

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.08.010 [http://www.crter.org]

徐美玲, 杨林, 廖红, 胡雪原, 张景勃. 美斯地浓聚乳酸载药纳米粒的制备及体外释放[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(8):1384-1389.

美斯地浓聚乳酸载药纳米粒的制备及体外释放★◆

徐美玲¹, 杨林², 廖红¹, 胡雪原¹, 张景勃¹

1 重庆医科大学药物高校工程研究中心和生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆市 400016

2 重庆市食品药品检验所, 重庆市 401121

文章亮点:

- 1 课题运用复乳液中干燥法制备美斯地浓聚乳酸纳米粒, 采用单因素实验设计方法优化处方, 成功制备了具有缓释效果的美斯地浓聚乳酸纳米粒。
- 2 美斯地浓生物半衰期短, 生物利用度低。目前已上市制剂为普通片剂, 每天需服药3次以上, 患者顺应性差。
- 3 创新之处: 探讨最优化的实验方法, 成功制备得到良好缓释作用的美斯地浓聚乳酸纳米粒。不足之处: 在时间允许的情况下可进一步研制包封率和载药量更高的制剂。

关键词:

生物材料; 纳米生物材料; 生物材料与药物控释; 纳米粒; 美斯地浓; 聚乳酸; 体外药物释放; 单因素实验; 缓释; 生物材料图片文章

摘要

背景: 美斯地浓临床常用于治疗重症肌无力, 但其水溶性较强, 半衰期短, 生物利用度低, 给药频率高, 患者依从性差, 因此提高其缓释作用对临床应用有重要意义。

目的: 制备美斯地浓聚乳酸纳米粒, 并考察其体外释放性能。

方法: 以聚乳酸为载药材料, 采用复乳液中干燥法制备美斯地浓聚乳酸纳米粒, 运用单因素实验设计优化处方, 动态透析法进行体外药物释放实验。

结果与结论: 确定以二氯甲烷作为油相制备纳米粒, 内水相与油相的比例 1:10, 聚乳酸浓度 6%, 外水相聚乙烯醇浓度 3%, 美斯地浓投药量 40 mg 为最佳制备工艺, 此条件制备的药物纳米粒包封率和载药率分别为(67.59±1.46)%和(4.31±0.17)%。美斯地浓聚乳酸纳米粒的平均粒径为 937 nm, 圆球形, 表面光滑, 未观察到粘连现象。与美斯地浓游离药物相比, 美斯地浓聚乳酸纳米粒存在突释现象, 之后呈现缓慢释放特性, 72 h 释放量为 57.03%, 提示成功制备美斯地浓聚乳酸纳米粒, 具有缓释效应。

Preparation and *in vitro* release of Mestinon-poly(lactic acid) nanoparticles

Xu Mei-ling¹, Yang Lin², Liao Hong¹, Hu Xue-yuan¹, Zhang Jing-qing¹

1 Medicine Engineering Research Center, Chongqing Key Laboratory of Biochemical & Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2 Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China

Abstract

BACKGROUND: Mestinon has been used for the symptomatic treatment of myasthenia gravis. It is very soluble in water, which may be responsible for the short half-life and poor bioavailability. The high dosing frequency may cause poor patient compliance. It is of great clinical significance to develop a Mestinon sustained release delivery system.

OBJECTIVE: To prepare a Mestinon-poly(lactic acid) nanoparticle and to assess its *in vitro* release characteristics.

