

顺铂温敏载药粒子的制备表征

杨 觅¹ 丁义涛¹ 黄兆琦² 钱晓萍¹ 禹立霞¹ 刘宝瑞^{*,1}

(¹ 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心, 南京 210008)

(² 南京大学生命科学院, 南京 210093)

摘要: 制备了顺铂温敏载药纳米粒子, 表征其相关性质并考察不同温度下对体外肿瘤细胞的生长抑制作用。制备的两亲嵌段聚合物在水溶液中自发形成胶束结构并包裹顺铂, 测定顺铂载药粒子的结构、形态、粒径及包封率、载药量、晶体状态等特性, 并对顺铂的体外释放以及不同细胞系体外毒性也做了研究。载药粒子粒径为 83.3 ± 4.3 nm, 载药量为 37.8%, 包封率为 77.8%。血清中相变温度 39.3 °C。载药颗粒在单纯化疗时细胞抑制率较小, 加热后抑制作用明显增加($P < 0.01$), 与游离药物相近($P > 0.5$)。顺铂载药纳米粒子具有较好的温控特性, 为顺铂在肿瘤热靶向治疗中的应用提供了一条新的途径。

关键词: 温敏; 顺铂; 靶向治疗

中图分类号: O614.82*6

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2007)02-0205-06

Preparation and Characterization of Cisplatin-loaded Thermosensitive Micelle

YANG Mi¹ DING Yi-Tao¹ HUANG Zhao-Qi² QIAN Xiao-Ping¹ YU Li-Xia¹ LIU Bao-Rui^{*,1}

(¹ Cancer Center of Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008)

(² School of Life Science of Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract: Cisplatin-loaded thermosensitive micelle was prepared and its characters and cytotoxicity were evaluated at different temperature *in vitro*. The thermally sensitive block copolymer, poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylamide)-*b*-poly(*D,L*-lactide), was synthesized by free radical polymerization and ring-opening polymerization. Cisplatin-loaded micelle was made of such thermosensitive polymer. The drug loading content was 37.8% and the entrapment efficiency was 77.8%. The LCST in serum was 39.3 °C. The physical properties, such as structure, size distribution, crystallization and morphology of the cisplatin-loaded micelles were characterized by NMR, XRD, DLS and AFM. The efficacy of this drug delivery system was also evaluated by examining the proliferation inhibiting activity against different cell lines *in vitro*. The results demonstrate that this copolymer could be an ideal candidate for thermal targeted antitumor drug delivery.

Key words: thermosensitive; cisplatin; target therapy

顺铂(cisplatin), 即顺式二氯二氨合铂, 是目前临床常用的金属铂类配合物, 属细胞周期非特异性抗肿瘤药物^[1]。微溶于水, 在 Cl⁻浓度高的条件下较稳定, 进入细胞后由于细胞内 Cl⁻浓度低, 药物水解为阳离子水化物, 具有类似烷化剂的双功能基团的作用, 主要与 DNA 上的核碱鸟嘌呤、腺嘌呤和胞嘧啶

