

• 药剂与工艺 •

柠檬苦素脂质体的制备和制剂学评价

李思敏^{1,2}, 吴文瀚², 高丽娜², 张 蕾², 吴诗涵², 刘雨萌², 周忠民^{1*}, 乔宏志^{2,3}

1. 淄博市中心医院 肾内科, 山东 淄博 255036

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

3. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 针对柠檬苦素(limonin, LM)的成药性问题, 开发其脂质体制剂, 优化处方和制备工艺, 并考察其体外抗肿瘤活性。方法 采用薄膜分散法制备柠檬苦素脂质体(LM@Lip), 通过单因素实验和正交试验筛选LM@Lip的制备工艺和处方, 采用Malvern粒度仪检测所制备LM@Lip粒径、PDI及Zeta电位, 采用HPLC检测其封装率和载药量, 透析法研究LM@Lip体外释放情况, MTT法评价LM@Lip对HepG2及A549细胞的毒性。结果 优化后的脂质体制备条件: 药脂比为1:150, 胆脂比为1:9, 探头超声条件为功率120 W、时间6 min(间隔1 s)。载药脂质体的平均粒径为(119.5±6.2) nm, PDI为0.318±0.124, Zeta电位为(-17.2±1.3) mV, 封装率为87.9%, 载药量为0.57%, 药物质量浓度为63.4 μg/mL。体外释放实验结果显示, 12 h累积释放量为58.59%。MTT结果显示, LM@Lip对HepG2和A549细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为20.16、15.39 μg/mL, 其肿瘤抑制作用优于LM单药。结论 将LM制备成LM@Lip可以增加药物的稳定性及溶解度, 药物表现出一定的缓释现象, 并且能明显抑制肿瘤细胞增殖, 效果优于LM。

关键词: 柠檬苦素; 脂质体; 薄膜分散法; 正交试验; 体外释放; 抗肿瘤; 成药性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)24-5957-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.007

Preparation and pharmaceutical valuation of limonin-loaded liposomes

LI Si-min^{1,2}, WU Wen-han², GAO Li-na², ZHANG Lei², WU Shi-han², LIU Yu-meng², ZHOU Zhong-min¹, QIAO Hong-zhi^{2,3}

1. Department of Nephrology, Zibo Central Hospital, Zibo 255036, China

2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective In view of drugability issue of limonin (LM), the liposomal preparation was developed. The liposomal formulation and preparation process were optimized, and its *in vitro* antitumor activity was investigated. **Methods** In this study, LM was loaded in liposomes to increase its stability and solubility. Meanwhile, *in vitro* cytotoxicity of LM@Lip was evaluated. LM@Lip were prepared by thin-film dispersion method, and formulation selection and process optimization were operated by single factor and orthogonal experiment. Size distribution, PDI and zeta potential were measured by Malvern sizer, and the encapsulation efficiency and drug loading content were determined by HPLC. The dialysis method was used to investigate the release profile of LM@Lip. *In vitro* cytotoxicity against HepG2 and A549 cells were estimated by MTT method. **Results** The optimized preparation conditions of liposomes were as follows: drug/lipid ratio was 1:150, cholesterol/lipid ratio was 1:9, the ultrasonic power was 120 W for 6 min (1 s interval). The average particle size, PDI and Zeta potential of optimized LM@Lip were (119.5 ± 6.2) nm, 0.318 ± 0.124, (-17.2 ± 1.3)

收稿日期: 2019-08-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503259); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20151002); 中国科协青年人才托举工程项目(CACM-2017-QNC1-01); 江苏省六大人才高峰项目(SWYY-057); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX18_1614); 大学生实践创新训练计划项目(201810315029Z)

作者简介: 李思敏, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail: 1252914228@qq.com

***通信作者** 周忠民, 本科, 主任医师。Tel: 18678185997 E-mail: 18678185997@163.com

mV, respectively, and the encapsulation efficiency and drug loading content were 87.9% and 0.57%. The final concentration of LM was 63.4 $\mu\text{g/mL}$. The release results showed 58.59% drug was released in 12 h. MTT results showed that the IC_{50} of LM@Lip on HepG2 and A549 cells was 20.16 and 15.39 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and its *in vitro* antitumor was superior to that of LM. **Conclusion** Liposomes can increase the stability and solubility of LM. LM@Lip showed slow-release profile and significant tumor inhibition superior to LM. **Key words:** limonin; liposomes; thin-film dispersion method; orthogonal experiment; *in vitro* release; antitumor; druggability

