

# 胰岛素巯基化透明质酸纳米粒的制备与体外性质评价

黄爱文<sup>1</sup>, 赵佳丽<sup>1,2</sup>, 刘志宏<sup>1</sup>, 曾棋平<sup>1,3</sup>, 宋洪涛<sup>1,2,3Δ</sup>

(1. 南京军区福州总医院 药学科, 福建 福州 350025; 2. 厦门大学 医学院, 福建 厦门 361005; 3. 福建医科大学 药学院, 福建 福州 350108)

**[摘要]** 目的 制备胰岛素巯基化透明质酸纳米粒(insulin thiolated hyaluronic acid nanoparticles, Ins-HA-Cys-NPs), 考察纳米粒的理化性质。方法 以合成的具有生物黏附性质的巯基化透明质酸作为载体, 采用超声乳化法制备纳米粒, 考察其外观、粒径、Zeta 电位、包封率、载药量, 并进行其冻干制剂的冻干保护剂筛选。结果 制备的 Ins-HA-Cys-NPs 粒径均一, 外观圆整; 平均粒径为(178.5 ± 0.8) nm, PDI 为(0.214 ± 0.013), Zeta 电位为-(38.47 ± 0.46) mV, 超滤离心法测定载药纳米粒的包封率为(48.85 ± 0.66)%, 载药量为(4.79 ± 0.13)%; 选择 10% 的甘露醇为冻干保护剂, 复溶后得到具有蓝色乳光的粒径均一的纳米粒混悬液。结论 巯基化透明质酸纳米粒是蛋白多肽类药物口服给药的潜在载体, 为下一步研究胰岛素纳米粒在大鼠体内药效、药动力学研究提供前提和基础。

**[关键词]** 巯基化透明质酸; 胰岛素; 纳米粒

**[中图分类号]** R944.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-1678(2014)07-0077-04

## Preparation and evaluation of insulin thiolated hyaluronic acid nanoparticles in vitro

HUANG Ai-wen<sup>1</sup>, ZHAO Jia-li<sup>1,2</sup>, LIU Zhi-hong<sup>1</sup>, ZENG Qi-ping<sup>1,3</sup>, SONG Hong-tao<sup>1,2,3Δ</sup>

(1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China; 2. College of Medicine, Xiamen University, Xiamen 360005, China; 3. College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

**[Abstract]** **Objective** To prepare insulin thiolated hyaluronic acid nanoparticles (Ins-HA-Cys-NPs) and study its physicochemical properties. **Methods** The Ins-HA-Cys-NPs was prepared by ultrasonic emulsifying method, and the properties of nanoparticles including morphology, mean diameter, Zeta potential, entrapment efficiency and drug loading efficiency were studied, as well as the cryoprotectant selection. **Results** The prepared nanoparticles was round in appearance and the mean diameter was(178.5 ± 0.8) nm, the polydispersity index was (0.214 ± 0.013) and the Zeta potential was -(38.47 ± 0.46) mV, while the entrapment efficiency was (48.85 ± 0.66)%, drug loading efficiency was (4.79 ± 0.13)%; 10% mannitol as cryoprotectant provided uniform and well dispersed suspension of nanoparticles with blue opalescence after redispersion. **Conclusion** The thiolated hyaluronic acid nanoparticles may be used as the carrier for oral drug delivery system of insulin, and it provides a basis for studies on rats in vivo.

**[Keywords]** thiolated hyaluronic acid; insulin; nanoparticles

胰岛素(insulin, Ins) 为目前临床上治疗糖尿病的一线药物。临床应用胰岛素制剂皆为注射剂。口服给药方式可提高患者顺应性, 减轻糖尿病患者的痛苦, 因而研究胰岛素口服制剂一直是药剂学的热点之一<sup>[1]</sup>。但是胰岛素由于自身稳定性差, 口服易被胃肠道酶水解, 且对肠道黏膜通透性低, 口服生物利用度一直较低<sup>[2]</sup>。

