• 研究论文 •

“右旋糖酐-磁性层状复合氢氧化物-氟尿嘧啶”给药系统的超分子组装表征与急毒性水平

苟国敬^{*,a,b} 王志宇^a 刘彦红^{a,b} 薛 冰^{a,b}
黄 洁^{a,b} 孙 岳^{a,b}

(^a宁夏医科大学医用化学系 银川 750004)

(^b宁夏医科大学医学科学技术研究中心 银川 750004)

摘要 用“前体共沉淀-离子交换插层-原位复合-溶剂转换”技术合成“右旋糖酐-磁性层状复合氢氧化物-氟尿嘧啶”(DET-MLDH-FU, DMF)运载系统,通过 XRD, IR, TEM, TG 表征及体外释放实验研究了 DMF 的物相特征与缓释性能,通过对小鼠灌胃和腹腔注射给药考察了 DMF 与载体 MLDH 的急毒性水平.结果表明,DMF 等超分子的 XRD 与 R-六方 LDH 衍射特征相符,是 $\text{Fe}_{3.6}\text{Fe}_{0.9}(\text{O},\text{OH},\text{Cl})_9$ 型 LDH 及微量 Fe_3O_4 的复合晶相,DMF 具有 DET,MLDH 与 FU 分级组装形成的核壳式构造.体外 pH 7.35 PBS 溶出介质中,DMF 的药物释放遵守零级模型 $C-1.162 \times 10^{-5}=4.566 \times 10^{-7}t$,速率常数 $4.566 \times 10^{-7} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{m}^{-1}$.DMF,MLDH-FU 及 MLDH 可经正常代谢排出体外,口服毒性小;腹腔注射 DMF 的 LD_{50} 为 $2542.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,MLDH 的 LD_{50} 为 $1951.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,均属低毒性物质.DET 的复合组装对 Fe(II,III)LDH 构架有抗氧化保护作用,对不同 MLDH-FU 粒子进行选择、分离与包封,提高 MLDH-FU 的缓释效果、强化 MLDH 的控释性能,降低给药系统 DMF 的急毒性水平.

关键词 右旋糖酐-磁性层状复合氢氧化物-氟尿嘧啶给药系统;三级超分子组装;药物释放模型;急毒性水平

Supra-molecular Assembly Characterization and Urgent Toxic Level of "Dextran-Magnetic Layered Double Hydroxide-Fluorouracil" Drug Delivery System

Gou, Guojing^{*,a,b} Wang, Zhiyu^a Liu, Yanhong^{a,b} Xue, Bing^{a,b}
Huang, Jie^{a,b} Sun, Yue^{a,b}

(^aDepartment of Chemistry, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

(^bResearch Center of Medical Science and Technology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

Abstract The drug delivery system DMF with a formation of DET-MLDH-FU (dextran-magnetic layered double hydroxide-fluorouracil) was synthesized by the “precursor co-precipitation-intercalated assembly with ion exchange-dextran *in situ* composite-solvent conversion” technology, the crystal-phase characteristic and slow-release performance of DMF system were investigated through XRD, IR, TEM, TG characterization and dissolve out experiment *in vitro*. The urgent toxic levels of DMF and MLDH were inspected through mice animal experiments of irrigation stomach and intraperitoneal injection. The results showed that the XRD of DMF, MLDH-FU and MLDH matched with R-sixtetragonum LDH series, mixed by $\text{Fe}_{3.6}\text{Fe}_{0.9}(\text{O},\text{OH},\text{Cl})_9$ type

* E-mail: ggj64@yahoo.com.cn

Received May 18, 2011; revised August 21, 2011; accepted September 28, 2011.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20961008), Ningxia Higher School Science and Technology Research Key Project Fund (No. 200919341), Ningxia Natural Science Fund (No. NZ09102), Ministry of Education Science and Technology Research Key Project Fund (No. 207127).

国家自然科学基金(No. 20961008)、宁夏高等学校科学技术研究重点项目基金(No. 200919341)、宁夏自然科学基金(No. NZ09102)、教育部科学技术研究重点项目基金(No. 207127)资助项目.

crystal-phase and trace iron oxide. The DMF supra-molecular system consisted by DET, MLDH and FU components had a core-shell structure formed through grading assembly. The drug release model of DMF accorded with the zero-order kinetics equation $C-1.162 \times 10^{-5}=4.566 \times 10^{-7}t$ at pH 7.35 of PBS *in vitro*, and its rate constant was $4.566 \times 10^{-7} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{m}^{-1}$. DMF, MLDH-FU and MLDH could be excreted *in vivo* through normal metabolism, with a tiny oral toxicity. The LD₅₀ of intraperitoneal injection experiment were 2542.8 mg·kg⁻¹ and 1951.0 mg·kg⁻¹ respectively for DMF and MLDH-FU, which meant all belonged to low toxic substances. Composite assembly with DET produced the antioxidant protection function for the layered structure of MLDH-FU, resulting in selection, separation and encapsulation of different particles, and gave rise to improving for the slow-release effect of MLDH-FU, strengthening of controlled-release characteristic for MLDH, and reducing of the urgent toxic levels for DMF drug delivery system.

Keywords dextran-magnetic layered double hydroxide-fluorouracil (DET-MLDH-FU) drug delivery system; three-level supra-molecular assembly; the drug release model; urgent toxic level

“右旋糖酐-磁性 LDH-氟尿嘧啶”(DET-MLDH-FU, DMF)超分子系统的化学组成为 $[(\text{C}_7\text{O}_5\text{H}_{12})_n]_{0.02} \cdot [\text{Fe}^{\text{II}}_2\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH})_6] \cdot (\text{C}_4\text{H}_3\text{FN}_2\text{O}_2)$, 是基于磁性层状复合氢氧化物(Magnetic Layered Double Hydroxide, MLDH)的磁靶向性能与缓释作用而设计的新型给药系统^[1,2]. 我们针对传统磁靶向制剂磁性材料与缓释载体分离、制备工艺繁杂等缺陷, 基于铁系离子的顺磁性^[3]、LDH 层板组成的调变性^[4,5]、插层组装^[6~11]的可逆性及层板表面的羟基亲和性设计 DET-MLDH-FU 超分子给药模型, 有效解决了“MLDH-Drugs”二聚体的氧化及系统的组织相容性^[12]问题, 实现了给药系统靶向与缓释作用的融合统一. 本文完整报道“前体共沉淀-离子交换插层-原位复合-溶剂转换”分级组装技术合成 DMF 的 XRD, IR, TEM 与 TG 表征数据, 以及 DMF 给药系统的体外释放特征与急毒性水平, 为 DMF 系统的制剂化研究提供基础数据.