徐美玲★, 女, 1986年生, 吉林省永吉市人, 2012年重庆医科大学毕业, 硕士, 现为重庆市急救中心药剂科药师, 主要从事药物新剂型与新技术研究。

通讯作者: 张景勃, 教授, 重庆医科大学药物高校工程研究中心和生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆市 400016
zjqrae01@163.com

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)08-01384-06

收稿日期: 2012-06-22

修回日期: 2012-07-21

(20120605006/GW·W)

Xu Mei-ling★, Master, Medicine Engineering Research Center, Chongqing Key Laboratory of Biochemical & Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Corresponding author: Zhang Jing-qing, Professor, Medicine Engineering Research Center, Chongqing Key Laboratory of Biochemical & Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
zjqrae01@163.com

Received: 2012-06-22

Accepted: 2012-07-21

METHODS: Mestinson-poly(lactic acid) nanoparticle was prepared by a double emulsion-solvent evaporation method. Poly(lactic acid) was used as the carrier material. The single factor experiment was carried out to properly formulate Mestinson-poly(lactic acid) nanoparticle. The *in vitro* release test was investigated by a dialysis method.

RESULTS AND CONCLUSION: The optimized conditions to prepare Mestinson-poly(lactic acid) nanoparticle were listed as follows: Dichloromethane was used as oil phase, the ratio between inner water phase and oil phase was 1:10, the poly(lactic acid) concentration was 6%, the polyvinyl alcohol concentration was 3%, and the amount of Mestinson was 40 mg. Mestinson-poly(lactic acid) nanoparticle prepared under the optimized conditions had an average particle size of 937 nm, an encapsulation efficiency of (67.59±1.46)% and a drug loading rate of (4.31±0.17)%. Mestinson-poly(lactic acid) nanoparticle displayed spherical shape with smooth surface and no aggregation was observed. Compared with free Mestinson, Mestinson-poly(lactic acid) nanoparticle had an initial burst release and subsequently a very slow release. The accumulated release rate of Mestinson-poly(lactic acid) nanoparticle was 57.03% at 72 hours. Mestinson-poly(lactic acid) nanoparticle with the good sustained-release characteristics could be successfully prepared.

Key Words: biomaterials; nanobiomaterials; biomaterials and drug release; nanoparticles; Mestinson; poly(lactic acid); *in vitro* drug release; single factor trial; sustained release; biomaterial photographs-containing paper

Xu ML, Yang L, Liao H, Hu XY, Zhang JQ. Preparation and *in vitro* release of Mestinson-poly(lactic acid) nanoparticles. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(8):1384-1389.

0 引言

为了获得药物缓释性能的改善, 纳米系统在近年的发展迅速^[1], 尤其是聚乳酸纳米粒得到越来越多的关注。聚乳酸作为一种可生物降解的材料已经被美国食品药品监督管理局批准用于人体临床使用^[2-3], 该类聚合物无毒、无刺激性、无热源性、无溶血作用、无致敏作用, 更由于其良好的生物相容性而被广泛应用于医学领域^[4-5]。美斯地浓是季铵类化合物, 作为一种可逆的胆碱酯酶抑制剂, 拮抗非去极化神经肌肉阻滞剂, 用于治疗重症肌无力超过50年, 同时也用于手术后腹部胀气和尿滞留^[6-7]。美斯地浓极易溶于水, 半衰期为1.0-2.0 h, 在健康志愿者体内的生物利用度仅为11.5%-18.9%^[8-9]。对于成年患者口服溴比斯的明片的常规剂量为每天五六次, 因此需要缓释给药系统来避免经常给药的问题^[10-11]。实验将聚乳酸纳米缓释系统应用于半衰期短、生物利用度低的化学药物美斯地浓, 制备药物的纳米粒并考察其性质。

1 材料和方法

设计: 体外观察实验。

时间及地点: 于2010年9月至2011年2月在重庆医科大学药物高校工程研究中心和生物化学与分子药理学重点实验室完成。

材料:

试剂与仪器: 美斯地浓(纯度>99%, 上海远城有限公司); 聚乳酸(重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程中心); 聚乙烯醇(PVA-217, 日本可乐丽公司); 二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮(重庆川东化工集团有限公司化学试厂); 分析电子天秤(瑞士Mettler Toledo仪器公司); DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司); RE-52AA旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 激光粒度仪(英国Malvern公司); XSP-35-1600X生物显微镜(江西凤凰光学集团有限公司); UV-3150紫外-可见分光光度计及UV-probe软件工作站(英国马尔文公司)。

