

• 药剂与工艺 •

重组水蛭素-2 鼻腔给药纳米粒制备工艺研究

陈明霞, 张玉杰*, 李维峰, 潘激杨, 马小虹, 韦灵玉

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: 目的 优选重组水蛭素-2 (rHV2) 鼻腔给药纳米粒最佳制备工艺。方法 采用壳聚糖与三聚磷酸钠复凝聚法, 以包封率、载药量等为评价指标, 以单因素考察和正交试验设计, 对壳聚糖黏附纳米粒制备过程中有关影响因素及工艺参数进行优化。结果 壳聚糖的类型、壳聚糖溶液的 pH 值、壳聚糖与多聚磷酸钠的最终质量比以及搅拌速率对 rHV2 纳米粒的包封率和载药量均有较显著影响; 优选工艺的包封率可达到 70% 以上, 载药量 > 8%。结论 经优选的工艺稳定可靠, 可用于 rHV2 鼻腔给药纳米粒的制备。

关键词: 重组水蛭素-2; 鼻腔给药纳米粒; 制备工艺; 壳聚糖; 包封率

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1503-05

Preparation technology of recombinant hirudin-2 nasal nanoparticles

CHEN Ming-xia, ZHANG Yu-jie, LI Wei-feng, PAN Ji-yang, MA Xiao-hong, WEI Ling-yu

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: **Objective** To optimize the preparation technology of recombinant hirudin-2 (rHV2) nanoparticles for nasal drug delivery. **Methods** Nanoparticles were prepared using chitosan (CS) and sodium tripolyphosphate (TPP) by complex coacervation. Taking the rHV2 encapsulation efficiency (EE) and drug loading as the evaluation indexes, the influencing factors and technological parameters in the preparation process were investigated by single factor and orthogonal tests. **Results** The results proved that not only the CS pH value, CS types, and the final proportion of CS to polyphosphate quality, but also the stirring speed in preparation had noticeable effect on the EE and drug loading of rHV2 nanoparticles. The EE and drug loading of optimized formulation could reach over 70% and 8%, respectively. **Conclusion** The optimized technology is stable and reliable, and could be used for the preparation of rHV2 nasal nanoparticles.

Key words: recombinant hirudin-2 (rHV2); nasal nanoparticles; preparation technology; chitosan (CS); encapsulation efficiency (EE)

重组水蛭素-2 (recombinant hirudin-2, rHV2) 是通过基因重组技术生产的高活性凝血酶特异性抑制剂。其为 65 个氨基酸残基组成的酸性多肽, 相对分子质量为 6 900。临床上主要用于治疗不稳定性心绞痛 (USA)、急性心肌梗死 (AMI)、血管成形术后血栓形成等多种血凝性疾病^[1]。临床上主要以静脉注射剂型给药。

近年来其非注射给药形式受到重视, 先后有口服、鼻腔给药等制剂研究报道^[2-3]。鼻腔给药由于可避免肝脏首过效应、吸收快、生物利用度高而受到广泛关注^[4]。rHV2 作为相对分子质量较大的多肽药

物, 黏膜渗透性较差并容易受到给药部位代谢酶的降解作用, 因此 rHV2 溶液制剂鼻腔给药的生物利用度仅有 2%^[3]。近年来发现壳聚糖具有良好的生物黏附性、生物相容性和体内可降解性, 可增加亲水性的蛋白质多肽药物通过肠道上皮和鼻腔的吸收, 还能直接作用于细胞的紧密连接, 从而促进药物通过细胞间隙的转运, 提高药物的生物利用度^[5-6]。因此本研究选择壳聚糖作为 rHV2 鼻腔给药纳米粒的包封材料, 以包封率为指标对影响纳米粒成型的各因素进行考察, 为制备 rHV2 鼻腔给药纳米粒制剂提供实验依据。

收稿日期: 2012-01-24

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09502-008)

*通讯作者 张玉杰 Tel: (010)84738618 E-mail: zhyj227@126.com

网络出版时间: 2012-06-15 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120615.1704.001.html>