纳米给药系统能够提高蛋白、多肽类药物在胃肠道内的稳定性, 保护包载的药物, 并且有利于黏膜对药物的摄取以及转运, 因此成为解决多肽、蛋白质类药物口服吸收难题的一个较为有效的方法<sup>[3]</sup>。透明质酸(HA) 是一种存在于高等动物机体

多种组织、器官中的天然大分子多聚糖, 具有良好的生物相容性、生物可降解性以及生物黏附性能, 在生物医学领域以及药物传递系统方面均有较多的应用<sup>[4-5]</sup>。将透明质酸与 L-半胱氨酸(Cys) 盐酸盐通过酰胺键连接得到新型的生物黏附性聚合物——巯基化透明质酸(HA-Cys)。本研究将生物黏附性技术与纳米载体相结合, 以巯基化透明质酸为生物黏附性材料制备包载胰岛素的纳米粒, 并对其体外性质进行评价。

### 1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 透明质酸钠(500 kDa, 镇江东元生物科技有限公司); 胰岛素(27.8 U/mg, 徐州万邦金桥制药有限公司); 吐温 80(国药集团化学试剂); 油酸聚乙二醇甘油酯(法国 GATTEFOSSE 公司); 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺盐酸盐(EDAC), N-羟基丁二酰亚胺(NHS), 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)(阿拉丁试剂); 猪胃黏膜蛋白(美国 Sigma 公司)。

资助项目: 福建省自然科学基金(2012J05159)

作者简介: 黄爱文, 女, 主管药师, 研究方向: 药物新剂型与制剂新技术, E-mail: haw83@163.com; 宋洪涛, 通信作者, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药物新剂型与制剂新技术、临床药学, E-mail: sohoto@vip.163.com。

Model 680 型多功能酶标仪(美国 BIO-RAD 公司); AVANCE III 500 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司); Nicolet Avatar 330 型傅里叶红外光谱仪(美国热电公司); JY88-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); RE2000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); Nicomp™-380 型粒度电位测定仪(美国 PSS 公司); CHRIST ALPHA 1-2 型冷冻干燥机(瑞士 CHRIST ALPHA 公司); JEM-1400 型透射电镜(日本电子株式会社); Agilent1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 HA-Cys 的制备: HA-Cys 的制备,参照文献<sup>[6]</sup>的方法称取 HA( MW500kDa),加蒸馏水溶解制成 0.4% 溶液,分别加入终浓度为 50 mmol/L 的 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺盐酸盐(EDAC)和 N-羟基丁二酰亚胺(NHS),加 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 5.50 室温下避光搅拌反应 45 min;称取 L-半胱氨酸盐酸盐(其与透明质酸质量比为 1:2)加至反应体系中,加 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 4.75 室温下避光搅拌反应 5 h;依次以 5 mmol/mL HCl 溶液、含 1% (w/v) NaCl 的 5 mmol/mL HCl 溶液和 1 mmol/mL HCl 溶液作为透析液 4 °C 避光透析 3 d,冷冻干燥 24 h,制得 HA-Cys 聚合物,结构验证经 <sup>1</sup>H-NMR 以及红外光谱分析 4 °C 保存备用。

1.2.2 HA-Cys 的巯基含量测定:浓度分别为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.3 μmol/mL 的 Cys 溶液 500 μL 与 500 μL Ellman's 试剂(以 0.5 mol/L pH8.0 PBS 配制的 0.3 mg/mL DTNB 溶液),进行显色反应,多功能酶标仪测量反应生成物在 450 nm 处的吸光度,建立吸光度-巯基浓度拟合方程。

精密称取 10 mg HA-Cys 加入 2.5 mL 三蒸水溶解,取 250 μL 溶液,加入 250 μL 0.5 mol/L pH8.0 PBS 和 500 μL Ellman's 试剂,室温、避光反应 2 h,测定 450 nm 处的吸光度。根据拟合方程计算巯基(-SH)含量,结果以每 1 g HA-Cys 含巯基的量(μmol)表示(μmol/g)。