动物实验^[13,14]研究证明 DMF 系统具有磁靶向特异性与特殊的体内缓释作用, 有一定的应用前景. 文献[15]报道无机超微粒子用作药物载体时体内代谢缓慢, 长期蓄积会引起肝、脾细胞肿胀及组织增生; 急毒性水平 LD₅₀ 是评价药物制剂安全性的重要参数, 本文测试磁性载体 MLDH、右旋糖酐修饰 DET-MLDH 及 DMF 三者针对小鼠腹腔给药的 LD₅₀, 证明 DMF 超分子系统具有良好的生物相容性, 这对开发 DMF 型磁靶向缓释制剂有重要的理论及实际意义.

1 实验部分

1.1 DET-MLDH-FU 三级超分子的分级组装

按文献[1], 装配 1000 mL N₂ 保护反应器, 连接 pH 电极及沉淀剂驱动滴注系统, 向反应器压注 500 mL 二

次水, 在通 N₂ 条件下磁搅拌 5 min 排除系统空气, 然后将 39.76 g (0.2000 mol) FeCl₂·4H₂O 与 27.03 g (0.100 mol) FeCl₃·6H₂O 混合、打磨后加到反应器中, 磁搅拌溶清. 在室温及 N₂ 保护条件下滴注 288 mL 2 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 控制共沉淀终点 pH 至 6.63. 关闭加碱系统, 维持室温、N₂ 保护及磁搅拌条件不变, 使浆料原位晶化 45 min, 将所得一级复合物 MLDH 浆料在 0 °C, 5000 r/min 条件下离心 20 min, 收集固相.

转移 MLDH 固相于 1000 mL N₂ 保护反应器内, 加 200 mL 水分散均匀, 然后加注 69 mL, pH 7.385、浓度 0.145 mol·L⁻¹ 的 5-Fu (5-Fluorouracil, C₄H₃FN₂O₂) 溶液, 在室温及 N₂ 保护条件下搅拌反应 45 min. 取 30 mL 二级复合物 MLDH-FU 浆料, 在 0 °C, 5000 r/min 离心 20 min, 分离出固相作表征, 标记为 MLDH-FU.

按文献[2], 称取右旋糖酐 [Dextran, DET, (C₇O₅H₁₂)_n] 84 g 用 200 mL 水溶解后, 加注到剩余的 MLDH-FU 浆料中, 升温至 40 °C, 在原位、通 N₂ 保护及磁搅拌条件下反应 50 min. 取 30 mL 三级复合物浆料在 0 °C, 5000 r/min 离心 20 min, 分离固相作为溶剂转换前的表征样品, 标记为 DMF. 关闭加热与搅拌系统, 在 N₂ 流通条件下将 DMF 浆料快速转移至 1000 mL 经 -80 °C 冷冻 4 h 的无水乙醇里, 快速搅拌、完成溶剂转换, 密封体系、室温下沉降 12 h, 倾出上清, 收集固相于离心杯中, 5000 r/min 离心 15 min 分离, 将湿固相转移到真空干燥箱, 59 °C 及 0.075 MPa 条件下干燥 96 h.

1.2 DET-MLDH-FU 系统的体外药物释放实验

称取 5.6 g KH₂PO₄ 和 28.4 g Na₂HPO₄·12H₂O, 加水溶解、配成 2 L pH 7.35 PBS 缓冲溶液, 量取 300 mL 作溶出介质, 称取 MLDH-FU 0.66 g, DMF 1.96 g, 分别在恒温 37 °C 和 100 r/min 条件下作药物释放动力学实验. 每隔一定时间取样 4 mL, 用膜孔 0.22 μm 针头过滤器处

理成澄清液样,取 2 mL 滤液稀释至 10 mL,在 265 nm 波长测吸光度,工作曲线 $A = 0.02741 + 0.02762C$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), $R=0.9999$.

1.3 DET-MLDH-FU 系统的急毒性实验

1.3.1 灌胃实验

设 DMF, MLDH-FU 和纯载体 MLDH 三个毒性实验组及一个空白对照组,将 40 只昆明种小鼠(体重 18~22 g,雌雄各半,宁夏医科大学动物实验中心提供)随机分成 4 组,实验前禁食 12 h. 将 DMF, MLDH-FU 和 MLDH 配成最大浓度 $400 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 药液,分别按每 10 g 体重 0.2, 0.1, 0.05 mL 剂量对小鼠灌胃,空白组给予相同量的生理盐水. 观察 3 d,记录各组动物的死亡只数.

1.3.2 腹腔注射实验

按文献[16]方法,将 DMF, DET-MLDH 和 MLDH 三种样品以最大浓度 $400 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为上限配成不同浓度梯度药液,按每 10 g 体重 0.2 mL 药液对小鼠腹腔注射,各实验组的每一浓度梯度下各试 4 只. 观察 3 d,记录小鼠在每一干预浓度的死亡只数,测定 0% 和 100% 估计致死剂量. 根据 100% 致死量,每 10 g 体重给药量递减为 0.14, 0.10, 0.07, 0.05 mL 腹腔注射,再各试 4 只,测定 100% 和 0% 估计致死剂量(D_m , D_n).

DMF, DET-MLDH 和 MLDH 的 D_m 测定值分别为 5000, 5000 和 $6000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; D_n 值分别为 1715, 1715 和 $1441 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. 据此,设 DMF 组 $D_m/D_n=2.9$, $1:k$ (组间剂量递减比例)=0.75, 分 5 个剂量组; DET-MLDH 组 $D_m/D_n=2.9$, $1:k=0.75$, 5 个剂量组; MLDH 组 $D_m/D_n=4.2$, $1:k=0.75$, 7 个剂量组. 170 只小鼠随机分 17 组,按 $0.02 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 给药量腹腔注射,测定死亡率.

