

## 环孢素 A 白蛋白纳米粒的制备、体外释放及大鼠药代动力学评价

张勇<sup>1</sup>, 高敏姣<sup>1</sup>, 张来芳<sup>1\*</sup>, 霍美蓉<sup>2</sup>, 彭晓玲<sup>2</sup>, 周建平<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 江苏正大天晴药业股份有限公司, 南京 210023; <sup>2</sup> 中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009)

**摘要** 以人血白蛋白为载体, 制备环孢素 A 白蛋白纳米粒 (CyA-HSA), 考察其包封率、载药量、粒径、Zeta 电位、pH、渗透压、形态、稀释稳定性等理化性质, 并以透析法研究其体外释药特性。结果表明, 所制得的 CyA-HSA 纳米粒载药量为 14.7%, 包封率为 85.8%, 动态光散射法测定其粒径为 240.5 nm, Zeta 电位为 -32.0 mV, pH 为 7.0, 渗透压为 314.7 mOsmol/kg。透射电镜照片表明该纳米体系为规整的球形结构。CyA-HSA 纳米制剂比市售环孢素 A 注射剂 (山地明) 具有更优越的稀释稳定性, 且二者皆具有缓释特性, 并呈现零级释药特征。CyA-HSA 和山地明注射剂同剂量 (7 mg/kg) 静脉注射后, 二者体内过程均符合二房室模型, 与山地明注射剂相比, CyA-HSA 的药物清除率和药物从中央室的消除速率常数  $k_{10}$  均有显著下降, AUC 显著提高 ( $P < 0.05$ )。HSA 纳米粒能够高效负载 CyA, 同时克服了山地明注射剂中增溶剂 (聚氧乙烯蓖麻油) 的不良反应, 有望开发成为环孢素的新一代制剂。

**关键词** 环孢素 A; 白蛋白; 纳米粒; 药代动力学

中图分类号 R994; R969.1 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)03-0239-05

## Cyclosporine A-loaded albumin nanoparticles: preparation, *in vitro* release and evaluation of pharmacokinetics in rats

ZHANG Yong<sup>1</sup>, GAO Minjiao<sup>1</sup>, ZHANG Laifang<sup>1\*</sup>, HUO Meirong<sup>2</sup>, PENG Xiaoling<sup>2</sup>, ZHOU Jianping<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Jiangsu Chia-Tai Tianqing Pharmacy Co. Ltd., Nanjing 210023;

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Cyclosporine A-loaded human serum albumin nanoparticles (CyA-HSA) were prepared and physico-chemical properties including entrapment efficiency, drug-loading capability, particles size, Zeta potential, morphology, pH value and osmotic pressure were evaluated. Dialysis was undertaken to investigate the release of CyA from CyA-HSA nanoparticles *in vitro*. The obtained CyA-HSA nanoparticles showed spherical shape with mean particle sizes of 240.5 nm and Zeta potential of -32.0 mV. The drug-loading amount and entrapment efficiency were 14.7% and 85.8%, respectively. The pH and osmotic pressure of nanoparticles were 7.0 and 314.7 mOsmol/kg, respectively. CyA-HSA nanoparticles exhibited better dilution stability than commercial cyclosporine A injection, Sandimmune®. Both CyA-HSA and Sandimmune® exhibited significant sustained release behavior *in vitro* and both release profiles displayed a zero-order process. The pharmacokinetic study at equal administration dosage (7 mg/kg) in rats showed that cyclosporine A concentration-time data were in accordance with the two-compartment model. The CL and  $k_{10}$  of CyA-HSA significantly decreased and AUC significantly increased compared to those of Sandimmune® ( $P < 0.05$ ). CyA-HSA nanoparticles showed obvious solubility enhancement, sustained release and less side effect and toxicity resulting from solubilizing agent of Sandimmune®, Cremophor EL, and might be developed as the next generation dosage form of cyclosporine A.

