

## 壳聚糖微球的制备方法研究进展

张越<sup>1,2,3</sup>, 师宪宪<sup>1</sup>, 于奕峰<sup>1,2,3</sup>

(1. 河北科技大学化学与制药工程学院, 河北石家庄 050018; 2. 河北省药用分子化学重点实验室, 河北石家庄 050018; 3. 河北省药物化工工程技术研究中心, 河北石家庄 050018)

**摘要:** 为了增加药物的靶向性、负载性及控释性能, 将其包覆在微球中。壳聚糖具有良好的生物相容性、生物可降解性、无毒副作用等特点, 可作为制备微球的载体。壳聚糖微球的制备方法主要有喷雾干燥法、乳化交联法、凝聚法、溶剂蒸发法等。综合国内外文献, 对其制备方法进行了综述研究。

**关键词:** 壳聚糖; 微球; 制备方法

中图分类号: TQ460.6 文献标志码: A

## Preparation methods of chitosan microspheres

ZHANG Yue<sup>1,2,3</sup>, SHI Xianxian<sup>1</sup>, YU Yifeng<sup>1,2,3</sup>

(1. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China; 2. Hebei Province Key Laboratory of Medicinal Chemistry, Shijiazhuang Hebei 050018, China; 3. Hebei Pharmaceutical Chemical Engineering Technology Research Center, Shijiazhuang Hebei 050018, China)

**Abstract:** Encapsulated drugs in microspheres can improve the targeting, loading, and release properties. As chitosan has good biocompatibility, biodegradable, non-toxic and non-vice, it can be used as the carrier during the preparation of microspheres. Spray drying, coacervation, emulsification crosslinking and solvent evaporation are the main methods to prepare chitosan microspheres. The domestic and foreign literatures are summarized, and the preparation methods are reviewed.

**Key words:** chitosan; microspheres; preparation method

壳聚糖是由蟹、虾外壳中的甲壳素脱乙酰基后得到的一种带正电荷的直链多糖, 也是唯一的碱性多糖。由于具有良好的生物相容性、易降解性, 以及无毒、抑菌、生物黏着性好等特点, 壳聚糖在药物载体方面有着广阔的应用前景<sup>[1-3]</sup>。使用壳聚糖制备的微球, 可以增加药物的水溶性及稳定性, 控制药物的释放, 提高药物的生物利用度, 改善体内脂肪的新陈代谢<sup>[4]</sup>。本研究综合国内外文献, 介绍了壳聚糖微球的主要制备方法。

### 1 壳聚糖的结构与性质

壳聚糖(chitosan), 化学名称为葡萄糖胺(1,4)-2-氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-葡聚糖, 其结构如图1所示。壳聚糖中大量的—OH和—NH<sub>2</sub>使其具有较强的吸附性, 易进行化学修饰。通过醛氨缩合反应可以使壳聚糖形成网状聚合物, 从而降低氨基被质子化的几率, 防止壳聚糖使用时的损耗及流失, 提高其应用特性<sup>[5-6]</sup>, 这一性质常用于壳聚糖微球的制备。

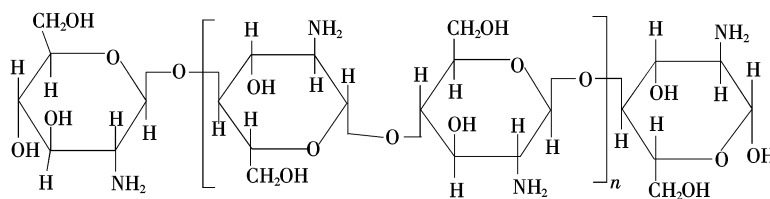


图 1 壳聚糖的结构

Fig. 1 Structure of chitosan

## 2 壳聚糖微球制备方法

### 2.1 制备壳聚糖微球的常用方法

#### 2.1.1 喷雾干燥法

喷雾干燥技术是将壳聚糖溶解分散于酸性溶液中,或形成 O/W, O/W/O, W/O/W 型乳剂后再在热气流中喷雾,使溶剂迅速蒸发为气体,形成壳聚糖微球。喷雾干燥法操作简单<sup>[7]</sup>,但制备的微球粒径不易控制,同时由于药物很难被包覆于体系中,药物的突释效应难以避免。此外,该方法不适合一些对温度敏感的药物<sup>[8-9]</sup>。