1 仪器与材料

HP—1100 系列高效液相色谱仪(包括四元梯度洗脱系统,在线真空脱气机,DAD 型检测器,Agilent 色谱工作站,7725i 手动进样器,美国惠普公司);HJ—3 恒温磁力搅拌器(河南省予华仪器有限公司);XL—90 型超高速离心机(美国 Beckman 公司);ER—182A 型精密电子天平(日本 A&D 公司)。

rHV2(北京大学生命科学院,质量分数>98%);壳聚糖(CS,水溶性,脱乙酰度为84%,相对分子质量为 5×10^4 ;非水溶性,脱乙酰度为90%,相对分子质量分别为 5×10^4 、 1×10^5 、 2.5×10^5 ;济南海得贝海洋生物工程有限公司);三聚磷酸钠(TPP,北京化学试剂公司);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 rHV2 纳米粒的制备^[7]

取一定质量浓度的 CS 0.2%醋酸溶液,用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值,将一定量 rHV2 溶液加至 CS 溶液中,室温磁力搅拌下滴加 0.8 mg/mL TPP 溶液,至有白色乳光产生,即得 rHV2 纳米粒。

2.2 rHV2 的 HPLC 测定^[8]

2.2.1 色谱条件 Kromasil C₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.1%三氟乙酸乙腈溶液(A)-0.1%三氟乙酸水溶液(B),梯度洗脱:0~30 min,10%~48% A;体积流量 1 mL/min;柱温 23 °C;检测波长 214 nm。在此色谱条件下,辅料等成分对 rHV2 的测定无干扰,结果见图 1。

2.2.2 供试品溶液的制备 取制备好的纳米粒悬液,

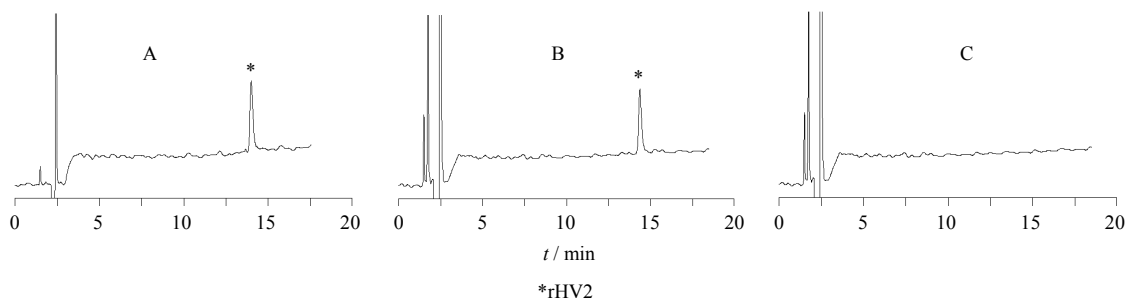


图1 rHV2 对照品 (A)、供试品 (B) 和空白 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of rHV2 reference substance (A), sample (B), and blank (C)

100 000×g 离心力,10 °C 的条件下,超速离心 1 h 后,吸取上清液,作为供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 精密称取 rHV2 适量,加水分别配制质量浓度为 0.06、0.12、0.18、0.24、0.30 mg/mL 的溶液,作为对照品溶液。分别进样 10 μL,依法测定峰面积,以峰面积积分值对 rHV2 质量浓度进行线性回归,得回归方程为 $A=4\ 887.25\ C-10.725$, $r=0.999\ 8$,线性范围为 0.06~0.30 mg/mL。

2.2.4 精密度试验 选择线性范围内高、中、低 3 种质量浓度(0.30、0.18、0.06 mg/mL) rHV2 溶液,依照上述色谱条件进行测定,结果日内 RSD 为 3.27%、2.52%、1.73% ($n=5$),日间 RSD 为 2.82%、2.73%、2.46% ($n=5$)。

2.2.5 稳定性试验 取 rHV2 溶液,分别于制备后 0、1、2、3、8 h,依法测定 rHV2 的峰面积,结果 RSD 为 2.08%,表明 rHV2 溶液制备后 8 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 精密量取一定量 rHV2 纳米粒悬液,共 6 份,加入适量 1%醋酸水溶液,超声至纳米粒完全溶解(溶液澄清,无乳光),依法测定

rHV2 的量,结果测得 rHV2 量的 RSD 为 2.52%。

2.2.7 回收率试验 精密称取 9 份 rHV2,分别加入适量空白纳米粒悬液,配制成高、中、低 3 个质量浓度(0.30、0.18、0.06 mg/mL)的含药纳米粒溶液,各 3 份,依法测定,计算平均回收率为 99.65%,RSD 为 2.89%。

