

氢溴酸东莨菪碱纳米粒-微球系统的研制

吕维玲, 胡晋红*, 朱全刚, 李凤前

(第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433)

摘要: 制备氢溴酸东莨菪碱纳米粒-微球系统 (scopolamine hydrobromide nanoparticles-in-microsphere system, SH-NiMS) 并考察其体外释放特性。以三聚磷酸钠 (TPP) 为交联剂, 以壳聚糖为载体材料, 采用离子交联法制备 SH 纳米粒, 以包封率和载药量为考察指标, 采用正交设计综合评分法优化纳米粒处方。调整喷雾干燥仪器参数, 以 HPMC 为载体材料, 将制得的 SH 纳米粒在喷雾干燥作用下制备成包裹纳米粒的微球系统, 即 NiMS 系统。在电镜下观察 SH-NiMS 的外观、红外检测其结构变化并测定其体外释放特性。纳米粒制备处方经正交试验优化为: 壳聚糖/TPP 为 3 : 1 (w/w), HPMC 浓度 0.3%、SH 浓度 0.2%。喷雾干燥的制备条件调节为蠕动泵速度 15%, 进口温度 110 °C, 在此条件下制得的 SH-NiMS 包封产率、载药量和平均粒径分别为 94.2%、20.4%和 1 256.5 nm。SH-NiMS 外观圆整, 性质稳定。结果表明, SH-NiMS 制备方法稳定可控, 为开发药物新剂型提供了新的思路。

关键词: 氢溴酸东莨菪碱; 纳米粒-微球系统; 纳米粒; 喷雾干燥

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 07-0914-06

Preparation of scopolamine hydrobromide nanoparticles-in-microsphere system

LÜ Wei-ling, HU Jin-hong*, ZHU Quan-gang, LI Feng-qian

(Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: This study is to prepare scopolamine hydrobromide nanoparticles-in-microsphere system (SH-NiMS) and evaluate its drug release characteristics *in vitro*. SH nanoparticles were prepared by ionic crosslinking method with tripolyphosphate (TPP) as crosslinker and chitosan as carrier. Orthogonal design was used to optimize the formulation of SH nanoparticles, which took the property of encapsulation efficiency and drug loading as evaluation parameters. With HPMC as carrier, adjusted the parameters of spray drying technique and sprayed the SH nanoparticles in microspheres encapsulated by HPMC was formed and which is called nanoparticles-in-microsphere system (NiMS). SH-NiMS appearances were observed by SEM, structure was observed by FT-IR and the release characteristics *in vitro* were evaluated. The optimized formulation of SH nanoparticles was TPP/CS 1 : 3 (w/w), HPMC 0.3%, SH 0.2%. The solution peristaltic speed of the spray drying technique was adjusted to 15%, and the temperature of inlet was 110 °C. The encapsulation product yield, drug loading and particle sizes of SH-NiMS were 94.2%, 20.4%, and 1 256.5 nm, respectively. The appearances and the structure of SH-NiMS were good. The preparation method of SH-NiMS is stable and reliable to use, which provide a new way to develop new dosage form.

Key words: scopolamine hydrobromide; nanoparticles-in-microsphere system; nanoparticle; spray drying technique

收稿日期: 2010-01-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (90612002); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2004CB5189906).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-81873747, E-mail: hjhong2006@gmail.com

美国学者 Bhavsar 提出“纳米粒-微球系统”(nanoparticles-in-microsphere system, NiMS)^[1, 2], 该系统是近来用于药物包载的新技术。它采用高分子材料以及包载技术将纳米粒包裹到微球中, 形成 NiMS, 可作为药物在胃肠道特定部位高效吸收的优良载体。NiMS 系统对于药物包载及保护具有独特的技术优势, 对药物释放比普通微囊有更好的调控作用, 并且可以降低局部刺激, 减少毒副反应, 在蛋白药物包载及缓控释制剂中应用较多。此技术越来越引起国内外学者的重视。