实验方法:

美斯地浓聚乳酸纳米粒的制备: 采用复乳法液中干燥法(W/O/W)制备美斯地浓聚乳酸纳米

粒^[12-14]。将美斯地浓溶于水作为内水相(W₁)，聚乳酸的二氯甲烷溶液为油相(O)，冰浴条件下将两相混合高速搅拌乳化形成稳定的W₁/O初乳，将初乳快速滴加到一定浓度的聚乙烯醇水溶液(W₂)中，机械搅拌制成W₁/O/W₂复乳，室温下减压旋蒸除去有机溶剂，即得美斯地浓聚乳酸纳米粒。

单因素优化处方：根据文献[15]报道，许多组成因素对聚乳酸纳米粒包封率和载药率起着关键性的影响，通过大量预实验及相关的文献[16]，确定以单因素实验考察油相的种类(S)、内水相与油相的比例(W/O)、聚乳酸浓度(C₁)、外水相聚乙烯醇的浓度(C₂)以及美斯地浓投药量(C₃)对美斯地浓聚乳酸纳米粒包封率和载药率的影响，以优化制备包封率和载药率较高的制剂，各因素水平见表1。

表 1 美斯地浓聚乳酸纳米粒单因素考察实验方案

Table 1 Single factor test program of Mestison-poly(lactic acid) nanoparticles

水 平	因素				
	油相 种类	内水相/油相 (体积比)	聚乳酸浓度(% 质量/体积)	外水相聚乙烯醇浓 度(%，质量/体积)	美斯地浓投 药量(mg)
1	二氯 甲烷	1 : 2	0.5	0.5	10
2	乙醇	1 : 4	1	1.5	20
3	混合 溶剂	1 : 6	2	3	30
4	丙酮	1 : 8	4	5	40
5	-	1 : 10	6	7	50

注：将美斯地浓溶于水作为内水相，聚乳酸的二氯甲烷溶液为油相。

美斯地浓聚乳酸纳米粒表面形态学评价：

聚乳酸载药纳米的粒度和粒径分布的测定：样品在测定前用蒸馏水稀释 10 倍，25 °C 条件下以激光粒度仪测定粒径大小及分布，每个样品测定 3 份。

聚乳酸载药纳米粒外形的观察：样品测定前，以蒸馏水稀释 10 倍，通过生物显微镜观察其形态和结构，调整好相机的放大倍数再进行拍照。

聚乳酸载药纳米粒包封率和载药率的测定：纳米粒药物的包封率和载药率采用二阶导数光谱法测定^[17]。首先通过离心法分离纳米粒与游离药物，预通过测定游离药物计算包封率和载药率，紫外扫描发现空白辅料在药物的最大吸收波长 269 nm 处有吸收，对药物测定有干扰，因此不能用紫外分光光度法直接测定含量^[18-19]。对零阶导数光谱图进行二阶求导运算，即得到二阶导数光谱图，在二阶导数光谱图中波长为 287 nm 处，美斯地

浓有最大峰-零振幅，而空白基质在此波长处的吸收振幅值为零，对测定没有干扰，因此可以选用二阶导数光谱峰-零法测定混悬液中美斯地浓聚乳酸纳米粒游离药物的含量，从而计算出美斯地浓聚乳酸纳米粒的包封率和载药率。标准曲线方程为 $D=0.0094C+0.0066$ ， $r=0.9998$ 。美斯地浓在 16.68–38.92 mg/L 质量浓度范围，与振幅值(D)呈良好的线性关系。美斯地浓聚乳酸纳米粒在低、中、高浓度的加样回收率分别为 100.05%，99.56%，101.32%，其相对标准偏差分别为 0.76%，0.25%，0.21%，该方法回收率良好，满足含量测定要求。取高、中、低浓度的美斯地浓溶液各 5 份，连续 5 d，计算日间精密度。结果日内相对标准偏差(n=5)分别为 0.86%，0.29%，0.93%；日间相对标准偏差(n=5)分别为 1.04%，0.69%，1.21%，回收率和精密度试验满足方法学要求。包封率和载药率的计算公式如下：

