

## 盐酸米托蒽醌聚乙二醇化脂质体的制备及包封率考察

凌云<sup>1</sup> 戎隆富<sup>2,3</sup> 孙彦华<sup>4</sup> 程婷<sup>2</sup> 许培<sup>2</sup> 宋礼华<sup>2,3,Δ</sup>

(1 安徽中医学院药学院 安徽 合肥 230038 2 安徽安科生物工程(集团)股份有限公司 安徽 合肥 230038 ;  
3 安徽省生物研究所 安徽 合肥 230038 ;4 复旦大学药学院 上海 201210)

**摘要 目的:**制备盐酸米托蒽醌聚乙二醇化(PEG化)脂质体,建立包封率测定方法。**方法:**采用乙醇注入结合高压均质法制备空白PEG化脂质体;以铵根离子梯度法进行主动载药制备盐酸米托蒽醌PEG化脂质体;采用G-25葡聚糖凝胶色谱分离脂质体和游离药物;使用紫外-可见分光光度法测定脂质体的包封率。**结果:**空白脂质体平均粒径为88.7nm,载药后粒径为95.3nm;在所建立色谱条件下,脂质体与游离米托蒽醌分离良好;盐酸米托蒽醌在0.5~10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 范围内线性关系良好( $R^2=0.9997$ ),精密度高;脂质体的平均包封率大于96%。**结论:**乙醇注入-高压均质法结合铵根离子主动载药法适用于制备盐酸米托蒽醌PEG化脂质体;所建立分析方法简单快捷、准确可靠,可用于盐酸米托蒽醌长循环脂质体包封率的测定。

**关键词:**盐酸米托蒽醌;PEG化脂质体;葡聚糖凝胶柱色谱;紫外-可见分光光度法;包封率

中图分类号:R927.R918 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)34-6637-06

## Preparation of Mitoxantrone Hydrochloride PEGylated Liposomes and Determination of its Entrapment Efficiency

LING Yun<sup>1</sup>, RONG Long-fu<sup>2,3</sup>, SUN Yan-hua<sup>4</sup>, CHENG Ting<sup>2</sup>, XU Pei<sup>2</sup>, SONG Li-hua<sup>2,3,Δ</sup>

(1 School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui, 230038, China;

2 Anhui Anke Biotechnology (Group) Co. Ltd., Hefei, Anhui, 230038, China;

3 Anhui Biological Institute, Hefei, Anhui, 230038, China;

4 School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai, 201210, China)

**ABSTRACT Objective:** To prepare mitoxantrone hydrochloride PEGylated liposomes and to develop a method for determining its entrapment efficiency. **Methods:** Blank PEGylated liposomes was prepared by ethanol injection and high-pressure homogenization. Mitoxantrone was encapsulated in the liposomes using the ammonium sulfate ion gradient technique. Liposomes and free Mitoxantrone were separated by Sephadex G25 column chromatography. Using UV absorption spectroscopy to determine the entrapment efficiency. **Results:** The average diameter of blank liposomes was 88.7nm, while the drug-encapsulated liposomes was 95.3nm. liposomes and free Mitoxantrone were well separated with the chromatography condition. The standard curve was linear in the concentration range 0.5~10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $R^2=0.9997$ ). The entrapment efficiency was above 95%. **Conclusion:** Ethanol injection-high pressure homogenization and ammonium sulfate ion gradient technique are suitable for preparing Mitoxantrone Hydrochloride PEGylated Liposomes, the method for determining the entrapment efficiency of Mitoxantrone Hydrochloride PEGylated Liposomes is simple, rapid and accurate.

**Key words:** Mitoxantrone hydrochloride; PEGylated liposomes; Sephadex G25 column chromatography; UV absorption Spectroscopy; Entrapment efficiency

Chinese Library Classification(CLC): R927, R918 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)34-6637-06

### 前言

盐酸米托蒽醌(Mitoxantrone, DHAD)是一种人工合成的蒽环类广谱抗肿瘤抗生素,可用于乳腺癌、肝癌、淋巴瘤等恶性肿瘤的治疗,尤其对急性白血病具有显著疗效<sup>[1]</sup>,最新研究表明,米托蒽醌可提高儿童白血病复发存活率,其效果明显优于过去使用的药物<sup>[2]</sup>。但是,与大多数蒽醌类抗癌药物一样,盐酸米托蒽醌有着较为严重的毒副作用。由于其血浆蛋白结合率高(大