1.4 固相样品表征

日本理学 Rigaku D/max-rB 型 X 射线粉末衍射仪($\text{Cu K}\alpha$, $\lambda=0.1542 \text{ nm}$)表征 XRD, 扫描速率 $2^\circ\cdot\text{min}^{-1}$, 扫描范围 $5^\circ\sim 80^\circ$. 德国布鲁克公司 TENEOR27 型红外分光光谱仪, KBr 压片, $4000\sim 400 \text{ cm}^{-1}$. 法国 SETARAM 公司 SETSYS-1750 CS 型热分析仪, N_2 气氛, 升温速率 $8^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, $20\sim 650^\circ\text{C}$. 日立 HITACHI H-7560B 透射电镜, 加速电压 80 kV, 放大 $70000\sim 120000$ 倍.

2 结果与讨论

2.1 DMF 给药系统化学合成过程液相的 pH 变化及产物的物相表征

图 1-A 给出一级超分子 MLDH 共沉淀与晶化过程液相的 pH 变化趋势, 共沉淀曲线在 pH 1.60~3.14 区间出现的缓冲平台, 恰好覆盖理论上^[17] $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 能发生沉

淀反应的 pH 范围(1.5~2.3), 按 LDH 共沉淀动力学机制^[18], 对应 Fe^{3+} 离子沉淀的主要阶段; 理论上 Fe^{3+} 沉淀完全的 pH 为 4.1, 因此, 曲线上 pH 3.14~5.04 这一快速上升区间对应 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沉淀完全后液相反应转向 $\text{Fe}(\text{OH})_2$ 沉淀的过渡区间; pH 5.04~6.18 区间出现第二个缓冲平台, 是 Fe^{2+} 离子沉淀的主要阶段, 与 $\text{Fe}(\text{OH})_2$ 沉淀的理论 pH (6.5~7.5) 相比提前一个 pH 单位, 一方面高浓混合盐共沉淀体系的金属离子浓度大于 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 另一方面前期沉淀的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 吸附与诱导共沉淀作用, 促使 $\text{Fe}(\text{OH})_2$ 提前沉淀; 理论上小于 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的独立 Fe^{2+} 离子只有在 pH 到达 7.5 时才能沉淀完全^[17], 但 $\text{Fe}(\text{II,III})$ 共沉淀研究^[1] 表明, 高浓混合盐体系的 pH 到达 6.50 时就会快速上升, 由此判断这时金属阳离子已基本沉降完全, 通常将 $\text{Fe}(\text{II,III})$ 共沉淀终点的 pH 控制在 6.50 上下. 在 MLDH 浆料晶化的 45 min 内, 液相 pH 有一个下降、再回升的调整过程, pH 降低与沉淀不完全的 Fe^{2+} 离子继续消耗液相 OH^- 有关, 但随氢氧化物脱水复

图 1 前体合成晶化(A)、MLDH-FU 离子交换及 DET 三级复合过程(B)液相 pH 变化

Figure 1 Liquid pH change in the process of precursor synthetic and crystallization of MLDH (A), ion exchange of MLDH-FU and third-level composite of DET (B)

合、 $\text{Fe}(\text{OH})_6^{2-/3-}$ 配离子羟基释放造成液相 pH 回升. 图 1-B 为二级超分子 MLDH-FU 插层及三级复合过程的 pH 变化趋势, 其中, 二级组装过程的 pH 上升很快, 在 MLDH-FU 离子交换进行 15 min 时趋于平衡; 液相 pH 升高与插层剂 5-Fu 溶液 pH 大于 MLDH 终点的 pH 有关, 也与被 FU 置换的 OH^- 向液相扩散有关. 在 DET 对 MLDH-FU 的第三级复合阶段, 终点 pH 7.24 与 DET 加入后的 pH 比较上升了 0.03 个 pH 单位, 与加注前 MLDH-FU 晶化终点的 pH 相比降低 0.01. 加入 DET 弱酸性溶液(pH 4.0~7.0)会扰动液相酸碱平衡, pH 突然降低后回升调整; 其中 pH 回升跟 DET-MF 复合反应对 MLDH 表面吸附 OH^- 的清除及部分取代有关.

图 2 给出物相鉴定所需 JCPDS 标准卡片 13-0088(A), 一级复合物 MLDH(B), 二级复合物 MLDH-FU(C)及三级复合物 DET-MLDH-FU(DMF)(D) 的 XRD 模型. 图 2-A 是国际粉末衍射标准联合会收录 $\text{Fe}_{3.6}\text{Fe}_{0.9}(\text{O}, \text{OH}, \text{Cl})_9$ 晶相的标准谱线, 特征峰包括 (003)(11.023°, 0.8020 nm), (006)(22.150°, 0.4010 nm), (0012)(33.140°, 0.2701 nm), (0015)(37.312°, 0.2408 nm), (110)(57.636°, 0.1598 nm)和(113)(58.887°, 0.1567 nm), 代表 R-六方晶系 LDH 型层状晶体的 XRD 特征, 是对 $\text{Fe}(\text{II,III})\text{LDH}$ 进行 XRD 鉴定的重要依据. 一级复合物 MLDH 的化学计量式 $[\text{Fe}_2^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH})_6][\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}]$ 与标准晶相的组成规律相同, XRD(图 2B)表现了与 13-0088 模型相对应的(003), (006)及(0012)等 c 轴向晶面衍射, 2θ 与 d 值参数分别为(11.041°, 0.8007 nm), (22.260°, 0.3990 nm)及(33.130°, 0.2702 nm), 强度分布规律与标准晶相相近, 纵向晶面间距微缩; 受主峰强衍射影响, a 轴向(110)晶面衍射较弱, 经 Jade 5.0 软件解析得到衍射参数 (57.471°, 0.1602 nm), 晶面间距大于标准晶相. 合成