$$\text{包封率}(\%) = \frac{W_{\text{total drug added}} - W_{\text{freedrug}}}{W_{\text{total drug added}}} \times 100\%$$

$$\text{载药率}(\%) = \frac{W_{\text{total drug added}} - W_{\text{freedrug}}}{W_{\text{total drug added}} + W_{\text{total PLA added}}} \times 100\%$$

式中“W_{total drug added}”为制备美斯地浓聚乳酸纳米粒时所加入的美斯地浓总药量，“W_{free drug}”为纳米粒制备后离心上清液中测得的药量，W_{total PLA added}为加入聚乳酸的总量

释放性能考察：采用动态膜透析法考察美斯地浓聚乳酸纳米粒和原料药美斯地浓的体外释药行为。取含美斯地浓 10 mg 的美斯地浓聚乳酸纳米粒和游离药物美斯地浓，置于经蒸馏水浸泡处理过的透析袋中，将含药透析袋置于盛有 pH 值 7.4 磷酸缓冲溶液 150 mL 释放介质的锥形瓶中，每个样品平行 3 份。温度为(37.0±0.5) °C，转速为 100 r/min。分别于 0.17, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 h 定时取样 0.5 mL，立即补加等量同质同温释放介质，计算累积释放百分率，并绘制释药曲线。

$$\text{累积释放率}(\%) = Q_t / Q_{\infty} \times 100\%$$

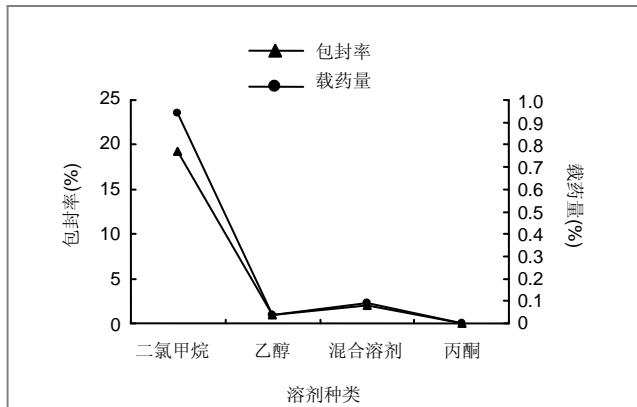
式中，Q_t为 t 时的释药量，Q_∞为 72 h 的总释药量

主要观察指标：美斯地浓聚乳酸纳米粒的性状及体外释药性能。

2 结果

2.1 单因素优化处方实验结果 在纳米粒制备的过程中，油相的种类(S)、内水相与油相的比例(W/O)、聚乳

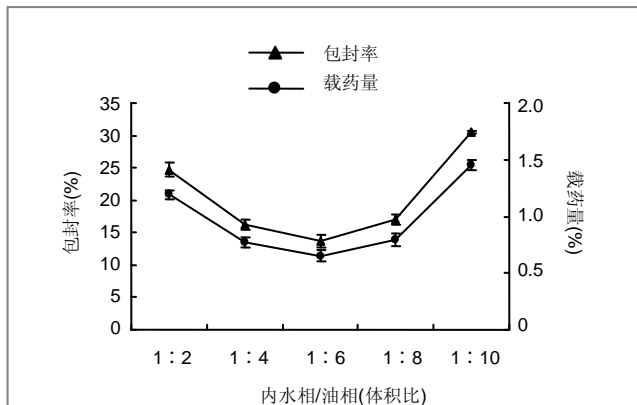
酸浓度(C_1)、外水相聚乙醇的浓度(C_2)以及美斯地浓投药量(C_3)对美斯地浓聚乳酸纳米粒包封率和载药率均具有影响, 结果见图1-5。