FILIPOVIC-GRCIC 等使用低、中、高不同分子质量的壳聚糖和羟丙基甲基纤维素(HPMC),以不同比例的药物-聚合物来制备壳聚糖微球<sup>[10]</sup>。其包封率和释放率决定于壳聚糖微球聚合物的组成以及药物和聚合物的比例,使用低分子质量的壳聚糖且加入 HPMC 时制备的微球的包封率最大。药物的载药量相对低的微球能更好地控制药物释放,含有 HPMC 的微球释放得更缓慢且无突释效应。

HE 等制备了微球表面带 Z 电势的壳聚糖微球,微球粒径分布均匀(2~10  $\mu\text{m}$ ),表面光滑,但表面形态稍显扭曲<sup>[11]</sup>。研究发现:非交联的壳聚糖微球不能悬浮在水溶液中,因此需加入交联剂来凝固微球;交联剂用量会影响粒径和 Z 电势,随着交联剂用量的减少,粒径和 Z 电势都增加;此外,微球粒径随着喷嘴尺寸、进料速度的增加而增加,随入口温度的增加而减小;与其他因素相比,入口温度对微球粒径影响最小。

壳聚糖可以吸附油脂和脂肪,因此可以帮助人类控制体重<sup>[12]</sup>。为提高壳聚糖对脂肪的结合效率同时降低毒副作用,王亚林用喷雾干燥法将壳聚糖制备成粒径为 2~5  $\mu\text{m}$  的微球,通过体外模拟人体的消化系统环境进行研究,考察壳聚糖微球吸附脂肪的效率<sup>[13]</sup>。结果表明,壳聚糖微球用量在 90 mg 时对脂类的结合能力为 19.53 g/g,对游离脂肪酸的结合能力为 12.15 mg/g,对胆酸盐的结合能力为 27.35 mg/g,均显著高于壳聚糖。这是由于壳聚糖微球的尺寸小,比表面积大,功能基富集在表面,包埋性能好,而且具有很强的吸附能力。此研究为新一代壳聚糖减肥类的产品开发提供了理论依据。

#### 2.1.2 凝聚法

凝聚法是在壳聚糖溶液中加入阴离子胶凝水溶液,形成不溶性的壳聚糖衍生物,经过滤、洗涤、干燥即得微球,属于物理包覆方式。该方法无有机溶剂的参与,制得的微球包封率高,缓释效应明显。凝聚法又分为单凝聚法和复凝聚法。

壳聚糖在碱性介质中溶解度会降低而使沉淀析出,单凝聚法就是利用此原理来制备的<sup>[14]</sup>。其过程是将壳聚糖通过压缩空气喷头吹入碱性溶剂(NaOH、乙二胺等)中,形成微粒。压缩空气的压力和喷头直径可以控制粒子的大小。来水利等利用此方法合成的羟丙基壳聚糖微球形状规整,包封率为 63%<sup>[15]</sup>。模拟人体肠液的稳定性实验时微球在 12 h 有少许破裂,72 h 全部破裂。表明物理包覆能够让药物释放出来。

复凝聚法是带大量正电荷的壳聚糖溶液与阴离子聚合物复凝聚成球,是自发相分离的过程。此方法可在较低的温度下进行。CHELLAT 等用壳聚糖和苍耳烷相互作用获得的复合水凝胶制备微球,实验表明 2 种聚合物复合使用能更好地控制微球的降解动力学<sup>[16]</sup>。DE 等制备了壳聚糖-藻酸钠纳米微球,当藻酸钠、CaCl<sub>2</sub> 和阳离子聚合物(聚-L-赖氨酸或壳聚糖)的最佳质量比为 100:17:10 时可以形成良好的纳米微球<sup>[17]</sup>。DAMBIES 等使用新型胶凝剂钼酸盐制备的壳聚糖微球,具有表面多孔、内层紧密的特殊双层结构,与使用阴离子胶凝剂制备的微球相比,结构和性能明显不同<sup>[18]</sup>。

#### 2.1.3 溶剂蒸发法

溶剂蒸发法又叫“液中干燥法”,是将壳聚糖醋酸溶液加入到油相中形成 W/O 型乳剂,然后蒸馏溶剂,

使微球固化制备壳聚糖微球的方法。该方法可以避免过高温度和可能引起相分离的凝聚剂<sup>[19]</sup>,得到的微球粒径在纳米范围内。但是由于溶剂蒸发可能导致药物泄漏在外相中,所以会使包封率与实际包封率有较大误差。