2.3 影响纳米粒制备因素的考察

2.3.1 包封率和载药量的测定 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,用 HPLC 测定游离 rHV2 的质量浓度,并按下面公式计算药物包封率和载药量。

包封率=(加入 rHV2 的量-上清液中 rHV2 的量)/加入 rHV2 的量

载药量=(加入 rHV2 的量-上清液中 rHV2 的量)/加入载体材料的量

2.3.2 pH 值对 rHV2 CS 纳米粒包封率的影响 取质量浓度为 1 mg/mL 的非水溶性 CS(相对分子质量为 1×10^5) 0.2%醋酸溶液,用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值分别为 4.5、5.0、5.5,将 rHV2 溶液加至 CS 溶液中,室温磁力搅拌下滴加 0.8 mg/mL 的

TPP 溶液,至有白色乳光产生(此时 CS 与 TPP 的质量比为 3:1),即得 rHV2 纳米粒^[7]。不同 pH 值的 CS 溶液制备的纳米粒包封率分别为(25.56±3.76)%、(66.23±1.14)%、(46.63±2.74)%($n=3$)。可以看出 pH 值对包封率影响较大,其中 pH 值为 5.0 时包封率最高,最有利于药物的包封,故最终选择将 CS 溶液的 pH 值调节至 5.0。

2.3.3 CS 类型对 rHV2 CS 纳米粒包封率的影响
选取市售规格的水溶性 CS(相对分子质量为 5×10^4)和非水溶性 CS(相对分子质量分别为 5×10^4 、 1×10^5 、 2.5×10^5),将水溶性 CS 用纯净水配制成不同质量浓度的 CS 溶液(未调 pH 值);将非水溶性 CS 用酸水溶解配制成不同质量浓度的 CS 溶液,并用碱液调节 pH 值为 5.0 后,按“2.1”项中制备方法制备纳米粒,考察不同类型壳聚糖对纳米粒包封率的影响,结果见表 1。结果表明相对分子质量为 1×10^5 和 2.5×10^5 的 CS 均能达到较高的包封率,且无显著差异。其中相对分子质量为 1×10^5 的 CS 在质量浓度为 1 mg/mL 时,制备的纳米粒获得较高的包封率;相对分子质量为 2.5×10^5 的 CS 在质量浓度为 1.5 mg/mL 时纳米粒包封率较高。而两种相对分子质量 CS 制备的纳米粒载药量不同,相对分子质量为 1×10^5 的 CS 制备的纳米粒载药量相对较高,为 12.37%;相对分子质量为 2.5×10^5 的 CS 制备的纳米粒载药量相对较低,为 8.42%;故选择了用相对分子质量为 1×10^5 的非水溶性 CS 作为包封材料。

2.3.4 CS 溶液中 CS 与 TPP 的初始质量浓度比、CS 与 TPP 的最终质量比的优选 采用正交试验的方法,对工艺参数进行进一步优选。选用相对分子质量为 1×10^5 的非水溶性 CS,固定其 pH 值为 5.0,分别选取 CS 溶液的质量浓度(A)、CS 与 TPP 的初始质量浓度比(B)、CS 与 TPP 的最终质量比(C)为 3 个主要因素,每个因素相应选取 3 个水平,采用 $L_9(3^4)$ 表安排正交试验。因素水平表见表 2。

在制备纳米粒的过程中,CS 的质量浓度不同,CS 与 TPP 形成均匀纳米粒时的质量比也会有所变化,如质量浓度为 1 mg/mL 的 CS 在与 TPP 的质量比大于 2.8:1 时,可以形成均匀的纳米粒体系(质量比过大时,会难以生成纳米粒,包封率很低);小于 2.8:1 时,形成的纳米粒不均匀,有肉眼可见的大粒子,放置不稳定,易聚集形成絮状沉淀;同样的现象,对于质量浓度为 2 mg/mL 的 CS 溶液,最佳质量比在 3.7:1 左右。

表 1 CS 类型对 rHV2 纳米粒包封率的影响 ($n=3$)
Table 1 Effects of CS types on EE of rHV2 nanoparticles ($n=3$)

