

星点设计-效应面优化欧前胡素脂质微球的处方工艺研究及质量评价

汤涛¹, 袁其红², 董伟¹, 赵国巍¹, 张婧¹, 廖正根¹, 梁新丽^{1*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西省吉安市中心人民医院 药剂科, 江西 吉安 343000

摘要: **目的** 采用星点设计-效应面法 (CCD-RSM), 以平均粒径、粒径分布 (多分散指数, PDI) 及 Zeta 电位为考察指标, 确定欧前胡素脂质微球 (ILM) 的最佳处方, 并进行质量评价。 **方法** 以平均粒径、PDI、Zeta 电位为评价指标, 考察蛋黄卵磷脂用量、泊洛沙姆用量、大豆油占油相总量的百分比对 ILM 制剂性质的影响。用二项式拟合建立指标与因素之间的数学关系, 根据评价指标的最佳数学模型描绘效应面, 经效应面法预测最佳处方, 并进行预测分析。按照优化出来的处方制备 ILM, 对其常规的质量评价进行研究。 **结果** 优化后的最佳处方为蛋黄卵磷脂 1.5 g, 泊洛沙姆 188 0.35 g, 注射用中链脂肪酸甘油酯 (MCT) 10 g, 优化处方各指标和目标值接近。按照优化的处方制备出来的 ILM 的平均粒径是 (165.00 ± 0.22) nm, PDI 为 0.058 ± 0.070 , Zeta 电位为 (-30.10 ± 0.13) mV, 包封率约为 90.09%, 载药量为 1.0 mg/mL。 **结论** 星点设计-效应面法适用于脂质微球的处方优化, 所建立的数学模型预测性良好; 优化后的 ILM 符合药剂学要求。

关键词: 欧前胡素; 脂质微球; 星点设计-效应面法; 质量评价; 多分散指数

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)01-0109-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.015

Technology research and quality assessment on prescription of imperatorin lipid microspheres by central composite design-response surface method

TANG Tao¹, YUAN Qi-hong², DONG Wei¹, ZHAO Guo-wei¹, ZHANG Jing¹, LIAO Zheng-gen¹, LIANG Xin-li¹

1. Key Laboratory of Preparation of Modern Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Department of Pharmacy, the Central People's Hospital of Ji'an City, Ji'an 343000, China

Abstract: Objective To optimize prescription and evaluate the quality of imperatorin lipid microspheres (ILM) by central composite design-response surface methodology (CCD-RSM), therefore to use the mean particle size, particle size distribution (polydispersity index, PDI) and Zeta potential as the primary indicator. **Methods** Mean particle size, particle size distribution and Zeta potential of lipid microspheres were measured to investigate the effect of the concentration of egg yolk lecithin, poloxamer and percentage of soybean oil in oil phase on the properties of ILM preparation. Mathematic relation between indicator and factor was constructed by binominal fitting. Then the response surface method according to the best mathematical model of evaluation indicators was used to make predictive analysis of the best prescription. Optimized prescription was used to prepare ILM and evaluate its quality. **Results** Optimized prescription was egg yolk lecithin 1.50 g, F68 0.35 g, and MCT 10 g. All items of optimized prescription were similar to target values. According to the optimized prescription, mean particle size of ILM was (165.00 ± 0.22) nm, particle size distribution was 0.046 ± 0.070 , Zeta potential was (-30.30 ± 0.13) mV, encapsulation efficiency was about 90.09%, drug-loading rate was 1.0 mg/mL. **Conclusion** Due to the better predictability of constructed mathematical model, CCD-RSM can be applied to optimize prescription of lipid microspheres and the optimized ILM meet pharmacy requirements.

Key words: imperatorin; lipid microspheres; CCD-RSM; quality evaluation; PDI

收稿日期: 2017-08-29

基金项目: 江西省青年科学家培养对象 (20153BCB23019); “赣鄱英才 555” 工程领导人才培养计划 (赣财教指 [2013] 296 号); 青年科学基金资助 (20161ACB21020)

作者简介: 汤涛, 在读硕士, 从事生物药剂学方向研究。Tel: 18779175038 E-mail: marryrose1013@163.com

*通信作者 梁新丽, 博士, 副教授, 从事药物新剂型与新技术研究。Tel: (0791)87119190 Fax: (0791)87118658 E-mail: paln7@163.com