柠檬苦素 (limonin, LM) 又名黄柏内酯, 是一种三萜类化合物, 常见于芸香科和楝科植物中。近年来研究发现, LM 具有多重生物活性, 包括抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗病毒、抗焦虑及防虫杀虫等作用^[1]。其中对其抗肿瘤的报道较多, 如 LM 可阻断己糖激酶-2 磷酸化, 诱导 HCC 肝癌细胞凋亡和抑制糖酵解^[2], 甚至可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路降低癌细胞干性^[3]。然而 LM 存在溶解度低、稳定性差、生物利用度低、代谢快等缺点^[4-6], 大大限制了其应用。

脂质体 (liposome, Lip) 是一种具有类生物膜结构的纳米囊泡, 具有良好的生物相容性和稳定性。由于其结构中存在亲水的空腔和疏水的双层磷脂膜, 因此对亲水和疏水性药物均有较好的包载能力, 在改善药物溶解性、渗透性, 提高生物利用度等方面均有广泛的应用开发价值^[7-11]。通过脂质体包裹 LM 有望提高药物的溶解度和相关制剂学性能。

本实验采用薄膜分散法^[12-13]制备柠檬苦素脂质体 (LM@Lip), 并以包封率和粒径为指标, 通过单因素实验和正交试验进行处方筛选及制备工艺优化, 并对载药脂质体进行制剂学和体外抗肿瘤评价, 为 LM 的开发应用提供科学依据。

1 仪器与材料

CL21 R 型高速离心机, 德国 Thermo Fisher 公司; Milli-Q 型纯水系统, 美国 Millipore 公司; XP/XS 型微量分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Heder ODS-2 色谱柱, 江苏汉邦科技有限公司; Zetasizer Nano-ZS90 型粒度分析装置, 英国 Malvern 公司; e2695 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Vortex-Genie2 型涡旋混合器, 美国 Scientific Industries 公司; R-100 5L 型旋转蒸发仪, 瑞士 Buchi 公司; SHB-(III) 水循环抽气真空装置, 上海诚献仪器设备有限公司; THZ-C 型温控空气震荡摇床, 苏州培英实验设备有限公司; KQ-500DE 型电子超声清洗装置, 昆山市超声仪器有限公司; XO-650D 探头细胞膜破碎超声装置, 额定功率 650 W, 南京先欧仪器制造有限公司; DE-M 手动移液器, 德国 BRAND 公司。

LM, 质量分数 >98%, 美国 Sigma 公司; 大豆

磷脂 (soybean phospholipids, SPC), 质量分数 >99%, 上海东尚生物科技有限公司; 胆固醇 (cholestenone, CH), 质量分数 >99%, 上海东尚生物科技有限公司; 甲醇、乙腈、三氯甲烷、二氯甲烷, 色谱纯, 南京化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 LM@Lip 的制备

采用薄膜分散法^[14-15]制备载药脂质体 LM@Lip。具体操作: 向茄状瓶 (容量 250 mL) 中置入适量 SPC、CH、LM, 分别加入 20 mL 溶剂, 充分溶解后, 置于旋蒸仪中, 调节至适合的水浴温度, 旋蒸 5 h, 使茄状瓶底部的溶剂被彻底除去, 并使其底部铺盖一层均匀的脂质薄膜。加入 9 mL 超纯水震荡, 使之充分水化至溶液均一, 将制剂转移至西林瓶中, 并置于冰水中使用超声波细胞膜破碎机超声, 最后使用孔径为 0.45 μm 一次性水性滤膜滤过, 即得 LM@Lip。

2.2 LM 含量测定

2.2.1 色谱条件^[16] 汉邦科技 Heder ODS-2 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (70:30), 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μL , 检测波长 210 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取 LM 12.5 mg, 加入适量的无水甲醇, 超声 1 min, 以使其充分溶解, 并用无水甲醇在量瓶中定容至 25 mL, 涡旋 1 min, 混匀, 得到 0.5 mg/mL 的 LM 对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液制备 取制备 LM@Lip 0.1 mL, 用甲醇稀释 100 倍, 12 000 r/min 离心, 取上清液, 即得。

2.2.4 专属性实验 取用甲醇破乳后的空白脂质体溶液, 以及稀释得到的 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 LM 对照品溶液分别进样, 记录色谱图, 见图 1。LM 大约在 3.86 min 出峰 (图 1-A), 而空白脂质体在这一时刻不出峰 (图 1-B), 表明载体并不会对待测组分产生干扰。