于95%)静脉注射后,血药浓度下降显著,广泛分布于各组织<sup>[3]</sup>。因此,病灶部位药物浓度相对较小,对癌细胞杀伤能力受限,对正常组织器官毒性较大。为达到治疗目的,临床上通常予以大剂量治疗,毒性反应表现随之明显。目前,国内外研究机构较为热衷于运用微粒给药技术对抗癌药物进行开发。其中,PEG化脂质体制剂因其良好的药动学特性和临床的实践效果<sup>[4-6]</sup>,成了一种技术相对成熟、可靠的药物二次开发手段。目前国内外对盐酸米托蒽醌脂质体的研究开展的虽较早,但绝大多数仅局限于实验室阶段的理论探索,极少数企业的产业化进程处于起步阶段<sup>[7-9]</sup>,未来市场潜能巨大。为将盐酸米托蒽醌开发成毒副作用低、治疗指数高的PEG化脂质体药物,本课题以全氢化豆磷脂(HSPC)、PEG化磷脂酰乙醇胺(mPEG2000-PE)及胆固醇为原料,结合国内外前期研究和企业生产实际,运用工业可行的

作者简介:凌云(1988-),男,药剂学硕士研究生,专业方向:药物制剂新技术与新工艺,E-mail:jixily@126.com

Δ通讯作者:宋礼华,男,研究员,博士生导师,从事生物制药研究,电话:86-551-5317751;E-mail:songlh@ankebio.com

(收稿日期:2012-06-11 接受日期:2012-07-05)

乙醇注入-高压均质法结合硫酸铵主动载药技术,对盐酸米托蒽醌 PEG 化脂质体的制备工艺进行研究,探索并建立简捷高效的包封率测定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

JN-3000Plus 低温超高压连续流细胞破碎仪(广州聚能生物科技有限公司);JEM-2100 型高分辨透射电子显微镜(日本电子);HH-1 型数控恒温水浴(金坛市江南仪器厂);UV-1800 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);Sephadex G-25 葡聚糖凝胶、1.5×20cm 玻璃色谱柱(美国 Pharmacia 公司);DF-101S 集热式恒温磁力搅拌器(河南予华仪器公司);数显紫外检测器(上海琪特分析仪器公司);LM17 型记录仪(永清示波器厂);Nicomp380 Z3000 粒度分析仪(苏州微流纳米生物技术有限公司);超纯水系统(美国 Merck-Millipore 公司);水浴式超声清洗机(宁波科生仪器厂)

盐酸米托蒽醌原料药(湖北健源医药化工有限公司);全氢化豆磷脂(HSPC)和 PEG 化磷脂酰乙醇胺(mPEG2000-PE),购自美国 Avanti Polar Lipids 公司,纯度 >99%;胆固醇(Sigma 公司,纯度 >99%);硫酸铵(国药集团,分析纯);无水乙醇(国药集团,分析纯);聚乙二醇辛基苯基醚 TritonX 100(化学纯,国药集团);高纯氮气(合肥恒兴气体公司);其余药品、试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

1.2.1 空白 PEG 化脂质体的制备 称取 16.52 g 硫酸铵固体,加去离子水溶解,定容至 500 mL,得浓度为  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫酸铵溶液,使用  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤、分装,量取 80 mL 硫酸铵水相溶液,于恒温磁力搅拌器中预热至  $65^\circ\text{C}$  保温,调节转速高速稳定。以质量比 3:1:1 分别精密称取 HSPC、胆固醇和 mPEG-PE,氮气流保护下,使用约 10 mL  $65^\circ\text{C}$  的无水乙醇充分搅拌溶解制得油相并保温。使用预热过的玻璃注射器吸取油相,针头探入液面,同时氮气流保护,匀速注入高速搅拌的水相中。继续  $65^\circ\text{C}$  搅拌,氮气吹扫挥除乙醇。1 小时后,使用水浴超声分散 30 分钟,得空白 PEG 化脂质体粗品。

将空白脂质体粗品装于透析袋中  $4^\circ\text{C}$  下,使用  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫酸铵溶液透析过夜,除去残留的乙醇。使用超高压连续流细胞破碎仪以 2000 Bar 压力在  $4^\circ\text{C}$  低温循环水浴中对脂质体粗品进行高压均质,乳匀 6 次后依次减压通过  $0.6$ 、 $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜,并在无菌环境中使用一次性  $0.22 \mu\text{m}$  滤器除菌,即得空白 PEG 化脂质体成品,分装  $4^\circ\text{C}$  避光冷藏保存备用。

