

含哌嗪取代酞菁金属配合物的合成及其对癌细胞的光灭活作用

黄紫洋^{1,2} 黄剑东¹ 陈锦灿³ 陈耐生¹ 黄金陵^{*,1}

(¹ 福州大学功能材料研究所, 福州 350002)

(² 福建师范大学化学与材料学院, 福州 350007)

(³ 中国科学院福建物质结构研究所, 福州 350002)

摘要: 本文报道了 8 种含哌嗪取代酞菁金属配合物[(SPEO)₄PcM, M=Zn、Ni、Co、Cu, SPEO=2-[4-(2-磺基乙基)哌嗪-1-基]乙氧基]的合成及其表征,并分别测定了它们的紫外可见吸收光谱、荧光发射光谱、DPBF 捕获单线态氧的能力,结果表明它们都具有极高的摩尔消光系数、较高的荧光量子产率、较大的单线态氧生成速率。通过对肝癌细胞 BEL7402 光灭活作用的研究发现,当 β -(SPEO)₄PcZn 浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,在 670 nm 激光辐照下,光剂量为 1.2 J,药物对癌细胞的抑制率可达 82%。

关键词: 酞菁金属配合物; HEPES; 合成; 光灭活作用

中图分类号: O611.4; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2008)01-0055-06

Metal Phthalocyanines Piperazine Containing: Synthesis and Photoinhibition on Cancer Cell

HUANG Zi-Yang^{1,2} HUANG Jian-Dong¹ CHEN Jin-Can³ CHEN Nai-Sheng¹ HUANG Jin-Ling^{*,1}

(¹Institute on Research of Functional Materials, Fuzhou University, Fuzhou 350002)

(²College of Chemistry and Materials Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007)

(³Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, Chinese Academy of Sciences, Fuzhou 350002)

Abstract: The synthesis and characterizations of eight metal phthalocyanines containing piperazine (SPEO)₄PcM, where M=Zn, Ni, Co or Cu, SPEO=2-[4-(2-sulfonic ethyl) piperazine-1-yl] ethoxyl were studied. The UV-Vis absorption spectra, fluorescence emission spectra and capacity of singlet oxygen yield with DPBF as capturer were examined. The results show that all complexes possess very high molar extinction coefficient, fluorescence quantum yield, rate of singlet oxygen yield. Zinc phthalocyanine complex β -(SPEO)₄PcZn possesses the best photoinhibition through photodynamic inhibition of BEL7402 liver cancer cells, 82% cancer cells are inhibited after it is irradiated by 1.2 J photo dosage of 670 nm red-light laser when the concentration of β -(SPEO)₄PcZn with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ is used.

Key words: metallophthalocyanine; HEPES; synthesis; photoinhibition

0 引 言

光动力疗法(Photodynamic therapy, PDT)是近年来兴起的一种治疗肿瘤的新方法^[1]。血卟啉衍生物(HpD)虽已被批准为光动力诊治癌症的药物,但存

在许多的不足之处,如活性组分不明,其主吸收带在近紫外波段(405 nm),与临床治疗肿瘤时对人体组织透射率较高的红光波段相悖,且易在肝脏中积聚,对体表皮肤有较大的光毒副反应,在溶液中稳定性差,价格昂贵等^[2]。1985 年, Ben-Hur 等^[3]首次报

收稿日期:2007-08-08。收修改稿日期:2007-10-10。

国家自然科学基金(No.20201005)和福建省自然科学基金(No.E0513011)。

*通讯联系人。E-mail: hjl@fzu.edu.cn

第一作者:黄紫洋,男,37岁,博士研究生,副教授;研究方向:药物化学。

道了酞菁铝 (AlClPc) 对中国仓鼠纤维细胞(V79-B310H)的光灭活作用,从此开始了对酞菁配合物作为 PDT 光敏剂的全面研究^[4]。近年来研究并筛选了大量酞菁配合物作为 PDT 的光敏剂,在肿瘤 PDT 方面的应用得到迅速的发展,其中包括 L-ZnPc ^[5]、 AlPcS_4 ^[6]、 Pc4 ^[7]和 ZnPcS_2P_2 ^[8],这些酞菁金属配合物目前已进入或即将进入临床应用。酞菁金属配合物用作 PDT 光敏剂的主要优点是具有确定的组成,化学性质稳定,主吸收峰值在波长 670 nm 左右,在光辐照下可产生光敏反应,对体表皮肤毒副作用小,且便宜易得,是一类具有光动力优势并值得深入研究的新颖光敏剂^[9]。