本实验以氢溴酸东莨菪碱 (scopolamine hydrobromide, SH) 为模型药, 制备氢溴酸东莨菪碱纳米粒微球系统 (SH-NiMS)。首先选用来源广泛、生物相容性好和可生物降解的壳聚糖 (chitosan, CS) 作为载体材料, 三聚磷酸盐 (tripolyphosphat, TPP) 为交联剂, 采用离子交联法 (ionotropic gelation process) 制备药物纳米粒。利用壳聚糖的游离氨基和 TPP 磷酸根离子发生分子间或分子内交联反应, 从而制备载药壳聚糖纳米凝胶粒。该制备条件温和, 易于控制, 不需任何有机试剂。进一步采用喷雾干燥技术将纳米粒胶体溶液系统制成微球, 喷雾干燥微囊化工艺, 可将药物纳米粒及其胶体液中的游离药物, 组装成多个含纳米粒单元的微球, 组成含氢溴酸东莨菪碱的 NiMS 系统。该过程可以实现规模化放大制备, 为工业化生产奠定基础。

SH 经过 NiMS 系统的双重包裹, 可降低 SH 不良反应和局部刺激, 延长释药时间, 减少给药频率, 提高患者顺应性。

材料与方法

药品与试剂 SH 原料药 (杭州和素化学技术有限公司, 含量 $\geq 99\%$, 批号 20090110); SH 对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量 $\geq 99\%$, 批号 1000492200308); 壳聚糖 (脱乙酰度 $>90\%$, 黏度 <100 cps, 平均分子质量为 40~80 kDa, 上海蓝季科技发展有限公司); 羟丙甲纤维素 (HPMC, K4MCR, 上海申美医药开发科技有限公司); 多聚磷酸钠 (TPP, 国药集团化学试剂有限公司); 乙酸铵 (中国医药集团上海化学试剂有限公司); 甲酸 (上海凌峰化学试剂有限公司)。

仪器 SPD-10AVP 型高效液相色谱仪 (日本岛津); ZRS-8G 型智能溶出试验仪 (天津大学精密仪器

厂); IFS55 傅立叶红外光谱仪 (瑞士 Bruker 公司), LS32 激光衍射粒度分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司); 1000B 型扫描电子显微镜 (Amray)。

波长选择 取 SH 对照品适量, 加水溶解至 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 于 190~400 nm 波长内进行扫描, 在 190~220 nm 波长处有吸收。考虑溶剂的紫外末端吸收和辅料及杂质的紫外吸收, 选择 210 nm 作为检测波长。

标准曲线确定

色谱条件: 色谱柱: Hypersil C₁₈ ODS2 (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇/2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液 (磷酸调至 pH 3.34, 40:60); 流速: 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 210 nm; 进样量: 20 μL 。

精密称取干燥至恒重的 SH 对照品适量, 分别配成质量浓度为 1、5、10、20、30、40 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列溶液, 按优化好的 HPLC 色谱条件进行测定。以 SH 浓度 (C) 对色谱峰面积 (A) 进行线性回归, 得回归方程为: $A = 16\,211C - 1\,382.2$, $r = 0.999\,8$ ($n = 3$), 表明质量浓度在 1~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, SH 与其峰面积呈良好线性关系。

按处方加入各辅料适量, 配成 3 种不同质量浓度的 SH 溶液 (15、20 和 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 每组进行回收率试验, 测得平均回收率分别为 (102.8 $\pm$ 0.3)%, (101.3 $\pm$ 0.2)%, (103.5 $\pm$ 0.1)% ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)。

