

壳聚糖修饰的雷公藤甲素聚乙二醇-聚乳酸纳米粒的制备及质量评价

李静¹, 周英¹, 徐秀玲², 王海南^{1,3*}, 魏颖慧^{2*}, 郭曼曼², 李范珠² (1. 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025; 2. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 3. 国家食品药品监督管理局, 北京 100053)

摘要:目的 制备壳聚糖修饰的雷公藤甲素聚乙二醇-聚乳酸纳米粒, 并对其质量进行评价。方法 通过降解反应合成低相对分子质量壳聚糖, 采用黏度测定法和酸碱滴定法测定其黏均相对分子质量和脱乙酰度; 以聚乙二醇-聚乳酸为载体材料, 低相对分子质量壳聚糖为修饰剂, 采用乳化溶剂挥发法制备壳聚糖修饰的雷公藤甲素聚乙二醇-聚乳酸纳米粒; 并比较壳聚糖修饰前后纳米粒的性质; 以纳米粒形态、粒径、Zeta 电位、包封率、载药量及体外释放度为指标评价其质量。结果 壳聚糖的黏均相对分子质量为 20 000, 脱乙酰度为 90%; 经壳聚糖修饰后, 纳米粒的粒径和 Zeta 电位均增大, 包封率几无变化; 所制备的纳米粒外观呈圆形或类圆形, 平均粒径、Zeta 电位、包封率和载药量分别为 (202.62 ± 1.52) nm、(0.17 ± 0.12) mV、(58.20 ± 2.43) % 和 (1.25 ± 0.13) %。体外释放实验表明, 纳米粒体外释放 $t_{1/2}$ 为 1.1 h, 在 10.0 h 累积释放率达到 74.0%。结论 壳聚糖修饰对纳米粒的粒径及 Zeta 电位影响较大; 制备的纳米粒包封率较高, 粒径小, 体外释放具有一定缓释特征。

关键词: 雷公藤甲素; 壳聚糖; 聚乙二醇-聚乳酸纳米粒; 质量评价

doi: 10.11669/cpj.2013.09.010 中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2013)09-0700-05

Preparation and Evaluation of Triptolide-Loaded Chitosan/PEG-PLA Nanoparticles

LI Jing¹, ZHOU Ying¹, XU Xiu-ling², WANG Hai-nan^{1,3*}, WEI Ying-hui^{2*}, GUO Man-man², LI Fan-zhu² (1. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 3. China Food and Drug Administration, Beijing 100053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare triptolide-loaded chitosan/polyethylene glycol-poly(lactic acid) (PEG-PLA) nanoparticles and to evaluate their quality. **METHODS** Low molecular weight chitosan was obtained by degradation reaction, and the viscosity-average molecular weight and degree of deacetylation were determined by viscometry and acid-base titration method, respectively. The PEG-PLA nanoparticles were prepared by emulsification solvent evaporation method with chitosan as modifying agent. Then, the influence of modification of chitosan on the nanoparticles was investigated. The morphological characteristics, particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency, drug loading and release *in vitro* of the prepared nanoparticles were evaluated. **RESULTS** The viscosity-average molecular weight and degree of deacetylation of chitosan were 20 000 and 90%, respectively. The particle size and Zeta potential of the nanoparticles increased after the modification of chitosan, while the encapsulation efficiency was almost the same. The shape of the prepared nanoparticles was spherical, and the mean particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency and drug loading were (202.62 ± 1.52) nm, (0.17 ± 0.12) mV, (58.20 ± 2.43) % and (1.25 ± 0.13) %, respectively. The release profiles showed that the accumulated release rate of the nanoparticles was 50.0% at 1.1 h and reached 74.0% at 10.0 h. **CONCLUSION** Chitosan modification can affect the particle size and Zeta potential. The nanoparticles show a certain sustained release characteristics with well-distributed particle size as well as high entrapment efficiency.