注: 以二氯甲烷作为油相制备纳米粒的包封率与载药率最佳。

图 1 不同油相组成对美斯地浓聚乳酸纳米粒包封率和载药率的影响

Figure 1 Effect of solvent types on entrapment efficiency and drug loading capacity of Mestison-poly(lactic acid) nanoparticles

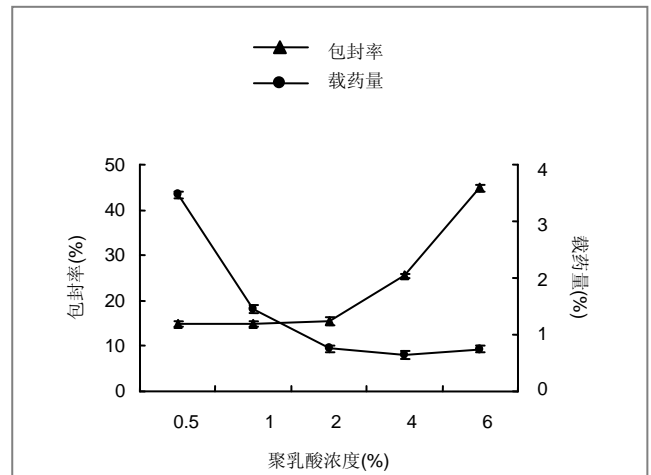


注: 美斯地浓溶于水的内水相与聚乳酸的二氯甲烷溶液油相的比例为 1:10 时, 纳米粒的包封率与载药量最佳。

图 2 不同内水相与油相比例对美斯地浓聚乳酸纳米粒包封率和载药率的影响

Figure 2 Effect of the volume ratio of inner water phase and oil phase on entrapment efficiency and drug loading capacity of Mestison-poly(lactic acid) nanoparticles

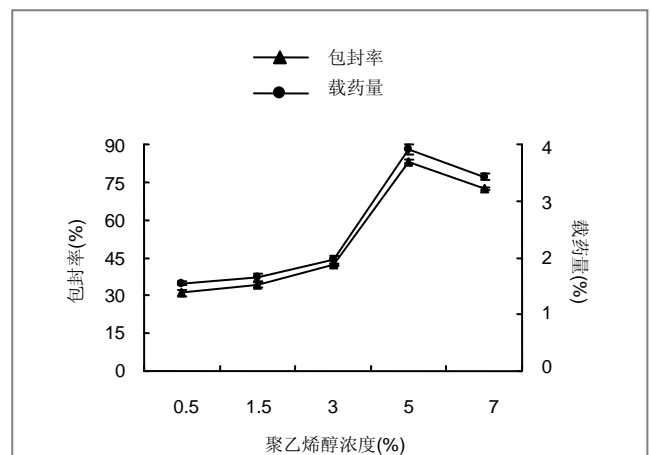
综合以上单因素实验结果, 确定以二氯甲烷作为油相制备纳米粒, 内水相与油相的比例, 聚乳酸浓度, 外水相聚乙醇的浓度, 美斯地浓投药量分别为 1:10, 6%, 3%, 40 mg 为最佳的制备工艺, 在此条件制备的药物纳米粒的包封率和载药率分别为 $(67.59 \pm 1.46)\%$ 和 $(4.31 \pm 0.17)\%$ 。



注: 当聚乳酸浓度为 6% 时, 纳米粒的包封率与载药量最佳。

图 3 不同聚乳酸浓度对美斯地浓聚乳酸纳米粒包封率和载药率的影响

Figure 3 Effect of the poly(lactic acid) concentration on entrapment efficiency and drug loading capacity of Mestison-poly(lactic acid) nanoparticles