欧前胡素是一种线性呋喃香豆素类天然活性成分,主要来源于中药白芷、欧前胡、蛇床、独活、北沙参、当归等植物。现代药理学研究表明欧前胡素在治疗心血管疾病、抗菌、抗病毒等方面具有显著意义^[1]。近年来,国内外诸多研究报道欧前胡素能够通过靶向于 Mcl-1 蛋白来诱导肿瘤细胞的凋亡从而发挥抗肿瘤以及逆转肿瘤细胞的多药耐药的作用^[2-8],这提示欧前胡素是一种潜在的抗肿瘤药物,具有良好的应用前景。由于欧前胡素的水溶性差,脂溶性较高,制备理想的药用制剂比较困难,且目前也没有市售的商品。文献报道欧前胡素在大鼠体内口服的绝对生物利用度仅为 7.20%^[9],半衰期短,胃肠道和肝脏对其代谢迅速^[10]。

脂质微球 (lipid microspheres, LM) 是指将药物溶于脂肪油中经磷脂乳化分散于水相后制成的一种平均粒径小于 200 nm 的微粒体分散系。作为一种新型的药物传递系统,LM 能够提高难溶性药物的溶解度,增加药物的吸收;增加理化性质不稳定,首关效应强的药物的稳定性;降低药物刺激性及其毒副作用;延长药物在体内的半衰期,提高药物生物利用度等优点^[11],是脂溶性药物理想的注射用载体。本研究利用欧前胡素水溶性差,脂溶性好的特性,将其溶解于注射用脂肪油中,然后选用生物相容性与安全性较好的卵磷脂作为乳化剂,结合纳米乳化技术,采用星点设计-效应面法 (CCD-RSM) 优化欧前胡素脂质微球 (ILM) 处方,并对优化后的 ILM 进行质量评价,本实验对 ILM 的处方和工艺进行研究,以期对欧前胡素的深入研究与临床应用奠定基础。

1 材料

Agilent1260 高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;Malvern 纳米粒度仪,英国马尔文公司;10BC 乳化机,上海恒川机械设备有限公司;HF6A 型多头磁力加热搅拌器,常州国华电器有限公司;高压均质机 (Panda plus2000 意大利尼鲁 Niro Soavi 公司),无锡凯派克斯科技有限公司;FEIQuanta250 扫描电镜,美国 FEI 公司;PHS-3C 型精密 pH 计,上海精密科学仪器公司。

欧前胡素原料药,批号 OQHS20170508,西安昊轩生物有限公司,质量分数 98%;欧前胡素对照品,中国食品药品检定研究院,批号 110826-200712,质量分数 ≥98%;注射用大豆油 (LCT),铁岭北亚药用油有限公司,批号 y11030103-2-01;注射用中

链脂肪酸甘油酯 (MCT),批号 940031,铁岭北亚药用油有限公司;注射用油酸钠 (批号 204352-1)、蛋黄卵磷脂 E80 (批号 510300-113404819015),上海东尚生物科技有限公司;注射用甘油,江西益谱生药业有司,批号 20160601;泊洛沙姆 188,上海昌盛科技有限公司;甲醇,色谱纯,上海振兴化工一厂;注射水,自制;其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 脂质微球的制备

2.1.1 ILM 制备工艺的单因素考察 预试验结果表明采用油中乳化法制备初乳的效果较好。将本品的基本处方暂定为混合油相为 10 g (LCT-MCT 1:1),蛋黄卵磷脂 1.2 g,泊洛沙姆 0.3 g,甘油 2.25 g,油酸钠 0.03 g。

采用单因素法考察初乳制备乳化温度分别在 50、60、70、80 °C,剪切速率分别为 13 000、16 000、19 000、22 000、25 000 r/min,剪切时间分别为 5、10、15 min 时脂质微球粒径的变化情况。结果显示,当乳化温度为 60 °C 时,剪切速率为 19 000 r/min 及搅拌时间为 10 min 时,能够达到实验要求。将制备的初乳在乳化机中以 19 000 r/min 搅拌 10 min 后高压均质,在相同的循环次数下压力取 600、800、1 000 MPa,结果在 600 MPa 时,粒径就能达到要求,且随着均质压力的增加 Zeta 电位反而越来越小。在 600 MPa 下分别循环 2、4、6、8、10 次,结果表明,循环 6 次时粒径最小,8 次与 10 次的粒径相差不大。因此,确定精制时均质压力为 600 MPa,循环 6 次。