MLDH 的物质的量比 $n(\text{Fe}^{2+})/n(\text{Fe}^{3+})=2$, 标准晶相的 $n(\text{Fe}^{2+})/n(\text{Fe}^{3+})=4$, 合成样品的 LDH 层内 $\text{Fe}(\text{III})$ 的同晶取代比率高, 层板正电密度大, 对层间阴离子的静电作用强、因而导致 c 轴向晶面间距收缩; 同时, 层板 $\text{Fe}(\text{III})$ 比例高造成相邻八面体配位中心间静电排斥增强, a 轴向金属离子间距增大. 可见, MLDH 合成样品与 JCPDS 13-0088 标准属于同一晶系, 是 $\text{Fe}(\text{II,III})\text{LDH}$ 型化合物, 由于 $\text{Fe}(\text{III})$ 比例高导致晶胞 c 轴向收缩、 a 轴向扩展. 图 2-C 的 XRD 与图 A、B 比较, 以 MLDH 为前体与 FU 插层组装生成的 MLDH-FU 承袭前体的 LDH 衍射特征, 表现 (003)(11.020°, 0.8094 nm), (006)(22.160°, 0.4008 nm)和(110)(57.566°, 0.1600 nm)等晶面衍射; d_{003} 相对前体明显增加、 d_{110} 值基本不变, 证明插层组装引起晶胞 c 轴向堆积秩序调整, 但没有改变 LDH 层板内部构造. 图 2-D 显示, 右旋糖酐对 MLDH-FU 二级超分子的表层复合不影响产物 DMF 对 LDH 晶相特征的保持及表达, 相应的 LDH 晶面衍射为 (003)(11.099°, 0.7965 nm), (006)(22.322°, 0.3980 nm)及(110)(57.499°, 0.1602 nm); 与前两级复合物相比, d_{110} 值保持不变、但 d_{003} 明显减小, 显示 LDH 晶胞 c 轴向有弹性, 而 a 轴向相对固定、属半刚性结构, DET 网格分子在 MLDH-FU 外层的复合、固化引起 LDH 的 c 轴向堆积密度增加、 d_{003} 收缩, 而 LDH 层板刚性限制了 DMF 晶胞的 a 轴向收缩. 1~3 级复合样品区别于标准晶相的衍射, 表现在图 B、C、D 中 35.42°处, 经 Jade 5.0 软件检索, 与 JCPDS 19-0629 的最强谱线(311)(35.422°, 0.2532 nm)吻合, 是 $Fd\bar{3}m$ 立方晶系铁氧体的强衍射, 这说明 3 级样品均含有一定比例的 Fe_3O_4 相, 利用简化 F. H. Chung 基体清洗法计算, 1~3 级复合物的 $\omega(\text{Fe}_3\text{O}_4)$ 值分别为 0.2251, 0.2698 和 0.0789, 其中, DMF 氧化程度最低、(003)主峰强度最高, 证明 DET 的层表复合对 $\text{Fe}(\text{II, III})\text{LDH}$ 构架产生了明显的抗氧化保护效果. 以上鉴定结果表明, 通过共沉淀、离子交换和 DET 原位复合技术能合成 LDH 特征突出、结构稳定的 DMF 三级超分子载药系统, $\text{Fe}(\text{II, III})\text{LDH}$ 层板磁性及微量 Fe_3O_4 的存在, 将赋予载药系统对外加磁场的靶向特异性; LDH 的控释作用与 DET 的辅助缓释效应^[19]将使 DMF 获得理想的缓、控释性能.

对比 DMF 样品在溶剂转换处理前后的 XRD 变化, 转换后样品的(003)主峰强度相对处理前降低 76%, 而 $\omega(\text{Fe}_3\text{O}_4)$ 值上升至 0.3240, 衍射峰基线陡起、结晶度显著降低, 这提示在 DMF 处理与干燥过程应尽量避免样品在空气中过度暴露. 有关结构参数的计算结果由表 1 给出, 1~3 级超分子的晶胞参数 a 均值 0.3200 nm, 晶胞参数 c 及通道高度 h 的变化与衍射参数 d_{003} 一致, 在 FU 对一级超分子插层后增大、DET 三级复合后减小、溶剂

图 2 三级复合物样品的 XRD 衍射模型
Figure 2 XRD model of three-order composites

表 1 三级复合物样品的结构参数运算结果

Table 1 Structure parameter calculated result of 3 grades composite samples

Sample	Lattice parameter				Grain size				$\omega(\text{Fe}_3\text{O}_4)^c$	CRT ^d
	a/nm	c/nm	R^a	h/nm	D_a/nm	D_c/nm	Ratio	n^b		
1 ^e	0.3204	2.4022	7.496	0.3237	81.52	21.18	3.849	8.82	0.2251	23.64
2	0.3200	2.4283	7.589	0.3324	60.62	17.91	3.384	7.38	0.2698	10.26
3	0.3203	2.3895	7.460	0.3195	68.46	18.33	3.735	7.67	0.0789	85.82
4	0.3196	2.3644	7.398	0.3111	23.74	19.26	1.233	8.14	0.3240	1.023

^a R —The ratio of lattice parameter c with a ; ^b n —grain contains crystal cell number on c axis, calculated with the formula $n=D_c/c$; ^c $\omega(\text{Fe}_3\text{O}_4)$ —calculated with F. H. Chung Adiabatic method (since cleaning method); ^d CRT—Crystallinity index, calculated with the formula $\text{CRT}=(7.21\text{cr1}+5.125\text{cr2}+\text{cr3}-100\text{crd}-493\text{SDR})/10$, See Ref. [8]. ^e 1—1[#] MLDH sample by co-precipitation, 2[#] MF sample by ion exchange reaction, 3[#] DMF sample by DET-MLDH-FU recombination, and 4[#] DMF sample by solvent conversion processing.

转换处理后进一步收缩; 粒子尺寸 D_a 、 D_c 相应改变, MLDH-FU 二级超分子相对前体 MLDH 的两维直径减小较多、DMF 相对二级分子略微增大, 晶胞数目变化与 D_c 相同; 溶剂转换对形貌参数(径厚比 D_a/D_c)影响较大, 厚度增加、面向直径减小 2/3, 说明 DMF 复合物在弱极性溶剂中沉降、离析与陈化过程, DET 对内包粒子的尺寸及形状有进一步选择、调整, 径厚比下降 67%、粒子形貌由平面层状向球形或椭圆转化。结晶度指数主要反映晶粒对 LDH 晶相特征的保留程度, 其中 DMF 结晶度最高, 证明 DET 网络分子对 MLDH-FU 层状结构有保护作用, 溶剂转换后粒子层状特征弱化、氧化程度增高导致结晶度降低。与“共沉淀插层-原位复合-溶剂转换”技术相比,“分级组装-溶剂转换”DMF 产物的 LDH 形貌特征较弱、氧化程度高而结晶度低, 显然, 减少超分子组装的中间步骤有利于保持产物的 LDH 特征; 结晶度越高、载药体系的缓、控释效果越好^[8], 但适当提高氧化程度、改变粒子尺寸及形状也有利于提高系统的体内靶向传输效率。