形成 DNA 单链内两点的交叉联结, 也可能形成双链间的交叉联结, 从而破坏 DNA 的结构和功能, 起到杀伤肿瘤细胞的作用(图 1)^[2]。

顺铂在静脉注射后, 主要分布于肝、肾及膀胱, 在血浆中迅速消失。与其他抗肿瘤药物一样, 顺铂对人体正常细胞和癌细胞无选择性, 主要不良反应为

收稿日期: 2006-05-29。收修改稿日期: 2006-11-08。

国家自然科学基金资助项目(No.30670958), 江苏省自然科学基金重点资助项目(No.H200349)。

*通讯联系人。E-mail: baoruiliu63@hotmail.com

第一作者: 杨 觅, 女, 27 岁, 博士研究生, 研究方向: 肿瘤靶向治疗。

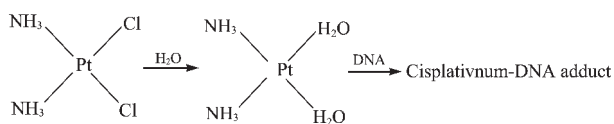


图 1 顺铂水解及作用示意图

Fig.1 Ligand substitution of cisplatin

消化道反应、肾脏毒性、骨髓抑制及听神经毒性,与所用剂量的大小及总量有关^[3]。为了寻找高效低毒的给药方式,人们开始尝试采用新的靶向给药途径。

对于顺铂的包裹,文献中多采用具有羧酸盐结构的高分子材料。但是,以羧酸盐为载体制备的载药粒子不稳定,易导致沉淀^[4]。本工作采用两亲性嵌段高分子聚合物——聚 *N*-异丙基丙烯酰胺-丙烯酰胺-*D,L*-丙交酯[P(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA]作为载体材料。其中,聚 *N*-异丙基丙烯酰胺-丙烯酰胺片段[P(IPAAm-co-AAm)]具有温敏特性,它在一定的温度以下是亲水的,超过这个温度时发生相变,聚合物由亲水变为疏水,这一温度称为低临界溶解温度(low critical solution temperature, LCST)^[5]。

将顺铂与该高分子聚合物简单混合后在水中自发形成稳定的胶束结构,其中,铂与聚 *D,L*-丙交酯(PDLLA)形成配合物位于胶束的核心,而具有温敏性的亲水片段 P(IPAAm-co-AAm)位于胶束的外壳,增加其稳定性,防止粒子间互相团聚沉淀,并能保护其进入机体后长期循环不被网状内皮系统清除(图 2)。一旦到达肿瘤加热部位,温度高于聚合物 LCST,聚合物外壳将失去其保护作用,成为疏水性物质并沉淀下来。由于体液中含有大量的氯离子,顺铂与聚合物分离,重新还原为二氯二氨合铂。药物在肿瘤部位的高分布,达到温控靶向的目的。

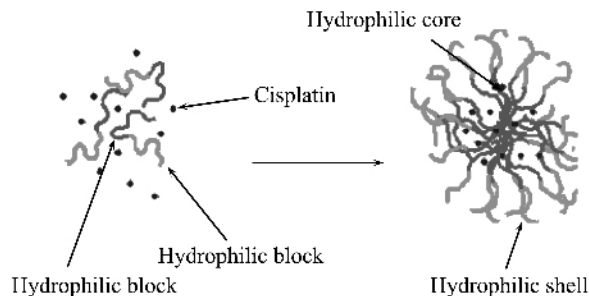


图 2 顺铂纳米胶束自组装示意图

Fig.2 Cisplatin micelle structure form in aqueous media

本文就聚合物载体的制备、结构特征进行了研究,并描述了顺铂的包裹过程、载药粒子的形态、粒径、包封率、载药量及晶体状态等性质,对顺铂的体外释放以及不同细胞系体外毒性也做了研究,为顺

铂热靶向化疗的临床应用奠定了基础。

1 实验部分

1.1 仪器和材料

顺铂(齐鲁制药惠赠);*N*-异丙基丙烯酰胺(Acros,美国,纯度 99%);丙烯酰胺(Fluka,瑞士,纯度 99%);*D,L*-丙交酯(东京化成工业株式会社,日本,分析纯);2,2'-偶氮二异丁腈(AIBN)(Aldrich,美国,分析纯);辛酸亚锡(Sigma,美国,纯度 95%);2-巯基乙醇(Sigma,美国,分析纯);RPMI-1640 培养液(Gibco,美国);新生牛血清(Amersco,美国);3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-四唑溴盐(MTT)(Amersco,美国);乙腈(Merck,德国,色谱纯);其他试剂均来自上海中兴化学品有限公司,分析纯。