LI等通过常压溶剂蒸发法和减压溶剂蒸发法制备了阿奇霉素微球<sup>[20]</sup>。和常压溶剂蒸发法相比,减压溶剂蒸发法制备的微球表面更光滑,包封率更高,突释效应有所减缓。阿奇霉素的溶解性和pH值有关,pH值越高,包封率越好。较短的制备时间和溶剂的循环使用使减压溶剂蒸发法成为一种有前途的微球制备技术。

SARAVANAN等用溶剂蒸发法制备的乙基纤维素/PEG微球性能良好<sup>[21]</sup>。PEG的加入增加了微球的气孔,使微球具有浮力,药物可持续释放4~6 h。YOSHINO等制备了5-氟尿嘧啶、去氧氟尿苷以及四氢呋喃尿嘧啶壳聚糖微球<sup>[22]</sup>。由于没有加入表面活性剂,微球粒径达到300~900 μm。KOCHISCH等使用轻质矿物油制得微球,具有良好的生物黏附性和缓释效果<sup>[23]</sup>。

#### 2.1.4 乳化交联法

乳化交联法是微球制备中应用最广的方法。主要制备过程是将壳聚糖醋酸溶液加入到含有表面活性剂的分散介质中,形成W/O型乳化剂,然后加入交联剂,得到的微球经过滤、洗涤、干燥即得壳聚糖微球。交联剂可以是甲醛、戊二醛等,戊二醛因比甲醛更安全而获得较广泛的应用。许多文献报道了戊二醛交联的微球制剂,但是由于微球在体内降解后产生的少量戊二醛是否对人体有害仍然受到质疑,因此更安全的天然交联剂如香草醛、京尼平等用于壳聚糖微球的制备引起了人们更多的关注。

JOSE等以戊二醛为交联剂,胰岛素为药物模型,通过控制壳聚糖、戊二醛的浓度及交联时间3组变量进行正交试验,找到了制备壳聚糖微球的最佳条件<sup>[24]</sup>。以雄性维塔斯白化鼠进行的体外释放试验显示,壳聚糖微球实现了胰岛素的缓释,有效降低了血糖。

GAO等也以戊二醛为交联剂制备了苯烯莫德(DHPS)-壳聚糖载药微球<sup>[25]</sup>。微球形状圆整,粒径为8~12 μm,包封率超过36%。体外释放中,96 h内DHPS的释放率达到30.9%;透皮释放时,60 h DHPS的释放率已达到76.2%。结果显示,微球的稳定性及缓释效果良好。

PENG等以新型的天然交联剂香草醛制备的白藜芦醇-壳聚糖微球表面光滑,粒径为53~311 μm<sup>[26]</sup>。光稳定性实验显示,在紫外灯下连续照射60 min后,白藜芦醇(Res)的含量和壳聚糖微球中Res的含量分别为61.65%和78.04%(皆为质量分数)。这是由于交联后的壳聚糖微球有效阻止了Res的降解。热稳定性实验中,在60℃和70℃连续放置15 d后,Res的含量分别为71.59%和48.08%(皆为质量分数)。而微球中Res的含量分别为83.81%和74.88%(皆为质量分数)。其原因一是Res和壳聚糖之间形成的氢键使Res的熔点升高,Res在高温下更稳定;二是物理作用形成的球体对Res具有保护作用。

YUAN等以天然、无毒的京尼平为交联剂制备了包覆蛋白质A的壳聚糖微球<sup>[27]</sup>。未加交联剂的微球反应4 h药物释放率达到30.9%,体内可维持24 d;反应8~16 h的微球药物释放率达到52.3%~60.0%,并在体内维持31 d。而加入交联剂后,京尼平的浓度为1.0~2.0 mol/L,交联4 h时,24 d内释放率仅为12.4%~27.1%。交联后的微球释放率明显低于未交联的微球。这些数据显示,药物的释放率受交联度的影响很大。

张越等制备的京尼平壳聚糖微球表面为多孔型结构,可以包覆二苯乙烯类(3,5-二羟基-4-异丙基二苯乙烯、白藜芦醇、紫檀芪、氧化白藜芦醇、白皮杉醇等)化合物,使药物的稳定性提高,实现了缓控释,药物的包封率为30%~90%,且制备方法简单,易于操作<sup>[28]</sup>。