图 3 是插层客体(A)、一级 MLDH(B)、二级 MLDH-FU(C)、三级 DMF(D)超分子及表层材料 DET(E)的 IR 光谱。图 3-B 以 1~4 标记了 MLDH 作为层状复合氢氧化物的 IR 吸收, 其中 1[#]峰(3444 cm^{-1})归属^[8]为 LDH 层板羟基及层间结合水分子羟基的 $\nu_{\text{O-H}}$ ($3650\sim 3100\text{ cm}^{-1}$)振动, 2[#]峰(1618.49 cm^{-1})为 LDH 层板羟基及层间水的 $\delta_{\text{O-H}}$ (1630 cm^{-1})弯曲振动模, 3[#]峰(1020.6 cm^{-1})为层板羟基氢原子的变形振动模 $\delta_{\text{MO-H}}$, 4[#]峰($633, 502\text{ cm}^{-1}$)为 LDH 层板晶格氧的伸缩振动模 $\nu_{\text{M-O}}$ 。图 3-C 给出二级超分子 IR 谱图, 在与前体标记峰 1~4 对应的 $3417.12, 1624, 1252, 1021, 633$ 和 502 cm^{-1} 位置, 分别表现 LDH 型化合物的 $\nu_{\text{O-H}}, \delta_{\text{O-H}}, \delta_{\text{MO-H}}$ 及 $\nu_{\text{M-O}}$ 等 IR 谱征^[8]; 层间客体 FU 的 IR 吸收^[20]在二级超分子形态下表达于标记 α, β 处, 其中 α 位(1683 cm^{-1})吸收对应客体 FU 二级酰胺羰基的伸缩振动 $\nu_{\text{C=O}}$ 高频模($1680\sim 1630\text{ cm}^{-1}$), β 位(1252 cm^{-1})吸收对应二级酰胺的另一特征吸收模

图 3 FU (A)、三级复合物(B, C, D)及 DET (E) IR 谱

Figure 3 IR spectrum of FU (A), three-order composites (B, C, D) and DET (E)

$\delta_{\text{N-H}}$ (1246 cm^{-1}), 在 MLDH-FU 中, MLDH 作为主相的 IR 特征明显, 而层间客体 FU 的 IR 特征表达较弱。图 3D 给出三级超分子的 IR 光谱, 综合反映 MLDH-FU(C)与复合材料 DET(E)的 IR 吸收^[13]。在 $3417, 1624, 1013\text{ cm}^{-1}$ 及 $633\sim 502\text{ cm}^{-1}$ 位置, DMF 承袭了 MLDH, MLDH-FU 两级超分子的 $\nu_{\text{O-H}}, \delta_{\text{O-H}}, \delta_{\text{MO-H}}$ 及 $\nu_{\text{M-O}}$ 等 LDH 谱征^[8,13,20], 层间客体的 IR 表达随三级复合层的形成进一步弱化, 原二级分子 α 位的 $\nu_{\text{C=O}}$ 模(FU 羰基伸缩振动)在图 3D 的标记 b 处(1683 cm^{-1})变成弱肩峰, 而 DET 的 $\delta_{\text{O-H}}$ (1643.91 cm^{-1})合并导致 DMF(D)在与前两级分子标记 2 对应的吸收峰(1624 cm^{-1})蓝移、峰面积增大; 与层间客体相比, 表层 DET 的 IR 表达^[13]明显, 除 $\delta_{\text{O-H}}$ 模外, 标记 a (2925.74 cm^{-1})处还出现与 DET 碳架 $\nu_{\text{C-H}}$ 模(2922.9 cm^{-1})对应的吸收, DET 羟基碳氧键的两个 $\nu_{\text{C-OH}}$ 振动模($1160\sim 1013\text{ cm}^{-1}$), 出现在 DMF 的标记峰 c 及 3[#]峰中, $\nu_{\text{C-OH}}$ 低频吸收(1013 cm^{-1})与 MLDH 的 $\delta_{\text{MO-H}}$ 模合并、造成 DMF 在这一波段的吸收面积显著增大。与

“共沉淀-原位复合”技术相比, 分级组装体的层间客体 FU 的 IR 信息更弱, 符合 DMF 以 LDH 为主要晶相、FU 插载于 LDH 层间、DET 包裹于 LDH 层表这一核壳式构造^[21]的 IR 特征.

2.2 DET-MLDH-FU 各级复合样品的形貌表征与热重分析

固相 TEM 表征结果由图 4 给出, 其中, 图 A 是一级超分子 MLDH 在放大 1 万 2 千倍视场呈现的层片形貌, 直径较小的粒子具有明显的六边菱形特征; 直径 200~500 nm 的巨型粒子表面堆积着许多大小不一的小层片粒子; 直径相近的粒子倾向取同一叠积方式, 标记 a 处在巨型平面粒子的上下至少有 4 个平行堆积层, 标记 b 处直径约 50 nm 的粒子呈侧向竖立、显示宏观层状形象. 图 B 是二级超分子 MLDH-FU 的 TEM 形貌, 六边菱形轮廓清晰, 平面直径在 150 nm 附近的粒子居多, 与前体对比, 平面 FU 分子插层后没有破坏 MLDH 的六边外形及纵向层积特征, 但改变了 *a*, *c* 轴向的聚集度, 增大或降低层堆积程度、增加平面横向链结或使层板裂解, 引起粒度分布改变. 图 C 为三级复合物 DMF 的球形粒子形貌, 在放大 1 万 5 千倍视场, 直径在 40~100 nm 之间, 球形对称; DET 对 MLDH-FU 的三级复合克服了不同层状菱形粒子间的吸附、粘结, 实现了对尺寸相近粒子的选择、分离与有效包封; 溶剂转换处理后, 球形粒子的粒度分布更趋均一、平均粒径进一步减小.