1.2.2 空白脂质体的载药 移取适量空白 PEG 化脂质体至透析袋中,扎紧,  $4^\circ\text{C}$  下,以 5 L 生理盐水透析过夜,临用前,再使用 pH 值为 7.4(使用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 溶液调节)的生理盐水透析 1 h 调节外相 pH 值。透析完成后,精密 pH 试纸检测空白脂质体外水相溶液 pH 值应为 6.5~7.5 范围内。分别精密移取 4.5 mL 空白脂质体和 0.5 mL 盐酸米托蒽醌储备液 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 至 10 mL 玻璃试管中,混匀后以保鲜膜覆盖管口,置于  $60^\circ\text{C}$  水浴中保温孵育 30 分钟,期间需不时轻轻震摇试管。孵育完成后立即将试管置于  $4^\circ\text{C}$  流水中冷却 10 分钟,即得盐酸米托蒽醌 PEG 化脂质体,分装后于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中冷藏保存。

1.2.3 脂质体的形态、粒径及  $\zeta$  电位表征 外观形态 吸取适量样品,经生理盐水稀释后,使用磷钨酸负染 4 h,滴于电镜专用铜网上自然晾干后,使用透射电镜进行拍照。

粒径及  $\zeta$  电位 取适量样品,经生理盐水稀释后,使用粒度及电位分析仪进行测定。

1.2.4 脂质体包封率考察 分光光度法检测波长的确定:使用生理盐水/破膜剂(无水乙醇:Triton:水 28:0.2:72)混合溶液(V/V 1:1)将盐酸米托蒽醌溶液精密稀释至  $10.0$ 、 $7.5$ 、 $5.0$ 、 $2.5$ 、 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  系列浓度(各三份)。取浓度为  $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品,用分光光度计进行光谱扫描,波长范围  $800$ – $200 \text{ nm}$ ,步长  $0.5 \text{ nm}$ 。

标准曲线的绘制:分别测定系列标准浓度样品的  $\text{OD}_{610\text{nm}}$  值,进行三次平行试验,以浓度为横坐标,吸光度算数平均值为纵坐标绘制标准曲线。

精密度试验:取  $10.0$ 、 $5.0$ 、 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (高、中、低)三个浓度的 MIT 溶液,于当天 8、10、12、14、16 时测定其  $\text{OD}_{610\text{nm}}$  值,计算浓度,求得日内精密度;于第 1、2、3、4、5 天测定  $\text{OD}_{610\text{nm}}$  值,计算浓度,求得日间精密度。

脂质体微粒与游离药物的分离 移取适量空白脂质体与盐酸米托蒽醌,混匀后上柱,使用生理盐水进行洗脱,控制流速约为  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。使用紫外检测仪  $220 \text{ nm}$  和记录仪监测脂质体微粒和游离药物的分离情况。分离完成后,以生理盐水平衡至基线。获得脂质体微粒与游离药物分离曲线。

柱分离法回收率的考察 移取适量载药脂质体上柱,洗脱并收集脂质体最大吸收峰附近洗脱液 2 mL,即得包封率视为 100% 的载药脂质体对照品 A 100%。精密移 A 100% 对照品  $200 \mu\text{L}$  上柱,洗脱并收集脂质体洗脱峰 15 mL,混匀后移取 2 mL 加入至等体积破膜剂,稀释后水浴超声 1 min,测定  $\text{OD}_{610\text{nm}}$  值,由标准曲线计算浓度,求算 A 100% 过柱后脂质体中包封的药物含量。另精密移取 A 100% 对照品  $200 \mu\text{L}$ ,以生理盐水 75 倍稀释后,同法测定  $\text{OD}_{610\text{nm}}$  值,计算浓度,求算 A 100% 过柱前脂质体中包封的药物含量;并分别测定上样量分别为  $400 \mu\text{L}$  和  $100 \mu\text{L}$  时的回收率,按下式计算回收率。

$$\text{回收率} = \frac{\text{过柱后对照脂质体中的药物总量}}{\text{过柱前对照脂质体中的药物总量}} \times 100\%$$

脂质体包封率测定 由上述已建立的柱分离法分离脂质体与游离药物,收集脂质体洗脱峰进行破膜处理,测定  $\text{OD}_{610\text{nm}}$  值,由标准曲线计算浓度,求算过柱后脂质体包封药物含量。另精密移取同上样量的载药脂质体,以生理盐水稀释相应倍数后(洗脱峰体积与上样量体积之比),同法破膜处理,求算过柱前脂质体分散系中包封与未包封的药物总量。参照中国药典 2010 版第二部附录 中关于微囊、微球与脂质体制剂指导原则所规定包封率计算方法计算包封率<sup>[10]</sup>,公式如下:

$$\text{回收率} = \frac{\text{过柱后脂质体中包封的药物量}}{\text{过柱前系统中包封与未包封的总药量}} \times 100\%$$