1.2.3 HA-Cys 材料自身的体外黏附性质评价:以黏蛋白微粒结合法评价 HA-Cys 的体外黏附性质<sup>[7]</sup>。取猪胃黏膜蛋白粉末溶于磷酸盐缓冲液(PBS, pH6.8)中,配成浓度为 1% 的混悬液,搅拌过夜使之充分混悬。将黏蛋白混悬液在冰水浴中探头超声 10 min 后(功率 200 W),以 6000 r/min 的转速离心 15 min,取上清液稀释到浓度为 0.5%,可得到亚微米级黏蛋白混悬液(ss-mucin particle suspension)。将不同浓度 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 的 HA-Cys 的 PBS 溶液 2 mL (pH6.8) 加入上述黏蛋白混悬液 2 mL 中,于 37 °C 下孵育 2 h 后,测定其电位的变化。

1.2.4 Ins-HA-Cys-NPs 的制备:称取 HA-Cys 26 mg 加三蒸水溶解,加入以 0.005 mol/L NaOH 溶液溶解的 8 mg 胰岛素,再加入质量分数 1.0% 的吐温 80,混合均匀作为水相,与油相正己烷(含 1.0% 油酸聚乙二醇甘油酯)以体积比 1:4 混合,探头超声 2 min(功率 400 W)。旋转蒸发 1 h 除去有机溶剂,加蒸馏水至 20 mL,再次探头超声,获得纳米粒混悬液。

### 1.2.5 Ins-HA-Cys-NPs 理化性质评价

#### ① 纳米粒粒径及 Zeta 电位的测定

以 Nicomp™-380ZLS 型粒度电位测定仪测定 Ins-HA-Cys-NPs 的 Zeta 电位、粒径及分布,将样品稀释至合适浓度进行

测定。

#### ② 包封率和载药量的测定

采用超滤离心法<sup>[8]</sup>测定,其中超滤膜截留的相对分子质量为 100 kDa,精密加入胰岛素纳米粒混悬液 400 μL,10 °C、6 000 r/min 离心 30 min。取滤液进高效液相色谱仪,测定游离胰岛素的含量,按下式计算纳米粒的包封率及载药量:

$$\text{包封率(EE\%)} = (\text{胰岛素的总质量} - \text{游离胰岛素的质量}) / \text{胰岛素的总质量} \times 100\%$$

$$\text{载药量(DL\%)} = (\text{胰岛素的总质量} - \text{游离胰岛素的质量}) / \text{纳米制剂的总质量} \times 100\%$$

#### ③ 纳米粒形态观察

采用透射电镜观察制备的 Ins-HA-Cys-NPs 的形态。取适量纳米粒溶液,稀释到一定浓度后,滴至覆有碳膜的铜网上,停留 2~3 min,以滤纸吸去多余溶液,滴加 2% 磷钨酸溶液负染 2 min,红外灯下干燥,透射电镜观察,拍照。

1.2.6 冻干保护剂的选择:胰岛素纳米粒混悬液制备成冻干制剂进行保存,将常用冻干保护剂葡萄糖、乳糖、海藻糖、甘露醇<sup>[9]</sup>以一定的量加入纳米粒混悬液中,装于西林瓶中,搅拌使之溶解。该溶液于 -80 °C 预冻 8 h,冷冻干燥 48 h。冻干样品加水 4 mL 复溶,以外观、再分散性、粒径、包封率、载药量、Zeta 电位等作为评价指标,筛选最佳冻干保护剂。

评价标准:制得的冻干制剂外观以维持原体积,不塌陷,不皱缩,质地细腻,表面光洁,可整块脱落但不粉碎为佳,加蒸馏水复溶并轻微振摇后,即分散成均匀有蓝色乳光的胶体溶液,表明再分散性良好,再分散时间以 30 s 以内为佳。各指标以 10 分制进行评分(见表 1)。

表 1 评分标准  
Tab. 1 Scoring standard

评分	外形	再分散性(s)	复溶外观
0~2	萎缩+++	>90	混浊++
3~5	萎缩++	60~90	混浊+
6~8	萎缩+	30~60	浅淡蓝色乳光
9~10	饱满	<30	淡蓝色乳光