图 5 给出各级样品的热分析结果, 从 MLDH 样品的热重曲线(A-a)看, $[\text{Fe}_2\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH})_6][\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}]$ 的热稳定性差, 能分辨的热分解过程包括两个阶段、并以第一阶段失重为主. 在 89.99~160.34 °C 区间失重 56.58%, 按 LDH 分解的一般规律, 实际合并了样品层表吸附、层间结合水及 LDH 层板羟基缩合水的三重脱除过程, 热流曲线 DSC(A-b)对应吸热焓 1418.3 J·g⁻¹, 主要消耗于层间水脱除及层板羟基缩合脱水; 309.8~354.2 °C 区间失重仅 0.458%, 吸热焓 8.696 J·g⁻¹, 归属为 LDO-Cl 深度分解. 图 5B 为二级复合物的热分析结果, TG 曲线(B-a)

与前体 MLDH 相似、但 DSC 曲线(B-b)变化较复杂, 失重表现 3 个阶段, 61.19~167.77 °C 区间失重 55.09%, 同前体相似合并层表吸附水、层间结合水及 LDH 层板羟基缩合水脱除 3 种变化, 吸热焓 985.5 J·g⁻¹ 相对前体明显减小, 层间客体 FU 对内层面的羟基取代促进缩合脱水、使活化能降低; 298.8~347.4 °C 区间失重 0.4658%, 失重峰 2 吸热 3.286 J·g⁻¹, 与层间客体的有机残基降解有关; 354.3~606.5 °C 区间先后失重 0.4658% 和 0.7985%, 对应失重峰 3 吸热焓仅为 0.336 J·g⁻¹, 对应 LDO-Organics 复合物的深度分解. 三级复合物 DMF 的热分析结果由图 5C 给出, 同前两级样品相似, TG 曲线表现 3 个失重阶段, 以第一次失重为主、脱水在 36.9~161.3 °C 区间完成, 对应失重峰 1 吸热焓 643.79 J·g⁻¹, 但在 DTG 曲线标记 a, b 处的斜率有明显变化, 失重峰 1 虽然合并有物理水、层间结合水及层板羟基缩合水的三重失重过程, 但 DMF 三聚态下, 这 3 个不同失重过程的微分曲线有明显分界, 通过精细分析能将其分开, 与前两级复合物相比失重量增加、吸热焓降低, 显然, 这与层表 DET 的存在有关, 层外 DET 和层间 FU 共同参与、促进了 LDH 层板羟基的缩合脱水, 活化能降低, DET-LDH 间的额外缩合造成失重量增大. 260.72~304.36 °C 区间失重 4.067%, 对应失重峰 2 为一放热峰, 热焓 -8.574 J·g⁻¹; 除与层间客体 FU 分解有关外, 还与层外 DET 残基的分解及产物对 LDO 的结合有关, 内、外有机基团对 LDO 的稳定结合使体系能量降低、失重放热. 304.4~606.2 °C 间失重 4.444%, 对应的 DSC 曲线呈漫放热趋势, 与 LDO-Organics 复合物深度分解相对应. DMF 溶剂转换后样品的热分析结果由图 5-D 给出, 三级分解特征比图 5C 更清晰, 31.9~142.6 °C 区间失重 63.79%, 失重峰 1 吸热 627.69 J·g⁻¹, DTG 曲线转折显示, 这个区间的失重与样品湿水及层间结合水脱除有关, 失水量大于转换前样品, DET 复合及溶剂转换造成样品包封水量增加、层板缩合脱水滞后. 251.67~308.83 °C 区间失重 19.03%, 对应失重峰 2 放热 60.25 J·g⁻¹, 失重源

图 4 MLDH (A), MLDH-FU (B) 及 DET-MLDH-FU (C) 3 级超分子的 TEM 形貌

Figure 4 TEM of MLDH (A), MLDH-FU (B), and DET-MLDH-FU (C) 3-level supra-molecular

图5 MLDH (A), MLDH-FU (B), DMF (C)及产物(D)样品的热分析结果

Figure 5 Thermal analysis result of MLDH (A), MLDH-FU (B), DMF (C) and product (D) samples

于 DET-LDH-FU 的双边缩合及 LDH 层板脱水 3 部分, 层架两边的有机残基均使 LDO 体系能量降低, 失重放热; 384.5~606.4 °C 区间先后失重 3.602% 和 2.295%, 失重峰 3 仍为放热过程, 焓值 $-42.9 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ 。脱水是 LDH 型化合物热失重的主要特征, 除 LDH 强吸附活性所致的表面吸附水发生物理失重外, 主要包括层间结构水脱除、层间客体置换层板羟基^[18]所引起的化学脱水, 制备与存放过程样品的吸水程度主要影响物理失水量高低, 但不影响与 LDH 超分子体系结构相对应的化学失重特征^[8]; 为防止分解氧化, 上述样品经历过低温冷冻处理, 因此, 物理水失重量与镁铝 LDH^[8,18]相比增加较多, 但化学脱水及失重特征与 DMF 各级超分子的组成及结构相吻合。

2.3 MLDH 载药复合物的体外释放动力学特征

图 6 给出 MLDH-FU 与 DET-MLDH-FU 两级复合物的药物释放曲线与动力学方程拟合结果。图 A 显示, MLDH-FU 的药物释放较快, 动力学曲线比较复杂、呈 S 形趋势, 最大释放浓度较低, 45 min 时趋于平衡, 平衡

前 5-Fu 的溶出速率符合零级动力学方程 $C-1.061 \times 10^{-5}=4.881 \times 10^{-7}t$; 图 B 显示, DET-MLDH-FU 的药物释放较慢, 最大溶出浓度 $39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与载体量相同的二级复合物相比高出约 25%, 60 min 时达到平衡, 相对 MLDH-FU 的平衡时间滞后 33%, 平衡前 5-Fu 浓度直线上升、零级动力学特征明显突出, $t=0 \sim 60 \text{ min}$ 区间的速率符合方程 $C-1.162 \times 10^{-5}=4.566 \times 10^{-7}t$, 相关系数 0.9981, 大于二级复合物的零级线性系数; 速率常数 $4.566 \times 10^{-7} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{m}^{-1}$, 小于同一模型的二级复合物。对比表明, DET-MLDH-FU 的药物释放更慢、零级速率特征更显著, 证明 DET 的三级复合增强了 MLDH-FU 系统的缓释功能、强化了 MLDH 的控释特性。