SH-NiMS 的制备 首先采用离子交联法制备 SH 纳米粒, 将 SH 溶于含有一定浓度 HPMC 的 0.5% 壳聚糖溶液中, 溶胀过夜, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、600 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下, 将 0.5% TPP 逐滴加到溶胀好的壳聚糖溶液中, 直到溶液出现淡蓝色乳光, 即形成 SH 纳米粒溶液。调节喷雾干燥仪的进出口温度和蠕动泵的速度, 将此溶液进行喷雾干燥, 形成以 HPMC 为载体材料的包裹纳米粒的微球系统, 即 SH-NiMS 系统。收集喷雾干燥后的 SH-NiMS 粉末, 进行各项指标的测定。考虑到诸多因素对微球形成和质量影响, 本文在单因素考察的基础上, 应用正交设计综合评分法, 优选最佳制备工艺。

SH-NiMS 形态与粒度分布测量 用电子扫描显微镜 (SEM) 观察 NiMS 的外观形态, 用激光粒度分析仪测定平均粒径与分布。

SH 纳米粒载药量与包封率测定 精确量取 SH 纳米粒胶体溶液 1 mL, 10 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 HPLC 进样, 由标准曲线推算上清液中 SH 浓度, 从而求得包封率和

载药量。

载药量 = (投药量 - 上清液中的含药量) / NiMS 的总重 × 100%

包封率 = (投药量 - 上清液中的含药量) / 投药量 × 100%

SH-NiMS 载药量与包封率测定 精确称取一定量的 SH-NiMS 于 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 超声 1 h, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 HPLC 进样, 由标准曲线推算 SH 浓度, 求得包封率与载药量。

载药量 = (NiMS 的含药量 / NiMS 的总重) × 100%

包封率 = (NiMS 的药物质量 / 投药质量) × 100%

SH 纳米粒或 SH-NiMS 体外释药性能考察 取一定量的 SH 纳米粒或 SH-NiMS 于透析袋中, 两端扎紧, 置于具塞广口瓶中, 加入磷酸盐缓冲液 100 mL (pH = 6.8), 于 37 °C 水浴恒温振荡器上振荡, 分别于 15、30、45、60、90、120、180、240 和 300 min 取样, 每次 1 mL, 同时补加同体积的缓冲液。将所取样液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 HPLC 进样, 由标准曲线计算 SH 浓度, 计算药物累计释放度。

红外光谱分析 用红外分光光度仪测定并比较 SH 和 SH-NiMS 的红外图谱。

统计学处理 实验中正交设计采用方差分析, 以 2005 版《中国药典》控制纳米粒质量的载药量和包封率为考察指标, 本研究参考文献[3]的统计方法, 在正交设计实验中引入理想函数 (desirability function, DF) 对纳米粒制备工艺进行综合评价。

实验数据的统计学处理公式如下:

$D_i = [d_1 \cdot d_2 \cdot d_3 \cdots d_k]^{1/k}$, 其中 k 为考察指标的个数。

$$d_i = \begin{cases} 0 & Y_i \leq Y_{\min} \\ (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min}) & Y_{\min} \leq Y_i \leq Y_{\max} \\ 1 & Y_i \geq Y_{\max} \end{cases}$$

D_i 及 d_i 分别代表总理想函数及每个非独立因素的理想函数, Y_i 为每个非独立因素的实验值。 $Y_{\max}$ 和 $Y_{\min}$ 为实验条件下 Y_i 可接受的最大值和最小值。

实验中组间比较采用完全随机设计资料的协方差分析进行统计学分析。

结果

1 单因素考察影响 SH 纳米粒质量的因素

考察不同壳聚糖与 TPP 配比和不同 HPMC 的浓度对 SH 纳米粒释放度的影响。

1.1 壳聚糖与 TPP 配比的影响 本文采用不同壳聚糖与 TPP 配比, 按上述纳米粒制备方法得到 SH 纳米

粒。结果如图 1, 壳聚糖与 TPP 配比不同, 对 SH 纳米粒释放度有显著性影响 ($P < 0.05$), TPP/CS 为 1:3 (w/w) 时释放最为平缓。文献[4]报道, 随 TPP 浓度增加表面游离氨基逐步减少, 在一定 TPP 浓度范围内, 纳米粒粒径减小。表面 zeta 电位降低, 稳定性也随之下降, 粒子易聚集, 释药速度和程度也随之降低。

