 值梯度法制备莫西沙星脂质体。

pH 值梯度法即通过内外水相的不同 H⁺ 梯度载药,提高两亲性药物 (特别是弱酸、弱碱类药物) 在脂质体中的包封率^[6]。在 pH 值梯度法中硫酸铵梯度法最为成熟,应用也最广。硫酸铵梯度法是利用硫酸铵水溶液为脂质体的内水相,缓冲溶液为外水相,而在磷脂双分子层两侧产生硫酸铵的浓度梯度,而硫酸铵梯度又是产生 pH 值梯度的原动力^[7]。外水相中的弱碱性药物分子通过磷脂双分子层进入内水相后,与 SO₄²⁻ 形成硫酸盐,因磷酸盐难以跨越双分子层不能再返回外水相而滞留在脂质体内水相。这样,外水相中的弱碱性分子持续不断地进入内水相,而使药物具有很高的包封率。本实验采用硫酸铵梯度法制备莫西沙星脂质体包封率达 70% 以上。

本实验对空白脂质体的性质及载药条件进行了考察,发现硫酸铵质量浓度、药脂比、孵育温度、孵育时间、透析时间等都能影响莫西沙星的脂质体的包封率和载药量。

载药孵育温度对包封率产生影响的原因在于当孵育温度大于脂质体的相变温度时,脂质体由“胶晶态”转变为“液晶态”,磷脂膜的流动性增加^[8],利于脂质体外面的药物分子跨越脂质膜进入内水相,然而流动性的增加同时也会在一定程度上降低脂质体膜内外 pH 值梯度,同时还可能导致包封药物的泄露,这是导致脂质体在较高孵育温度时包封率下降的原因。

脂质体的包封率随硫酸铵质量浓度的提高先增大后减小。当硫酸铵质量浓度较低时,莫西沙星不能在脂质体内水相有效地形成低溶性硫酸盐,或形成的低溶性硫酸盐过少,不能有效地滞留在脂质体内水相,且硫酸铵的质量浓度梯度偏低时不利于载药;硫酸铵质量浓度过高时,脂质体双层膜内外硫酸铵的梯度过大,脂质体稳定性下降,导致包封率降低^[9-10]。

本研究采用硫酸铵梯度法制备莫西沙星脂质体,以脂质体的包封率和载药量为指标,在保证较高包封率的同时兼顾获得高载药量,得到了最佳制备工艺。同时制备的脂质体粒径分布均匀,放置稳定。另外,采用氢化磷脂制备的脂质体较不饱和磷

脂的脂质体具有更好的稳定性和缓释性能, 利于改善莫西沙星脂质体临床应用的顺应性。

参考文献

- [1] 孟静娟. 新抗生素莫西沙星国内外研究应用最新进展 [J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 98-101.
- [2] 张天民. 莫昔沙星研究进展 [J]. 临床肺科杂志, 2000, 5(4): 242-243.
- [3] 王以炳, 张天民, 刘 黎, 等. 莫昔沙星的抗结核作用及其应用研究进展 [J]. 中国防痨杂志, 2009, 28(6): 411-413.
- [4] 赵 领. 高度肺靶向新型脂质体载体给药系统研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2009.
- [5] 林 兰, 徐晓梅. 盐酸莫西沙星壳聚糖滴鼻剂的制备和质量控制 [J]. 现代医药卫生, 2006, 22(17): 2614-2615.
- [6] Mayer L D, Tai L C, Bally M B, *et al.* Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1025(2): 143-151.
- [7] 苗彩云, 邓树海, 李艳辉. 主动载药法制备两亲性药物脂质体的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(7): 433-437.
- [8] Gregory G. *Liposome Technology* [M]. Vol 1. 2th ed. Florida: CRC Press. 1993: 1-36.
- [9] Senior J H. Fate and behavior of liposomes *in vivo*: a review of controlling factors [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1987, 3(2): 123-193.
- [10] Amandeep S, Taggar A S. Copper-topotecan Complexion: Development of a novel liposomal formulation of topotecan [D]. Vancouver: University of British Columbia, 2006.