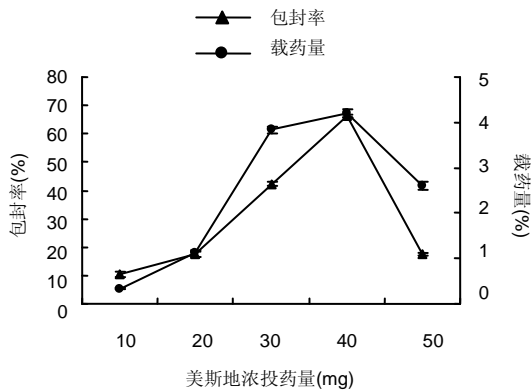
注: 当聚乙烯醇浓度为 3% 时, 纳米粒的包封率与载药量最佳。

图 4 不同聚乙烯醇浓度对美斯地浓聚乳酸纳米粒包封率和载药率的影响

Figure 4 Effect of the polyvinyl alcohol concentration on entrapment efficiency and drug loading capacity of Mestison-poly(lactic acid) nanoparticles

2.2 美斯地浓聚乳酸纳米粒的形态 最优化工艺条件下制备出的载药纳米粒的粒径分布见图6, 由图可见纳米粒的粒径分布较窄, 并较为均匀。

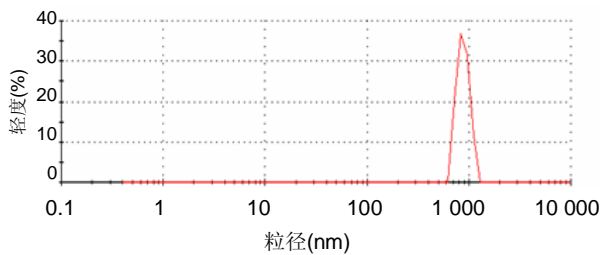
通过生物显微镜观察载药纳米粒, 见图7。聚乳酸载药纳米粒成球规整, 表面光滑, 分散比较均匀, 无粘连现象。



注: 当美斯地浓投药量为 40 mg 时, 纳米粒的包封率与载药量最佳。

图 5 不同美斯地浓投药量对美斯地浓聚乳酸纳米粒包封率和载药率的影响

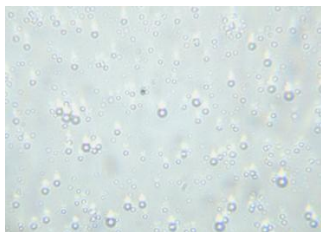
Figure 5 Effect of the amount of Mestison on entrapment efficiency and drug loading capacity of Mestison-poly(lactic acid) nanoparticles



注: 纳米粒的粒径分布较窄, 并较为均匀。

图 6 美斯地浓聚乳酸纳米粒的粒径分布图

Figure 6 The graph depicting particle size distribution

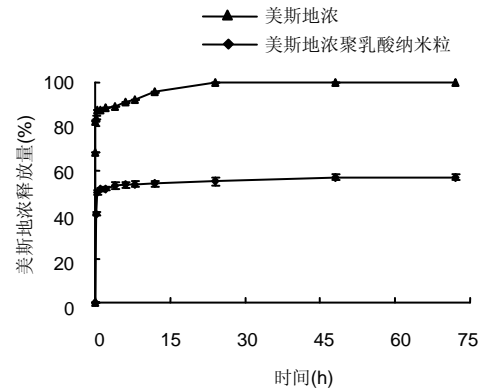


注: 聚乳酸载药纳米粒成球规整, 表面光滑, 分散比较均匀, 无粘连现象。

图 7 美斯地浓聚乳酸纳米粒的显微图片($\times 2\ 000$)

Figure 7 Photomicrographs of Mestison-poly(lactic acid) nanoparticles ($\times 2\ 000$)