2.1.2 ILM 的制备 将蛋黄卵磷脂加入到 100 g 混合油相 (LCT-MCT) 中,在 60 °C 条件下搅拌至全部溶解后加入 1.0 g 的欧前胡素,搅拌均匀,作为油相。注射用甘油、油酸钠、泊洛沙姆 188 分散于 800 mL 注射用水中,在 60 °C 下混合均匀,作为水相。恒速缓慢将油相加入到水相中,于 19 000 r/min 下搅拌 10 min,补充注射用水至 1 000 mL,得到初乳。初乳在高压均质 600 MPa 下均质 6 次,得到白色均一的乳液。然后灌装于棕色西林瓶中,充氮,100 °C 高压灭菌 40 min,即得 ILM。同法制备不添加欧前胡素的空白脂质微球 (BLM)。

2.2 欧前胡素定量测定方法

2.2.1 色谱条件 参考《中国药典》2015 年版一部定量测定白芷中欧前胡素的方法并进行优化^[12]。确定欧前胡素的色谱条件为 Agilent1260 高效液相色

谱仪; Phenomenex-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相比比例为甲醇-水(80:20); 检测波长 300 nm; 柱温 25 °C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 20 μL。在上述色谱条件下, 欧前胡素对照品溶液(A)、BLM 溶液(B)、ILM 溶液(C) 色谱图无干扰, 见图 1。

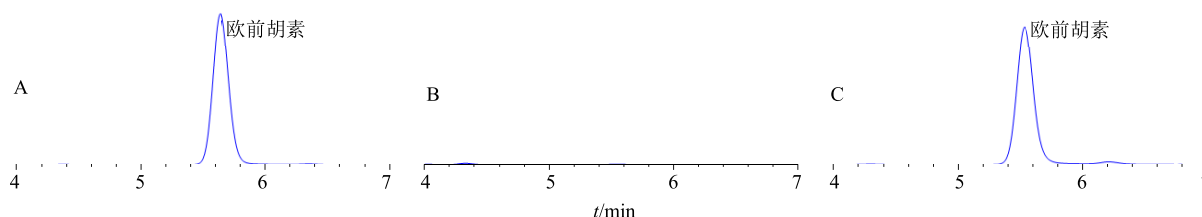


图 1 欧前胡素对照品溶液 (A)、BLM 溶液 (B) 和 ILM 溶液 (C) 专属性 HPLC 图谱

Fig. 1 Specificity HPLC of solution of imperatorin reference substance (A), solution of blank lipid microsphere (B), and solution of ILM (C)

项下的色谱条件进行检测, 以峰面积(A)与质量浓度(C)进行线性回归, 得到欧前胡素的回归方程为 $A=28.205 C-10.001$, $r=0.999 3$ 。结果表明欧前胡素质量浓度在 0.369 25~14.770 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.3 精密度试验 将低、中、高 3 种质量浓度的欧前胡素供试品溶液(0.369 25、1.477、14.77 μg/mL), 按照上述色谱条件连续进样 6 次, 连续进样 3 d, 分别记录峰面积。结果表明, 日内精密度的 RSD 分别为 0.956%、0.574%、0.123% ($n=6$), 日间精密度的 RSD 分别为 1.752%、1.126%、0.831% ($n=6$), 表明方法的精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取 ILM (1.0 mg/mL) 100 μL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 时按照上述色谱条件进样, 记录峰面积, 经计算其 RSD 为 0.45%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 重复性试验 取 ILM 样品 5 份, 加入甲醇破乳制备供试品溶液, 按照上述色谱条件进样, 记录峰面积, 经计算其 RSD 值为 1.42%, 表明该方法重复性好。

2.2.6 加样回收率试验 精密量取 9 份 5 mL BLM 于 100 mL 量瓶中, 分成 3 水平, 精密量取“2.2.2”项中的对照品母液 0.677、0.850、1.000 mL 加入各组量瓶中, 甲醇稀释并定容, 0.22 μm 滤膜滤过后, 按照上述色谱条件进行定量测定, 记录色谱图和峰面积, 计算得平均回收率为 100.29%, RSD 为 0.01%。