#### 2.1.5 离子交联法

该方法的基本过程是将壳聚糖溶液滴入阴离子水溶液中搅拌,再将微球从反离子溶液中取出,经洗涤、干燥即得<sup>[29-30]</sup>。此方法简单,不使用化学交联剂,避免了一些毒副作用。

邢志华等使用离子交联法,根据壳聚糖的氨基与叶酸的羧基的静电相互作用原理,制备的叶酸-壳聚糖(FA-CS)微球平均粒径范围分布很大(18~90 μm),粒径分散指数为 $1.10 \pm 0.02$ ,但是微球形态圆整,大小均匀且无粘连出现<sup>[31]</sup>。

杨春梅等以三聚磷酸钠(STPP)为交联剂制备5-氟尿嘧啶壳聚糖微球,药物释放突释作用小(30 min, 21.3%),48 h内体外累积释放率为77.0%<sup>[32]</sup>。这主要是由于STPP上含有5个氧负离子,与壳聚糖以离子键形式交联后形成致密的网状结构,使得微球缓释作用明显。

ZENG等采用离子交联法制备的神经因子(NGF)壳聚糖微球,释放缓慢,无明显突释作用,释放率随

交联剂 STPP 浓度的增加而减小,释放出的 NGF 可维持 PC12 的细胞生存,并且生物活性可维持 7 d<sup>[33]</sup>。这表明其在神经组织再生方面有着广阔的应用前景。

#### 2.1.6 悬浮交联法

马骏等使用“反相悬浮-交联-低温冷却法”制备固定化酶载体-多孔壳聚糖微球,粒径均匀、成球性好<sup>[34]</sup>。在聚合形成微球时加入的制孔剂  $\text{CCl}_4$  占据一定的空间,形成的微球表面成多孔结构。通过正交试验得知提取时间和乳化剂 (span 80) 用量对微球的粒径影响大。

陈宇等在最佳条件下制备了粒径分布较窄的微米级壳聚糖微球,测定了其对于薄荷油的吸附能力<sup>[35]</sup>。结果表明,在吸附初期速度非常快,然后趋于平缓,符合吸附规律,但吸附能力有一定的局限性。

#### 2.1.7 乳液液滴凝聚法

该方法是 TOKUMITSU 等结合乳化交联法和化学沉淀法进一步发展得到的<sup>[36]</sup>。壳聚糖/药物的稳定乳液液滴和壳聚糖/NaOH 的水溶性稳定乳液液滴在高速搅拌下混合,致使 2 种乳液液滴随机碰撞、结合,而后经分离得到微粒<sup>[37-38]</sup>。粒子的大小和壳聚糖的脱乙酰度有关,随其减小而增大;载药量则相反,当壳聚糖的脱乙酰度为 100% 时平均粒径为 452  $\mu\text{m}$ ,载药量为 45%。

SIVABALAN 等通过筛选不同聚合物及表面活性剂确定了制造配方,即聚合物质量分数为 1.0%~2.5%,tween-20 为表面活性剂时药物有较高的包封率和释放率<sup>[39]</sup>。据此配方制备的 5-氟尿嘧啶纳米颗粒与原有剂型相比对癌细胞的靶向性更强。

### 2.2 其他方法

除了以上常用的制备壳聚糖微球的方法外,还有一些其他制备方法,如壳聚糖微球乙酰化法、壳聚糖溶液包衣法、反相胶束法和筛分法。

#### 2.2.1 壳聚糖微球乙酰化法

POTERO 等制备的乙酰化壳聚糖微球可以控制其吸水膨胀的容量且在酸性条件下易凝胶化,进而可延长药物的释放时间<sup>[40]</sup>。此外,乙酰化时间可影响药物的释放、包覆的抗生素的活性。

周旋将壳聚糖微球 (CMs) 乙酰化得到乙酰化壳聚糖微球 (ACMs),2 种微球粒径均一,大小相似<sup>[41]</sup>。结果显示,CMs 的溶胀率受 pH 值的影响较大,pH 值越低溶胀率越高。但是,pH 值对 ACMs 的溶胀影响不明显。