不同时间间隔点定时取样并补充相同体积的释放介质, 二阶导数光谱法测定药物含量, 计算累积释药百分率, 见图8。



注: 美斯地浓聚乳酸纳米粒中大约有 50.05% 美斯地浓在 0.5 h 之内释放出来, 之后呈现缓慢释放的趋势, 72 h 释放量为 57.03%; 游离的美斯地浓在同样条件下, 在 0.5 h 内释放出药物(85.44 \pm 0.18)%, 24 h 时释放出(99.94 \pm 0.01)%。与游离药物相比, 美斯地浓聚乳酸纳米粒的释放速度相对缓慢, 具有一定的缓释效应。

图 8 美斯地浓聚乳酸纳米粒与美斯地浓在释放介质中的累积释放曲线

Figure 8 Cumulative release curve of Mestison-poly(lactic acid) nanoparticles and Mestison in the dissolution medium

由图8可知, 美斯地浓聚乳酸纳米粒存在突释现象^[20], 美斯地浓聚乳酸纳米粒中大约有 50.05% 美斯地浓在 0.5 h 之内释放出来, 之后呈现缓慢释放的趋势, 72 h 释放量为 57.03%; 对于游离的美斯地浓药物来说, 在同样条件下, 在 0.5 h 内释放出药物(85.44 \pm 0.18)%, 24 h 时释放出(99.94 \pm 0.01)%。与游离药物相比, 美斯地浓聚乳酸纳米粒的释放速度相对缓慢, 具有一定的缓释效应。

3 讨论

课题运用复乳液中干燥法制备美斯地浓聚乳酸纳米粒, 采用单因素实验设计方法优化处方, 成功制备了具有缓释效果的美斯地浓聚乳酸纳米粒。复乳液中干燥法常用于制备水溶性好的药物。美斯地浓是水溶性良好的药物, 因此实验将其溶于内水相, 选择工艺条件相对温和的复乳液中干燥法制备聚乳酸纳米粒, 以单因素实验考察了对药物纳米粒包封率和载药率影响较大的 5 个因素, 即油相的种类(S)、内水相与油相的比例(W/O)、聚乳酸浓度(C₁)、外水相聚乙烯醇的浓度(C₂)以及美斯

2.3 美斯地浓聚乳酸纳米粒的释放性能考察 分别在

地浓投药量(C_3), 综合分析单因素实验结果, 优化出最佳的工艺, 在此工艺条件制备的纳米粒具有较高的包封率和载药率, 制得的纳米粒形态圆整, 粒径分布均匀; 药物纳米粒包封率的测定方法, 选择了能够完全消除空白辅料干扰的二阶导数光谱法, 此方法简单、灵敏、重现性好, 结果准确可靠; 体外释药研究表明, 美斯地浓原料药释放迅速, 美斯地浓聚乳酸纳米粒存在一定的突释现象, 之后呈现缓慢释放的特点, 美斯地浓聚乳酸纳米粒中45.96%–50.05%的美斯地浓在0.5 h内释放出来, 反映出未被包裹的药物量, 在临床实践中, 这种突释现象为制剂的缓慢释放提供基础。另一方面, 被包裹的药物由于聚乳酸纳米粒而被阻碍, 药物很难从纳米粒中释放出来分散到释放介质中去, 正是之后美斯地浓聚乳酸纳米粒呈现出缓慢释放特性的原因。