以上结果表明, MLDH 对层间药物释放的控制具有明显的零级动力学特征。缓、控释制剂的释放机理^[22]有控制溶出、扩散、溶蚀机制, 以及扩散与溶出相结合的情况; 缓、控释的区别在于缓释为先快后慢的非恒速释放, 控释则按零级模型释放, 表现恒速过程。显然, MLDH 运载系统的药物释放特征以控释为主; 释放机制

图6 MLDH-FU (A)与 DMF (B)的体外药物释放动力学模型
Figure 6 Drug release dynamics model of MLDH-FU (A) and DMF (B) *in vitro*

主要是溶出介质与 MLDH-Drugs 的离子交换^[23], 也涉及药物分子在 MLDH 层内通道的扩散溶出与介质对 LDH 层板的溶蚀作用^[24]. 从结构上看, DMF 表层的 DET 通过环架羟基及 1,6- α -酐键形成的线性、网络链结, 与 MLDH 层外羟基缩合、氢键缔合实现复合、包封, 在与 MLDH-FU 复合时, 夹裹了一部分吸附在 LDH 层外的 FU 小分子, 与 MLDH-FU 二级体系相比药物包封率增加; 在 pH 7.35 的 PBS 介质中 α -糖苷键水解断裂, DET 保护层部分溶蚀^[19], MLDH-FU 与 PBS 接触、发生离子交换, 药物在克服 MLDH 层间通道及 DET 包封层的双重控制后缓慢释出^[13]; DET 包封层对从 MLDH 层间交换出来的 5-Fu 向介质的快速扩散有阻滞作用, 造成药物在 DMF 内部蓄积, 因而使 DMF 的药物释放更加缓慢、恒速释放的零级特征更突出, 平衡时最大释放浓度高于 MLDH-FU, 并在高浓度水平维持更长的药物释放时间.

2.4 DET-MLDH-FU 给药系统的急毒性水平

灌胃给药的毒性实验结果表明, 除 MLDH 的 4000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组死亡一只小鼠外, 其余各组在 8000, 4000, 2000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下的存活率均为 100%. 各实验组小鼠灌胃后活动正常, 无弓背、松皮及竖毛现象, 排泄物呈乌黑色, 3 d 后体重略增. 毒性实验组的小鼠存活率大于 90%, 测不到半数致死量 LD_{50} , DMF, MLDH-FU

和 MLDH 灌胃后可经正常代谢排出体外, 毒性极微^[25].

根据腹腔注射各毒性实验组测得的小鼠死亡率, 用简单机率单位法^[16]计算 DMF, MLDH-FU 和 MLDH 的半数致死量(LD_{50})和 95% 的平均可信限(L_{95}), 结果由表 2 给出. 腹腔注射 DET-MLDH 的 LD_{50} 为 3279.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, DMF 的 LD_{50} 为 2542.8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, MLDH 的 LD_{50} 为 1951.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 相比之下, LD_{50} 值 $\text{MLDH} \ll \text{DET-MLDH}$, 证明右旋糖酐对载体 MLDH 的复合、修饰降低了 MLDH 的急毒性水平, 生物相容性提高; LD_{50} 值 $\text{DMF} < \text{DET-MLDH}$, 证明 DMF(DET-MLDH-FU)的急毒性水平高于纯载体 MLDH 的糖酐包合物 DET-MLDH, 二者在化学成分上的差别在于前者负载了抗肿瘤药物氟尿嘧啶, DMF 相对于 DET-MLDH 所增加的毒性源自氟尿嘧啶的药物毒性. 三级复合物 DMF 相对纯载体 MLDH 的 LD_{50} 增加了 591.8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 可见, 在插载抗肿瘤药物的情况下, 右旋糖酐的复合修饰可显著降低 DMF 给药系统的急毒性水平.

表2 腹腔注射的急毒性实验结果

Table 2 The acute toxicity experimental results of peritoneal injection

Sample	Dosage/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Log dosage	Mortality rate	LD_{50}^a / ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	L_{95}^b
DMF	5000	3.70	1.0	2542.8	2256.7~ 2828.9
	3750	3.57	0.9		
	2812	3.45	0.7		
	2110	3.32	0.6		
	1582	3.20	0.0		
DET- MLDH	5000	3.70	1.0	3279.5	2797.9~ 3579.1
	3750	3.57	0.7		
	2813	3.45	0.2		
	2109	3.32	0.0		
	3375	3.53	1.0		
MLDH	2531	3.40	0.7	1951.0	1738.6~ 1972.3
	1898	3.28	0.6		
	1424	3.15	0.1		
	1068	3.03	0.0		

^a LD_{50} — Harf lethal dose, calculated with the formula: $\text{LD}_{50} = \text{anti log} \left[\bar{x} + 1/b(5 - \bar{y}) \right]$, $b = 6 \sum R \cdot y / ik(k^2 - 1)$; ^b L_{95} — 95% confidence interval, calculated with the formula: $L_{95} = \text{LD}_{50} \pm 4.5 \text{LD}_{50} 1/b \sqrt{1/n \sum w}$.

按世界卫生组织的化合物急毒性分级标准^[25], 小鼠半数致死量在 501~5000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 范围属低毒性水平; 研究表明, DMF 给药系统及载体 MLDH 的 LD_{50} 均高于低毒性水平的下限, 属于低毒性物质. 据文献报道, 小鼠腹腔注射肝靶向聚氰基丙烯酸正丁酯丝裂霉素纳米粒的 LD_{50} 为 54.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 腹腔注射氟尿嘧啶原药的 LD_{50} 为 257.7 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, Fu-GalCer 脂质体的 LD_{50} 为 380.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. DMF 给药系统的急毒性水平相对以上制剂要

低一个数量级,生物相容性优势明显.

3 结论

利用“前驱体共沉淀-离子交换插层-原位复合-溶剂转换”分级组装技术能合成 LDH 晶相特征突出、结构稳定的 DMF 三级超分子型药物运载系统,磁性 Fe(II, III)LDH 层板与微量 Fe₃O₄ 共存,赋予了系统对外加磁场的靶向特异性,MLDH 的控释作用与 DET 的辅助效应使 DMF 获得理想的缓、控释性能. DMF 及其前级复合物的 XRD 均与 R-六方 LDH 衍射特征相符,为 Fe_{3.6}Fe_{0.9}(OH,Cl)₉ 型 LDH 与微量 Fe₃O₄ 的复合晶相;由 DET,MLDH 及 FU 三组分复合形成的核壳式结构中,MLDH 的 XRD,IR 及 TEM 六边形特征表达程度高;DMF 在中高温段分解的放热趋势明显. DET 复合对 Fe(II, III)LDH 构架起到抗氧化保护作用,能对不同的 MLDH-FU 粒子加以选择、分离、有效包封. DMF 的体外药物释放具有突出的零级动力学特征,速率方程 $C-1.162 \times 10^{-5} = 4.566 \times 10^{-7}t$,速率常数 $4.566 \times 10^{-7} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{m}^{-1}$;DET 的三级复合增强了 MLDH-FU 系统的缓释作用、进一步强化了 MLDH 的控释特性.

