

眼用妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的制备及体外释放性能研究

吴润莲¹, 刘 婷²

1. 南京大学医院 药剂科, 江苏 南京 210093

2. 南京市江宁区中医医院 药剂科, 江苏 南京 210093

摘要: 目的 制备眼用妥布霉素羧甲基壳聚糖微球, 并评价其体外释药性能。方法 采用乳化-交联固化法制备妥布霉素羧甲基壳聚糖微球, 并以微球的收率、粒径分布和包封率作为评价指标, 使用 Box-Behnken 实验设计优化得到妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的最优处方。通过马尔文激光粒度仪测定了微球的粒径分布, 扫描电镜观察其微观结构, 考察微球在人工泪液中的释药性能。结果 优化得到微球的处方组成: 羧甲基壳聚糖质量浓度为 3.5%, 甲醛质量浓度为 1.5%, Span-80 质量浓度为 0.8%; 妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的平均粒径为 $(12.3 \pm 0.4) \mu\text{m}$, 呈圆整球状分布, 无聚集; 体外释药前期较快, 后期较为缓慢, 药物释放符合 Higuchi 释药模型。结论 通过使用 Box-Behnken 实验设计优化制备得到妥布霉素羧甲基壳聚糖微球, 制备工艺简易, 重现性良好, 具有较好的缓释性能, 可进一步进行实验研究。

关键词: 妥布霉素; 羧甲基壳聚糖微球; 体外释药性能; 乳化-交联固化法; Box-Behnken 实验设计

中图分类号: R945 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 03-0524-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.03.010

Preparation and *in vitro* release properties of tobramycin-loaded carboxymethyl chitosan microspheres for ophthalmology

WU Runlian¹, LIU Ting²

1. Department of Pharmacy, Nanjing University Hospital, Nanjing 210093, China

2. Department of Pharmacy, Jiangning District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210093, China

Abstract: Objective To prepare tobramycin-loaded carboxymethyl chitosan microspheres (Tob-loaded CMCs) for ophthalmology and evaluate their *in vitro* release properties. **Methods** The Tob-loaded CMCs were prepared by emulsification-crosslinking curing method. The yield, particle size distribution and encapsulation efficiency of microspheres were used as evaluation indexes. The Box-Behnken experimental design was used to obtain the optimal formulation of the Tob-loaded CMCs. The particle size distribution of the Tob-loaded CMCs was measured by Malvern laser particle size analyzer. The microstructure was observed by scanning electron microscopy. The *in vitro* release properties of the microspheres were investigated in artificial tears. **Results** The optimal formulation of the Tob-loaded CMCs was optimized as followed: The carboxymethyl chitosan concentration was 3.5%, the formaldehyde concentration was 1.5%, the Span-80 surfactant concentration was 0.8%. The average particle size of Tob-loaded CMCs was $(12.3 \pm 0.4) \mu\text{m}$, which had a regular spherical distribution and no aggregation. *In vitro* release was faster in the early stage and slower in the later stage, which was consistent with the Higuchi model. **Conclusion** The formulation of Tob-loaded CMCs was optimized by Box-Behnken experimental design. The preparation process was simple, and the reproducibility was good. The Tob-loaded CMCs could delay drug release, which laid the experimental foundation for animal experiments.

Key words: tobramycin; carboxymethyl chitosan microspheres; *in vitro* release properties; emulsification-crosslinking curing method; Box-Behnken experimental design

妥布霉素 (Tobramycin, Tob) 属于第二代氨基糖苷类抗生素, 通过与细菌核糖体 30S 亚单位结合, 抑制细菌蛋白质的合成, 对敏感细菌所致的结膜炎效

果明显^[1], 上市产品为妥布霉素滴眼液。然而普通滴眼液在使用过程中药液流失严重, 降低药物治疗效果, 因此需要频繁给药, 给患者带来诸多不便^[2-3]。

收稿日期: 2020-06-18

第一作者: 吴润莲 (1985—), 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药学。

羧甲基壳聚糖微球(carboxymethyl chitosan microspheres, CMCs)生物相容性好,可生物降解,延长药物在眼部滞留时间,控制药物释放速度,已受到国内外学者的广泛关注^[4-6]。本研究采用乳化-交联固化法将妥布霉素制备成羧甲基壳聚糖微球,为妥布霉素用于治疗结膜炎提供一种新的给药途径。