CS 类型		CS 质量浓度 / (mg·mL ⁻¹)	CS 与 TPP 终质量比	包封率 / %
水溶性	5×10^4	1.0	4.17:1	37.96
		1.5	4.17:1	17.24
		2.0	6.25:1	5.93
		2.5	8.33:1	0
非水溶性	5×10^4	0.5	2.68:1	15.02
		1.0	3.75:1	42.51
		2.0	9.38:1	17.24
		2.5	8.33:1	6.70
	1×10^5	0.5	2.50:1	32.70
		1.0	2.88:1	70.51
		1.5	3.41:1	38.95
		2.0	3.75:1	39.99
		2.5	5.36:1	7.71
	2.5×10^5	0.5	2.21:1	0
		1.0	2.42:1	13.83
		1.5	3.13:1	72.50
		2.0	5.36:1	5.08
		2.5	—	极易形成沉淀

因此在正交试验过程中,难免会有不能生成纳米粒、生成的纳米粒不均匀等现象出现,只用包封率 1 个指标对试验结果进行评价有失准确,本试验将包封率、载药量和形成纳米粒的形态 3 个指标分别设置权重后进行综合评分,综合 3 项测试指标对试验结果进行考察(综合评分=包封率×0.4+载药量×0.4+形态×0.2,其中包封率和载药量为主要考察因素,权重均设置为 0.4,形态权重设置为 0.2)。结果见表 2,方差分析见表 3。

根据纳米粒的均匀程度分成不同等级,其中将纳米粒均匀者记为 1,大量聚集者记为 0.5,少部分聚集者记为 0.6,有絮状星点分布者记为 0.7,偶见絮状者记为 0.8,基本澄清但粒径较大者记为 0.9。

结果显示,因素 C 对试验结果有显著影响($P<0.05$),其中质量比为 3:1(C_3)时会出现较好的结果,即有较高的包封率、载药量及较好的纳米粒形态;因素 A、B 无显著影响。

试验过程中也发现当 CS 的质量浓度为 1 mg/mL 时,最容易与 TPP 以 3:1 的质量比结合,形成的纳米粒最均匀,包封率也较高,为 65.8%;而 CS 的

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A / (mg·mL ⁻¹)	B	C	D (误差)	包封率 / %	载药量 / %	形态	综合评分
1	0.5 (1)	1.67 : 1 (1)	4.0 : 1 (1)	(1)	24.4	0.65	1.0	0.212
2	0.5 (1)	1.25 : 1 (2)	2.5 : 1 (2)	(2)	32.7	7.79	0.6	0.282
3	0.5 (1)	1.00 : 1 (3)	3.0 : 1 (3)	(3)	59.4	14.85	0.7	0.437
4	1.0 (2)	1.67 : 1 (1)	2.5 : 1 (2)	(3)	37.6	4.48	0.5	0.268
5	1.0 (2)	1.25 : 1 (2)	3.0 : 1 (3)	(1)	65.8	8.22	1.0	0.496
6	1.0 (2)	1.00 : 1 (3)	4.0 : 1 (1)	(2)	19.2	2.57	0.9	0.267
7	2.0 (3)	1.67 : 1 (1)	3.0 : 1 (3)	(2)	72.7	4.55	0.7	0.449
8	2.0 (3)	1.25 : 1 (2)	4.0 : 1 (1)	(3)	36.5	2.43	0.9	0.336
9	2.0 (3)	1.00 : 1 (3)	2.5 : 1 (2)	(1)	26.0	1.55	0.5	0.210
K_1	0.931	0.929	0.815	0.918				
K_2	1.031	1.114	0.760	0.998				
K_3	0.995	0.914	1.382	1.041				
R	0.100	0.200	0.622	0.123				

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.001 72	2	0.667	
B	0.008 19	2	3.172	
C	0.078 90	2	30.557	$P < 0.05$
D (误差)	0.002 58	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

质量浓度为 2 mg/mL 时, 与 TPP 以 3 : 1 的质量比结合较困难, 易生成微米级甚至更大的粒子, 所得体系不稳定, 放置易有沉淀生成; CS 的质量浓度为 0.5 mg/mL 时包封率较低, 故将 CS 的质量浓度确定为 1 mg/mL (A_2)。