1.2 HPMC 浓度的影响 采用 0.1%、0.3% 和 0.5% 的 HPMC 分别制备 SH 纳米粒, 比较其浓度对 SH 纳米粒释放度的影响。结果见图 2, HPMC 的浓度对 SH 纳米粒释放度有显著性影响 ($P < 0.05$); 当 HPMC 浓度为 0.3% 时, 释放较为平缓。

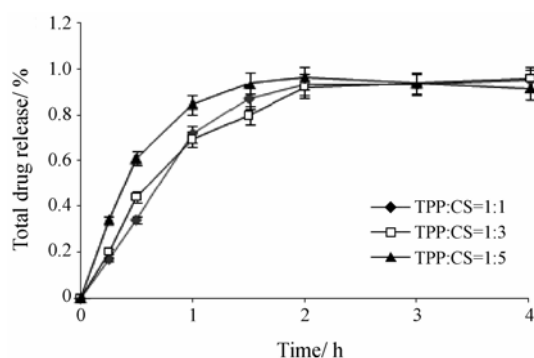


Figure 1 Drug release from nanoparticles-in-microsphere system (NiMS) with different tripolyphosphat (TPP): chitosan (CS). $n = 5$

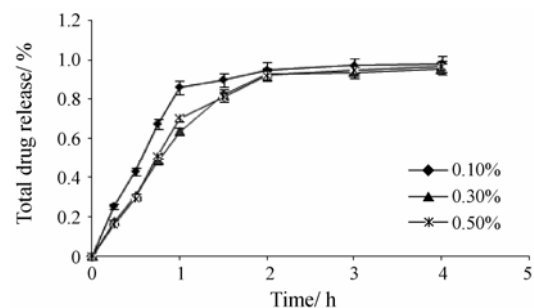


Figure 2 Drug release from NiMS with different HPMC concentrations. $n = 5$

2 SH 纳米粒的最佳制备工艺优化

由单因素实验结果可以看出, 壳聚糖与 TPP 配比、HPMC 浓度对 SH 纳米粒的释放有显著性影响。以包封率和载药量为指标, 考察壳聚糖/TPP (w/w) (A)、HPMC 浓度 (B) 以及 SH 浓度 (C) 3 个因素, 每个因素 3 个水平, 见表 1。按 $L_9 (3^3)$ 正交设计表安排实验。

根据专业知识及初步实验的结果, $Y_{\max}$ 、 $Y_{\min}$ 数值见表 2。

Table 1 Orthogonal factors and levels. A: CS : TPP (w/w); B: HPMC (%); C: SH (%)

A	B	C
1 : 1	0.1%	0.1%
3 : 1	0.3%	0.2%
6 : 1	0.5%	0.3%

Table 2 Maximum and minimum of the independent factors

Factor	$Y_{\max}$	$Y_{\min}$
Encapsulation efficiency/%	20	3
Loading content/%	3	0.5

由每次正交实验得到的各指标的实验值 Y_i 与对应的 $Y_{\min}$ 和 $Y_{\max}$ 得到每个非独立因素的 d_i 值, 计算 D_i 值, 结果见表 3。

Table 3 Orthogonal design and results

No.	A	B	C	Encapsulation efficiency/%	Loading content/%	D_i
1	1	1	1	1.9	0.3	0.002
2	1	2	2	12.3	2.2	0.372
3	1	3	3	6.8	1.0	0.045
4	2	1	3	10.3	1.8	0.223
5	2	2	2	17.8	2.9	0.836
6	2	3	1	9.7	1.6	0.173
7	3	1	3	8.6	1.4	0.119
8	3	2	1	10.8	1.9	0.257
9	3	3	2	11.5	2.0	0.300
K_1	0.419	0.344	0.432			
K_2	1.232	1.465	1.508			
K_3	0.676	0.518	0.387			
R	0.814	1.121	1.075			