1 材料

1.1 主要仪器

安捷伦 1290 型高效液相-蒸发光散射检测器(安捷伦科技有限公司);i70 电动搅拌器(上海弗鲁克流体机械制造有限公司);SHB-B88 型循环水式多用真空泵(苏州江东精密仪器有限公司);DZF-6020 真空干燥箱(苏州三清仪器有限公司);80-1 离心沉淀仪(江苏中大仪器科技有限公司);KL05A 台式离心机(湖南凯达离心机厂);Malvern Mastersizer 2 000 型激光粒度测定仪(英国 Malvern 公司);JSM-IT500 扫描电子显微镜(日本电子株式会社);SHA-C 型恒温水浴振荡器(常州金坛精达仪器制造有限公司)。

1.2 药物及主要试剂

妥布霉素原料药(四川仁安药业有限责任公司,批号 20190211,质量分数 97.9%);妥布霉素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 130340-201203,质量分数 98.6%);羧甲基壳聚糖(武汉兴众诚科技有限公司);液体石蜡(河南省华龙药业有限公司);甲醛(上海实验试剂有限公司);石油醚(天津化学试剂有限公司);Span-80、无水乙醇、硫酸氢钠(国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法

2.1 妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的制备

参照文献方法^[7]以及预试验结果,本研究所有实验均按照以下工艺制备妥布霉素羧甲基壳聚糖微球:①称取处方量的妥布霉素原料药加入到生理盐水中搅拌溶解,再加入处方量的羧甲基壳聚糖搅拌溶解,得到水相溶液;②按照实验设计称取处方量的液体石蜡和 Span-80,混合均匀,得到油相溶液;③将水相溶液缓慢加入到油相溶液中,持续搅拌 15 min,得到 W/O 型溶液;④向上述溶液中加入处方量甲醛,持续搅拌,交联固化 30 min,分离得到妥布霉素羧甲基壳聚糖微球溶液;⑤取上述微球溶液,依次加入石油醚洗涤 3 次,2% 硫酸氢钠洗涤 3 次,在 40 °C 条件下真空干燥 12 h,即得妥布霉素羧甲基壳聚糖微球。

2.2 HPLC-ELSD 测定妥布霉素^[8]

2.2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为 1% 三氟醋酸-甲醇(90:10);体积流量 0.5 mL/min;进样量 20 μL;柱温 30 °C;漂移管温度 60 °C;雾化室气体压力 344.74 kPa。

2.2.2 方法学考察 称取妥布霉素对照品 25 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,再加入流动相溶解并定容,取妥布霉素对照品溶液加入流动相稀释至含药物质量浓度为 100.0、50.0、25.0、10.0、5.0 μg/mL,进样检测,以峰面积为纵坐标,以药物质量浓度为横坐标,进行回归方程拟合,得到方程为 $y = 1.532x - 0.836$ ($r = 0.9999$),结果显示,妥布霉素质量浓度在 5.0~100.0 μg/mL 药物质量浓度与峰面积线性关系良好。低、中、高(5.0、25.0、100.0 μg/mL)3 个药物质量浓度的妥布霉素对照品按“2.2.1”项下色谱条件,每天连续进样 6 次,考察日内精密度,连续测定 3 d,考察日间精密度。日内精密度 RSD 分别为 1.1%、0.9%、0.8% ($n = 6$),日间精密度 RSD 分别为 1.4%、1.2%、1.0% ($n = 6$);按制剂处方量的 80%、100%、120% 比例精密称取妥布霉素对照品,加入处方量辅料,再加入流动相溶解并定容,制成低、中、高浓度的加样回收率试验溶液,进样测定。结果显示,低、中、高 3 个质量浓度加样回收率平均值分别为 $(100.2 \pm 0.6)\%$ 、 $(99.2 \pm 0.7)\%$ 、 $(101.2 \pm 0.5)\%$ ($n = 3$),RSD 值为 1.1%,表明回收率良好。