Millipore Stirred Cells 8050 型超滤器, Bruker MSL-300 型核磁共振仪, Brookhaven BI-90plus 型激光粒度仪, Seiko SPI3800 原子力显微镜, PANalytical X 射线衍射仪, Shimadzu UV3100 型紫外分光光度计, TOKYO Rikaaikai ELLY4 型恒温槽, DG5031 型酶标仪。

1.2 聚合物的合成

采用自由基聚合法,将单体 *N*-异丙基丙烯酰胺 80 mmol、丙烯酰胺 20 mmol、引发剂 2,2'-偶氮二异丁腈 1 mmol 及链转移剂 2-巯基乙醇 2 mmol 加入三颈反应瓶中,加入 30 mL 乙醇做溶剂,磁力搅拌器强烈搅拌下通氮气 20 min,升温至 60 ℃,氮气保护下恒温 20 h 后反应产物在乙醇-乙醚体系中纯化,真空干燥后采用滤过分子量为 10 000 的滤膜超滤。产物冷冻干燥,得具有羟基末端的温敏性共聚物 P(IPAAm-co-AAm)。

将此共聚物对 *D,L*-丙交酯开环聚合。P(IPAAm-co-AAm) 10 mg 与 *D,L*-丙交酯按质量比 1:1.5 加入一内径约 10 mm 的试管中,加入 0.033 mol·L⁻¹ 辛酸亚锡二甲苯溶液 30 mL,真空条件下除去水及二甲苯后,采用酒精喷灯熔断封口,置 150 ℃油浴中开环聚合 20 h。反应结束后将产物用乙醇溶出,并用乙醇-乙醚体系纯化,真空干燥得两亲性嵌段共聚物 P(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA。

1.3 顺铂胶束自组装

20 mg 顺铂与 50 mg P(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA 嵌段共聚物溶于 5 mL 二氯甲烷中,搅拌 2 h 使之充分溶解。溶液放入滤过分子量为 8 000 的透析袋中,于纯水中 4 ℃避光透析至透析液黄色消失。

透析袋内溶液冷冻干燥,得到顺铂载药纳米颗粒。

1.4 聚合物结构测定

采用 ^1H NMR 及定量 ^{13}C NMR 检测聚合物分子结构。

1.5 不同溶液中 LCST 检测

将聚合物 P(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA 及顺铂载药粒子分别溶于纯水、磷酸缓冲液(PBS)溶液及血清中,配成 $0.01\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 稀溶液,采用目测法,以溶液由清澈瞬间出现混浊时的温度为 LCST,估算样品 LCST。将样品溶液置于可见紫外分光光度计中,在估算得到的 LCST 为中心 $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ 的范围内,以 $0.1\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率对溶液缓慢升温,在 500 nm 处测定溶液的透光率,以透光率降为原来 50% 时所对应的温度点为样品的 LCST,所有测试进行 3 次取平均值。

1.6 载药量及包封率的检测

采用邻苯二胺(*o*-phenylenediamine)法测定载药粒子中铂的含量^[2]。将邻苯二胺溶于 DMF 中配成 $1.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。以顺铂标准品溶于纯水中配成 $10^{-4}\sim 1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,与邻苯二胺 DMF 溶液按体积比 1:1 充分混合后, $100\text{ }^\circ\text{C}$ 加热 10 min 。溶液于 703 nm 波长下检测,获得标准曲线。载药粒子溶于纯水中配成 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,与邻苯二胺 DMF 按体积比 1:1 充分混合后, $100\text{ }^\circ\text{C}$ 加热 10 min ,于 703 nm 波长下检测,与标准曲线对照,计算顺铂含量。并按下列公式推算载药量及包封率:

$$\text{载药量} = \frac{\text{胶束中顺铂质量}}{\text{胶束总质量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{包封率} = \frac{\text{胶束中顺铂质量}}{\text{给药量}} \times 100\% \quad (2)$$