2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸(HEPES),是一种常用的生物缓冲剂,广泛用于生理、生化、药理研究中。由于 HEPES 具有许多生物学效应^[10],因此本实验选择 HEPES 作为酞菁金属配合物的周环取代基,旨在协同利用 HEPES 的生物学效应和酞菁的光敏作用,期盼制备具有更强生物学效应的 PDT 光敏剂和更广泛用途的新型酞菁金属配合物。通过对合成的 8 种酞菁金属配合物的紫外可见吸收光谱、荧光发射光谱、DPBF 捕获单线态氧($^1\text{O}_2$)能力的测定,结果表明它们都具有极高的摩尔消光系数(ϵ)、较大的荧光量子产率(Φ_f)和较大的单线态氧生成速率(k)。接着将这些配合物应用于肝癌细胞 BEL7402 光灭活作用的研究,结果发现, β -(SPEO)₄PcZn 酞菁锌配合物具有较高的光敏活性,当浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,辐照光剂量为 1.2 J 的 670 nm 激光,对癌细胞的抑制率可达 82%。由于在酞菁周环引入的取代基(SPEO)较大且带有磺酸基团,这对酞菁的聚集行为和亲水性都有一定的改善。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

紫外可见(UV-Vis)吸收光谱的测定: Lambda 800 UV-Vis Spectrometer, Perkin Elmer Instruments。

荧光发射光谱的测定: FL/FS920 PCSPC Steady and Lifetime Spectrometer and Spectrofluorimeter。

红外光谱 (FTIR) 的测定: Spectrum 2000 FTIR Spectrometer, Perkin Elmer。

质谱(MS)的测定: Finnigan LCQ Deca XP Max, Thermo Electron Corporation。

元素分析 (Elem. Anal.) 的测定: Vario EL III, Elementar German。

实验中所用的试剂除粗孔 ZCX-II 型柱层层析硅胶 (青岛海洋化工有限公司)、1,8-二氮杂二环 [5,4,0]十一碳烯-7(DBU, Aldrich 公司)、1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF, ACROS Organics)、CEL(Cremophor EL, Sigma)外,其余试剂和溶剂均购自中国医药集团上海化学试剂公司,所用试剂均为市售分析纯试剂,水溶液全部采用去离子水配制。3-{2-[N'-(2-磺酸基乙基)哌嗪-N-]乙氧基}邻苯二腈(S)和 4-{2-[N'-(2-磺酸基乙基)哌嗪-N-]乙氧基}邻苯二腈(T)为本课题组合成的中间体,实验中用作合成(SPEO)₄PcM 的前驱体。无水盐的制备方法和溶剂的预处理见文献^[11]。

1.2 (SPEO)₄PcM 的制备

称取 182 mg(0.5 mmol)前驱体 S,置于 100 mL 三口圆底烧瓶中,烧瓶一口接通气管,一口接球形冷凝管,加入 10 mL 预处理过的正戊醇,连续通入氮气,搅拌,加热至 90 °C 使前驱体溶解,冷却后加入无水醋酸锌 30 mg (>0.13 mmol),滴加 0.20 mL DBU,控温 150 ± 5 °C,加热回流 6~8 h。冷却后减压蒸馏除去溶剂正戊醇,得到墨绿色的固体物质,加入 50 mL DMF,充分搅拌,有机膜过滤,旋转蒸发浓缩至 20 mL 左右,以 DMF:CH₃OH=1:1(V/V)的混合溶剂作为流动相 1,采用柱层层析分离提纯。再次旋转蒸发除去流动相的大部分混合溶剂后,以乙酸乙酯为流动相 2 再次进行柱层层析分离提纯。旋转蒸发除去乙酸乙酯和 DMF 后,产物于 110 °C 下真空干燥 24 h,得 α -(SPEO)₄PcZn 53.5 mg。