## 2 结果

### 2.1 HA-Cys 的结构验证

2.1.1 <sup>1</sup>H-NMR 分析:图 1 为 HA 和 HA-Cys 的 <sup>1</sup>H-NMR 图谱,在 3.3~3.9 ppm 之间的多重峰对应的是透明质酸分子中的糖环结构。HA-Cys 图谱(图 1B)中 2.88 ppm 处的信号峰归属于 Cys 分子亚甲基上的氢原子,这表明 Cys 已共价连接至 HA 上。

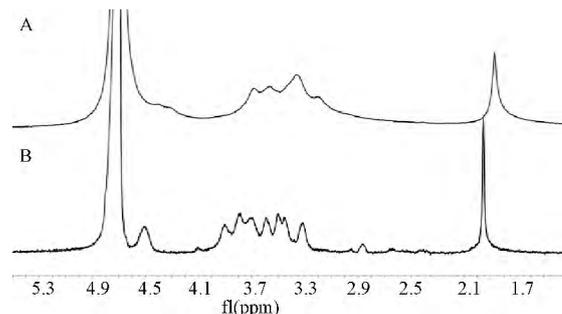


图 1 HA(A)和 HA-Cys(B)的核磁共振氢谱  
Fig. 1 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of HA(A) and HA-Cys(B)

2.1.2 红外光谱分析: HA、HA-Cys 的红外谱图见图 3。与未修饰的 HA 相比,在 2500 cm<sup>-1</sup> 附近出现的新波段确证了 HA-Cys 的形成是由于巯基基团的吸收造成的。

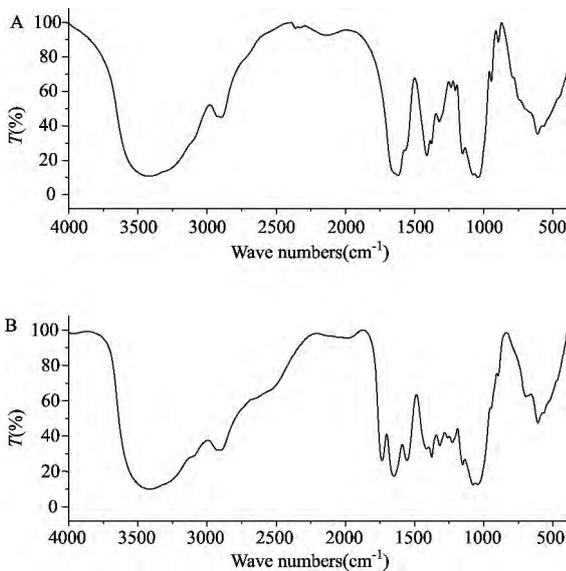


图 2 HA (A) 和 HA-Cys (B) 红外扫描图谱  
Fig. 2 IR spectrum of HA (A) and HA-Cys (B)

2.2 HA-Cys 的巯基含量测定 经冷冻干燥获得的 HA-Cys 聚合物为白色纤维状物质。按照 1.2.2 项下方法得到的拟合方程为  $A = 3.157C - 0.012$  ( $r = 0.9996$ ), 将测得的 HA-Cys 与 DTNB 反应产物的吸光度值代入上述拟合方程, 得到游离巯基含量为  $(225.7 \pm 4.4) \mu\text{mol/g}$ 。

2.3 HA-Cys 材料自身的体外黏附性质评价 黏蛋白属于一类大分子糖蛋白,其黏蛋白结构中存在的唾液酸残基以及硫酸化糖分子使黏蛋白等电点降低,在胃肠道生理 pH 环境下,黏蛋白荷负电<sup>[10]</sup>。黏蛋白混悬液与不同浓度的 HA-Cys 溶液孵育后的 Zeta 电位变化如图 4 所示。结果表明:在与 HA-Cys 溶液共同孵育 2 h 后,黏蛋白纳米粒的 Zeta 电位由 -18.4 mV 变得更低,且其 Zeta 电位随着 HA-Cys 溶液浓度的增加而逐渐降低,这说明在 pH=6.8 的 PBS 环境中 HA-Cys 对黏蛋白纳米粒具有良好的黏附性,可稳定地吸附在黏蛋白纳米粒表面从而改变其表面电荷。