1.7 形态及粒径检测

将冻干的聚合物及载药粒子分别溶于纯水中配成 $5 \times 10^{-4}\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的稀溶液,采用激光粒度仪测定室温下胶束的粒径及粒径分布,并以 $1\text{ }^\circ\text{C}$ 的间隔逐渐升温至 $45\text{ }^\circ\text{C}$,测定不同温度下的粒径变化。

取载药粒子溶于纯水中配成 $5 \times 10^{-4}\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 稀溶液,滴加到硅晶片上,分别于室温下及 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 时干燥,通过原子力显微镜观察其表面结构,选用 $20\text{ }\mu\text{m}$ 扫描器轻敲模式。

1.8 X 射线衍射(XRD)检测

采用 X'Pert ProX 射线衍射仪 (PANalytical, 荷兰)分别对顺铂、空白载体及顺铂载药粒子晶体结构进行分析, Cu 靶 $K\alpha$ 射线($\lambda=0.15418\text{ nm}$), 管压 40 kV , 管流 150 mA , 扫描速率 $0.04^\circ\cdot\text{s}^{-1}$ 。

1.9 体外释放实验

精密称量冻干后的顺铂载药粒子,溶于纯水中配成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液 5 mL 置滤过分子量 $8\text{ }000$ 的透析袋中,将透析袋扎紧并浸入装有 200 mL PBS 溶液的烧杯中。烧杯置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中恒温。采用磁力搅拌器缓慢搅拌烧杯中的 PBS 溶液,每隔一定时间取出 0.5 mL PBS 溶液,采用 1.6 节所述的方法测定其中顺铂的含量,计算载药粒子在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下的释放情况。同样的方法,将载药粒子溶液至于 $43\text{ }^\circ\text{C}$ 的 PBS 溶液中,测定载药粒子在 $43\text{ }^\circ\text{C}$ 下的释放情况。

1.10 体外细胞毒实验

采用人胃癌细胞株 BGC-823、人肝癌细胞株 HepG II、人肝癌细胞株 SMMC-7721、人肠癌细胞株 Lovo 及鼠肉瘤细胞株 S180、鼠肺癌细胞株 Lewis 等 6 株肿瘤细胞及人脐静脉内皮细胞株 HUVEC 检测顺铂载药纳米粒子的细胞毒性,并采用游离顺铂及空白载体作为对照。

肿瘤细胞以每孔 1×10^4 的密度接种于 96 孔板内,采用含 10% 小牛血清的 1640 培养液。HUVEC 以每孔 5×10^3 的密度种植于 96 孔板内,采用含 10% 胎牛血清的 EGM 培养液。不同浓度顺铂载药纳米粒子、游离顺铂及空白载体分别加入细胞中,细胞置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱内培养 20 h 后每孔加入 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT $20\text{ }\mu\text{L}$,继续培养 4 h 后弃去上清,每孔加入 DMSO $200\text{ }\mu\text{L}$,置振荡仪上充分混匀,采用酶标仪在 570 nm 波长时测量各孔吸光度。采用公式(3)计算各组细胞生存率,并对浓度作图,以生存率为 50% 时的药物浓度为 IC_{50} 。

$$\text{细胞生存率} = \frac{\text{该组平均吸光度值}}{\text{空白对照平均吸光度值}} \times 100\% \quad (3)$$

热化序组与上述实验方法相同,只是在加药后置 $43\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴恒温 30 min ,再放入 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱内培养。

2 结果与讨论

2.1 聚合物结构测定

采用 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 测定聚合物 P(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA 的化学组成。在 ^1H NMR 谱中(图 3), 4.0 ppm 及 5.1 ppm 处的峰面积之比代表聚合物中的 PIPAAm 与 PDLLA 的物质的量之比为 1.3:1。

由于在 ^1H NMR 中 PIPAAm 与 AAm 中的质子无法区分,因此,我们采用反转门控去偶技术,通过

定量 ^{13}C NMR 测定聚合物中 PIPAAm 与 AAm 的含量比。如图 4 中分别显示了 3 种不同的羰基碳 (169.7 ppm, 175.0 ppm 及 180 ppm), 其峰面积之比代表 PDLLA、PIPAAm 及 AAm 物质的量之比, 为 8.27:9.9:1。其中 PIPAAm 与 PDLLA 之比为 1.2(9.9:8.27), 与 ^1H NMR 测得的结果相近。