2.3 CCD-RSM 优化 ILM 的处方

2.3.1 因素与水平的确定 通过查阅文献, 预试验

2.2.2 线性关系考察 精密称取欧前胡素对照品 14.77 mg, 用甲醇定容至 25 mL 量瓶中配制成 590.8 μg/mL 的对照品母液。用甲醇分别稀释成 14.770、7.385、2.954、1.477、0.738 5、0.369 25 μg/mL 系列对照品溶液。用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按照“2.2.1”

和单因素实验结果显示混合油相(LCT-MCT)、蛋黄卵磷脂 E80 和泊洛沙姆 188 的量是影响制剂成功的主要因素。预试验和单因素实验确定的油相总量为 10%, 油酸为 0.05 g, 甘油为 2.25 g。

以平均粒径、PDI、Zeta 电位为评价指标, 蛋黄卵磷脂的用量(A)、泊洛沙姆用量(B)、LCT 占油相总量百分比(C)对 ILM 的稳定性影响较大, 并确定其用量范围为 A 1.0%~1.5%, B 0.1%~0.6%, C 0~50%。采用 3 因素 3 水平, 因素和水平表见表 1, 实验安排和结果见表 1。

2.3.2 数据处理 应用 Design Expert 8.0.6 软件进行 2 次多项式逐步回归拟合, 得到方程如下: 平均粒径 = $542.56 - 338.94 A - 539.57 B - 2.05 C + 264 AB + 2.28 AC - 0.38 BC + 64.32 A^2 + 189.39 B^2 - 14.64 C^2$, $R^2=0.813 4$; 粒径分布 = $0.699 44 - 0.652 37 A - 0.443 83 B - 16.69 C + 0.278 67 AB + 13.912 AC - 5.113 6 BC + 0.147 33 A^2 + 0.056 668 B^2 + 2.838 8 C^2$, $R^2=0.948 9$; Zeta 电位 = $-0.480 14 - 73.990 26 A + 49.913 8 B + 0.480 73 C - 39.599 87 AB - 0.680 AC + 0.365 33 BC + 38.813 4 A^2 + 0.146 73 B^2 + 5.568 5 C^2$, $R^2=0.779 7$; 综合评分 = $-104.409 48 + 206.685 35 A + 170.716 69 B + 1.368 91 C - 95.493 3 AB - 1.175 87 AC + 0.329 47 BC - 50.267 05 A^2 - 40.533 63 B^2 - 4.459 35 C^2$, $R^2=0.926 3$ 。

本实验的优化目的是平均粒径和粒径分布尽可能的小, Zeta 电位的绝对值尽可能的大, 综合评分尽可能的高。通过软件的处理, 预测出这些因素的最佳水平为蛋黄卵磷脂 1.50 g, 泊洛沙姆 188 0.35 g, MCT 10 g, 甘油 2.25 g, 油酸钠 0.05 g。用 Design-

表 1 星点设计与结果

Table 1 Central composite design and results

试验号	A/%	B/%	C/%	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	综合评分
1	1.25 (0)	0.1 (-1)	0 (-1)	194	0.105	-28.5	80.0
2	1.0 (-1)	0.1	25 (0)	262	0.164	-41.0	60.4
3	1.25	0.35 (0)	25	188	0.095	-39.5	85.4
4	1.25	0.35	25	187	0.087	-36.2	86.4
5	1.0	0.6 (+1)	25	174	0.078	-26.5	88.8
6	1.25	0.35	25	177	0.080	-35.0	89.1
7	1.5 (+1)	0.6	25	168	0.065	-33.0	91.9
8	1.5	0.1	25	190	0.082	-37.6	87.3
9	1.25	0.6	50 (+1)	183	0.061	-38.4	92.6
10	1.0	0.35	50	173	0.080	-28.0	87.2
11	1.25	0.35	25	174	0.077	-34.8	90.1
12	1.25	0.6	0	168	0.078	-32.9	90.6
13	1.25	0.35	25	187	0.082	-39.3	88.0
14	1.0	0.35	0	182	0.135	-32.3	76.9
15	1.5	0.35	0	165	0.058	-30.1	94.8
16	1.25	0.1	50	219	0.133	-43.1	73.8
17	1.5	0.35	50	213	0.126	-42.8	75.7