DMF,MLDH-FU 及 MLDH 可经正常代谢排出体外,口服毒性微弱;腹腔注射 DMF 的 LD₅₀ 为 2542.8 mg•kg⁻¹,相对其它制剂的生物相容性好;MLDH 的 LD₅₀ 为 1951.0 mg•kg⁻¹,属低毒性物质,右旋糖酐的复合能使给药系统的急毒性水平显著降低.

References

- Gou, G.-J.; Bao, F.-J.; Yang, J.-H. *CN 101607088A*, **2009** [*Inv p gaz.* **2009**, 1241, 139] (in Chinese). (苟国敬, 鲍凤娟, 杨建宏, 发明专利公报, 101607088A, **2009**, 1241, 139.)
- Gou, G.-J.; Bao, F.-J.; Jiang, Y.-X. *CN 101607091B*, **2009** [*Inv p gaz.* **2009**, 1241, 140] (in Chinese). (苟国敬, 鲍凤娟, 蒋袁絮, 发明专利公报, 101607091A, **2009**, 1241, 140.)
- Choi, H. J.; Kwon, T. M.; Jhon, M. S. *J. Mater. Sci.* **2000**, 35, 889.
- Kwon, T.; Tsigdinos, G. A.; Pinnavaia, T. J. *Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 3653.
- Dimotakis, E. D.; Pinnavaia, T. J. *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 2393.
- Li, S. P. *Colloids Surf. A* **2006**, 290, 56.
- Wang, J.-Q.; Li, X.; Li, S.-P. *Acta Chim. Sinica* **2011**, 69, 137 (in Chinese). (王继芹, 李鑫, 李淑萍, 化学学报, **2011**, 69, 137.)
- Gou, G.-J.; Xu, H.-P.; Liu, J.-P. *Acta Chim. Sinica* **2009**, 67, 65 (in Chinese). (苟国敬, 许红平, 刘建平, 化学学报, **2009**, 67, 65.)
- Xing, F.-F.; Ni, Z.-M.; Wang, P. *Acta Chim. Sinica* **2007**, 65, 2738 (in Chinese). (邢方方, 倪哲明, 王平, 化学学报, **2007**, 65, 2738.)
- Jin, S.; Fallgren, P. H.; Morris, J. M. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2007**, 8, 67.
- Josanlet, C. V.; Oscar, H. G.; Kate, L.; Steven, L. S. *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 5621.
- Urs, O. H.; Judy, S. R.; Linda, H. S.; Anita, C. B.; Framin, M.; James, P. D.; David, B. *Mol. Pharmaceutics* **2009**, 6, 1417.
- Bao, F.-J.; Gou, G.-J.; Wang, S.-J. *Chin. Pharm. J.* **2011**, 46, 128 (in Chinese). (鲍凤娟, 苟国敬, 王淑静, 中国药学杂志, **2011**, 46, 128.)
- Bao, F.-J. *M.S. Thesis* Ningxia Medical University, Yinchuan, **2010** (in Chinese). (鲍凤娟, 硕士论文, 宁夏医科大学, 银川, **2010**.)
- Shi, J.-H.; Wu, X.-T.; Fan, M.-X.; Jiang, G.-R. *Chin. Phys. Med. J.* **1995**, 17, 71 (in Chinese). (施建华, 吴信陶, 樊明信, 姜光锐, 中华物理医学杂志, **1995**, 17, 71.)
- Xu, S.-Y.; Chen, X. *Pharmacology Experiment Methodology*, Science Press, Beijing, **1982**, pp. 402~403 (in Chinese). (徐叔云, 陈修, 药理实验方法学, 科学出版社, 北京, **1982**, pp. 402~403.)
- Inorganic Chemistry Write Group, *Inorganic Chemistry*, People's Education Press, Shanghai, **1978**, p. 205 (in Chinese). (无机化学编写组, 无机化学, 人民教育出版社, 上海, **1978**, p. 205.)
- Gou, G.-J.; Ma, P.-H.; Chu, M.-X. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **2004**, 20, 1357 (in Chinese). (苟国敬, 马培华, 褚敏雄, 物理化学学报, **2004**, 20, 1357.)
- Jiao, L.; Gou, G.-J.; Yang, J.-H.; Yang, X.-P. *Chin. Pharm. J.* **2011**, 46, 357 (in Chinese). (焦林, 苟国敬, 杨建宏, 杨晓萍, 中国药学杂志, **2011**, 46, 357.)
- Gou, G.-J.; Bao, F.-J.; Zheng, Z.-X.; Xu, H.-P. *Chem. Res. Appl.* **2008**, 20, 1158 (in Chinese). (苟国敬, 鲍凤娟, 郑志详, 许红平, 化学研究与应用, **2008**, 20, 1158.)
- Ahmet, N. A.; Birgl, Z. K.; Abidin, T.; Vicente, R. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 8871.
- Higuchi, T. *J. Pharm. Sci.* **1963**, 52, 1145.
- Ambrogio, V.; Fardella, G.; Grandolini, G.; Perioli, L. *Int. J. Pharm.* **2001**, 220, 23.
- Bao, F.-J.; Wang, S.-J.; Gou, G.-J.; Lu, N.-Q.; Yang, X.-P.; Jiao, L.; Wang, Z.-Y. *Chem. Res. Appl.* **2010**, 22, 47 (in Chinese). (鲍凤娟, 王淑静, 苟国敬, 卢宁清, 杨晓萍, 焦林, 王志宇, 化学研究与应用, **2010**, 22, 47.)
- Xu, X.-Y. *Mod. Prevent Medic.* **1997**, 24, 246 (in Chinese). (徐新云, 现代预防医学, **1997**, 24, 246.)