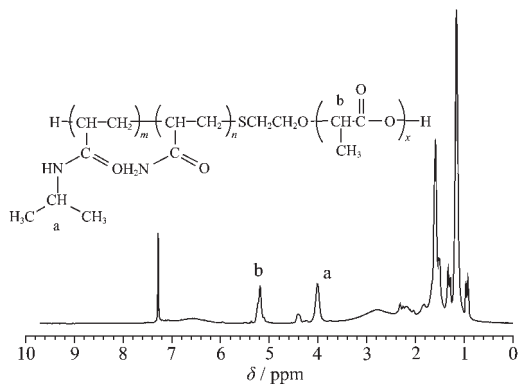


图 3 聚合物 P(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA 的 ^1H NMR
Fig.3 ^1H NMR spectrum of poly(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA

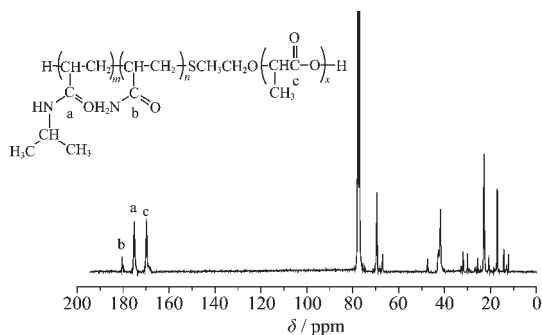


图 4 聚合物 P(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA 的 ^{13}C NMR
Fig.4 ^{13}C NMR spectrum of poly(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA

2.2 不同溶液中 LCST 测定

空白载体及包裹顺铂后的载药粒子在不同溶液中的 LCST 见表 1。由表可以看出,在不同溶液中的 LCST 不同。这是因为 LCST 除了受聚合物结构的影响外,还受溶液中血清及蛋白的影响。因此,在设计载体时,需考虑进入体内后这些因素的干扰。载药后粒子的 LCST 有所下降,但是仍高于人体的正常温度 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 而低于加热后肿瘤组织的温度 $42\text{ }^\circ\text{C}$ ^[6],符合

表 1 粒子载药前后在不同介质中的 LCST

Table 1 LCSTs of micelles in different solution ($^\circ\text{C}$)

	Empty micelles	Cisplatin-loaded micelles
Water	43.8	41.7
PBS	40.2	39.9
Plasm	39.9	39.3

临床应用的需要。

2.3 形态及粒径检测

采用动态光散射法测定粒子粒径。室温下,空白载体粒径为 $83.3 \pm 4.3\text{ nm}$,多分散性 0.122 ± 0.025 。不同温度下粒子粒径变化情况如图 5 所示。在 LCST 附近时,载体粒径出现了先减小后增大的现象。在接近 LCST 时,粒径出现了轻度减小。产生这一现象的原因是在 LCST 时胶束外壳的 P(IPAAm-co-AAm)由亲水长链状变为疏水的皱缩状态,导致粒子的水合半径下降。而在 LCST 以上时,由于已变成疏水的 P(IPAAm-co-AAm)外壳失去了保护作用,粒子之间开始互相团聚,导致所测得的粒径持续迅速增大。