Expert 8.06 软件得到的响应曲面见图 2。

2.3.3 最佳处方的验证 按照预测的处方平行进行 3 次实验, 各指标与预测值接近, 表明建立的回归方程预测性良好, 结果见表 2。

2.4 优化处方制备的 ILM 质量评价

2.4.1 形态观察 用注射用水将 ILM 稀释 100 倍,

滴于样品台上, 自然挥干后喷金, 用扫描电镜观察 (SEM), 结果见图 3。结果表明制得的 ILM 微圆球形, 且大小比较均一。

2.4.2 粒径、PDI 及 Zeta 电位的测定 用注射用水将 ILM 稀释至 200 mL, 混匀后用 Malvern 纳米粒度仪测定其粒径、PDI 和 Zeta 电位, 结果见图 4,

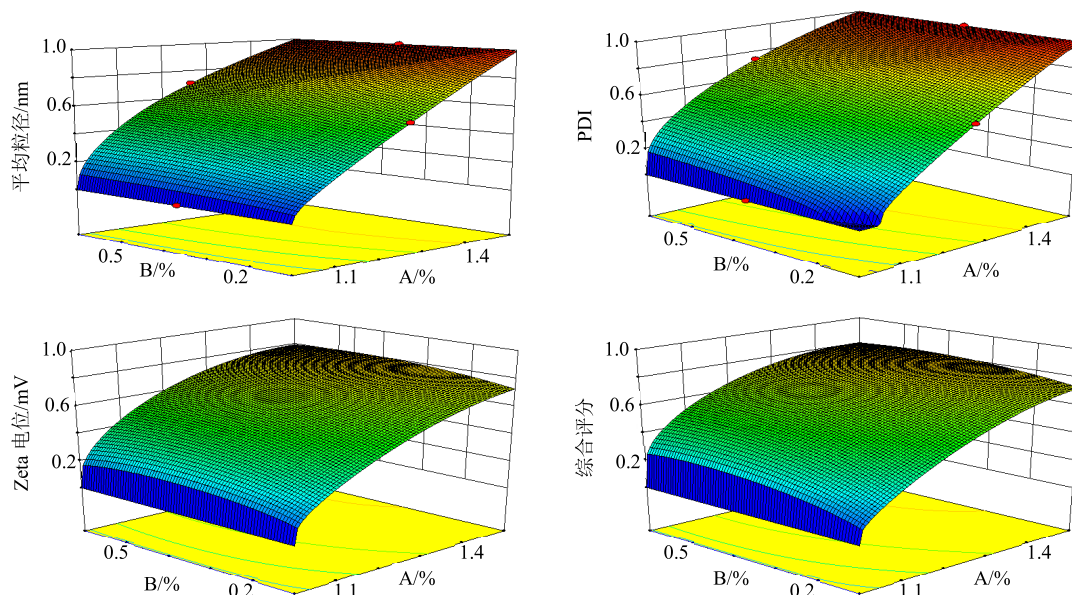


图 2 响应曲面图

Fig. 2 Response surface map

表 2 预测值与实测值的比较

Table 2 Comparison of predicted and measured values

比较项	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	综合评分
预测值	152.00	0.051	-35.3	97.17
实测值	165.00±0.22	0.058±0.070	-30.10±0.13	94.80
偏差/%	8.55	13.72	14.73	2.43

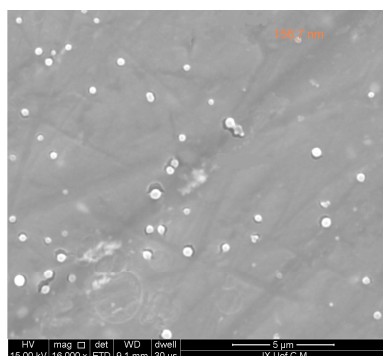


图 3 ILM 的 SEM 图

Fig. 3 SEM figure of ILM

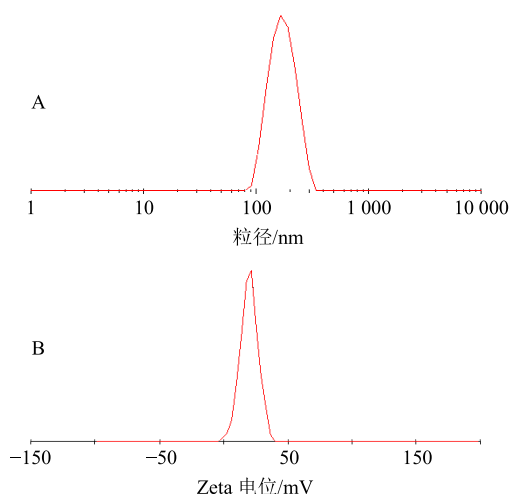


图 4 ILM 的粒径分布 (A) 及 Zeta 电位 (B)