2.3 妥布霉素羧甲基壳聚糖微球评价指标

2.3.1 收率计算 精密称量每组实验所得到的妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的质量,根据公式计算每组实验微球的实际收率。

收率 = 微球质量/物料质量

2.3.2 包封率测定 精密称取 40 mg 妥布霉素羧甲基壳聚糖微球,加入到 50 mL 量瓶中,加入 0.1 mol/L 盐酸溶液,水浴超声溶解,定容,微孔滤膜滤过,取 2.0 mL 续滤液加入到 10 mL 量瓶中,加入流动性稀释并定容,使用 HPLC-ELSD 法测定妥布霉素药物含量,根据公式计算微球包封率。

包封率 = 实际药物量/理论投药量

2.3.3 粒径测定 采用马尔文激光粒度仪干法测定妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的粒径分布,每份样品测定 3 次,取平均值。

2.4 实验优化

2.4.1 Box-Behnken 实验设计 以妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的收率(Y_1)、粒径(Y_2)和包封率(Y_3)作为评价指标,以羧甲基壳聚糖质量浓度(X_1)、甲醛质量

浓度(X_2)和Span-80质量浓度(X_3)作为变量因素,通过3因素3水平的Box-Behnken实验设计^[9-10]优化妥布霉素羧甲基壳聚糖微球处方,3个因素低、中、高水平值见表1,实验方案及结果见表2。

表1 Box-Behnken实验设计中变量及水平
Table 1 Variables and levels in Box-Behnken experimental design

变量因素	水平			响应值	目标值
	低(-1)	中(0)	高(+1)		
X_1	1%	3%	5%	Y_1	最大
X_2	0.5%	1.25%	2%	Y_2	最小
X_3	0.2%	0.6%	1%	Y_3	最大

2.4.2 模型的建立及显著性检验 通过Box-Behnken实验设计软件对表2中数据统计分析,以评价羧甲基壳聚糖质量浓度(X_1)、甲醛质量浓度(X_2)和Span-80质量浓度(X_3)与妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的收率(Y_1)、粒径(Y_2)和包封率(Y_3)的相关性。由表3方差分析结果可知: Y_1 、 Y_2 和 Y_3 3个模型的 P 值均小于0.05,模型显著, Y_1 、 Y_2 和 Y_3 与3个变量之间的多元二次方程分别为:

$$Y_1 = 62.27 + 11.05 X_1 + 1.46 X_2 + 4.76 X_3 + 1.08 X_1 X_2 - 0.98 X_1 X_3 - 0.85 X_2 X_3 - 9.43 X_1^2 - 0.46 X_2^2 - 1.86 X_3^2 (R^2 = 0.9865)$$

$$Y_2 = -14.57 + 1.10 X_1 + 0.050 X_2 + 3.67 X_3 - 0.10 X_1 X_2 + 0.05 X_1 X_3 - 0.50 X_2 X_3 + 0.37 X_1^2 - 0.43 X_2^2 - 0.83 X_3^2 (R^2 = 0.9828)$$

$$Y_3 = -61.40 + 4.81 X_1 + 1.57 X_2 + 12.56 X_3 - 1.25 X_1 X_2 + 0.78 X_1 X_3 + 0.75 X_2 X_3 - 1.19 X_1^2 + 0.088 X_2^2 - 4.89 X_3^2 (R^2 = 0.9738)$$