作者贡献: 第一、五作者进行实验设计, 实验实施为第一、三作者, 实验评估为第二作者, 资料收集为第一、四作者, 第一作者成文, 第五作者审核, 第一、五作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 未涉及与伦理冲突的内容。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Adair JH, Parette MP, Altinoğlu EI, et al. Nanoparticulate alternatives for drug delivery. *ACS Nano*. 2010;4(9): 4967-4970.
- [2] Ishihara T, Takahashi M, Higaki M, et al. Preparation and characterization of a nanoparticulate formulation composed of PEG-PLA and PLA as anti-inflammatory agents. *Int J Pharm*. 2010;385(1-2):170-175.
- [3] Chen CC, Chueh JY, Tseng H, et al. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. *Biomaterials*. 2003;24(7):1167-1173.
- [4] Xiong XY, Guo L, Gong YC, et al. In vitro & in vivo targeting behaviors of biotinylated Pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles through biotin-avidin interaction. *Eur J Pharm Sci*. 2012; 46(5):537-544.
- [5] Lasprilla AJ, Martinez GA, Lunelli BH, et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices. *Biotechnol Adv*. 2012;30(1):321-328.
- [6] Andersen JB, Engeland A, Owe JF, et al. Myasthenia gravis requiring pyridostigmine treatment in a national population cohort. *Eur J Neurol*. 2010; 17(12): 1445-1450.
- [7] Barak D, Ordentlich A, Stein D, et al. Accommodation of physostigmine and its analogues by acetylcholinesterase is dominated by hydrophobic interactions. *Biochem J*. 2009; 417(1): 213-222.
- [8] Liu J, Qiu Z, Wang S, et al. A modified double-emulsion method for the preparation of daunorubicin-loaded polymeric nanoparticle with enhanced in vitro anti-tumor activity. *Biomed Mater*. 2010;5(6):065002.
- [9] Costa HM, Ramos VD, Visconte LLY, et al. Design and analysis of single-factor experiments: Analysis of variance of the effect of rice husk ash and commercial fillers in NR compounds. *Polymer Bulletin*. 2007;58:597-610.
- [10] Danhier F, Ansorena E, Silva JM, et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J Control Release*. 2012;161(2):505-522.
- [11] Wu ZM, Zhou L, Guo XD, et al. HP55-coated capsule containing PLGA/RS nanoparticles for oral delivery of insulin. *Int J Pharm*. 2012;425(1-2):1-8.
- [12] Li X, Chang S, Du G, et al. Encapsulation of azithromycin into polymeric microspheres by reduced pressure-solvent evaporation method. *Int J Pharm*. 2012;433(1-2):79-88.
- [13] Liu R, Ma GH, Wan YH, et al. Influence of process parameters on the size distribution of PLA microcapsules prepared by combining membrane emulsification technique and double emulsion-solvent evaporation method. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005;45(3-4):144-153.
- [14] Chognot D, Léonard M, Six JL, et al. Surfactive water-soluble copolymers for the preparation of controlled surface nanoparticles by double emulsion/solvent evaporation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2006;51(1):86-92.
- [15] Zhang JQ, Zhang ZR, Yang H, et al. Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: in vitro and in vivo studies. *Pharm Res*. 2005;22: 573-583.
- [16] Tan QY, Wang N, Yang H, et al. Characterization, stabilization and activity of uricase loaded in lipid vesicles. *Int J Pharm*. 2010;384(1-2):165-172.
- [17] Markovic B, Vladimirov S, Cudina O, et al. An application of second-order UV-derivative spectrophotometry for study of solvolysis of a novel fluocinolone acetonide ester. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectros*. 2010;75(2):930-935.
- [18] Xia SH, Lu J, Cao LY, et al. *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi*. 2007; 27(4):564-565.
夏曙辉, 陆鉴, 曹凌燕, 等. 二阶导数光谱法测定盐酸利多卡因胶浆中盐酸利多卡因的含量[J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(4): 564-565.
- [19] Wang Y, Zhang Y. *Yaowu Fenxi Zazhi*. 2007;27(1):139.
王彦, 张燕. 二阶导数光谱法测定硫酸阿托品胶浆剂的含量[J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(1):139.
- [20] Luan X, Skupin M, Siepmann J, et al. Key parameters affecting the initial release (burst) and encapsulation efficiency of peptide-containing poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Int J Pharm*. 2006;324(2):168-175.