2.2.5 线性关系考察 向 10 mL 量瓶中精确移取 LM 储备液 0.01、0.02、0.1、0.2、0.5、1 mL, 加入无水甲醇, 使液面相切于刻度标识, 混匀, 得 0.5、1、5、10、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, 依次

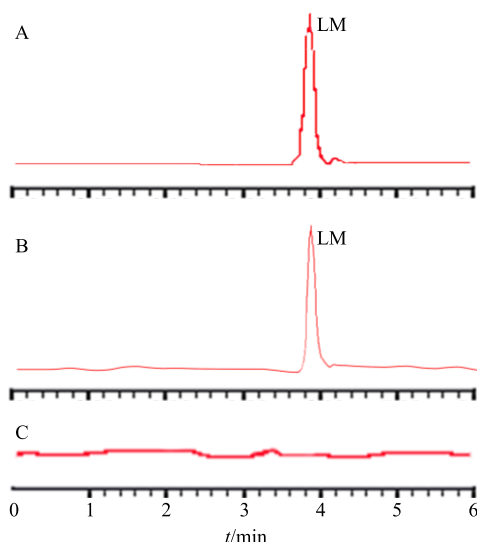


图 1 LM 对照品溶液 (A)、LM@Lip 样品 (B) 和空白脂质体 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of LM reference substance (A), LM@Lip sample (B), and blank liposomes (C)

进样, 求算标准方程, 经计算得定量标准方程为 $Y = 5\,890.06 X - 729.15$, 线性相关系数为 0.999 4, 结果表明 LM 标准曲线的峰面积与质量浓度在 0.5~50 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性相关性。

2.2.6 精密度试验 分别取“2.2.2”项下所制备的 0.5、10.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ LM 对照品溶液。每份平行测定 6 次, 测得的精密度 RSD 分别为 4.38%、2.27%、0.19%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 加样回收率试验 精确量取适量 LM 储备液, 用无水甲醇分别稀释成 0.5、10、50 $\mu\text{g/mL}$ 。同时取适量空白脂质体 3 份, 分别加入以上对照品溶液中混合, 按 2.2.3 项下操作进样。测得的 LM 回收率分别为 106.88%、105.35%、101.15%, RSD 分别为 2.32%、3.46%、3.73%, 符合检测要求。

2.3 脂质体粒径、PDI 及 Zeta 电位测定

取制备的 LM@Lip 适量, 加入适宜量超纯水调整粒子浓度后, 置入样品池中。使用 Malvern 粒度分析装置检测粒径、PDI 及 Zeta 电位, 测得制剂的平均粒径为 (119.5 ± 6.2) nm, PDI 为 0.318 ± 0.124 (图 2), Zeta 电位为 (-17.2 ± 1.3) mV, 所制得 LM@Lip 粒径合乎要求。

2.4 脂质体包封率及载药量的测定

包封率指包载于脂质体内的药物量占总药量的百分比。载药量意为某一质量脂质体中负荷的药量, 与制剂的药物浓度密切关联。上述指标被广泛用于脂质体的质量考察、工艺优化及处方筛选^[17-18]。本

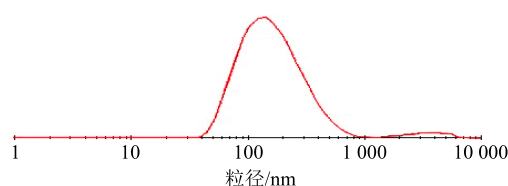


图 2 LM@Lip 的粒径分布

Fig. 2 Particle size distribution of LM@Lip

课题预实验证明 LM 的平衡溶解度小于 1 $\mu\text{g/mL}$, 故使用过膜法评判脂质体的包封率和载药量。取制备好的 LM@Lip 2 mL, 过 0.45 μm 滤膜, 再取过膜前后 LM@Lip 各 200 μL 分别置于 2.5 mL EP 管中, 各加入适量甲醇, 涡旋 2 min, 使之充分破膜, 通过 HPLC 分别测定过膜前后脂质体中的 LM 含量。包封率和载药量的计算方法如下公式。按上述方法求得 LM@Lip 中 LM 的包封率为 87.9%, 载药量为 0.57%, 药物质量浓度为 63.4 $\mu\text{g/mL}$ ($n=3$)。