## 2 结果

### 2.1 脂质体的形态、粒径及 $\zeta$ 电位

2.1.1 外观形态 电镜下可观察到,制备所得空白脂质体粒子呈圆整球形、分布均一。而包封有米托蒽醌的脂质体部分呈现针状或棒状亮芯结构,电镜下形态有少许改变。

2.1.2 粒径及分布 粒度分析仪测得空白脂质体平均粒径(光强

径)为 88.7 nm,载药脂质体的平均粒径为 95.3 nm,粒度分布均较为集中且呈单峰正态分布,与电镜观察结果基本一致。

2.1.3  $\zeta$  电位 电位测定结果表明,空白脂质体的平均  $\zeta$  电位大小为 -9.65 mV,载药脂质体的平均  $\zeta$  电位大小为 -12.0 mV。

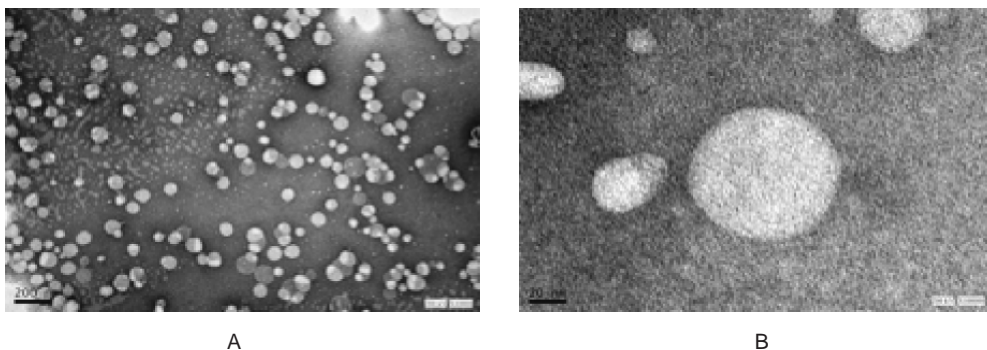


图 1 空白 PEG 化脂质体的透射电镜图(A 10000 倍, B 100000 倍)

Fig.1 TEM photography of blank PEGylated liposomes(A for Magnification 10000, B for Magnification 100000)

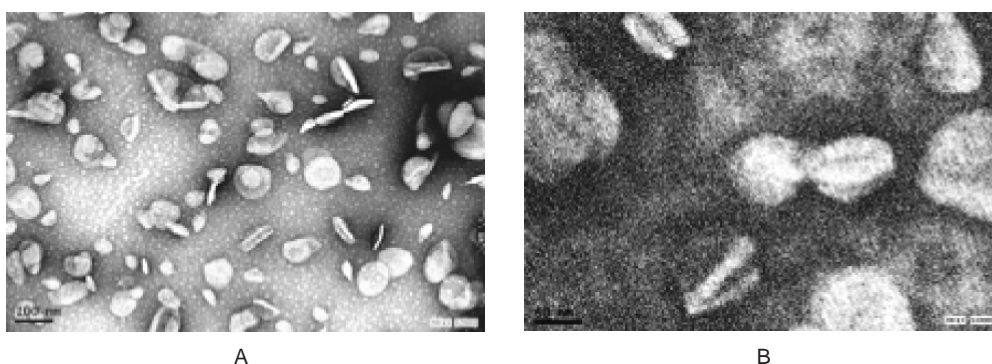


图 2 载药 PEG 化脂质体的透射电镜图(A 20000 倍, B 40000 倍)

Fig.2 TEM photography of drug-loaded PEGylated liposomes(A for Magnification 20000, B for Magnification 40000)

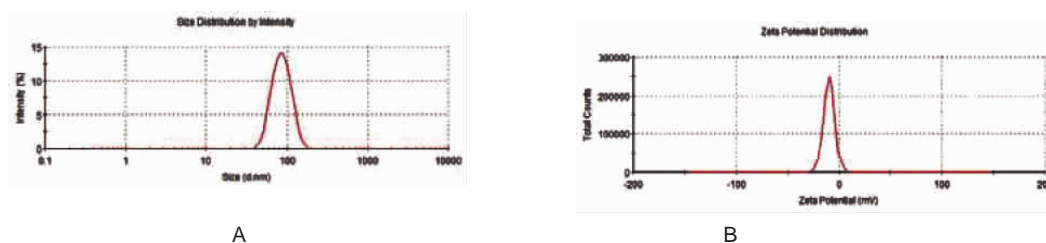


图 3 空白 PEG 化脂质体的粒径及  $\zeta$  电位分布图(A 粒径分布, B 电位分布)

Fig.3 Size and  $\zeta$  potential distribution of blank PEGylated liposomes(A for size, B for  $\zeta$  potential)