KEY WORDS: triptolide; chitosan; PEG-PLA nanoparticle; quality evaluation

雷公藤甲素 (triptolide, TP) 是从卫矛科雷公藤属雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 根部提取分离的含有 3 个环氧基的二萜内酯类化合物, 是临床常用药物雷公藤多苷片的主要有效成分之一, 主要用于治疗增殖性肾小球肾炎、肾病综合征、紫癜性及狼疮性肾炎等肾脏疾病^[1]。但 TP 水溶性差, 治疗

窗窄, 半衰期短, 对消化系统、泌尿生殖系统和血液系统等具有较大的毒副作用^[2], 限制了其在临床肾脏疾病治疗中的应用。

纳米粒作为药物输送载体, 具有降低药物毒副作用、靶向给药、增加疗效等优点。如 Li 等^[3] 将叶酸化学键合至紫杉醇纳米粒表面, 结果表明, 该纳米

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30902007); 浙江省重点科技创新团队项目 (2012R10044-05)

作者简介: 李静, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型与新技术; * 通讯作者: 王海南, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药化学及药理学; Tel: (010) 88330772; Fax: (010) 88331242-806; E-mail: md_wanghaiannan@yahoo.com.cn; 魏颖慧, 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 药物新剂型与新技术; Tel: (0571) 86633173; Fax: (0571) 86633030; E-mail: weiyingshui@163.com

粒能提高紫杉醇的肿瘤靶向性,明显降低化疗期间全身毒性反应,增加了对肿瘤细胞杀伤作用。壳聚糖(chitosan,CS)是目前发现的唯一的天然碱性多糖,具有良好的生物相容性、生物可降解性、低免疫原性及低毒副作用等优点,且研究发现低相对分子质量壳聚糖具有良好的肾靶向性^[4],但以低分子质量壳聚糖为载体材料的纳米粒体外释药行为难以控制^[5]。聚乙二醇-聚乳酸(polyethylene glycol-poly-lactic acid,PEG-PLA)也是一种常用的载体材料,所制备的纳米粒具有良好的缓释作用^[6]。因此,本实验以PEG-PLA为载体材料,壳聚糖为修饰剂,制备了壳聚糖修饰的雷公藤甲素聚乙二醇-聚乳酸纳米粒(triptolide-loaded chitosan/PEG-PLA nanoparticles,CS/TP-NPs),并对其进行了初步的质量评价。

1 材料和仪器

1.1 药品与试剂

CS原料(上海伯奥生物科技有限公司, $\bar{M}_w = 650\,000$,90%脱乙酰度);低相对分子质量CS(自制, $\bar{M}_n = 20\,000$,脱乙酰度为90%);PEG-PLA(济南岱罡生物工程有限公司, $\bar{M}_w = 10\,000$,其中PEG嵌段 $\bar{M}_w = 2\,000$);雷公藤甲素(深圳振强生物技术有限公司,纯度>98%,批号101115);雷公藤甲素对照品(中国食品药品检定研究院,批号111567-200502);Poloxamer 188(德国BASF公司,批号WP-WA544C);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国Agilent公司);CP225D 电子天平(德国Sartorius公司);JEM-1200EX 透射电子显微镜(日本Jeol公司);Nano-ZS 型粒径分析仪(英国Malvern公司);HJ-6B 多头磁力加热搅拌机(江苏金坛市金伟实验仪器厂);HZ-9212S 恒温振荡器(江苏太仓市科教器材厂);DZG-6050 真空干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);TGL-16B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);DL5M 低速冷冻离心机(湖南长沙凯达科学仪器有限公司);99-IIDN 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂);透析袋(美国Viskase公司,截留相对分子质量7000);ATS 高压均质机(加拿大ATS公司);Labconco 冷冻干燥机(美国Labconco公司)。