#### 2.2.2 壳聚糖溶液包衣法

樊军等采用 *N*-三甲基壳聚糖 (TMC60) 对脂质体包衣,包衣后的脂质体粒径略有增加,Z 电势由负转正,形态均较圆整<sup>[42]</sup>。与未包衣的脂质体相比,包衣微粒缓释作用更显著。MAZZARINO 等制备的包衣后的纳米粒子的粒径和 Z 电势都得到改变,并且其载药量高达 99%,通过静电效应与黏蛋白的相互作用,增加了其作为黏膜黏着剂载体的可能性<sup>[43]</sup>。

#### 2.2.3 反相胶束法

反相胶束法是热稳定的水、油和表面活性剂的混合体系,可通过调节水、有机相和表面活性剂的比例来调节反相胶束的尺寸大小。MITRA 等采用反相胶束法将阿霉素和葡聚糖的复合药物包覆在壳聚糖纳米粒子中<sup>[44]</sup>。实验证明,在治疗肿瘤中,不仅减少了副作用而且提高了疗效。

#### 2.2.4 筛分法

AGNIHOTRI 等使用此方法制备了壳聚糖微粒<sup>[45]</sup>。将一定质量的壳聚糖溶于 4% (体积分数) 的醋酸溶液中,加入戊二醛交联壳聚糖来获得不粘连的玻璃态的水凝胶,然后通过合适筛孔的筛子。将微粒用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液清洗除去过量的戊二醛,然后在 40 °C 的烘箱中干燥过夜。若交联之前在壳聚糖溶液中加入氯氮平,则微粒的包封率可达到 98.9%。此方法操作简单并可进行放大实验,但是得到的微粒粒径并不均匀。

## 3 结 语

壳聚糖由于具有良好的安全特性而用于药物的载体研究。近年来,壳聚糖微球作为一种新型的药物载体而备受关注。随着生物技术的发展,其制备工艺会日趋完善,应用范围会更加广泛。