$$\text{包封率} = W_c / (W_c + W_0)$$

$$\text{载药量} = W_c / (W_c + W)$$

W_c 为包载于脂质体中的药量, W_0 为未包载于脂质体中的药量, W 为脂质体中脂质的质量

2.5 LM@Lip 处方优化

据参考文献, 一般以包封率及粒径为指标^[19], 通过单因素实验分别考察溶剂 (二氯甲烷、无水甲醇、三氯甲烷)、药脂比 (0.5:100、0.75:100、1:100、2:100)、胆脂比 (1:3、1:6、1:9、1:12)、旋蒸时间、温度及探头超声条件对 LM@Lip 制备的影响。根据单因素实验的考察, 发现探头超声条件 (A)、药脂比 (B) 及胆脂比 (C) 对脂质体质量的影响最大, 为了科学地考察上述因素对脂质体质量的影响, 选择以上 3 者分别作为正交试验的 3 种实验因素, 并从每种因素中选出最优的 3 种条件分别作为正交试验的 3 种水平^[20], 见表 1。根据以上 3 因素 3 水平, 以包封率为判定依据, 按照正交试验表 $L_9(3^3)$ 进行实验, 结果见表 2, 方差分析见表 3。

由表 2 可知, 3 种实验因素对脂质体包封率的影响由大至小分别为超声条件 (因素 A)、药脂比 (因

表 1 3 因素 3 水平的筛选

Table 1 Selection of three factors and three levels

水平	A		B	C
	功率/W	时间/min		
1	120	6	1:100	1:6
2	60	12	1:150	1:9
3	180	6	1:200	1:12

表 2 $L_9(3^3)$ 正交试验设计与结果分析Table 2 Results of $L_9(3^3)$ orthogonal experimental design

序号	A	B	C	D (误差)	包封率/%
1	1	1	1	1	57.1
2	1	2	2	2	84.0
3	1	3	3	3	84.9
4	2	1	2	3	32.6
5	2	2	3	1	45.8
6	2	3	1	2	35.6
7	3	1	3	2	38.9
8	3	2	1	3	46.3
9	3	3	2	1	85.1
K_1	226.0	128.6	139.0		
K_2	114.0	176.1	201.7		
K_3	170.3	205.6	169.6		
R	37.3	25.6	10.7		

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

误差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	2 090.69	2	1 045.35	12.68	$P>0.05$
B	1 006.17	2	503.09	6.10	$P>0.05$
C	655.34	2	327.67	3.97	$P>0.05$
D (误差)	164.88	2			

素 B)、胆脂比 (因素 C)。根据正交试验, 最令人满意的因素与水平为 $A_1B_3C_2$, 即超声功率 20%, 持续时间 6 min, 药脂比 1:200, 胆脂比 1:9, 这与单因素实验中初步筛选出的条件一致, 表明正交试验结果的可信度较高。与此同时, 单因素实验表明, 药脂比为 1:200 和 1:150 时, 包封率分别为 85.7% 和 84.0%, 但药脂比为 1:150 时, 由于载药量的提升, 药物浓度明显高于药脂比为 1:200 时; 同时, 正交试验也表明, 在一定范围内适当改变药脂比并不会对包封率产生显著影响 ($P=0.1$), 故最终确定该制剂的制备条件为 $A_1B_2C_2$, 即超声功率 20%, 超声时间 6 min, 药脂比 1:150, 胆脂比 1:9。

2.6 体外释放实验

向截留相对分子质量 3 400 的透析袋中精确移取 LM@Lip 2 mL, 用封口夹将透析袋两端夹紧, 放置于 50 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 模拟 pH 7.4 的血液环境^[21]。向其中加入 1% 聚山梨酯-80, 使用空气摇床振荡, 保持摇床温度为 37 °C, 分别于 0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 h 取样 2 mL,

并补足新鲜介质, 样品离心后, 按色谱分析方法测定 LM 释放量, 以累积释放量对时间绘制释药曲线。结果见图 3, 药物在 1.0 h 时释放 23.78%, 2.0 h 后基本释放平稳, 呈现出缓释现象, 12.0 h 测得的累积释放量为 58.59%, 表明药物的体外释放呈现先快后慢的规律, 能够维持较长的药物释放周期。