2 实验方法

2.1 低相对分子质量CS的合成及相对分子质量、

脱乙酰度的测定

2.1.1 低相对分子质量CS的合成 前处理:取CS原料适量分散于80倍($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)5.0%的醋酸中,自然溶胀3h后磁力搅拌溶解,滤过,滤液用 $5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节pH至11时析出胶状絮凝物,用蒸馏水洗至中性。所得絮状物重复上述纯化操作流程2次,收集絮凝物分别用无水乙醇和丙酮脱水数次, $45\text{ }^\circ\text{C}$ 真空干燥4h,收集干燥物备用。

降解反应:参照文献[7]并稍加修改,取上述干燥物10.0g溶于1500mL体积分数0.45%盐酸中,置于 $55\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中搅拌2h后,加入15mL30%过氧化氢调节浓度至0.3%,搅拌反应2h后,滴加 $5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节pH至11终止反应, $4\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,用蒸馏水将沉淀洗至中性,并抽滤除去多余水分,收集沉淀,冷冻干燥,过筛,备用。

2.1.2 黏均分子质量及脱乙酰度的测定 黏均分子质量的测定:采用黏度测定法^[8],根据Mark-Houwink方程计算壳聚糖的黏均分子质量:

$$[\eta] = 0.006589 \bar{M}_\eta^{0.88}$$

式中 $[\eta]$ 为特性黏度($\text{dL} \cdot \text{g}^{-1}$); \bar{M}_η 为黏均分子质量(Daton)。

脱乙酰度(degree of deacetylation,DD)的测定:采用酸碱滴定法^[9],以甲基橙-苯胺蓝为指示剂,按下式计算壳聚糖的DD:

$$\text{DD}\% = \frac{(c_{\text{HCl}}V_{\text{HCl}} - c_{\text{NaOH}}V_{\text{NaOH}}) \times 0.016}{m_{\text{chitosan}} \times 9.94\%} \times 100\%$$

式中 c_{HCl} 为盐酸标准溶液的浓度($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); c_{NaOH} 为氢氧化钠标准溶液的浓度($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); V_{HCl} 为加入盐酸标准溶液的体积(mL); V_{NaOH} 为滴定消耗氢氧化钠标准溶液的体积(mL);0.016为与1mL $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl溶液相当的氨基质量(g); m_{chitosan} 为干燥至恒重壳聚糖的质量(g);9.94%为理论氨基含量。

2.2 纳米粒的制备

称取处方量的TP和PEG-PLA溶于二氯甲烷溶液中构成有机相,在 $1\,500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 磁力搅拌下,将有机相缓慢加入到 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ poloxamer 188水溶液的水相中;探头超声2min(360W,工作2s,停1s),得到的初乳经FJ-200高速分散均质机分散后磁力搅拌3h,挥去有机溶剂,再经900bar高压均质,循环10次,将此初乳分散至一定体积的分散介质中($10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ poloxamer 188 $2\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 壳聚糖 $5\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸),得到带有蓝色乳光的CS/TP-NPs混悬液。

2.3 CS修饰前后纳米粒的性质比较

CS修饰的纳米粒(CS/TP-NPs)即按“2.2”项

下方法制备;未修饰的纳米粒(TP-NPs)制备方法同“2.2”,但在分散介质中不添加壳聚糖。以粒径、包封率、Zeta 电位为指标考察壳聚糖修饰剂对纳米粒的影响。

2.4 分析方法的建立

2.4.1 HPLC 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS2 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(43:57); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 25 °C; 检测波长: 218 nm; 进样量: 20 μL。

2.4.2 方法专属性 分别取 TP 对照品、空白纳米混悬液和 CS/TP-NPs 混悬液适量, 甲醇溶解, 按“2.4.1”项下 HPLC 色谱条件测定。

2.4.3 线性范围 精密称取减压干燥至恒重的 TP 对照品 5.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 得质量浓度为 500.00 μg · mL⁻¹ 的 TP 对照品贮备液。分别精密量取 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mL, 用甲醇稀释至 10 mL, 摇匀, 得质量浓度分别为 12.50、25.00、50.00、100.00、200.00 μg · mL⁻¹ 的系列溶液, 按“2.4.1”项下 HPLC 色谱条件测定, 以峰面积(A)对质量浓度(ρ)进行线性回归。