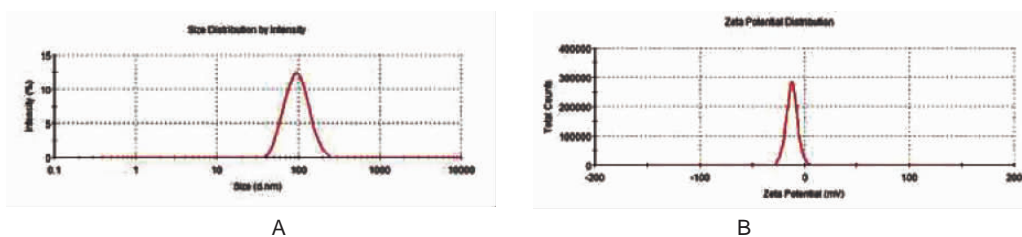


图 4 载药 PEG 化脂质体的粒径及  $\zeta$  电位分布图(A 粒径分布, B 电位分布)

Fig.4 Size and  $\zeta$  potential distribution of drug-loaded PEGylated liposomes(A for size, B for  $\zeta$  potential)

## 2.2 包封率考察

2.2.1 检测波长 光谱显示,在该混合溶液中,MIT 在可见光区 610 nm 和 661 nm 附近有较大吸收值,结合文献报道<sup>[11]</sup>,选择 610 nm 作为检测波长。且在该波长下脂质体处方成分无吸收,对测定无干扰。

2.2.2 标准曲线 由 Excel 2010 软件求得线性方程为  $y = 0.0295x - 0.0064$ ,  $R^2 = 0.9997$ ,显示盐酸米托蒽醌的生理盐水/破膜剂混合溶液在  $0.5 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  浓度范围内线性关系良好。

2.2.3 精密度考察 测得日内精密度分别为 0.74%、1.04%、1.28% 测得日间精密度分别为 0.92%、2.63%、3.81%。

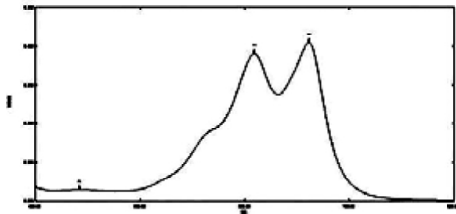


图5 盐酸米托蒽醌在生理盐水/破膜剂混合溶液中的光谱吸收图  
Fig.5 VIS-UV absorption of mitoxantrone hydrochloride in the mixed solution of 0.9 %NaCl/membrane dissolution agent

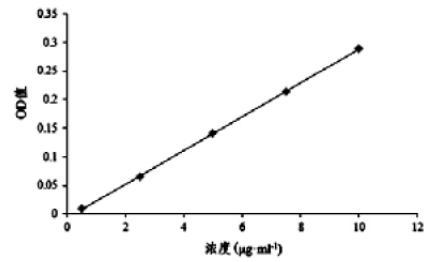


图6 盐酸米托蒽醌标准曲线  
Fig.6 Standard curve of mitoxantrone hydrochloride

表 1 盐酸米托蒽醌浓度测定的精密度试验结果

Table 1 Precision result for determination of the concentration of mitoxantrone hydrochloride

Item	Concentration Group ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		
	10.0	5.0	2.5
Inner day mean $\pm$ SD	10.01 $\pm$ 0.074	4.98 $\pm$ 0.052	2.49 $\pm$ 0.032
Inner day RSD	0.74 %	1.04 %	1.28 %
Inter day mean $\pm$ SD	9.99 $\pm$ 0.092	4.98 $\pm$ 0.131	2.54 $\pm$ 0.097
Inter day RSD	0.92 %	2.63 %	3.81 %

2.2.3 洗脱及分离曲线 在本文建立的色谱条件下 脂质体微粒 分布窄 吸收强 易于准确收集。与游离药物能够实现良好的分离 ,分离界限明显且脂质体微粒

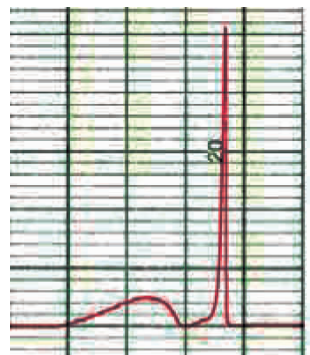


图7 空白脂质体与盐酸米托蒽醌游离药物的 G25 葡聚糖凝胶分离曲线  
Fig.7 Dissociation curve of blank PEGylated liposomes and mitoxantrone hydrochloride using Sephadex G25