另外,表3方差分析结果表明, X_1 对 Y_1 影响显

表2 Box-Behnken实验设计优化
Table 2 Optimization of Box-Behnken experimental design

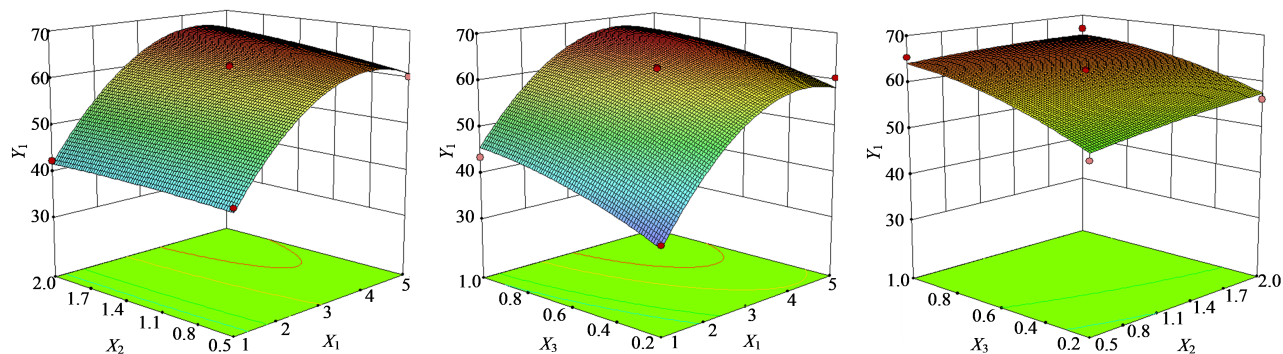
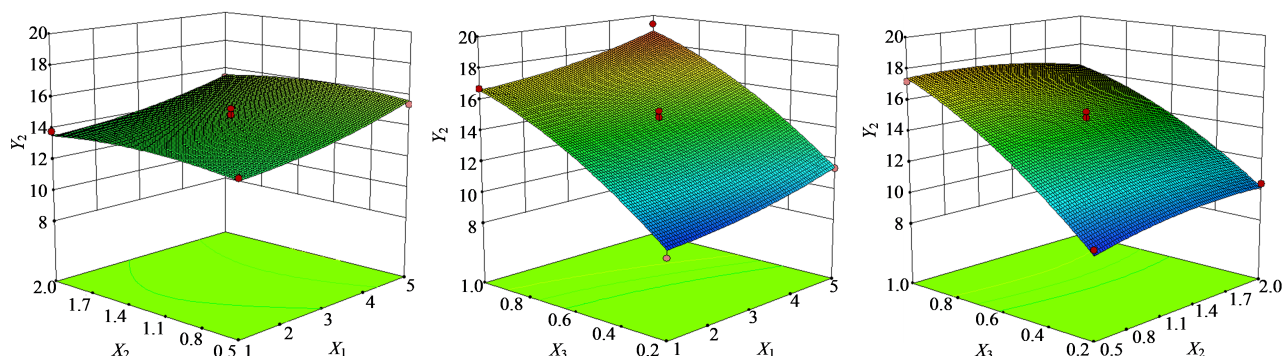
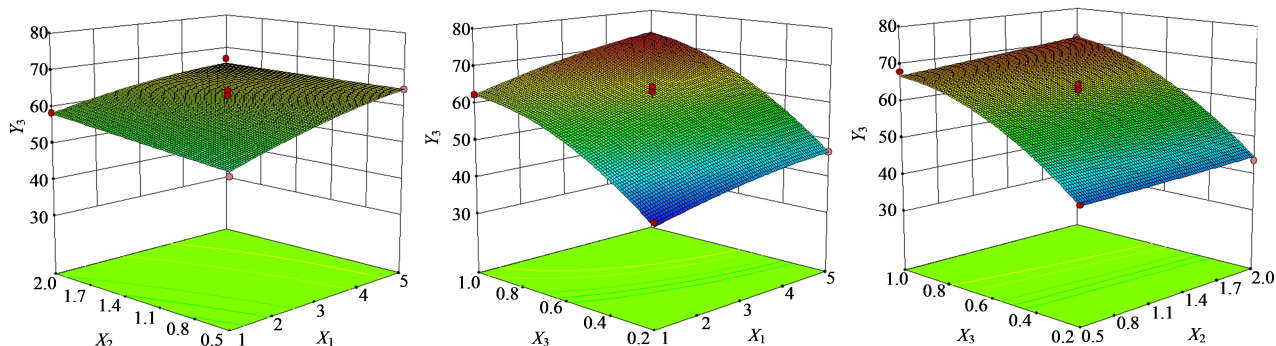
编号	变量因素			响应值		
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3
1	1	1.25	1	42.9	16.3	63.8
2	5	2	0.6	64.8	14.2	65.5
3	3	0.5	1	64.7	16.9	68.4
4	5	0.5	0.6	61.0	14.8	65.1
5	5	1.25	1	64.7	20.1	72.2
6	3	2	0.2	57.1	10.3	44.0
7	5	1.25	0.2	61.1	11.5	47.2
8	3	1.25	0.6	62.2	15.1	65.6
9	3	0.5	0.2	51.2	9.2	43.2
10	3	1.25	0.6	61.8	14.1	63.0
11	1	2	0.6	41.6	14.2	58.8
12	3	2	1	67.1	15.9	71.1
13	3	1.25	0.6	63.2	15.1	56.9
14	1	1.25	0.2	35.4	9.2	39.5
15	1	0.5	0.6	42.0	13.2	51.8