**Key words** cyclosporine A; albumin; nanoparticles; pharmacokinetics

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81102397); and China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2009ZX09310-004)

\* 收稿日期 2013-04-02 \* 通信作者 Tel: 025-868551502 E-mail: zhanglf\_citq@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81102397); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (No. 2009ZX09310-004)

第3代高效免疫抑制剂环孢素A(CyA)是一种从丝状真菌培养液中分离出的由11个氨基酸残基组成的环肽,主要用于器官移植或组织移植后排异反应的防治和自身免疫性疾病的治疗<sup>[1]</sup>。由于其水中溶解度小于 $7.3\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,目前临床使用的环孢素A注射剂(山地明)处方中采用65%以上的聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor EL)作为增溶剂,而此辅料易导致超敏反应和肝肾毒性等<sup>[2]</sup>。因此,开发不含Cremophor EL的环孢素A注射制剂具有重要意义。

人清血白蛋白(HSA)是人血浆中最丰富的蛋白质,具有化学性能稳定、免疫原性小、生物相容性好、体内半衰期长等特点<sup>[3]</sup>,且由于其多肽链上带有较多极性基团及疏水性氨基酸,对70%小分子药物、特别是难溶性药物具有高度的亲和力,且可发生可逆结合<sup>[4]</sup>,因此,人清血白蛋白作为药物载体材料受到日益关注。然而目前报道的白蛋白纳米粒或微粒的制备方法主要有:乳化凝聚法、去溶剂化法、pH凝聚法等<sup>[5]</sup>,但存在使用大量油相或有机溶剂、需要化学交联剂或加热变性固化、仅适合水溶性药物包封递送等缺陷。

药物结合白蛋白纳米(nab)技术由美国生命科学公司开发,主要以白蛋白为载体材料,实现水难溶性且具有高蛋白结合率药物的递送<sup>[6]</sup>。目前,紫杉醇结合白蛋白纳米粒(Abraxane<sup>®</sup>)已获得FDA批准上市<sup>[7]</sup>。本研究参照nab技术开发了CyA的白蛋白纳米粒,并以山地明注射剂为对照,考察了其理化性质及大鼠药代动力学行为。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

环孢素A(纯度>98%,台州市化学制药有限公司);环孢素D(CyD,纯度99%,福建科瑞药业有限公司);人血清白蛋白注射液(20%,奥地利Baxter AG公司);山地明注射剂(本实验室自制,每毫升含CyA 50 mg, Cremophor EL 650 mg, 32.9%无水乙醇,适量氮气);乙腈、甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司);5%葡萄糖注射液(山东华鲁制药有限公司);肝素钠(美国Sigma公司);其他试剂均为市售分析纯;实验用水为双蒸水。

### 1.2 仪器

Zetasizer 3000HS 粒径仪(英国Malvern公司);

pHS-25B型数字酸度计(上海大普仪器有限公司);SMC 30 渗透压摩尔浓度测定仪(天津天河医疗仪器有限公司);H-7000 透射电子显微镜(日本日立公司);LC-2010C 高效液相色谱仪(日本岛津公司);FA-2004 型电子天平(上海精密仪器厂)。

### 1.3 动物

健康SD 雄性大鼠,体重( $220 \pm 30$ )g,南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供,动物合格证号:SCXK(苏)2009-0001。

## 2 方法

### 2.1 CyA-HSA 纳米粒冻干粉的制备

将人血白蛋白注射液以水稀释至 $5\text{ mg/mL}$ ,量取10 mL,逐滴滴加CyA的乙醇溶液( $40\text{ mg/mL}$ ) $250\text{ }\mu\text{L}$ ,冰浴下探头超声30 min,双蒸水透析过夜, $0.8\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,即得载药纳米粒溶液, $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱放置预冻24 h后,冷冻干燥24 h即得下纳米粒冻干粉。

### 2.2 包封率和载药量测定

采用RP-HPLC法测定纳米粒溶液CyA含量<sup>[8]</sup>。色谱条件:色谱柱为Hedra ODS-2 C<sub>18</sub>( $4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ),流动相为甲醇-水(90:10),流速为 $1\text{ mL/min}$ ,柱温为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,检测波长为 $206\text{ nm}$ ,进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。CyA标准溶液在 $0.1 \sim 20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的范围内线性良好,标准曲线为: $A = 4.062 \times 10^3 c - 2.533 \times 10^3$  ( $r = 0.9999$ )。精密称取载药纳米粒冻干粉10 mg,以5%葡萄糖水溶液复溶,精密量取CyA-HSA纳米混悬液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 至10 mL量瓶,甲醇稀释定容至刻度,测定CyA含量,按下列公式计算包封率和载药量。包封率(EE,%) = 载入胶束的药物量/投药量 $\times 100$ ,载药量(DL,%) = 载入胶束的药物量/载药胶束量 $\times 100$ 。