由极差 R 得出 3 个因素的重要性从大到小依次为: HPMC 的浓度>SH 浓度>壳聚糖/TPP。通过直观分析, 确定 SH 纳米粒的优化处方为 $A_2B_2C_2$, 即壳聚糖/TPP 为 1 : 3、HPMC 的浓度为 0.3%、SH 浓度为 0.2%。

3 SH 纳米粒的包封率和载药量测定

按照最优处方制得的 SH 纳米粒经过高速离心过程, 纳米粒与未包裹的药物分离。离心后收集上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤后采用 HPLC 检测上清液中 SH 的浓度, 按照包封率和载药量计算 SH 壳聚糖纳米粒的包封率和载药量分别为 $(18.5 \pm 2.3)\%$ 和 $(4.7 \pm 1.1)\%$ ($n = 3$)。

4 喷雾干燥因素考察

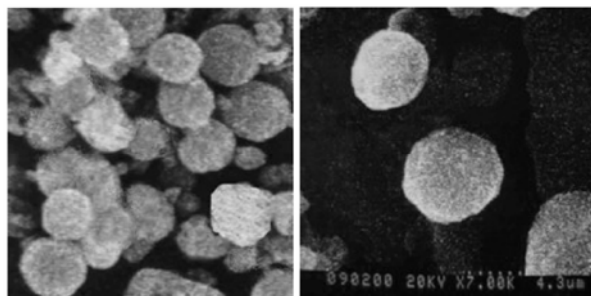
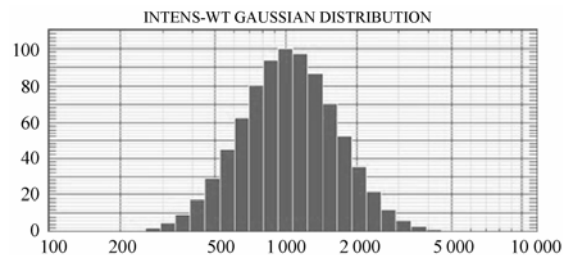
4.1 蠕动泵速度的影响 制备 SH 纳米粒溶液时, 选

用 10%~25% 的蠕动速度, 其余操作条件相同。结果表明, 蠕动泵的速度能影响进料速度和药液的保温时间, 进而影响药液喷出时的干燥快慢。蠕动泵太慢, 影响进料速度; 蠕动泵太快, 药液则不能及时干燥。采用 15% 的蠕动速度, 既不影响进料, 药物又能得到较好的干燥效果。

4.2 进口温度的影响 制备 SH 纳米粒溶液时, 选用不同的进口温度, 其余操作条件相同。结果表明, 进口温度能影响药液喷出时的干燥程度。温度太高, 影响药物稳定性及挥发性; 温度太低, 粉末易粘壁, 收率降低。采用进口温度为 110 $^{\circ}\text{C}$ 时能保证药物稳定并且有较高的收率。

5 SH-NiMS 形态与粒度分布

SEM 观察 SH-NiMS 的外观形态见图 3。SH-NiMS 表面圆整, 外观良好; 激光粒度测定仪测定平均粒径与分布见图 4, SH-NiMS 平均粒径为 1 155.9 nm, 分布均匀。

**Figure 3** SEM photograph of scopolamine hydrobromide nanoparticles-in-microsphere system (SH-NiMS)**Figure 4** Size and distribution of SH-NiMS

6 验证实验

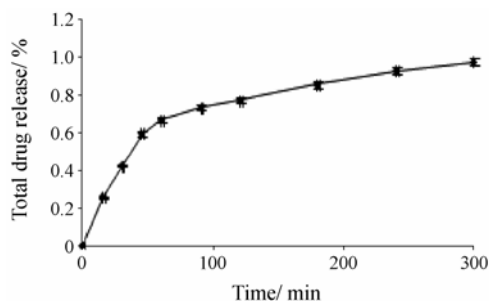
为验证上述辅料配比和制备工艺的可行性和稳定性, 配制 3 批 SH-NiMS, 测定其平均粒径、载药量和包封率见表 4。结果表明, SH 纳米粒经过喷雾干燥进一步包裹后包封产率和载药量明显提高, 为进一步工业化生产提供了依据。