CS 与 TPP 的初质量浓度比对试验结果影响不显著, 但当 CS 与 TPP 的质量比固定时, TPP 的初浓度越小, 加入 TPP 体积将越大, 将给大生产时纳米粒的浓缩带来一定的困难, TPP 质量浓度太高, 当 TPP 滴入 CS 溶液中时会因为局部质量浓度过高而影响纳米粒的粒径, 进而影响纳米粒的形态及稳定性, 最终选择了 CS 与 TPP 的初质量浓度比为 1.25 : 1 (B_2)。从正交试验结果直观分析也得出 $A_2B_2C_3$ 结果最佳。

2.3.5 药物辅料比 (rHV2 与 CS 质量比) 对 rHV2 纳米粒包封率的影响 选取相对分子质量为 1×10^5 的非水溶性 CS, 配制质量浓度为 1 mg/mL 的 CS 0.2% 醋酸水溶液, 并用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值为 5.0, 分别在 CS 溶液中加入不同量的 rHV2 制

备纳米粒, CS 与 TPP 最终质量比为 3 : 1, 考察不同药物辅料比 1 : 15、1 : 6、1 : 2、1 : 1 对纳米粒包封率的影响。结果包封率分别为 $(66.62 \pm 0.42)\%$ 、 $(66.76 \pm 1.44)\%$ 、 $(66.68 \pm 0.75)\%$ 、 $(68.76 \pm 0.335)\%$ ($n=3$)。可以看出, 包封率随着药物加入量在一定范围内变化不是很明显, 可根据临床需要适当调整药物的加入量。

2.3.6 药物加在分散相 (CS 溶液) 中和加在凝聚相 (TPP 溶液) 中对 rHV2 纳米粒包封率的影响 选取相对分子质量为 1×10^5 的非水溶性 CS, 配制质量浓度为 1 mg/mL 的 CS 0.2% 醋酸水溶液, 并用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值为 5.0, 分别以药物加在 CS 溶液中和加在 TPP 溶液中两种方式制备 rHV2 纳米粒, CS 与 TPP 最终质量比为 3 : 1, 考察两种制备方法对包封率的影响。结果包封率分别为 $(65.98 \pm 1.23)\%$ 、 $(72.08 \pm 2.7)\%$ ($n=3$)。可见, 药物加在 TPP 溶液中包封率更高, 故确定了将药物加在 TPP 溶液中的制备方法。

2.3.7 磁力搅拌速率对 rHV2 纳米粒包封率的影响 选取相对分子质量为 1×10^5 的非水溶性 CS, 配制质量浓度为 1 mg/mL 的 CS 0.2% 醋酸水溶液, 并用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值为 5.0, 分别在低、中、高 (200、800、1 500 r/min) 3 种不同磁力搅拌速率下制备 rHV2 纳米粒, 考察不同搅拌速率对纳米粒包封率的影响。结果包封率分别为 $(66.55 \pm 1.25)\%$ 、 $(74.39 \pm 1.49)\%$ 、 $(60.03 \pm 0.29)\%$ 。可以看出, 搅拌速率对纳米粒包封率的影响较明显,

选择合适搅拌速率具有重要意义。推测可能是由于搅拌速率过低时, TPP 与 CS 接触、交联形成纳米粒的机会减少, 搅拌速率过高时, 形成的纳米粒粒径过小, 不能达到很好的包封效果。因此选择中磁力搅拌速率(800 r/min)进行纳米粒的制备。

2.3.8 搅拌时间对 rHV2 纳米粒包封率的影响 选取相对分子质量为 1×10^5 的非水溶性 CS, 配制质量浓度为 1 mg/mL 的 CS 0.2% 醋酸水溶液, 并用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值为 5.0, 制备 rHV2 纳米粒后, 以相同搅拌速率继续搅拌不同的时间(0、5、10 min), 考察搅拌时间对纳米粒包封率的影响。结果包封率分别为 $(58.67 \pm 1.83)\%$ 、 $(66.58 \pm 1.27)\%$ 、 $(67.00 \pm 2.54)\%$ 。可见搅拌时间对包封率的影响不显著, 滴加 TPP 后立即停止搅拌, 包封率会稍微偏低, 这可能是因为最后滴加的 TPP 未与 CS 反应所致, 故最终选择继续搅拌 5~10 min。