## 参考文献/References:

- [1] AGNIHOTRI S A, MALLIKARJUNA N N, AMINABHAVI T M. Recent advances on chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery[J]. *J Control Release*, 2004, 100(1): 5-12.
- [2] 陈新梅. 壳聚糖微球研究进展[J]. *中国药师*, 2009, 12(6): 734-737.  
CHEN Xinmei. Research progress of chitosan microspheres[J]. *China Pharmacist*, 2009, 12(6): 734-737.
- [3] 贾守雄, 李平, 魏琴. 生物黏附药物传输系统研究进展[J]. *中国药师*, 2007, 10(10): 972-975.  
JIA Shouxiong, LI Ping, WEI Qin. Research progress of biological adhesion drug delivery system[J]. *China Pharmacist*, 2007, 10(10): 972-975.
- [4] SINHA V R, SINGLAINGLA A K, WADHAWAN R, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 274(1/2): 1-33.
- [5] HE Peng, STANLEY S D, LISBETH I. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998, 166: 75-78.
- [6] 何小立, 邓瑞红, 王国永, 等. 不同类型壳聚糖及壳聚糖微球的制备与性质研究[J]. *江西化工*, 2005(3): 57-60.  
HE Xiaoli, DENG Ruihong, WANG Guoyong, et al. The study of the preparation and properties of different types of chitosan and chitosan microspheres[J]. *Jiangxi Chemical Industry*, 2005(3): 57-60.
- [7] 邓菲. 喷雾干燥法生产无菌原料药的质量风险与控制[J]. *河北工业科技*, 2012, 29(5): 314-317.  
DENG Fei. The production of sterile materials quality risk and control by spray drying method[J]. *Hebei Journal of Industrial Science and Technology*, 2012, 29(5): 314-317.
- [8] 姬振行, 安静, 王德松, 等. 壳聚糖微球的制备与应用[J]. *材料导报: 综述篇*, 2010, 24(7): 128-132.  
JI Zhenxing, AN Jing, WANG Desong, et al. Preparation and application of chitosan microspheres[J]. *Materials Review: A Review Article*, 2010, 24(7): 128-132.
- [9] 李学斌, 祝华. 壳聚糖微球制备方法研究[J]. *药学进展*, 2005, 29(4): 166-169.  
LI Xuebin, ZHU Hua. Preparation methods of chitosan microspheres[J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2005, 29(4): 166-169.
- [10] FILIPOVIC-GRCIC J, PERISSUTTI B, MONEGHINI M, et al. Spray-dried carbamazepine loaded chitosan and HPMC microspheres: Preparation and characterisation[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55(7): 921-926.
- [11] HE Peng, STANLEY S D, LISBETH I. Chitosan microspheres prepared by spray drying[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 187(1): 53-65.
- [12] NI M C, POPPITT S D, MCGILL A T, et al. The effect of the dietary supplement, chitosan, on body weight: A randomised controlled trial in 250 overweight and obese adults[J]. *Int J Obes*, 2004, 28(9): 1 149-1 156.
- [13] 王亚林. 壳聚糖微球体外降脂活性研究[J]. *北京生物医学工程*, 2011, 30(5): 512-515.  
WANG Yalin. Chitosan microspheres in vitro lipid-lowering active research[J]. *Beijing Biomedical Engineering*, 2011, 30(5): 512-515.
- [14] NISHIMURA K, NISHIMURA S, SEO H, et al. Macrophage activation with multiporous beads prepared from partially deacetylated chitin[J]. *J Biomed Mater Res*, 1986, 20: 1 359-1 372.
- [15] 来水利, 王克玲. 羟丙基壳聚糖微球的制备与性能[J]. *塑料*, 2010, 39(1): 16-19.  
LAI Shuili, WANG Keling. The preparation of hydroxypropyl chitosan microspheres with performance[J]. *Plastics*, 2010, 39(1): 16-19.
- [16] CHELLAT F, TABRIZIAN M, DUMITRIU S, et al. Study of biodegradation behavior of chitosan-xanthan microspheres in simulated physiological media[J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 53(5): 592-599.
- [17] DE S, ROBINSON D. Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-L-lysine-alginate nanospheres[J]. *J Controlled Release*, 2003, 89(1): 101-112.
- [18] DAMBIES L, VINCENT T, DOMMARD A, et al. Preparation of chitosan gel beads by ionotropic molybdate gelation[J]. *Biomacromolecules*, 2001, 2(4): 1 198-1 205.
- [19] 刘志挺. 溶剂蒸发法在微球制备中的应用及研究进展[J]. *广东药学院学报*, 2007, 23(5): 596-600.  
LIU Zhiting. The application of solvent evaporation method in preparation of microspheres and research progress[J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2007, 23(5): 596-600.
- [20] LI Xiujuan, CHANG Si, DU Guangsheng, et al. Encapsulation of azithromycin into polymeric microspheres by reduced pressure-solvent evaporation method[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 433(1/2): 79-88.
- [21] SARAVANAN M, ANUPAMA B. Development and evaluation of ethylcellulose floating microspheres loaded with ranitidine hydrochloride by novel solvent evaporation-matrix erosion method[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 85(3): 592-598.
- [22] YOSHINO T, MACHIDA Y, ONISHI H, et al. Preparation and characterization of chitosan microspheres containing doxifluridine[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2003, 29(4): 417-427.
- [23] KOCHISCH S, REES G D, YOUNG S A, et al. In situ evaluation of drug-loaded microspheres on a mucosal surface under dynamic test conditions[J]. *Int J Pharm*, 2004, 276(1/2): 51-58.
- [24] JOSE S, FANGUEIRO J F, SMITHA J, et al. Cross-linked chitosan microspheres for oral delivery of insulin: Taguchi design and in