Table 4 Result of validation test of optimal formulations

No.	Encapsulation efficiency/%	Loading content/%	Average diameter/nm
1	95.6	20.7	1 207.1
2	93.8	20.3	1 198.3
3	93.1	20.1	1 364.2
Average	94.2 ± 1.3	20.4 ± 0.3	1 256.5 ± 93.3

7 微球体外释药性能

SH-NiMS 的体外释放如图 5。释药曲线可分为两部分：前部分曲线陡直，释药迅速，30 min 时累计释药量即达 40%，突释效应显著；后部分曲线平缓，释放较慢。分别按零级、一级和 Higuichi 方程拟合释药行为，经回归处理得到体外释放按一级方程拟合效果最好， $\ln(1 - Q) = -0.010 5t - 0.287 7$, $r = 0.987 7$ 。

**Figure 5** Drug release from NiMS *in vitro*

突释效应有利于药物的吸收，可使药物服用后在短时间内达到较高的浓度，同时减少滞后现象。药物通过突释效应快速达到治疗浓度后缓慢释放，维持平稳，5 h 后全部释放。SH 作为晕动病防治药物，释放可延缓 5 h 以上，从而减少给药频率，降低药物局部刺激和不良反应，为外出长途旅行及航空航海防治晕动病带来便利。

8 红外光谱分析

由 SH 原料药与 SH-NiMS 样品的红外光谱分析可见，包载前后 SH 的特征峰 $3\ 375\text{ cm}^{-1}$ (胺 NH 伸缩振动), $1\ 649\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 603\text{ cm}^{-1}$ (芳香烃 C=C 伸缩振动, 双峰), 735 cm^{-1} (芳香烃=C-H 变形振动), $2\ 932\text{ cm}^{-1}$ (=CH 芳氢伸缩振动), $1\ 727\text{ cm}^{-1}$ (酯 C=O 伸缩振动), $1\ 153\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 070\text{ cm}^{-1}$ (酯 C-O-C 伸缩振动) 位移小于 5 cm^{-1} 。表征结果显示，二者的红外谱图基本一致，经过 NiMS 包裹后的 SH 特征峰减弱而位置没有发生变化，说明纳米粒制备过程和喷雾干燥过程中，SH 只是被 NiMS 包载而未发生结构变化。

讨论

药物包封产率的考察主要采用两种方法，一种是以微球中药物的总重量对制备时投入的药物总量的重量百分比 (w/w)；另一种是制剂实际测得药物的百分含量 (%) 与制备时药物加入百分量 (理论百分含量) 二者的百分比。前者是重量与重量的比值，除了考察药物被微球包封的效率外，还考虑到制备工艺中的收率。后者不考虑收率多少，仅考察药物被微囊化工艺包封的效率。喷雾干燥法制备药物微囊的实验研究中，影响收率的因素较多，包括仪器的黏附损耗、仪器规格与投药量的关系、实验操作等因素。本研究主要为实验室研究，故选择后者进行 SH-NiMS 包封产率测定较为合理^[5]。

本研究采用壳聚糖作为包载材料，制备纳米粒，在喷雾干燥作用下成球，形成 SH-NiMS。壳聚糖的分子基本单元是带有氨基的葡萄糖，同时含有氨基和羟基，其性质比较活泼，可进行交联等多种反应。壳聚糖作为一种新型药用辅料在缓释给药系统中得到了广泛的应用^[6-8]。壳聚糖的脱乙酰度是影响纳米粒制备的重要因素，随着壳聚糖脱乙酰度增高，溶液黏度下降，微球的粒径迅速减小，分散性逐渐变差，且颜色加深^[9]。通过调整壳聚糖的脱乙酰度可改变药物包封率。本研究模型药物为防治运动病的药物，希望达到快速起效和延缓药效双重效果，所以采用了脱乙酰度为 90% 的壳聚糖。采用离子交联法制备 SH 壳聚糖纳米粒。它是用无副作用的三聚磷酸钠 (TPP) 对壳聚糖进行离子诱导凝胶化来制得纳米粒。离子交联法反应条件温和，在室温条件下可进行，不需有机溶剂，且易于得到均一、可调整粒径范围的纳米粒^[9]。