著($P < 0.05$); X_1 和 X_3 对 Y_2 影响显著($P < 0.05$); X_2 和 X_3 对 Y_3 影响显著($P < 0.05$)。通过响应曲面图(图1~3)更能直观分析3个变量与响应值之间的联系。

2.4.3 最优处方预测与验证 本研究要求制备的妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的收率“越大越好”,粒径“越小越好”,包封率“越大越好”,经实验软件预测得到微球的最佳处方组成为:甲基壳聚糖质量浓度为3.5%、甲醛质量浓度为1.5%、Span-80质量浓度为0.8%,微球的收率最大可达到64.8%,粒径最小为12.7 μm ,包封率最大为62.9%。按照最优处方连续

表3 方差分析结果
Table 3 Results of variance analysis

来源	平方和			F值			P值		
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_1	Y_2	Y_3
模型	1 520.49	122.65	1 570.22	40.62	31.67	20.63	0.000 4	0.000 7	0.001 9
X_1	976.82	9.68	185.28	234.88	22.49	0.91	<0.000 1	0.005 1	0.395 4
X_2	17.11	0.020	19.85	4.11	0.046	15.47	0.098 3	0.837 8	0.018 4
X_3	181.45	108.04	1 262.53	3.63	251.07	43.28	0.134 7	<0.000 1	0.009 4
$X_1 X_2$	4.62	0.004 0	6.25	1.11	0.083	0.74	0.340 0	0.772 7	0.429 3
$X_1 X_3$	3.80	0.001	2.40	0.91	0.023	0.28	0.382 9	0.884 8	0.616 9
$X_2 X_3$	2.89	1.00	2.25	0.69	2.32	0.27	0.442 5	0.187 9	0.628 0
X_1^2	328.57	0.50	5.21	79.01	1.15	0.62	0.000 3	0.331 9	0.468 2
X_2^2	0.78	0.69	0.028	0.19	1.61	0.003 3	0.683 8	0.260 2	0.956 1
X_3^2	12.75	2.56	88.20	3.07	5.96	10.43	0.140 3	0.058 6	0.023 2

图1 羧甲基壳聚糖质量浓度(X_1)、甲醛质量浓度(X_2)和Span-80质量浓度(X_3)对微球收率(Y_1)的响应面图Fig. 1 Response surface of carboxymethyl chitosan (X_1), formaldehyde (X_2) and Span-80 (X_3) to microsphere yield (Y_1)图2 羧甲基壳聚糖质量浓度(X_1)、甲醛质量浓度(X_2)和Span-80质量浓度(X_3)对微球粒径(Y_2)的响应面图Fig. 2 Response surface of carboxymethyl chitosan (X_1), formaldehyde (X_2) and Span-80 (X_3) to microsphere size (Y_2)图3 羧甲基壳聚糖质量浓度(X_1)、甲醛质量浓度(X_2)和Span-80质量浓度(X_3)对微球包封率(Y_3)的响应面图Fig. 3 Response surface of carboxymethyl chitosan (X_1), formaldehyde (X_2) and Span-80 (X_3) to encapsulation efficiency of microspheres (Y_3)