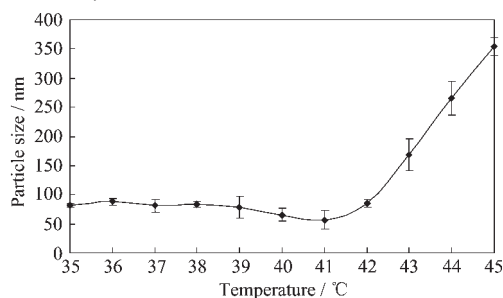


图 5 不同温度下空白载体粒径

Fig.5 Particle size of empty micelles at different temperature

包裹顺铂后,载体粒径略有增大。粒径 $92.7 \pm 6.8\text{ nm}$,多分散性 0.374 ± 0.102 。原子力显微镜可见,载药后粒子呈圆形,表面光滑,无顺铂晶体析出。加热后粒子团聚,但并非彼此融合,粒子仍保持圆形。

2.4 载药量、包封率及体外释放检测

采用邻苯二胺法测定了顺铂纳米胶束的载药量、包封率及不同温度下的体外释放情况。测得载药量为 37.8%,平均包封率 77.8%。

不同温度下体外释放情况见图 6 所示。纳米粒子显示了良好的缓释特性。由于抗肿瘤药物毒性较高,为了防止体内药物浓度过高,常常采用长时间静脉滴注的方法来给药。如果药物载体具备缓释效果,那么就可以采用较静脉滴注更为方便的一次性注射方式,使得药物在体内缓慢释放,这样既能缩短给药时间,大大减少患者的不便,同时还可以使体内的药物浓度保持一定的水平,使得肿瘤细胞长时间处于一定的药物浓度之下,提高药效^[7]。顺铂静脉注射后在血浆中迅速消失,静脉注射后 1 h 血浆中含量为 10%左右,90%与血浆蛋白结合,增加了药物毒性^[8]。而顺铂载药粒子在前 10 h 内,药物释放小于 50%,

缓释特性良好。由图 6 还可以看出,43 ℃加热后,顺铂的释放增加,表现出良好的温控特性。

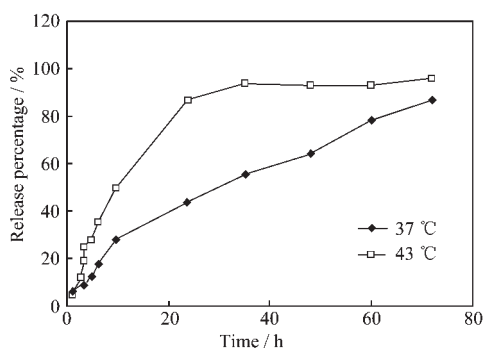


图 6 不同温度下顺铂纳米粒子体外释放情况

Fig.6 Cumulative *in vitro* release profiles of cisplatin-loaded micelles at 37 °C and 43 °C

2.5 XRD 检测

图 7 为顺铂、冻干后的顺铂载药粒子及空白载体的 XRD 图。图 7a 为顺铂 X 射线衍射图,存在明显的晶相衍射峰,而空白载体是无定形的,因此在 XRD 图上表现为平滑的宽峰(图 7b)。顺铂载药粒子的 XRD 图与空白载体相似,为平滑的宽峰,顺铂自身的晶相衍射峰消失,说明顺铂以无定型状态高度分散在载体的内部^[9]。

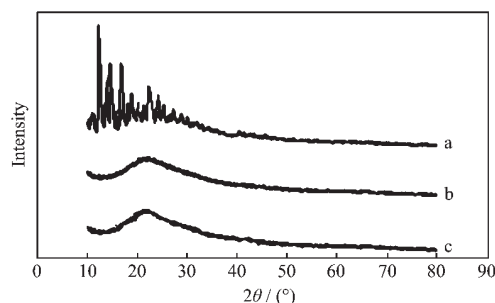


图 7 顺铂(a)、空白粒子(b)及顺铂载药粒子(c)的 XRD 图

Fig.7 XRD patterns of cisplatin (a), empty micelles (b), and cisplatin-loaded micelles (c)

2.6 对不同细胞系的体外抗肿瘤作用

我们考察了 6 株肿瘤细胞系及 1 株内皮细胞不同处理条件下的 IC_{50} ,由表 2 可见,顺铂单纯加热毒性增加,可见顺铂具有热增敏作用。因此,采用热靶向载体包裹顺铂,不仅能够发挥药物的靶向投递,还能起到热疗与化疗的协同作用,进一步促进疗效。