2.3.9 最佳工艺确定及验证试验 基于以上对各个影响纳米粒包封率因素的考察, 确定最佳制备工艺: 室温下, 选取相对分子质量为 1×10^5 的非水溶性 CS, 配制质量浓度为 1 mg/mL 的 CS 0.2% 醋酸水溶液, 并用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值为 5.0; 取 rHV2 加入质量浓度为 0.8 mg/mL 的 TPP 溶液中, 在中磁力搅拌速率(800 r/min)下将相当于 CS 溶液一半体积的 TPP 溶液逐滴滴加在 CS 酸水溶液中, 滴加完毕, 继续搅拌 5~10 min, 即得 rHV2 纳米粒胶体溶液。

按照优选处方工艺制备 rHV2 纳米粒, 对最佳参数进行 3 批验证试验。结果包封率分别为 72.70%、79.70%、76.55%; 载药量分别为 8.81%、9.03%、8.56%。可见, 该制备工艺稳定可靠, 包封率可达到 70% 以上。制备的 rHV2 壳聚糖纳米粒多为类圆形的球体, 平均粒径为 213.2 nm ($n=3$), 纳米粒带正电荷, Zeta 电位值为 +30.61 mV ($n=3$), 体系相对稳定性较高。

3 讨论

壳聚糖纳米粒的制备方法主要有沉淀法、共价交联法、离子交联法、乳滴聚结法等, 本实验采用离子交联法, 又称复凝聚法, 即在 CS 溶液中, 加入 TPP 阴离子, 利用 CS 的游离氨基与 TPP 阴离子发生分子间或分子内交联反应, 从而制备 CS 珠球状凝胶。由于该实验反应条件温和, 不使用有机溶剂, 易于得到均一、可调整粒径(120~1 000 nm)

的纳米粒, 因此在 CS 纳米粒的制备中得到广泛应用^[9-10]。

经单因素及正交试验考察, 结果表明 CS 的 pH 值、CS 类型、CS 与 TPP 的最终质量比、搅拌速率对纳米粒的包封率和载药量均有较显著影响。其中正交试验的设计较为复杂, 结果显示 CS 与 TPP 的最终质量比对实验结果影响较显著。CS 与 TPP 的最终质量比起作用的同时还与 CS 的质量浓度有关, CS 的质量浓度不同时, 达到较高包封率所需 CS 与 TPP 的最终质量比也不同。CS 与 TPP 的最终质量比还直接影响到纳米粒的形成, TPP 量过少, 溶液清晰, 难以形成纳米粒; TPP 量过多, 形成纳米粒的粒径增大且容易聚集生成沉淀, 体系不稳定。在不影响纳米粒粒径增大、进一步形成沉淀的情况下, 增加 TPP 的量有助于包封率的提高。

参考文献

- [1] Fischer K G. The role of recombinant hirudins in the management of thrombotic disorders [J]. *Biol Drugs*, 2004, 18(4): 235-68.
- [2] 王征, 杨丽, 唐星, 等. 重组水蛭素肠溶包衣微丸的制备及体外释放行为考察 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(6): 413-416.
- [3] Zhang Y J, Ma C H, Lu W L, *et al.* Permeation-enhancing effects of chitosan formulations on recombinant hirudin-2 by nasal delivery *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(11): 1402-1408.
- [4] 罗洁琦, 沙先谊, 方晓玲. 三七总皂苷离子敏感型鼻用原位凝胶的制备 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1299-1304.
- [5] 吴立明, 习温瑜, 管正红. 壳聚糖纳米粒制备的研究进展 [J]. 齐鲁药事, 2008, 27(11): 682-685.
- [6] 周闻舞, 顾海铮. 壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 290-295.
- [7] 蒋新宇, 周春山, 张俊山. 应用三聚磷酸钠为交联剂制备载药物纳米粒的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(22): 69-71.
- [8] 张玉杰, 吴建梅, 张强, 等. 重组水蛭素-2 在家兔鼻黏膜中降解的体外实验 [J]. 药学报, 2006, 41(11): 1099-1103.
- [9] Wang X M, Chi N, Tang X. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 70(3): 735-740.
- [10] Goycoolea F M, Lollo G, Remuñán-López C, *et al.* Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(7): 1736-1743.