表 2 柱分离法的回收率结果

Table 2 Recovery result of Sephadex G25 column chromatography

Item	Sample volume group( $\mu\text{L}$ )		
	100	200	400
Before column purification( $\mu\text{g}$ )	33.7	65.4	132.2
After column purification( $\mu\text{g}$ )	33.4	64.4	130.5
Recovery	99.2 %	98.5 %	98.7 %

表 3 盐酸米托蒽醌聚乙二醇化脂质体的封装率

Table 3 Entrapment efficiency of Mitoxantrone Hydrochloride PEGylated Liposomes

Item	Lot number		
	20120315	20120326	20120406
Entrapment efficiency	96.6 %	96.5 %	97.3 %
Mean	96.8 %		

2.2.4 柱分离法回收率 计算得上样体积为 100、200、400  $\mu\text{L}$  时回收率分别为 99.2%、98.5%、98.7%。

2.2.5 脂质体包封率 测得本课题所制得三批次的盐酸米托蒽醌聚乙二醇化脂质体的平均包封率为 96.8%。

### 3 讨论

#### 3.1 制备方法的选择

本实验以乙醇注入联用高压均质法制备空白 PEG 化脂质体,工业化前景良好,可较大幅度地减少毒性试剂的使用;所采用的铵根离子主动载药法,在中性介质中进行封装且条件较为温和,可以较好地维持脂质体粒径并对多数弱碱性药物进行高效封装,包封率大于 80%,符合药典要求。近年来,又相继有基于离子载体 A23187 及 EDTA 铵盐载药法等新技术理论提出,所得包封率均十分理想(EE>98%)<sup>[12-15]</sup>。但笔者考虑到大量的离子载体及螯合剂在人体内的安全性评价暂未明确,注射剂产品中 EDTA 限量要求严格,因此运用于产业化的开发前景有待考察,但不可否认其重大的理论创新意义。在工艺过程中,选用透析法去除脂质体分散系外相的硫酸铵,具有操作简便、去除效率高、单次取样量少等优点,且基本不会造成脂质体的稀释,从而可准确按照最佳药脂比进行投料。本课题组曾尝试使用过超滤机及柱层析脱盐法进行外相置换,但由于超滤和柱层析脱盐需较多的空白脂质体样品,且置换后浓度发生明显改变,不便于实验室小批量样品的探索和试制,但这两种方法对于脂质体药物的工业化生产具有重要意义。

#### 3.2 包封率测定法的建立

脂质体的包封率测定法主要有超滤离心法、微柱分离联合 HPLC 法及分光光度法联合凝胶色谱法等<sup>[16]</sup>。本实验尝试建立了以 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶为介质的色谱法进行脂质体和游离药物的分离,并使用在线监测的方式准确收集脂质体峰,运用紫外-可见分光光度法进行包封率的测定,具有操作省时高效,数据准确可靠且设备要求较低等优点。针对脂质体与游离药物的分离,国内外同类研究一般使用 G-50 葡聚糖凝胶进行分离,并收集游离药物进行检测计算包封率<sup>[17]</sup>。但结合本课题的具体实践发现,米托蒽醌具有很强的吸附性,加样后,游离药物的洗脱速度非常缓慢,且药物在凝胶柱中扩散较快,导致洗脱峰过宽或不明显,加之游离药物量较少,难以准确判定收集终点从而影响包封率测定结果。药典规定关于包封率的测定有两种方法可通行,因此采取收集脂质体峰进行包封率测定。基于游离药物的上述属性,我们以 G-25 葡聚糖凝胶作为色谱介质,以 1.5 $\times$ 20 cm 玻璃色谱柱即可实现良好分离。采用其他型号(如 G-50、G-75 等)凝胶,对脂质体微粒的洗脱时间基本无影响,但却显著增加了游离药物冲柱后进行再检测的循环周期。

#### 3.3 脂质体的表面荷电性

脂质体的  $\zeta$  电位值是衡量脂质体微粒稳定性的重要参数,具有一定  $\zeta$  电位值的脂质体能因电荷间的斥力而减少微粒间的聚集、融合,增加稳定性。对于水相中分散的普通微粒,当  $|\zeta| \geq 30 \text{ mV}$  时,带电微粒不易聚集,比较稳定<sup>[18]</sup>。本实验制备获得的 PEG 化脂质体虽含有带电荷的磷脂酰乙醇胺,但实测  $|\zeta|$  值偏低,可能原因在于表面覆盖的 PEG 柔性链团状分子链对

表面电荷造成了遮蔽,造成电位测定读数偏低。但有文献报道,对于经 PEG 或同类高分子材料修饰的脂质体微粒,当  $|\zeta| \geq 10 \text{ mV}$  时,即可使微粒稳定<sup>[19]</sup>。因此可认为本实验制备的 PEG 化脂质体药物具有较理想的表面  $\zeta$  电位值。