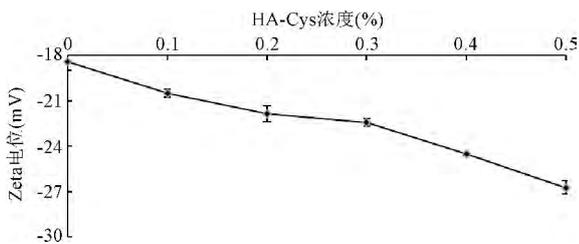


图 3 不同浓度 HA-Cys 结合黏蛋白微粒的 Zeta 电位改变  
Fig. 3 Zeta potential of ss-mucin particles in the solution of HA-Cys with various concentration

2.4 Ins-HA-Cys-NPs 理化性质评价 制备的纳米粒混悬液外观呈淡蓝色乳光。测定纳米粒粒径以及电位,平均粒径为

$(178.5 \pm 0.8) \text{ nm}$ , 多分散系数为  $(0.214 \pm 0.01)$ , Zeta 电位为  $(-38.47 \pm 0.46) \text{ mV}$ ; 超滤离心法测定载药纳米粒的包封率为  $(48.85 \pm 0.66) \%$ , 载药量为  $(4.79 \pm 0.13) \%$ 。

2.5 Ins-HA-Cys-NPs 形态观察 如图 4 所示,在透射电镜扫描下,可见粒子表面光滑圆整,呈类圆球形,且分布均一,其与粒度电位测定仪所测定的粒径大小相近。

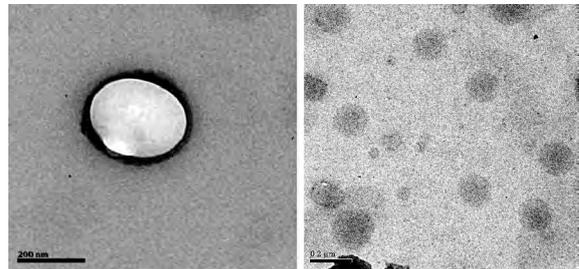


图 4 Ins-HA-Cys-NPs 透射电镜图  
Fig. 4 TEM photo of Ins-HA-Cys-NPs

2.6 Ins-HA-Cys-NPs 冻干保护剂的选择 冷冻干燥是确保聚合物纳米颗粒的长期保存的一项常用技术。纳米粒混悬液长期储存易产生增溶,聚合物降解,药物泄露、解吸附或降解等情况,并且具有聚集成团的倾向<sup>[11]</sup>。因此需要在冷冻干燥前加入合适的冻干保护剂,防止纳米粒的团聚,减少药物泄漏。选择常用的冻干保护剂进行筛选(见表 2)。

表 2 冻干保护剂筛选结果  
Tab. 2 Results of the cryoprotectant selection

序号	冻干保护剂	浓度 (%)	冻干外观	再分散性	复溶外观	综合评分
1	葡萄糖	2	1	3	3	7
2		5	1	2	3	6
3		10	2	2	4	8
4	乳糖	2	2	5	4	11
5		5	3	4	6	13
6		10	6	4	9	19
7	海藻糖	2	3	5	4	12
8		5	4	3	4	11
9		10	4	3	5	12
10	甘露醇	2	8	9	7	24
11		5	9	9	10	28
12		10	10	9	10	29
13	乳糖 + 甘露醇	5 + 5	7	7	6	20
14	葡萄糖 + 甘露醇	5 + 5	3	6	6	15
15	海藻糖 + 甘露醇	5 + 5	2	5	4	11
16	葡萄糖 + 乳糖	5 + 5	1	4	4	9
17	无	0	0	3	3	6

由表 2 可知,不添加冻干保护剂,冻干后的制剂萎缩成一层透明薄膜,不能保持原液体积;以葡萄糖和乳糖作保护剂,冻干后体积干缩,不够整齐饱满,并易吸潮;而以甘露醇作保护剂,其冻干制剂的外观等指标均较符合要求,综合评分为 24 分以上,且以 10% 甘露醇为最佳。选取综合评分相对较高的 6、10、11、12、13 号冻干制剂以粒径、多分散指数、Zeta 电位、包封率以及载