Fig. 4 Particle sizes distribution (A) and Zeta potentials (B) of ILM

其平均粒径为 (165.00 ± 0.22) nm, PDI 为 0.058 ± 0.070 , Zeta 电位为 (-30.10 ± 0.13) mV。从图 4-A 中可以看出 ILM 的粒径小且分布均匀。一般认为, Zeta 电位的绝对值大于 20 mV 时, 体系一般就是稳定的, 说明制备的 ILM 较稳定。

2.4.3 ILM 载药量测定 取 1.0 mL 的 ILM, 加甲醇定容至 100 mL, 涡旋混匀即得样品溶液; 精密称取欧前胡素对照品, 加甲醇溶解, 配制成 10 μ g/mL 对照品溶液。按照“2.2.1”项下的液相条件进行分析, 结果 5 批 ILM 的载药量分别为 1.01、1.00、0.99、1.01、1.01 mg/mL。

2.4.4 包封率的测定 (超高速离心法) 精密量取 1.0 mL 的 ILM 于 1.5 mL Eppendorf 管中, 置于超速离心机中, 在 4 $^{\circ}$ C, 14 000 r/min 条件下离心 1 h, 取下层澄清溶液, 用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 平行制备 5 份, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行 HPLC 检测, 每份样品重复进样 3 次, 测定欧前胡素在 LM 中的总质量浓度 (C_0) 以及在水相中的质量浓度 (C_w), 根据公式: 包封率 = $(C_0V_0 - C_w - V_w)/C_0V$, 其中, V_0 为 LM 的体积, V_w 为水相的体积, 来计算包封率。结果 ILM 的包封率分别为 90.75%、90.24%、91.38%、91.05%、91.12%。

2.4.5 ILM 的长期稳定性实验 选择 3 批样品, 考察室温条件下 ILM 放置 6 个月的长期稳定性, 于 0、1、2、3、4、5、6 月取样 3 份, 分别测定 ILM 的粒径、粒径分布、Zeta 电位、载药量及包封率。实验结果见表 3。

3 讨论

本实验采用高压均质法制备了 ILM, 包封率高, 粒径分布均匀。脂质微球包封率的测定方法有很多, 常见的有超滤法、透析法、葡聚糖凝胶柱色谱法、离心法等。超滤法简便易行, 重现性好, 一般适用

表 3 ILM 在室温下的长期稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Long term stability of ILM at room temperature ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

时间/月	粒径/nm	粒径分布/nm	Zeta 电位/mV	载药量/(mg·mL ⁻¹)	包封率/%
0	165.0±1.3	0.058±0.003	-30.1±2.1	1.00±0.08	90.90±0.44
1	160.0±1.4	0.062±0.004	-32.6±1.8	1.02±0.04	91.20±0.37
2	159.0±0.4	0.060±0.002	-33.7±2.4	0.96±0.10	92.40±0.74
3	162.0±0.9	0.056±0.001	-31.8±1.6	0.99±0.07	90.50±0.89
4	163.0±1.2	0.062±0.018	-33.5±5.6	0.99±0.12	92.50±1.27
5	165.0±3.4	0.059±0.022	-34.7±3.7	0.98±0.18	90.40±0.77
6	164.0±2.9	0.067±0.009	-32.8±2.1	1.04±0.07	91.70±1.11

于水溶性药物脂质微球的分离,但所用的离心管多为一次性产品,故该方法成本较高^[13]。透析法操作简单、经济,但所需时间较长,一般需 10~24 h 以上且易导致 LM 中药物的渗漏^[14]。葡聚糖凝胶柱色谱法所需样品量少,但其耗时较长,包括预装柱、柱平衡、预饱和等多个程序,且在样品洗脱过程中,脂质微球易被稀释和遭到一定程度的破损^[15]。而离心法不仅能够改善这些问题,还具有操作简单,省时且精准的优点^[16]。因此,本课题组选择超速离心法测定该脂质微球的包封率。

均匀设计和正交设计是药物制剂研究、中药炮制、提取等工艺中广泛使用的 2 种实验设计方法。但均匀设计和正交设计优化法受到所选线性模型的限制,只能指出某一因素的取值方向,无法求得极值,且在所选择的最优条件下测得的效应值与数学模型预测值偏差较大^[17]。星点设计-效应面优化法集数学和统计学于一体,比正交设计更简化,比均匀设计更全面,试验次数较少,试验精度更高,并适用于多因素、多水平的试验^[18]。