#### 3.4 载药后外观形态

载药脂质体呈现针状或棒状亮芯结构,主要因米托蒽醌在脂质体内相形成硫酸多价盐胶状沉积有关。值得注意的是,大多蒽环类抗肿瘤抗生素的盐酸盐(如盐酸多柔比星)使用硫酸铵法进行脂质体药物制备时,都会以硫酸多价盐胶体的形式沉积于脂质体内相。文献报道,若使用冷冻-透射电镜观察,可使载药脂质体呈现“咖啡豆”样夹心,并使得实际载药量超出了理论预测值<sup>[20]</sup>。因此,该机制对增加脂质体制剂载药量、增强脂质体药物稳定性、减少药物贮存期渗漏等具有重要意义,值得以此为出发点对脂质体内相的选择和开发进行深入研究。

#### 参考文献(References)

- [1] 徐淑梅,李旻,刘卓刚.国内米托蒽醌治疗急性白血病疗效的 Meta 分析[J].中国药房,2011,22(12):1122-1124  
Xu Shu-mei, Li Yan, Liu Zhuo-gang. Effectiveness and Safety of Mitoxantrone for Acute Leukemia: A Meta-analysis [J]. China Pharmacy, 2011, 22(12): 1122-1124
- [2] Catriona Parker, Rachel Waters, Carly Leighton, et al. Effect of mitoxantrone on outcome of children with first relapse of acute lymphoblastic leukaemia(ALL R3): an open-label randomised trial[J]. The Lancet, 2010, 376(9757): 2009-2017
- [3] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M].北京:人民卫生出版社,2003:696  
Chen Xin-qian, Jin You-yu, Tang Guang. A New Pharmacology[M]. Beijing: People's Medical Press, 2003: 696
- [4] 孟淑燕,周彩存,栗波,等.长循环紫杉醇纳米脂质体的合成及其活性评估[J].现代生物医学进展,2009,9(13):2407-2409  
Meng Shu-yan, Zhou Cai-cun, Su Bo, et al. Preparation and Characterization of PEGylated Paclitaxel Liposomes[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(13): 2407-2409
- [5] Marije Slingerland, Henk Jan Guchelaar, Hans Gelderblom. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road [J]. Drug Discovery Today, 2011, 0(0): 1-7
- [6] Peter G. Rose, John A. Blessing, Shashikant Lele, et al. Evaluation of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) as second-line chemotherapy of squamous cell carcinoma of the cervix: A phase II study of the Gynecologic Oncology Group[J]. Gynecologic Oncology, 2006, 210: 210-213
- [7] 李春雷,王金成,王彩霞,等.一种脂质体药物及其制备方法[P].中国专利,公开号 CN101209243A, 2008  
Li Chun-lei, Wang Jin-rong, Wang Cai-xia, et al. preparation method of one kind of liposomal drug [P]. China Patent, Publishing NO. CN101209243A, 2008
- [8] Howard J. Lim, Thomas D. Madden, Marcel B. Bally, et al. Liposomal formulations of mitoxantrone[P]. United States Patent, US005858397A, 1999
- [9] Imran Ahmad, Wadsworth, Aquilur Rahman, et al. Liposomal formulations of mitoxantrone [P]. United States Patent, US 20030219476A1, 2003

- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版(第二部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010, 附录: 204  
Committee of National Pharmacopoeia. Chinese Pharmacopoeia 2010 edition (2nd Department)[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2010, Appendix: 204
- [11] 段逸松, 于波涛, 张志荣. 米托蒽醌长循环脂质体的制备及药代动力学的研究[J]. 药学学报, 2002, 37(6): 465-468  
Duan Yi-song, Yu Bo-tao, Zhang Zhi-rong. Preparation of mitoxantrone hydrochloride long circulating liposomes and its Pharmacokinetics Studies[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2002, 37(6): 465-468
- [12] Euan Ramsay, Jehan Alnajim, Malathi Anantha, et al. A novel liposomal irinotecan formulation with significant anti-tumour activity: Use of the divalent cation ionophore A23187 and copper-containing liposomes to improve drug retention[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008, 68: 607-617
- [13] Yang Yue-hui, Ma Yan-ling, Wang Shao-ning. A novel method to load topotecan into liposomes driven by a transmembrane NH<sub>4</sub>EDTA gradient[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012, 80(2): 332-339
- [14] Jerzy Gubernator, Grzegorz Chwastek, Mariola Korycińska, et al. The encapsulation of idarubicin within liposomes using the novel EDTA ion gradient method ensures improved drug retention in vitro and in vivo[J]. Journal of Controlled Release, 2010, 146: 68-75
- [15] 张艳晶, 杨强, 李洁, 等. 乙二胺四乙酸梯度法制备苹果酸舒尼替尼脂质体[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(5): 345-348  
Zhang Yan-jing, Yang Qiang, Li Jie, et al. Preparation of sunitinibmaleate liposomes with triethylamine-ethylene diaminetetra acetate gradient [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2011, 28 (5): 345-348
- [16] 赵妍, 于彬, 邓意辉. 主动载药法制备硫酸长春新碱脂质体及其包封率的测定[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(20): 1559-1562  
Zhao Yan, Yu Bin, Deng Yi-hui. Preparation of liposomes entrapped vincristine sulfate by active loading and determination of its entrapment efficiency[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2005, 40(20): 1559-1562
- [17] 魏伟, 邓英杰, 张睿智, 等. 硫酸铵梯度法制备盐酸伊立替康脂质体及体外释放的研究[J]. 中国药理学杂志, 2009, 7(1): 20-29  
Wei Wei, Deng Ying-jie, Zhang Rui-zhi, et al. Preparation of irinotecan hydrochloride liposomes with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gradient and study on its in vitro release [J]. Chinese Journal of Pharmaceutics, 2009, 7(1): 20-29
- [18] 陈立亚, 于宝珠, 赵慧芳. Zeta 电位及其在药学分散体系研究中的应用[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(2): 281-285  
Cheng Li-ya, Yu Bao-zhu, Zhao Hui-fang. Zeta potential and its application in the study pharmaceutical dispersion system [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2006, 26(2): 281-285
- [19] Heurtault B, Saulnier P, Pech B, et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles[J]. Biomaterials, 2003, 24: 4283-4300
- [20] V. P. 托尔钦林, V. 魏西希. 脂质体 (原著第二版, 邓意辉, 徐晖译) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 135  
V. P. Torchilin, Volkmar Weissig. Liposomes: A Practical Approach (The original second edition, Translated by Deng Yihui, Xu Hui) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 135

(上接第 6662 页)

- [10] 王桂华, 王晓文, 夏启胜, 等. 四氧化三铁磁纳米介导磁感应治疗 Wistar 大鼠 Walker-256 肿瘤 [J]. 中国微创外科杂志, 2009, 9(3): 237-240  
Wang Gui-hua, Wang Xiao-wen, Xia Qi-sheng, et al. Therapeutic Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanometer magnetic induction hyperthermia on Walker-256 tumor in Wistar rats [J]. Chinese Journal of Minimally Invasive Surgery, 2009, 9(3): 237-240
- [11] Wu Y, Xing D, Chen WR. Single cell FRET imaging for determination of pathway of tumor cell apoptosis induced by photofrin-PDT[J]. Cell Cycle, 2006, 5(7): 729-734
- [12] Murphy KM, Streips UN, Lock RB. Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N terminus and Bax mitochondrial translocation[J]. J Biol Chem, 2000, 275(23): 17225-17228
- [13] Desagher S, Osen-Sand A, Nicols A, et al. Bid-induced conformational changes of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis[J]. J Cell Biol, 1999, 144(5): 891-901
- [14] Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, et al. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c[J]. J Biol Chem, 1999, 274(30): 21155-21161
- [15] Rong Y, Mack P. Apoptosis induced by hyperthermia in Dunn osteosarcoma cell line in vitro[J]. Int J Hyperthermia, 2000, 16(1): 19-27
- [16] Shellman YG, Howe WR, Miller LA, et al. Hyperthermia induces endoplasmic reticulum-mediated apoptosis in melanoma and non-melanoma skin cancer cells[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(4): 949-956
- [17] Abe T, Sakaguchi Y, Ohno S, et al. Apoptosis and p53 over expression in human rectal cancer; relationship with response to hyperthermochemo-radiotherapy[J]. Anticancer Res, 2001, 21(3C): 2115-2120
- [18] Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme[J]. J Neurooncol, 2007, 81(4): 53-60
- [19] Franckena M, Stalpers LJ, Koper PC, et al. Long-term improvement in treatment outcome after radiotherapy and hyperthermia in locoregionally advanced cervix cancer: an update of the Dutch Deep Hyperthermia Trial [J]. Int J Radiation Oncology Biol Phys, 2008, 70(4): 1176-1182
- [20] 唐劲天. 肿瘤磁感应治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 271  
Tang Jin-tian. Magnetic induction hyperthermia for cancer[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2009: 271
- [21] 郝丽莉, 盛廷良, 王淑秋, 等. 肿瘤热疗的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(4): 772-774  
Hao Li-li, Sheng Yan-liang, Wang Shu-qiu, et al. Progress of hyperthermia in tumor treatment[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(4): 772-774