- vivo testing[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 92: 175-179.
- [25] GAO Jungang, ZHANG Yue, YU Yifeng, et al. Preparation of chitosan microspheres loading of 3,5-dihydroxy-4-i-propylstilbene and in vitro release[J]. *J Polym Res*, 2011, 18(6): 1 501-1 508.
- [26] PENG Hailong, XIONG Hua, LI Jihua, et al. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled released of resveratrol[J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(1): 23-28.
- [27] YUAN Y, CHESNUTT B M, UTTURKAR G, et al. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 68(3): 561-567.
- [28] 张越, 黄道伟, 牛东杰, 等. 生物提取物京尼平交联壳聚糖包覆二苯乙烯类化合物的缓控释微球及其制备方法[P]. 中国专利: 102240268, 2011-05-06.
- ZHANG Yue, HUANG Daowei, NIU Dongjie, et al. The Two Styrene Compounds Controlled Release of Biological Extract Genipin Chitosan Microspheres with the Preparation Methods[P]. CN:102240268,2011-05-06.
- [29] POLK A, AMSOEN B, YAO K D, et al. Controlled-released of albumin from chitosan-alginate microspheres[J]. *J Pharm Sci*, 1994, 83: 178-185.
- [30] LIU L S, LIU S Q, NG S Y, et al. Controlled released of interleukin-2 for tumour immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres[J]. *J Controlled Rel*, 1997, 43(1): 65-74.
- [31] 邢志华, 方桂珍. 离子交联法制备叶酸-壳聚糖微球工艺研究[J]. *黑龙江医药*, 2011, 24(6): 915-917.
- XING Zhihua, FANG Guizhen. The preparation research of ionic crosslinking of folic acid-chitosan microspheres[J]. *Heilongjiang Medicine Journal*, 2011, 24(6): 915-917.
- [32] 杨春梅, 顾磊, 孙怡, 等. 离子交联法制备氟尿嘧啶壳聚糖微球[J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2010, 36(4): 546-549.
- YANG Chunmei, GU Lei, SUN Yi, et al. The preparation of fluorouracil chitosan microspheres with ionic crosslinking method[J]. *Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2010, 36(4): 546-549.
- [33] ZENG Wen, HUANG Jinghui, HU Xueyu, et al. Ionically cross-linked chitosan microspheres for controlled released of bioactive nerve growth factor[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 421(2): 283-290.
- [34] 马骏, 宁光辉, 廖子夷, 等. 固定化酶载体-多孔壳聚糖微球的制备研究[J]. *四川师范大学学报(自然科学版)*, 2009, 32(3): 339-342.
- MA Jun, NING Guanghui, LIAO Ziyi, et al. The preparation of immobilized enzyme carrier -porous chitosan microspheres[J]. *Journal of Sichuan Normal University(Natural Science Edition)*, 2009, 32(3): 339-342.
- [35] 陈宇, 刘兆丽, 吴庆辉. 微米级壳聚糖微球的制备[J]. *大连工业大学学报*, 2012, 31(3): 203-206.
- CHEN Yu, LIU Zhaoli, WU Qinghui. The preparation of micron grade chitosan microspheres[J]. *Journal of Dalian University of Technology*, 2012, 31(3): 203-206.
- [36] TOKUMITSU H, ICHIKAWA H, FUKUMORI Y. Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron capture therapy of cancer; Preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization[J]. *Pharm Res*, 1999, 16(1): 1 830-1 835.
- [37] AGNIHOTRI S A, MALLIKARJUNA N N, AMINABHAVI T M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2004, 100(1): 5-28.
- [38] 刘炳选, 张亚通, 李立, 等. 乳液法合成阳离子聚丙烯酰胺污水絮凝剂的研究[J]. *河北工业科技*, 2011, 28(3): 173-176.
- LIU Bingxuan, ZHANG Yatong, LI Li, et al. The research of emulsion method synthesis of cationic polyacrylamide wastewater flocculants[J]. *Hebei Journal of Industrial Science and Technology*, 2011, 28(3): 173-176.
- [39] SIVABALAN M, SHERING A, REDDY P, et al. Formulation and evaluation of 5-fluorouracil loaded chitosan and eudragit nanoparticles for cancer therapy[J]. *Pharmacie Globale, International Journal of Comprehensive Pharmacy*, 2011, 2(1): 1-4.
- [40] POTERO A, REMUNAN-LOPEZ C, CRIADO M T, et al. Reacetylated chitosan microspheres for controlled delivery of antimicrobial agents to the gastric mucosa[J]. *J Microencapsul*, 2002, 19(6): 797-809.
- [41] 周旋. 壳聚糖微球制备优化及其乙酰化微球作为潜在栓塞材料的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- ZHOU Xuan. Preparation of Chitosan Microspheres Optimization and Its Acetylated Microspheres as Potential Embolization Materials [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [42] 樊军, 何文. 溴吡斯的明 N-三甲基壳聚糖包衣脂质体的研制及其体外释药研究[J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(5): 455-458.
- FAN Jun, HE Wen. Study on pyridostigmine bromide N - trimethyl chitosan coating the liposomes and in vitro release[J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2011, 27(5): 455-458.
- [43] MAZZARINO L, TRAVELET C, ORTEGA-MURILLO S, et al. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 370(1): 58-66.
- [44] MITRA S, GAUR U, GHOSH P C, et al. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier[J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 74(1/3): 317-323.
- [45] AGNIHOTRI S A, AMINABHAVI T M. Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method [J]. *J Control Release*, 2004, 96(2): 245-259.