从结果可以看出纳米粒的包封率和载药量都不高，可能是由于壳聚糖在水中略显正电性，而氢溴酸东莨菪碱在水中也显正电性，产生排斥作用导致。所以希望通过下一步喷雾干燥包裹作用，提高包封率和载药量，同时提高缓释系统的稳定性和可控性。

本研究以 HPMC 作为缓释骨架材料，将纳米粒在喷雾干燥作用下形成纳米粒-微球系统。喷雾干燥具有瞬时干燥、干燥产品质量好和干燥过程简单等特点^[10]。采用喷雾干燥器的雾化形式为气流式雾化，喷雾干燥得到的微球经常会出现凹瘪，这是喷雾干燥常见的现象，由于剧烈的热量交换使微球表面水迅速挥发，表面产生负压，微球内部水分迅速向表面扩

散,干燥后在微球内部形成空穴。通常可采用降低溶剂挥发温度、减慢喷雾速度或改变囊材配比等方法改善。

本实验纳米粒制备处方优化为:壳聚糖/TPP (w/w) 为 3:1, HPMC 浓度 0.3%、SH 浓度 0.2%。在此条件下喷雾干燥制得的 SH-NiMS 包封率、载药量和平均粒径分别为 94.2%、20.4%、1 256.5 nm。SH-NiMS 制备方法稳定可控,为开发药物新剂型提供了新的思路。作为晕动病防治药物,SH-NiMS 的突释效应有利于药物在较短时间内达到较高的治疗浓度而快速起效。在 5 h 内释放完全,既减少给药频率,又降低局部刺激和不良反应,给外出旅行和作战条件带来便利。

NiMS 为中间体剂型,将药物制备成 NiMS 后还可进一步制成片剂、胶囊和喷雾剂等剂型。NiMS 的研制为进一步开发新的药物剂型提供依据。

References

- [1] Bhavsar MD, Tiwari SB, Amiji MM. Formulation optimization for the nanoparticles-in-microsphere hybrid oral delivery system using factorial design [J]. *J Control Release*, 2006, 110: 422–430.
- [2] Bhavsar MD, Amiji MM. Gastrointestinal distribution and *in vivo* gene transfection studies with nanoparticles-in-microsphere oral system (NiMOS) [J]. *J Control Release*, 2007: 339–348.
- [3] Zheng AP, Liu HH, Li HB, et al. Preparation and *in vitro* release of 5-fluorouracil-loaded chitosan microspheres for the intranasal administration [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, 35: 318–323.
- [4] Lin AH, Liu YM, Ping QN. Free amino groups on the surface of chitosan nanoparticles and its characteristics [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2007, 42: 323–328.
- [5] Li FQ, Hu JH. Drug entrapment and encapsulation rate of spray dried ciprofloxacin albumin microspheres [J]. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2001, 26: 256–273.
- [6] Kas HS. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate system [J]. *J Microencapsul*, 1997, 14: 689–711.
- [7] Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient [J]. *J Pharm Res*, 1998, 15: 1326–1331.
- [8] Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs [J]. *Int J Pharm*, 2004, 274: 1–33.
- [9] Fang KH, Zhou YK. Advance in chitosan microsphere [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 1999, 19: 744–745.
- [10] Xia H, Zhang N, Jin ZM, et al. Study on the preparation of breviscapine microsphere [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2007, 29: 683–686.