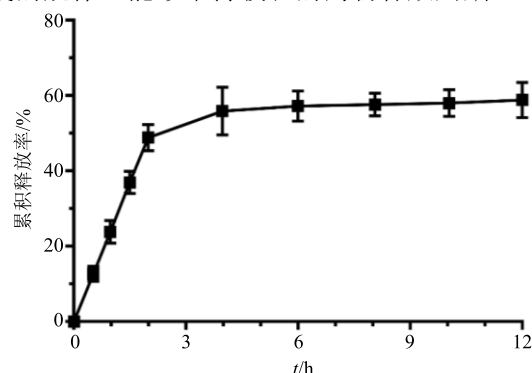


图 3 LM@Lip 释放曲线

Fig. 3 Release profile of LM@Lip

2.7 细胞毒性实验

为了考察 LM@Lip 对肿瘤细胞的抑制作用, 本实验选择了 2 种不同来源的肿瘤细胞: 人肝癌 HepG2 细胞和人肺腺癌 A549 细胞。取对数生长期的 HepG2 细胞或 A549 细胞, 以 1×10^4 /孔密度接种于 96 孔板, 在细胞培养箱中培养 12 h, 移去细胞培养基, 加入不同质量浓度的 LM 及 LM@Lip 的不完全培养基 200 μ L (LM 的质量浓度为 0.5、1.0、5.0、10.0、30.0、60.0 μ g/mL), 细胞随后置于培养箱中孵育 24 h, 吸去含药培养基, 加入 200 μ L PBS 清洗 1 次, 加入 200 μ L 含有 MTT 的不完全培养基, 37 °C 孵育 4 h, 吸弃培养基, 加 150 μ L DMSO, 置于摇床摇匀, 酶标仪 570 nm 处测定吸光度 (A) 值。结果见图 4, LM@Lip 对 HepG2 细胞和 A549 细胞的 IC_{50} 分别为 20.16、15.39 μ g/mL, LM 对 2 种细胞的 IC_{50} 分别为 46.84、39.53 μ g/mL, 可见 LM 经脂质体包覆后, 能有效提高其抗肿瘤活性, 这可能与脂质体改变了药物的油水分配性质和摄取行为有关。

3 讨论

本实验通过单因素考察和正交设计优化脂质体处方。过程中发现, 超声条件对脂质体质量影响较大, 其可能的原因是, 超声时间不足, 功率较低时, 脂质体匀化效果较差, 不同大小粒径的脂质体均存在, 这可能是导致 PDI 较大的原因之一; 而超声时间过长, 空化效应可能导致脂质体破坏, 造成药物的泄露和包封率降低。因此, 调节合适的超声分散

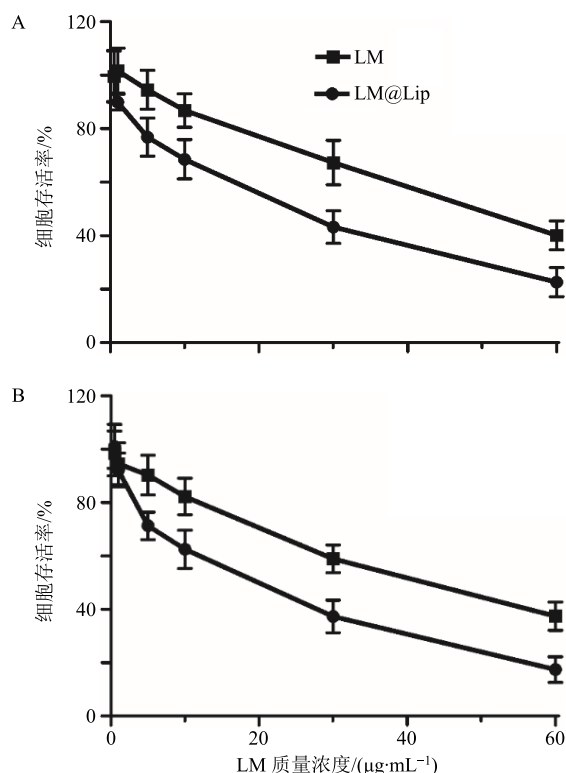


图4 LM和LM@Lip对HepG2细胞 (A) 和A549细胞 (B) 的毒性

Fig. 4 Cytotoxicity of LM and LM@Lip against HepG2 (A) and A549 (B) cells

条件对脂质体质量有重要影响。此外,目前比较常用的高压均质、微射流等技术在脂质体分散方面亦有较好的应用,且更适宜较大量脂质体的生产。

在制备脂质体的过程中,发现随着药脂比的增加,包封率在一定的范围内呈现下降趋势,药脂比过低则会降低载药量,故本实验中通过正交试验设计筛选药脂比最优比值以得到较高的包封率和载药量。胆固醇对脂质体的物理化学性质也有着较大的影响,研究表明在胆固醇用量在40%以下时,随着胆固醇浓度的增加,脂质体膜双分子层的微黏度逐渐增加,流动性逐渐减小,脂质体的包封率会有所下降,粒径会趋向变大并对脂质体稳定性有一定的影响^[22]。故本实验在胆固醇含量较小的范围内进行筛选,发现较小的胆脂比对脂质体包封率无显著影响,故结果选择较小的胆脂比(1:9)进行后续实验,以保证脂质体具有合适的粒径和较高的包封率。