由于CyA在水介质中溶解度非常低,和载入纳米粒的药物量( $>2\text{ mg/mL}$ )相比可以忽略不计。因此纳米粒水溶液中的游离CyA含量在计算包封率和载药量时未加考虑。

### 2.3 粒径、Zeta 电位、pH 及渗透压的测定

CyA-HSA 纳米粒冻干粉以5%葡萄糖溶液稀释至药物质量浓度为 $0.5\text{ mg/mL}$ ,测定其粒径、Zeta 电位、pH 及渗透压。

### 2.4 形态学研究

取CyA-HSA 纳米粒冻干粉,以5%葡萄糖溶

液复溶稀释至药物质量浓度 0.5 mg/mL, 磷钨酸负染法染色, 透射电镜观察形态。

## 2.5 稀释稳定性考察

称取一定量的 CyA-HSA 冻干粉末及山地明注射剂, 以 5% 葡萄糖溶液复溶稀释至 CyA 质量浓度分别为 0.5, 1, 1.5, 2 mg/mL, 于室温放置, 不同时间点取复溶溶液适量, 3 000 r/min 离心 10 min, 目测离心管底部有无沉淀, 并精密吸取上清液 50  $\mu$ L, 甲醇稀释至一定浓度, 照“2.2”项下方法测定 CyA 含量, 并以 0 h 时溶液中 CyA 含量为 100%, 计算各时间点纳米粒稀释液中 CyA 的百分含量, 以药物浓度降低幅度超过 5% 认为纳米溶液发生明显不稳定现象。

## 2.6 体外释放实验

采用溶剂置换法考察 CyA-HSA 的体外释放动力学。具体操作为: 精密称取 CyA-HSA 冻干品, 5% 葡萄糖溶液溶解稀释至 CyA 质量浓度为 0.5 mg/mL, 取 1 mL 置于预先在释放介质中平衡 12 h 的透析袋内 (MWCO = 7 000), 两端扎紧后, 置盛有 pH 7.4 PBS 释放介质 100 mL 的烧杯中, 在水浴恒温振荡器转速 80 ~ 100 r/min 和 (37  $\pm$  0.5)  $^{\circ}$ C 下进行实验。于设定时间点取样, 最后用 PBS (pH 7.4) 100 mL 彻底更换透析袋外的释放液。精密量取释放溶液 5 mL 于西林瓶冻干, 用甲醇 1 mL 涡旋提取 3 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液按“2.2”项下色谱条件下测定 CyA 的浓度, 以各点累积释放百分率的平均值对时间绘制释放曲线。

## 2.7 大鼠体内药代动力学研究

2.7.1 全血样品处理 在 10 mL 具塞玻璃离心管中加入相同质量浓度 (60  $\mu$ g/mL)、相同体积 (50  $\mu$ L) 的环孢素 D 内标液, 挥干后精密移取 500  $\mu$ L 全血置离心管中, 涡旋 1 min 混匀, 加入氢氧化钠溶液 (0.1 mol/L) 0.5 mL, 涡旋 3 min; 加入乙醚 5 mL, 涡旋 5 min, 3 000 r/min 离心 10 min; 取乙醚层 4 mL 于 50  $^{\circ}$ C 水浴挥干; 再次加入乙醚 1 mL, 涡旋 2 min, 50  $^{\circ}$ C 水浴挥干; 残渣用甲醇 100  $\mu$ L 和 25 mmol/L HCl 的混合溶液 (1:1) 复溶, 涡旋 2 min, 然后加入正己烷 0.4 mL, 涡旋 1 min, 3 500 r/min 离心 5 min, 取下层 20  $\mu$ L 进样, 进行 HPLC 色谱分析。

2.7.2 方法学考察 色谱条件与“2.2”项大致相同, 流动相改为乙腈-甲醇-水 (57:25:18)。取大鼠空白全血 0.5 mL, 加入 CyA 甲醇标准溶液及环孢