药量进行下一步的筛选,结果如表 3 所示。

表 3 冻干保护剂对冻干后纳米粒性质的影响

Tab. 3 Effect of cryoprotectant agents on nanoparticles after freeze drying

序号	冻干保护剂	粒径 (nm)	多分散指数	Zeta 电位 (mV)	包封率 (%)	载药量 (%)
1	冻干前样品	178.5	0.223	-42.36	48.4	4.72
2	10% 乳糖	278.8	0.230	-28.94	35.8	3.51
3	2% 甘露醇	256.3	0.208	-30.49	35.3	2.83
4	5% 甘露醇	249.7	0.216	-31.83	49.2	3.64
5	10% 甘露醇	182.5	0.231	-41.11	48.1	4.68
6	5% 甘露醇 + 5% 乳糖	307.2	0.215	-32.29	32.7	3.23

由表 3 可知,以 10% 的甘露醇为冻干保护剂,所测得的粒径、多分散指数、Zeta 电位、包封率及载药量与冻干前样品测得的数据较相近。因此选择以 10% 甘露醇作为冻干保护剂。采用冷冻干燥工艺制得的 HA-Cys-NPs 纳米粒冻干制剂,呈白色饼状,色泽均一,表面不塌陷,不皱缩。将该冻干制剂以蒸馏水复溶稀释,复溶速度快,得到具有蓝色乳光、均一的纳米粒混悬液。

### 3 讨论

以 EDAC/NHS 为催化体系,将透明质酸与 L-半胱氨酸通过酰胺键连接,制备巯基化透明质酸,测定其巯基含量为  $(225.7 \pm 4.4) \mu\text{mol/g}$ 。适当范围内较高的巯基含量可在避免巯基自氧化的情况下提高巯基氧化的速率,从而改善黏膜粘附性能。本实验制备的巯基化透明质酸的巯基含量同既往文献报道巯基含量为  $201.3 \mu\text{mol/g}^{[12]}$ 、 $210.58 \mu\text{mol/g}^{[13]}$  的结果相当,能够有效改善纳米粒的黏膜粘附性能。

巯基化聚合物使药物黏附在肠道黏膜表面,减少药物与肠道蛋白酶接触,从而减少药物的降解;并且其作为载体可以提高黏液层药物浓度,使得吸附-吸收部位产生一个促进细胞被动吸收的驱动力,增强药物的口服吸收。采用黏蛋白微粒法评价制备的 HA-Cys 聚合物的体外黏附性,结果表明 HA-Cys 在中性介质中能较好地与黏蛋白微粒结合,从而改变其 Zeta 电位。这说明在 pH 6.8 的 PBS 环境中 HA-Cys 对黏蛋白微粒具有良好的黏附性,可稳定地吸附在黏蛋白纳米粒表面从而改变其表面电荷。这种吸附除了归因巯基化透明质酸的范德华力及氢键作用外,还与其结构上的游离巯基有关,巯基化透明质酸与黏蛋白表面的带游离巯基的半胱氨酸残基之间通过巯基氧化而交联形成二硫键,从而以共价键的形式增强了二者之间的相互作用,提高其在黏蛋白微粒表面的黏附量。

制备的 Ins-HA-Cys-NPs 粒径为 200 nm 左右,据报道<sup>[14-15]</sup>,粒径为 50~500 nm 的纳米粒可通过肠道内 Peyer's patch 上的 M 细胞吞噬,增加药物的吸收。测量 Zeta 电位可以预测纳米粒组成的分散体系的稳定性。通常,纳米粒 Zeta 电位的绝对值越大,纳米粒之间的相互排斥力也越大,体系也就越稳定<sup>[16]</sup>。本研究 Ins-HA-Cys-NPs 的 Zeta 电位为  $(-38.47 \pm 0.46) \text{ mV}$ ,说明纳米粒体系较稳定<sup>[16]</sup>。采用超滤离心法测定纳米粒的包封率为  $(48.85 \pm 0.66) \%$ 、载药量为  $(4.79 \pm 0.13) \%$ 。实验中,超滤膜将纳米粒截留于管中,游离药物处于下清液中,纳米粒子与游离药物可得到较好的分离,保证测定结果的准确性。