2.4.4 精密度实验 取 TP 对照品贮备液, 配制质量浓度分别为 12.50、50.00、200.00 μg · mL⁻¹ 的低、中、高 3 个浓度的对照品溶液, 按“2.4.1”项下 HPLC 色谱条件测定, 分别于 1 d 内测定 5 次, 连续测定 5 d。

2.4.5 重复性实验 取同一批次制备的 CS/TP-NPs 混悬液 6 份, 精密量取 1 mL 至 10 mL 量瓶, 用甲醇稀释至刻度。按“2.4.1”项下 HPLC 色谱条件测定。

2.4.6 稳定性实验 取 CS/TP-NPs 混悬液放置于室温下, 于 0、2、4、8、12、24 h 分别按“2.4.1”项下 HPLC 色谱条件测定。

2.4.7 回收率实验 精密量取已知含量 CS/TP-NPs 1.0 mL, 分别精密加入质量浓度为 500.0 μg · mL⁻¹ TP 对照品贮备液 0.25、1.00、4.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇适量超声, 并稀释至刻度, 配制成低、中、高 3 个质量浓度的溶液。经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液按“2.4.1”项下色谱条件进行测定, 计算加样回收率。

2.5 纳米粒的质量评价

2.5.1 纳米粒外观形态考察及粒径和 Zeta 电位的测定 吸取少量采用最优工艺制备的 CS/TP-NPs 混悬液滴至铜网上, 静置 2 min 后用滤纸片吸干, 再滴加 2.0% 磷钨酸溶液负染 2 min, 自然挥干, 用 JEM-1200EX 透射电子显微镜观察纳米粒的形态。

采用 Nano-ZS 型粒径分析仪测定平均粒径、多分散系数(polydispersity, PDI)及 Zeta 电位。

2.5.2 包封率与载药量测定 精密量取 CS/TP-NPs 混悬液 1 mL 于具塞离心管中, 13 000 r · min⁻¹ 离心 40 min, 取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液按“2.4.1”项下色谱条件测定游离 TP 的含量; 取沉淀用蒸馏水洗涤, 真空冷冻干燥后精密称定 CS/TP-NPs 总重量。另精密量取 CS/TP-NPs 混悬液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇适量超声, 并稀释至刻度, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液按“2.4.1”项下色谱条件测定 CS/TP-NPs 混悬液中 TP 的总含量。按下式计算 CS/TP-NPs 的包封率(encapsulation efficiency, EE)和载药量(drug loading, DL):

$$EE\% = (W_0 - W_1) / W_0 \times 100\%$$

$$DL\% = (W_0 - W_1) / W_1 \times 100\%$$

式中, W₀: CS/TP-NPs 中的总药物量; W₁: CS/TP-NPs 中游离药物量; W₁: CS/TP-NPs 的总重量。

2.5.3 体外释放实验 分别精密量取 TP 溶液和 CS/TP-NPs 混悬液 4.0 mL, 置于预先处理好的透析袋中, 密封后置于 300 mL 含体积分数 20% 乙醇的 pH 7.4 PBS 缓冲液中, 于(37 ± 0.5) °C 恒温水浴振荡(75 r · min⁻¹), 定时取样 1.0 mL, 并立即补加等量同温释放介质, 样品按“2.4.1”项下 HPLC 色谱条件测定, 计算累积释放率, 绘制体外释放曲线。