素内标液内标各 20  $\mu$ L, 涡旋 30 s 后, 其余按样品预处理及测定方法进行操作, 记录样品峰与内标峰的峰面积  $A_s$ 、 $A_i$  和峰面积之比 ( $R = A_s/A_i$ ), 对全血 CyA 浓度进行线性回归, 得全血样品的回归方程  $R = 2.908 \times 10^{-1}c + 0.02$ , 在 0.2 ~ 12.0  $\mu$ g/mL 范围内线性良好, 相关系数  $r^2 = 0.9996$ , 生物样品的萃取回收率大于 75%, 最低检测限为 0.062 5  $\mu$ g/mL, 方法回收率 (99.7  $\pm$  2.1)%, 日内精密度小于 5.3%, 日间精密度小于 8.2%。

2.7.3 给药方法 选取 SD 大鼠 12 只, 禁食 12 h, 自由饮水, 随机分成 2 组, 每组雌雄各半, 按给药剂量 7 mg/kg 各组分别尾静脉注射 CyA-HSA 和山地明注射剂 (药物浓度均为 1 mg/mL), 给药后分别于 5, 10, 20, 40 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 h 时间点于眼底静脉丛取血。全血置于肝素钠试管中, 按样品预处理及测定方法进行操作, 记录  $A_s$  和  $A_i$ , 计算大鼠全血在不同时间的药物浓度。

2.7.4 数据处理 根据 CyA-HSA 和山地明注射剂在大鼠全血中 CyA 浓度, 采用药代动力学软件 Winnonlin 5.1 计算药代动力学参数。各参数之间采用统计学软件 SPSS 15.0 进行  $t$  检验, 分析差异性。

## 3 结果与讨论

### 3.1 环孢素 A 白蛋白纳米粒冻干粉的制备

制备的环孢素 A 白蛋白纳米粒溶液通过冻干复溶, 载药量达 (14.7  $\pm$  0.1)%, 包封率达 (85.8  $\pm$  5.7)%, 且制备工艺简单, 避免油相、表面活性剂及化学交联剂的加入, 大大提高了制剂产品的安全性。其负载药物原理可能是由于在高剪切条件下, 白蛋白产生的氧化巯基残基相互交联形成新的二硫化键, 从而形成包裹有药物的稳定的白蛋白纳米粒<sup>[9]</sup>。

### 3.2 粒径、Zeta 电位、pH 值及渗透压值测定

CyA-HSA 纳米粒粒径为 (240.5  $\pm$  3.1) nm, 分散系数为 0.141  $\pm$  0.014, 表明其粒径大小符合 2010 年版《中华人民共和国药典》静脉注射制剂要求, 且分布较为均匀。

CyA-HSA 纳米粒 Zeta 电位为 -(32.0  $\pm$  0.6) mV, 这可能是由于带负电荷的白蛋白分子包裹于纳米粒子表面, 使其纳米粒表面带负电。一般而言, 当 Zeta 电位的绝对值大于 30 mV 时, 纳米粒间存在较大的排斥力, 而有利于纳米溶液

的稳定并促使纳米粒粒径大小均一<sup>[10]</sup>。CyA-HSA 纳米粒较大的 Zeta 电势绝对值预示其可能具有良好的物理稳定性。

CyA-HSA 纳米粒溶液 pH 为  $7.0 \pm 0.1$  时,渗透压为  $(314.7 \pm 1.5)$  mOsmol/kg,接近人体正常的体液渗透压 ( $300 \sim 340$  mOsmol/kg),均符合人体静脉给药要求。

### 3.3 形态学考察

透射电镜图见图 1。CyA-HSA 纳米粒为规则球形结构,粒径分布均匀,大约为 200 nm,小于动态光散射实验所得到的载药纳米粒在溶液中的粒径(240 nm)。这可能是由于 TEM 样品制备过程中的干燥过程引起纳米粒表面的塌陷所致。

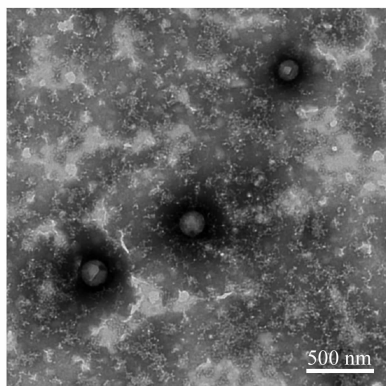


Figure 1 TEM image of cyclosporine A-loaded human serum albumin (CyA-HSA) nanoparticles