制备3批妥布霉素羧甲基壳聚糖微球,经测定收率平均值为 $(63.8 \pm 0.5)\%$,粒径为 $(12.3 \pm 0.4)\mu\text{m}$,包封率为 $(63.2 \pm 0.8)\%$,实测值与预测值接近,模型预测性较好。

2.5 妥布霉素羧甲基壳聚糖微球性质表征

2.5.1 粒径测定 取约1g妥布霉素羧甲基壳聚糖微球加入到马尔文激光粒度仪干法杯内,每份样品测定3次,取平均值。经测定微球的平均粒径为 $(12.4 \pm 0.5)\mu\text{m}$ 。见图4。

2.5.2 微观形态 通过扫描电镜观察妥布霉素羧

甲基壳聚糖微球的微观形态,取少量微球粘贴到导电胶布上,吹去未黏附微球,喷金处理,在电镜观察微球表面形态,结果见图5。在扫描电镜下可以观察到微球呈圆整球状,无粘连。

2.6 药物释放研究

参考文献报道^[11],本研究采用人工泪液测定妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的体外药物释放行为。称取50mg妥布霉素羧甲基壳聚糖微球加入到离心管中,加入10mL人工泪液中,密封,放入到水浴振荡器中,设置水浴温度为 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,振荡速度

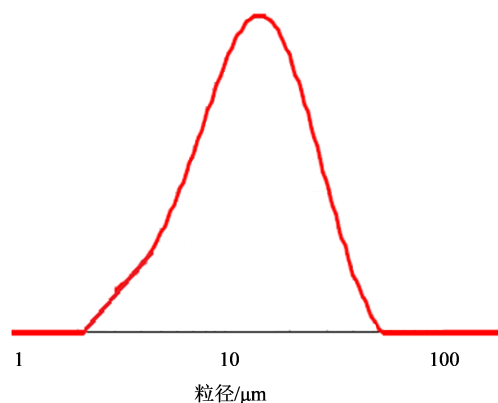


图4 妥布霉素羧甲基壳聚糖微球粒径分布图

Fig. 4 Particle size distribution of tobramycin carboxymethyl chitosan microspheres

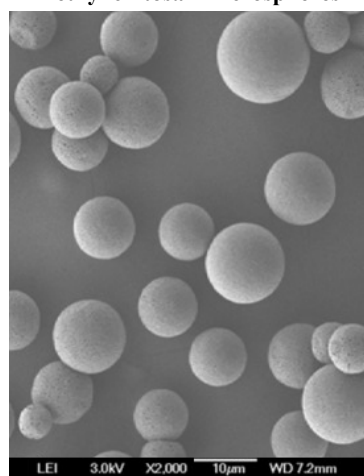


图5 妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的扫描电镜图

Fig. 5 Scanning electron microscope of tobramycin carboxymethyl chitosan microspheres

为 100 r/min, 分别在 10、20、30、60、120、240、360、480、600、720、840、960、1 080、1 200 min 取出离心管。4 000 r/min 离心 10 min, 微球全部沉淀到离心管底部, 用移液枪取出全部上清液(同时再加入 10 mL 空白介质), 经 0.45 μm 微孔过滤膜滤过, 取续滤液稀释至一定浓度。采用 HPLC-ELSD 法测定妥布霉素药物含量, 计算妥布霉素羧甲基壳聚糖微球各时间点的药物释放量, 绘制释放曲线, 见图 6。

由释药曲线可知, 妥布霉素羧甲基壳聚糖微球在释药初期表现为突释效应, 这是吸附到微球表面的妥布霉素快速溶解所致; 后期药物释放较为平缓, 这是包裹在微球内部的药物通过扩散或者壳聚糖降解后药物释放所致, 在 1 200 min 药物累积释放达到 83%。