3 结果

3.1 CS 相对分子质量和脱乙酰度的测定

测得“2.1.1”项下 CS 的 \bar{M}_n 为 20 000, DD 为 90%。

3.2 分析方法的建立

按“2.4.1”项下 HPLC 色谱条件测定, TP 的保留时间为 6.9 min, 辅料和溶剂对药物测定均无干扰, 专属性良好, 见图 1。在 12.5 ~ 200 μg · mL⁻¹ 内, TP 标准曲线方程为 $A = 57.330\rho - 301.783$, $r = 0.9999$, 表明 TP 在 12.5 ~ 200 μg · mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系。

按“2.4.4”项下方法测定精密度, 测得低、中、高 3 个浓度的 TP 对照品溶液的日内精密度 RSD 分别为 1.84%、1.05%、1.70%, 日间精密度 RSD 分别为 1.67%、1.51%、2.69%。按“2.4.5”项下方法测定重复性, 测得 RSD 为 1.93%。按“2.4.6”项下方法测定稳定性, 考察室温对 TP 稳定性的影响, 测得 RSD 为 2.04%。按“2.4.7”项下方法测定加样回收率, 低、中、高 3 个浓度溶液的平均回收率分别为

97.6%、99.7%、98.6%，RSD 分别为 1.80%、1.22%、1.93%。平均回收率均在 97% 以上，满足方法学要求。

3.3 CS 修饰前后纳米粒的性质比较

CS 修饰对纳米粒的性质影响结果见表 1。由表 1 可知，CS 修饰 TP-NPs 后，纳米粒的粒径增大，Zeta 电位转为正值，但包封率几无变化。

3.4 纳米粒的质量评价

3.4.1 CS/TP-NPs 外观形态考察、粒径及 Zeta 电位的测定 由透射电镜照片可知，CS/TP-NPs 呈圆形或类圆形，大小及分布较均匀，粒子之间未见粘连和聚集现象；CS/TP-NPs 的平均粒径为 (202.62 ± 1.52) nm，PDI 为 (0.232 ± 0.009) 、Zeta 电位为 (0.17 ± 0.12) mV，见图 2 3。

3.4.2 CS/TP-NPs 包封率与载药量 CS/TP-NPs 的包封率和载药量分别为 $(58.20 \pm 2.43)\%$ 和 $(1.25 \pm 0.13)\%$ 。

3.4.3 体外释放实验 在含体积分数 20% 乙醇的 pH 7.4 PBS 缓冲液中，TP 在释放介质中释放很快，由体外释放曲线直接提取参数得 $t_{1/2}$ 为 0.6 h，至 2.5 h 药物已基本释放完全，累积释放率达 99.9%。CS/TP-NPs 前期释放具有一定的突释现象， $t_{1/2}$ 为 1.1 h，随后释放曲线渐趋平稳，缓慢释放，在 10.0 h 累积释放率达到 74.0%，显示出一定的缓释特征。体外释放曲线见图 4。

4 讨论

4.1 CS 常压烘干易结块，硬度大，不易粉碎，而采用冷冻干燥或乙醇脱水后真空干燥效果较好，与文

献[10]报道一致。CS 在干燥过程中，随着溶剂及水分的蒸发，CS 较为伸展的分子链由于脱溶剂化而不断卷曲，分子链之间的缠绕或结合趋于紧密。常

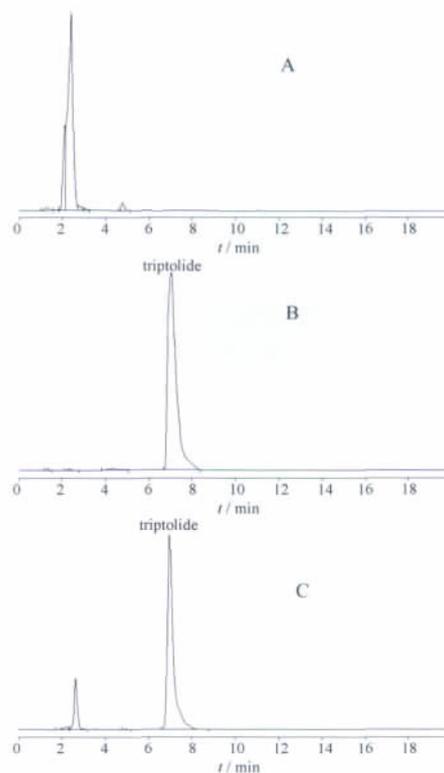


图 1 空白 NPs (A)，TP 对照品 (B)，CS/TP-NPs (C) 的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank nanoparticles (A)，TP standard solution (B)，CS/TP-NPs (C)