本研究制备的 Ins-HA-Cys-NPs 粒径较小,分布均一,选择 10% 的甘露醇为冻干保护剂,复溶后得到具有蓝色乳光的粒径

均一的纳米粒混悬液,且包封率、载药量均无显著变化。说明采用本实验报道方法制备纳米粒具有较好的可行性,其为体内药效学的进一步研究提供了一定的基础,作为蛋白多肽类药物的口服递送载体具有良好的应用前景。□

### 参考文献

- [1] Sonia TA, Sharma CP. An overview of natural polymers for oral insulin delivery [J]. Drug discovery today 2012, 17(13):784-792.
- [2] Chaturvedi K, Ganguly K, Nadagouda MN, et al. Polymeric hydrogels for oral insulin delivery [J]. Journal of Controlled Release 2013, 165(2):129-138.
- [3] des Rieux A, Fievez V, Garinot M, et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach [J]. Journal of Controlled Release 2006, 116(1):1-27.
- [4] 孟路华, 王驰. 透明质酸及其衍生物在药物递送系统中的研究进展 [J]. 中国新药杂志 2012, 21(18):2165-2167.
- [5] 俞晨洁, 张莉, 李红玫, 等. 透明质酸及其衍生物用作药物载体的研究进展 [J]. 药学进展 2012, 35(12):543-549.
- [6] 丁洁英. 用于蛋白质药物口服给药的巯基化透明质酸/聚乙烯醇多层水凝胶膜载体 [D]. 复旦大学, 2010.
- [7] 黄爱文, 肖衍宇, 孙敏捷, 等. 海藻酸钠包覆的降钙素脂质体的制备和体内外黏附性质 [J]. 中国药科大学学报 2011, 42(5):423-427.
- [8] 张自强, 许玫, 姚静, 等. 超滤法测定伊立替康脂质体包封率的研究 [J]. 药物分析杂志 2009, 28(12):2081-2084.
- [9] 胡连栋, 唐星, 崔福德, 等. 维甲酸固体脂质纳米粒冷冻干燥工艺研究 [J]. 中国医药工业杂志 2007, 38(1):22-26.
- [10] Lee S, Muller M, Rezwani K, Spencer ND. Porcine Gastric Mucin (PGM) at the Water/Poly (Dimethylsiloxane) (PDMS) Interface: Influence of pH and Ionic Strength on Its Conformation, Adsorption, and Aqueous Lubrication Properties [J]. Langmuir, 2005, 21(18):8344-8353.
- [11] Rampino A, Borgogna M, Blasi P, et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability [J]. International journal of pharmaceuticals 2013, 455(1):219-228.
- [12] Kafedjiiski K, Jetti RK, Föger F, et al. Synthesis and in vitro evaluation of thiolated hyaluronic acid for mucoadhesive drug delivery [J]. International journal of pharmaceuticals 2007, 343(1):48-58.
- [13] Li X, Yu G, Jin K, et al. Hyaluronic acid L-cysteine conjugate exhibits controlled-release potential for mucoadhesive drug delivery [J]. Die Pharmazie—An International Journal of Pharmaceutical Sciences 2012, 67(3):224-228.
- [14] Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL, et al. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size [J]. Pharmaceutical research 1996, 13(12):1838-1845.
- [15] Jung T, Kamm W, Breitenbach A, et al. Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfoethylated poly (vinyl alcohol) graft-poly (lactide-co-glycolide): evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice [J]. Pharmaceutical research 2001, 18(3):352-360.
- [16] 刘辉, 汤韧, 何晓霞, 等. 脂质体处方和制备方法对阿昔洛韦棕榈酸酯脂质体稳定性的影响 [J]. 药学学报 2002, 37(7):563-566.

(编校:王伊伊)