对妥布霉素在羧甲基壳聚糖微球中的药物释放数据分别采用零级、一级和 Higuchi 释药模型进行拟合, 探讨药物从微球中释放机制。拟合方程的相关系数 r 越接近 1 表明拟合效果越好, 拟合方程结果表 4。

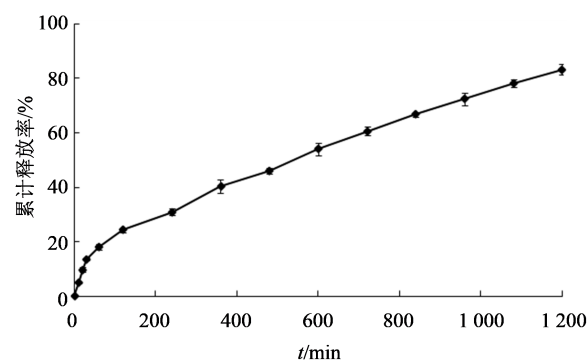
图6 妥布霉素羧甲基壳聚糖微球体外释放曲线($n=6$)Fig. 6 Release curve of tobramycin carboxymethyl chitosan microspheres *in vitro* ($n=6$)

表4 释药模型拟合结果

Table 4 Drug release model fitting results

模型	拟合方程	r
零级释药	$y = 11.244 + 0.3235t$	0.9682
一级释药	$\ln(100-y) = 4.5594 - 0.0067t$	0.9844
Higuchi 释药	$y = -1.3339 + 5.229t^{1/2}$	0.9934

拟合结果显示, 妥布霉素在羧甲基壳聚糖微球中的药物释放符合 Higuchi 释药模型, 说明微球的释药机制为扩散和溶蚀双重机制^[12]。

3 讨论

羧甲基壳聚糖作为一种水溶性壳聚糖衍生物, 具有一定的抗菌活性, 以及良好的生物相容性和生物降解性。近年来, 羧甲基壳聚糖作为缓释微球的载体已受到学者的广泛关注。文献报道^[13]制备羧甲基壳聚糖微球的工艺主要包括: 乳化-交联法、离子凝胶法、凝聚-沉淀法、乳滴聚结法、反相胶束法等。其中乳化-交联法是目前文献报道较多的壳聚糖微球制备方法, 该制备方法是将药物溶解到含有壳聚糖的水溶液中, 并加入到含有表面活性剂的液体石蜡中, 搅拌形成 W/O 型乳液, 在交联剂作用下, 壳聚糖的氨基与交联剂的醛基发生交联作用, 最终将壳聚糖交联固化成微球。

本研究采用乳化-交联固化法将妥布霉素制备成羧甲基壳聚糖微球, 为妥布霉素用于治疗结膜炎提供一种新的给药途径。优化得到微球的处方组成: 羧甲基壳聚糖质量浓度为 3.5%, 甲醛质量浓度为 1.5%, Span-80 质量浓度为 0.8%; 妥布霉素羧甲基壳聚糖微球的平均粒径为 $(12.3 \pm 0.4) \mu\text{m}$, 呈圆整球状分布, 无聚集; 体外释药前期较快, 后期较为缓慢, 药物释放符合 Higuchi 释药模型。本研究通过使用 Box-Behnken 实验设计优化制备得到妥布霉素羧甲基壳聚糖微球, 制备工艺简易, 重现性良好, 具