表 1 TP-NPs 和 CS/TP-NPs 的特性， $n=3 \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Characteristics of TP-NPs and CS/TP-NPs. $n=3 \bar{x} \pm s$

Type of nanoparticles	Particle size/nm	PDI	Encapsulation efficiency/%	Zeta potential/mV
TP-NPs	287.3 ± 8.7	0.208 ± 0.017	40.9 ± 1.94	-4.33 ± 0.21
CS/TP-NPs	302.9 ± 5.1	0.260 ± 0.019	38.5 ± 2.83	0.14 ± 0.13



图 2 CS/TP-NPs 透射电镜照片 ($\times 100\ 000$)

Fig. 2 TEM Photograph of CS/TP-NPs ($\times 100\ 000$)

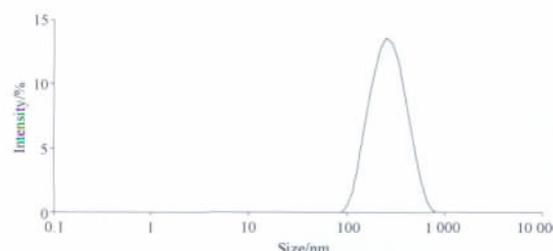


图 3 CS/TP-NPs 粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of CS/TP-NPs

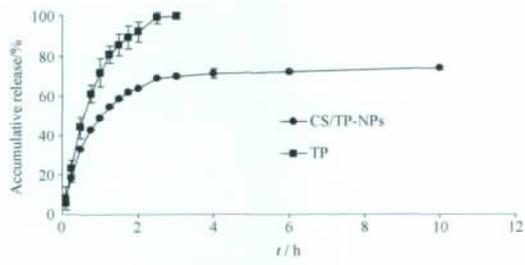


图4 TP和CS/TP-NPs体外释放曲线. $n=3$ $\bar{x} \pm s$

Fig. 4 *In vitro* release profiles of TP and CS/TP-NPs. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

压烘干时水分蒸发慢,分子链得到了充分卷曲和缠绕,因此形成的CS颗粒较粗;真空干燥促进了CS分子链的运动,分子间的缠绕或结合减少,因此真空干燥后的CS较疏松;冷冻干燥时水分升华逸出,在CS中间留下小孔,因此冷冻干燥后的CS较膨松。

4.2 本实验中CS以直接吸附的方式修饰TP-NPs,相关文献[11]表明,以直接吸附方式修饰纳米粒时,CS可通过静电作用吸附在纳米粒表面。本实验结果显示,未修饰CS的TP-NPs为负电性,经CS修饰后逆转为正电性,此结果也证实了CS已经修饰至纳米粒表面;经CS修饰后纳米粒的粒径增大,其原因可能是CS修饰增加了纳米粒的黏性,从而使其更容易发生聚集或CS修饰至纳米粒后,使纳米粒表面增加了一层CS薄膜,从而使粒径增大。

纳米粒制备过程中,在PEG-PLA和水相固定的情况下,随着有机相体积的减少,有机相黏度增大,有机相向水相中扩散的速率减慢,从而使药物从有机相向水相中扩散的阻力增大,包封率增大;但有机相黏度过大,会使纳米粒的粒径和多分散指数增大^[12]。当PEG-PLA和有机相体积固定时,随着水相体积增大,药物从有机相向水相中扩散的阻力减小,包封率下降。此外,在处方因素固定的情况下,随着均质次数的增加,初乳在长时间的剪切力下形成了更细小的乳滴,纳米粒粒径减小,包封率几无变化。