在加热及不加热的情况下,空白载体对细胞抑制都很小,说明载体本身的毒性很小。载药粒子在单纯化疗时细胞抑制作用较小,明显小于游离药物($P < 0.01$),而加热后抑制作用明显增加,与游离药物相似($P > 0.5$),显示了良好的热靶向特性。

表 2 不同细胞系 IC_{50} 浓度

Table 2 IC_{50} ($\mu g \cdot mL^{-1}$) of different cell lines

	Cisplatin		Empty micelles		Cisplatin-loaded micelles	
	37 °C ^a	43 °C ^b	37 °C ^a	43 °C ^b	37 °C ^a	43 °C ^b
BGC-823	2.4	2.1	>1 000	>1 000	17.2	1.8
HepG II	7.2	6.3	>1 000	>1 000	21.8	6.7
SMMC-7721	14.8	14.2	>1 000	>1 000	26.9	15.3
Lovo	11.2	10.8	>1 000	>1 000	18.4	11.7
Lewis	0.84	0.81	>1 000	>1 000	3.3	0.93
S180	21.8	17.6	>1 000	>1 000	67.3	12.5
HUVEC	0.15	0.13	670	320	12.3	0.34

IC_{50} : inhibitory concentration of 50% cell inhibition or death. ^a without incubating cells at 43 °C after replacing the medium.

^b incubating cells at 43 °C for 30 min after replacing the medium.

3 结 论

两亲性嵌段共聚物在水中能自发形成稳定的胶束结构。本文采用两亲性嵌段高分子聚合物聚 *N*-异丙基丙烯酸酰胺-丙烯酸酰胺-*D,L*-丙交酯 (P(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA)为载体材料,使顺铂以无定型状态高度分散在胶束内部。这一载药系统具有温敏特性,其 LCST 高于人体正常温度而低于加热后肿瘤组织温度,可在肿瘤加热部位沉积,既可实现顺铂在肿瘤

部位富集,又可将化疗与热疗相结合,发挥顺铂的热增敏作用,进一步提高其对肿瘤的抑制作用^[10]。加热后包药载体毒性显著增加,与游离药物相似($P > 0.5$),说明我们制备的载体细胞毒性小。包裹顺铂后显示一定的缓释特性,未加热时也是稳定的,而一旦加热则会将其包裹的药物释放出来,达到杀伤肿瘤细胞的效果。由此可见,顺铂温敏纳米颗粒具有较好的热控释特性,进一步的体内实验、载体稳定性测试,将为其走向临床打下基础。

参考文献:

- [1] Conti M, De Giorgi U, Tazzari V, et al. *J. Chemother*, **2004**, **16**: 23~25
- [2] Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, et al. *J. Controlled Rel.*, **1996**, **39**:351~356
- [3] Parikh PM, Fuloria J, Babu G, et al. *Trop Gastroenterol*, **2005**, **26**:115~118
- [4] Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, **47**:113~131
- [5] Kohori F, Sakai K, Aoyagi T, et al. *J. Controlled Rel.*, **1998**, **55**:87~98
- [6] Van D. *Ann. Oncol.*, **2002**, **13**(8):1173~84
- [7] Lee J, Cho E, Cho K. *J. Controlled Rel.*, **2004**, **94**:323~33
- [8] LIU Xin-Min(刘新民), XU Tao-Yuan(徐韬园), ZHANG Ke-Yi(张克义), et al. *Practical Clinical Therapy Pharmacopoeia* (实用临床治疗药典). Shengyang: Liaoning Science and Technology Press, **2003**.
- [9] Cserhati T, Forgacs E, Hollo J, et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1995**, **13**:533~541
- [10] Andresen T, Jensen S, Jorgensen K. *Progress in Lipid Research*, **2005**, **44**:68~97