本研究利用高压均质法制备 ILM,以粒径、PDI、Zeta 电位为考察指标,黄卵磷脂用量(A)、泊洛沙姆用量(B)、大豆油占油相总量的百分比(C)为自变量,以星点设计-效应面法建立了优化处方的数学模型,该模型拟合度高,具有良好的预测能力。欧前胡素为难溶性药物,预试验结果表明其在水中的溶解度仅为 1.93 $\mu\text{g/mL}$,本实验通过将其制备成脂质微球不仅能够保持欧前胡素原型药的脂溶性,使其更容易地在体内发挥其药物作用,而且还能够解决其自身溶解度低不能制成溶液型注射液的难题。加之近年来研究发现其在具有抗肿瘤作用,故有望成为一种新型的抗肿瘤药物。

参考文献

- [1] Koziol E, Skalicka-Woźniak K. Imperatorin-pharmacological meaning and analytical clues: Profound investigation [J]. *Phytochem Rev*, 2016, 15(4): 627-649.
- [2] Choochuay K, Chunhacha P, Pongrakhananon V, et al. Imperatorin sensitizes anoikis and inhibits anchorage-independent growth of lung cancer cells [J]. *J Nat Med*, 2013, 67(3): 599-606.
- [3] Luo K, Sun J, Chan J Y W, et al. Anticancer effects of imperatorin isolated from *Angelica dahurica*: Induction of apoptosis in HepG2 cells through both death-receptor-and mitochondria-mediated pathways [J]. *Chemotherapy*, 2011, 57(6): 449-459.
- [4] 黄志平, 邵立龙, 阮阳平. 欧前胡素对顺铂的骨肉瘤细胞抗肿瘤作用的增效作用 [J]. *中国现代应用药学*, 2015(10): 1193-1197.
- [5] 郑颖, 姜凯. 欧前胡素增强多柔比星对 HeLa 细胞的抗肿瘤效应 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(9): 1578-1583.
- [6] Badziul D, Jakubowicz-Gil J, Paduch R, et al. Combined treatment with quercetin and imperatorin as a potent strategy for killing HeLa and Hep-2 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 392(1/2): 213-227.
- [7] Jakubowicz-Gil J, Paduch R, Ulz Z, et al. Cell death in HeLa cells upon imperatorin and cisplatin treatment cell death in HeLa cells upon imperatorin and cisplatin treatment [J]. *Folia Histochem Cytochem*, 2012, 50(3): 381-391.
- [8] Bądziul D, Jakubowicz-Gil J, Langner E, et al. The effect of quercetin and imperatorin on programmed cell death induction in T98G cells *in vitro* [J]. *Pharmacol Rep*, 2014, 66(2): 292-300.
- [9] Wang S C, Chen Q H, Wang L, et al. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of imperatorin in rat plasma and tissue: Application to study its pharmacokinetics [J]. *Anal Sci*, 2009, 25(7): 869-873.
- [10] 潘京京, 吴培培, 李汉文, 等. 欧前胡素缓释片的制备及家兔血浆药代动力学研究 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2010, 31(5): 584-587.
- [11] 韩飞, 魏学鑫, 周貌男, 等. 中药注射剂的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(17): 1980-1984.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [13] 庄英华, 张中文, 韩伟, 等. 超速离心法测定连翘酯苷脂质体包封率 [J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(18): 2209-2211.
- [14] 蔡晓瑶, 张莉, 任翔, 等. 离心法和透析法测定蟾皮提取物固体脂质纳米粒包封率的比较 [J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(4): 744-747.
- [15] 陈蓓, 袁明奎, 王建华, 等. 葡聚糖凝胶柱色谱法测定阿苯达唑纳米脂质体包封率的方法研究 [J]. *中国药房*, 2012, 23(45): 4281-4284.
- [16] 李雪春, 董晓旭, 张玲玲, 等. 高速离心法测定包载香豆素-6 荧光探针聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的包封率 [J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(11): 915-919.
- [17] Aurieremma G, Mencherini T, Russo P, et al. Prilling for the development of multi-particulate colon drug delivery systems: pectin vs pectin-alginate beads [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1): 367-373.
- [18] Watts P J, Illum L. Colonic drug delivery [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 1997, 23(9): 893-913.