4.3 释放介质的选择需综合考虑药物的溶解性以及对其体液的模拟,TP为难溶性药物,在普通的释放介质(生理盐水、PBS缓冲液)中溶解度极小,无法准确测定其释放度。文献[13]报道,TP在含有一定乙醇的PBS缓冲液中溶解性能较好。故本实验选用含体积分数20%乙醇的pH 7.4 PBS缓冲液作为释放介质。

由于药物在纳米粒中可能有多种存在方式,如包封于纳米粒内,吸附纳米粒的表面或浅层,因此会对纳米粒的释药行为有不同影响。本实验中,纳米粒在1.1 h累计释放率达到了50%,可能是存在于表面或浅层药物的快速释放;而1.1~10.0 h释放相对缓慢,可能是由于包封于纳米粒内的TP通过纳米粒微孔的扩散较困难,其释放主要依赖于聚合物的降解。此外,聚合物的相对分子量、纳米粒的粒径、包封率及载药量等都可能对药物释放产生一定的影响^[13]。

REFERENCES

- [1] SU M X, GAO X, SONG M, *et al.* Study on influence of glucoside tripterygium total tablets on metabolism in rats by NMR metabonomic technique [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36(11): 1449-1452.
- [2] QIANG Z, TAO G, XUN S, *et al.* Synthesis, characterization and *in vitro* evaluation of triptolide-lysozyme conjugate for renal targeting delivery of triptolide [J]. *Arch Pharm Res*, 2006, 29(12): 1164-1170.
- [3] LI N, YANG X, ZHAI G, *et al.* Multifunctional pluronic/poly(ethylenimine) nanoparticles for anticancer drug [J]. *J Colloid Interface*, 2010, 350(1): 117-125.
- [4] YUAN Z X, LI J J, ZHU D, *et al.* Enhanced accumulation of low-molecular-weight chitosan in kidneys: A study on the influence of N-acetylation of chitosan on the renal targeting [J]. *J Drug Target*, 2011, 19(7): 540-551.
- [5] HE W, KUANG C C, ZHANG H, *et al.* Study on effect of molecular parameters of chitosan on properties of chitosan nanoparticles *in vitro* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2005, 40(6): 438-453.
- [6] ESSA S, RABANEL J M, HILDGEN P. Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly(ethylene glycol) grafting density [J]. *Int J Pharm*, 2011, 411(1-2): 178-187.
- [7] YUAN Z X, GONG T, ZHANG Z R, *et al.* Synthesis and characterization of water-soluble chitosan-prednisolone conjugates [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2007, 42(19): 1449-1452.
- [8] CHEN L S, ZHOU W, JIANG Y S. Determination the viscosity-average molecular weight of chitosan [J]. *Chemistry* (化学通报), 1996(4): 57-58.
- [9] LIN R X, JIANG S H, ZHANG M S. The methods about degree of deacetylation determination of chitosan [J]. *Chemistry* (化学通报), 1992(3): 39-42.
- [10] ZHAO H X, JIN H, CAI J Y. Microstructure and micromechanical properties of chitosan films under different drying conditions [J]. *Acta Phys Chim Sin* (物理化学学报), 2010, 26(3): 649-653.
- [11] CHEN H L, LV J L, YAN J, *et al.* The study of PLGA nanoparticle surface modified with chitosan as protein drug carriers [J]. *J Func Mater* (功能材料), 2011, 2(42): 202-205.
- [12] KHIN Y W, FENG S S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(15): 2713-2722.
- [13] LIU M X, DONG J, YANG Y J, *et al.* Preparation and toxicity of triptolide-loaded poly(D,L-lactic acid) nanoparticles [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2004, 39(7): 556-560.

(收稿日期: 2012-10-24)