脂质体的制备方法很多,常用的方法有薄膜分散法、高压均质法、逆相蒸发法和表面活性剂增溶法等。本实验采用薄膜分散法,操作方便,易于工业化生产。

本实验选用的脂质材料为大豆磷脂和胆固醇,均为安全常用的脂质体材料,价廉易得,便于后续产品放大和临床使用。

制备的LM@Lip有良好的制剂学性质和抗肿瘤活性,这说明脂质体改变了药物的理化性质,表现出更优的成药性能。本研究将为LM在相关领域的应用提供数据参考。

参考文献

- [1] 孙崇德,陈昆松,戚行江,等.柑桔果实柠檬素类化合物的研究与应用[J].浙江农业学报,2002,14(5):154-158.
- [2] Yao J L, Liu J T, Zhao W S. By blocking hexokinase-2 phosphorylation, limonin suppresses tumor glycolysis and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11(1): 3793-3803.
- [3] Tang Z Y, Tang Y T, Li L, *et al*. Limonin provokes hepatocellular carcinoma cells with stemness entry into cycle via activating PI3K/Akt signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117(1): 109051.
- [4] Manners G D, Jacob R A, Breksa A P, *et al*. Bioavailability of citrus limonoids in humans [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(14): 4156-4161.
- [5] Tian Q G, Kent K D, Bomser J A, *et al*. Characterization of limonin glucoside metabolites from human prostate cell culture medium using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18(24): 3099-3104.
- [6] Yang X W, Teng J, Zhao B, *et al*. Studies on absorption and transport of limoninoids from *Fructus Evodiae* in Caco-2 cell monolayer model [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 53-58.
- [7] Pattni B S, Chupin V V, Torchilin V P. New developments in liposomal drug delivery [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(19): 10938-10966.
- [8] Guo Y, Shen L X, Lu Y F, *et al*. Preparation of rutin-liposome drug delivery systems and evaluation on their *in vitro* antioxidant activity [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(4): 371-375.
- [9] 李秀英,李学涛,王颖莉.氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体的制备工艺研究[J].中草药,2019,50(7):1569-1575.
- [10] 银晓晶,叶田田,王淑君.7-乙基-10-羟基喜树碱脂质体在大鼠体内的代谢和排泄[J].现代药物与临床,2019,34(9):2593-2597.
- [11] 国瑞琪,王秋红,王向涛,等.和厚朴酚脂质体的制备

- 及其体内外抗乳腺癌作用研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 48-53.
- [12] 孙庆雪, 邵 伟, 黄桂华. 脂质体制备方法的选择 [J]. 中成药, 2010, 32(8): 1397-1401.
- [13] 邹蔓姝, 钟思雨, 周莉莉, 等. 斑蝥素半乳糖化脂质体制备工艺研究 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2809-2816.
- [14] 余荧蓝, 郑智元, 伊宸辰, 等. 青蒿素长循环脂质体的制备及体外性质评价 [J]. 药学学报, 2018, 53(6): 1002-1008.
- [15] 陈一桢, 张文娟, 唐兰如, 等. 和厚朴酚长循环脂质体的制备及药动学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3720-3727.
- [16] 刘 亮, 戚向阳, 董绪燕, 等. 高效液相色谱法测定柑橘中的柠檬苦素类似物 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 130-133.
- [17] 王小宁, 贾慧婷, 李伟泽, 等. 水飞蓟宾前体脂质体的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1314-1320.
- [18] 吴 骏, 朱家壁. 阿昔洛韦脂质体的制备和稳定性的初步考察 [J]. 药学学报, 2003, 38(7): 552-554.
- [19] 阙慧卿, 彭华毅, 钱丽萍, 等. 雷公藤内酯醇纳米脂质体的处方及制备工艺研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2277-2282.
- [20] 范云鹏, 王德云, 胡元亮, 等. 正交试验优选黄芪多糖脂质体的制备工艺 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 470-473.
- [21] 蒋苗苗, 金 玉, 方国民, 等. 丹皮酚-奥扎格雷偶联物长循环脂质体的制备及其体外释放 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(2): 78-83.
- [22] Kaddah S, Khreich N, Kaddah F, *et al.* Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 113: 40-48.