有较好的缓释性能,可进一步用于动物实验研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 蒋慧娣,邱翠,方严.妥布霉素滴眼液治疗新生儿细菌性结膜炎的疗效观察[J].临床眼科杂志,2019,27(2):161-163.
Jiang H D, Qiu C, Fang Y. Clinical efficacy of tobramycin sulfate eye drops on the treatment of neonatal bacterial conjunctivitis [J]. J Clin Ophthalmol, 2019, 27(2): 161-163.
- [2] Gao Y, Wu Y J, Li J, et al. Preparation and physicochemical evaluation of indomethacin sustained-release microspheres for ophthalmic delivery [J]. Chin Pharm J, 2012, 47(17): 1391-1395.
- [3] 魏红领,刘韶瑞,陆宁.雷帕霉素-壳聚糖-海藻酸钙缓释微球抑制青光眼滤过术区瘢痕增殖的实验研究[J].眼科新进展,2016,36(2):110-115.
Wei H L, Liu S R, Lu N. Experimental study on anti-proliferation of rapamycin-chitosan-microspheres sustained release microspheres during glaucoma filtering surgery in rabbit [J]. Recent Adv Ophthalmol, 2016, 36(2): 110-115.
- [4] Liu Z B, Wang C Y, Liu Y F, et al. Cefepime loaded O-carboxymethyl chitosan microspheres with sustained bactericidal activity and enhanced biocompatibility [J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2017, 28(1): 79-92.
- [5] Lin Q, Huo Q, Qin Y, et al. Development of ligustrazine hydrochloride carboxymethyl chitosan and collagen microspheres: formulation optimization, characterization, and *vitro* release [J]. Bioengineered, 2017, 8(1): 55-60.
- [6] Lin X Y, Li Y Q, Zhou J, et al. Preparation of chitosan/berberine hydrochloride sustained-release microspheres [J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(11): 2560-2566.
- [7] 李新民,宋全道,叶国华,等.尼莫地平壳聚糖微球的制备及其体外释药特性的研究[J].中国现代应用药学,2010,27(6):513-517.
Li X M, Song Q D, Ye G H, et al. The preparation of nimodipine chitosan microspheres and their sustained release characteristics *in vitro* [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2010, 27(6): 513-517.
- [8] 郑妍,高琳.HPLC-ELSD法测定妥布霉素滴眼液的含量[J].西北药学杂志,2011,26(4):259-261.
Zheng Y, Gao L. Determination of tobramycin content in eye drops by HPLC-ELSD [J]. Northwest Pharm J, 2011, 26(4): 259-261.
- [9] 王芳,翟文婷,李艳丽,等.Box-Behnken效应面法优化穿心莲内酯-PLGA微球处方研究[J].中草药,2013,44(13):1743-1747.
Wang F, Di W T, Li Y L, et al. Formula optimization of andrographolide-loaded PLGA microsphere by Box-Behnken design and response surface method [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2013, 44(13): 1743-1747.
- [10] 刘元芬,高缘,朱家璧.Box-behnken效应面法优化补骨脂素中空黏附微球的制备[J].华西药学杂志,2013,28(6):563-566.
Liu Y F, Gao Y, Zhu J B. Optimization of psoralen loaded hollow-bioadhesive microspheres formulation using Box-behnken experimental design [J]. West China J Pharm Sci, 2013, 28(6): 563-566.
- [11] 王毅峰,薛伟明,朱秀萍,等.载环孢素A海藻酸钙-壳聚糖微球的制备及体外释放特性[J].中国医院药学杂志,2011,31(17):1424-1429.
Wang Y F, Xue W M, Zhu X P, et al. Preparation and *in vitro* release behavior of calcium alginate-chitosan microsphere loaded with cyclosporin A [J]. Chin J Hosp Pharm, 2011, 31(17): 1424-1429.
- [12] 姚志勇,支钦,李新宇.注射用醋酸奈西利肽缓释微球的制备及体外释药研究[J].中南药学,2015,13(4):392-395.
Yao Z Y, Zhi Q, Li X Y. Preparation and *in vitro* release of nesiritide acetate sustained-release microspheres for injection [J]. Cent South Pharm, 2015, 13(4): 392-395.
- [13] 魏海霞,赵凯,纪鑫,等.壳聚糖微球的制备及其在药物载体中的应用进展[J].中国新药杂志,2008,17(13):1105-1108.
Wei H X, Zhao K, Ji X, et al. Progress of preparation methods of chitosan microspheres and its application to drug carrier [J]. Chin New Drugs J, 2008, 17(13): 1105-1108.

【责任编辑 兰新新】