### 3.4 稀释稳定性考察

由于目前环孢素 A 注射剂(山地明)在临床上主要用输液介质生理盐水或者 5% 葡萄糖按 1:20 或 1:100 比例稀释后静脉滴注(即质量浓度为 0.5 ~ 2.5 mg/mL),因此本研究以 5% 葡萄糖溶液为稀释介质,考察了 CyA-HSA 纳米溶液药物质量浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL 时的稳定性(25 °C)。结果显示, CyA-HSA 冻干品复溶溶液稳定性随着质量浓度降低,稳定性显著延长,质量浓度为 0.5 mg/mL 时稳定长达 7 d(表 1),远远高于市售制剂,能够满足临床静脉滴注注射剂稳定性的要求。

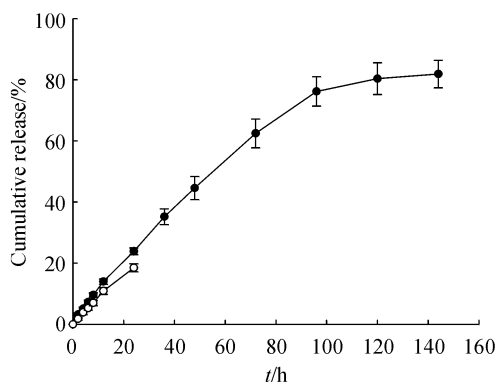
Table 1 Dilution stability of CyA-HSA and Sandimmune in 5% dextrose

c(CyA-HSA)/ (mg/mL)	Stability/d	
	CyA-HSA	Sandimmune
2.0	3	2
1.5	4	2
1.0	5.5	3
0.5	7	4

### 3.5 体外释放实验

CyA 难溶于水,漏槽虽然可以通过有机溶剂、表面活性剂等增加其溶解度,但该类添加剂本身可能对药物的释放动力学和递药载体的稳定性存在潜在的影响<sup>[11]</sup>。本研究采用整体溶剂置换法以满足释放所需的漏槽条件。经检测, CyA 在 PBS(pH 7.4)中饱和溶解度为  $(2.43 \pm 0.18)$   $\mu\text{g/mL}$ ,在整个释放过程中, CyA 质量浓度始终保持在 0.03 ~ 0.77  $\mu\text{g/mL}$  之间,小于其在释放介质中的饱和溶解度的 1/3,即 CyA 从白蛋白纳米粒中的释放满足漏槽条件,药物的释放不受释放介质中药物浓度的影响。但释放介质中药物浓度较低,测定有一定的难度。故本文采用先冻干再用少量有机溶剂溶解环孢素 A 从而解决难以测定的问题。

CyA-HSA 纳米粒和市售制剂的累积释放曲线如图 2 所示。CyA-HSA 纳米粒在释药初期没有明显的突释现象,表明药物并没有吸附在纳米粒表面,而是完全包裹于纳米粒中。CyA-HSA 纳米粒释药速度略快于山地明注射剂,24 h 累积释药量分别为 23.9% 和 18.5% ( $P < 0.05$ )。由于山地明注射液 37 °C 在 36 h 出现明显的沉淀物,因此体外释放仅考察了 24 h,而 CyA-HSA 纳米粒在 37 °C 较为稳定,因此体外释放考察了 144 h。CyA-HSA 纳米粒在 96 h 前药物基本以相对恒定速度释放,96 h 以后药物的释放速度逐渐减小,表现为释放曲线的后段逐渐趋于平缓。



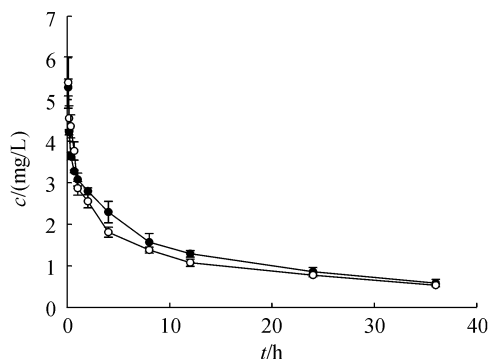
—●—CyA-HSA; —○—Sandimmune

Figure 2 Cumulative release of CyA from the CyA-loaded HSA nanoparticles and Sandimmune at 37 °C ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 3.6 大鼠体内药代动力学研究

由于 CyA 在红细胞、粒细胞及淋巴细胞中分布较多<sup>[12]</sup>。因此,本研究测定全血样品中 CyA 的浓度来评价 CyA 制剂的大鼠血液药代动力学行

为。大鼠全血药物浓度-时间曲线如图 3 所示。



—●—CyA-HSA; —○—Sandimmune

**Figure 3** Whole blood concentration-time profiles of CyA after intravenously administration of CyA-loaded HSA nanoparticles and Sandimmune to rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

使用 Winnonlin 5.1 药代动力学软件对大鼠体内的药代动力学数据按二室模型进行分析,药代动力学参数如表 2 所示。与山地明相比,CyA-HSA 在大鼠体内的  $AUC_{0-\infty}$  有显著提高( $P < 0.05$ ),AUC 升高的原因为 CyA 经 HSA 包载后,CyA 清除率 CL 和药物从中央室的消除速率常数  $k_{10}$  均有显著下降( $P < 0.05$ ),从而提高了 CyA 的利用率。

**Table 2** Comparison of the mean pharmacokinetic parameters of CyA from CyA-HSA nanoparticles and Sandimmune after a single 7 mg/kg iv dose in rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Parameter	CyA-HSA	Sandimmune
$k_{10}/(1/h)$	$0.07 \pm 0.01^*$	$0.09 \pm 0.01$
$k_{12}/(1/h)$	$0.28 \pm 0.14$	$0.43 \pm 0.11$
$k_{21}/(1/h)$	$0.34 \pm 0.24$	$0.29 \pm 0.07$
$CL/(L/kg/h)$	$0.09 \pm 0.01^*$	$0.12 \pm 0.00$
$AUC_{0-4}/(mg/L \cdot h)$	$54.07 \pm 3.42^*$	$40.88 \pm 1.49$
$AUC_{0-\infty}/(mg/L \cdot h)$	$75.21 \pm 7.63^*$	$56.78 \pm 1.89$

\*  $P < 0.05$  vs Sandimmune

## 4 结 论

本研究以白蛋白为载体材料成功制备了 CyA 的新型纳米制剂,该制剂具有较高的载药量、包封率及优越的稀释稳定性和缓释能力,大鼠药代动力学结果表明与市售山地明注射剂相比,CyA-HSA 纳米粒 AUC 显著提高,且该制剂由于避免表面活性剂 Cremophor EL 所带来的毒性与变态反应而具

有更高的安全性。该产品有望成为一种新的山地明替代用品。

## 参 考 文 献

- [1] Basaran E, Demirel M, Sirmagul B, et al. Polymeric cyclosporine-A nanoparticles for ocular application [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2011, **7**(5): 714–723.
- [2] Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation [J]. *Eur J Cancer*, 2001, **37**(13): 1590–1598.
- [3] Yin XQ, Huo MR, Zhou JP, et al. Synthesis, characterization and drug loading capacity of dodecyl serum albumin for insoluble antitumor drugs [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2011, **42**(4): 319–323.
- [4] Kratz F. Albumin as a drug carrier; design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2008, **132**(3): 171–183.
- [5] Elsaddek B, Kratz F. Impact of albumin on drug delivery — new applications on the horizon [J]. *J Control Release*, 2012, **157**(1): 4–28.
- [6] Fu Q, Sun J, Zhang W, et al. Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology is a promising method for anti-cancer drug delivery [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2009, **4**(3): 262–272.
- [7] Guarneri V, Dieci MV, Conte P. Enhancing intracellular taxane delivery: current role and perspectives of nanoparticle albumin-bound paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2012, **13**(3): 395–406.
- [8] Zhang Q, Yie GQ, Li Y, et al. Studies on the cyclosporin A loaded stearic acid nanoparticles. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, **34**(4): 308–312.
- [9] Desai NP, Tao C, Yang A, et al. Protein stabilized pharmacologically active agents, methods for the preparation thereof and methods for the use thereof; US, 9717157 [P]. 1997-09-24 [2013-05-01].
- [10] Wang Y, Zhu L, Dong Z, et al. Preparation and stability study of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticle suspensions [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, **98**: 105–111.
- [11] Yao DG, Sun KX, MU HJ, et al. Preparation of cyclosporine A loaded mPEG-PLGA copolymer micelles and study its pharmacokinetics in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2009, **44**(12): 1410–1415.
- [12] Atkinson K, Britton K, Biggs J. Distribution and concentration of cyclosporin in human blood [J]. *J Clin Pathol*, 1984, **37**(10): 1167–1171.