8 种产物的合成方法相同,分离方法也相近,不同之处在于所用的前驱体、无水金属盐和分离提纯时的柱层层析流动相,见表 1。反应方程式如图 1 所示。

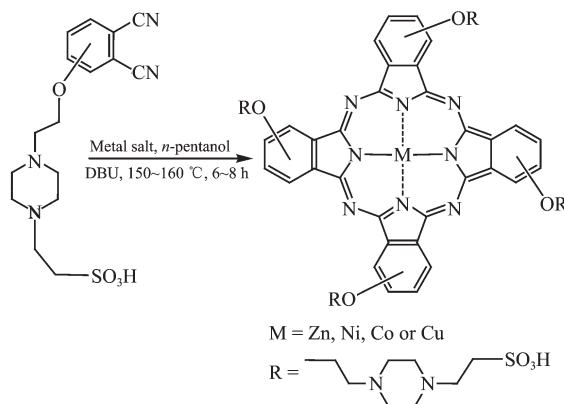


图 1 (SPEO)₄PcM 的合成反应方程式

Fig.1 Synthetic approach of (SPEO)₄PcM

表 1 (SPEO)₄PcM 的制备
Table 1 Preparation of (SPEO)₄PcM

Tag	Complex	Precursor	Metal salt	Eluant 1 (V/V)	Eluant 2 (V/V)	Yield / %
3a	α -(SPEO) ₄ PcZn	S	(CH ₃ COO) ₂ Zn	DMF:CH ₃ OH=1:1	Ethyl acetate	28.1
4a	β -(SPEO) ₄ PcZn	T	(CH ₃ COO) ₂ Zn	DMF:Acetone=1:1	THF:Benzen=1:10	27.2
3b	α -(SPEO) ₄ PcNi	S	NiCl ₂	DMF:CH ₃ OH=1:1	Ethanol:CH ₂ Cl ₂ =10:1	24.2
4b	β -(SPEO) ₄ PcNi	T	NiCl ₂	DMF:Acetone=1:1	Acetone:CH ₃ OH=5:1	23.5
3c	α -(SPEO) ₄ PcCo	S	CoCl ₂	DMF:C ₂ H ₅ OH=2:1	CH ₃ OH:CH ₂ Cl ₂ =1:5	27.6
4c	β -(SPEO) ₄ PcCo	T	CoCl ₂	DMF:THF=1:1	C ₆ H ₅ CH ₃ :THF=5:1	25.3
3d	α -(SPEO) ₄ PcCu	S	CuCl	DMF:CH ₃ OH=1:1	Acetone:CH ₃ OH=15:1	32.4
4d	β -(SPEO) ₄ PcCu	T	CuCl	DMF:THF=1:2	CH ₃ OH:CH ₂ Cl ₂ =1:1	34.5

1.3 UV-Vis 吸收光谱的测定

UV-Vis 吸收光谱采用 Lambda 800 UV-Vis Spectrometer 测定,记录波长范围 300~800 nm 或 300~900 nm,以 DMF 为溶剂,DMF 纯溶剂为基线,扫描速率 750 nm·min⁻¹,间隔 0.02 nm。摩尔消光系数的计算根据朗伯-比尔定律求得。实验中根据不同浓度下测得的吸光度 A 对其浓度 c 作图求得线性关系的斜率,即为摩尔消光系数(ε)。

1.4 荧光量子产率的测定

以无取代 ZnPc 的荧光量子产率($\Phi_F=0.32$)作为基准值^[12],DMF 为溶剂,试样浓度为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,测定前通高纯氮除氧 20 min,实验在室温(15~30 $^{\circ}\text{C}$)下进行,同时测得荧光发射光谱和激发波长下试样的吸光度,采用式(1)求出(SPEO)₄PcM 的荧光量子产率(Φ_F)。

$$\Phi_F=0.32 \frac{A_{\text{ZnPc}}}{S_{\text{ZnPc}}} \frac{S}{A} \quad (1)$$

式中: Φ_F :(SPEO)₄PcM 的荧光量子产率; A_{ZnPc} :基准样 ZnPc 在 610 nm 或 640 nm 处的吸光度; S_{ZnPc} :基准样 ZnPc 荧光发射光谱的积分面积; A :(SPEO)₄PcM 在 610 nm 或 640 nm 处的吸光度; S :(SPEO)₄PcM 荧光发射光谱的积分面积。

1.5 单线态氧生成速率的测定

(SPEO)₄PcM 光敏化产生单线态氧(¹O₂)能力的测定方法是:以 DMSO 为溶剂,配制含 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 试样、24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DPBF 溶液,在连续通入氧气的条件下,用波长 670 nm 的点状激光照射,采用二苯基苯并异呋喃(DPBF)为探针,测定紫外可见吸收光谱在 417 nm 处的吸光度变化,从而计算得到单线态氧生成速率^[13]。由于测定是在氧饱和的条件下进行,酞菁金属配合物光敏化产生的 ¹O₂ 迅速被 DPBF 捕获,而溶液中溶解 O₂ 的浓度可以认为是一个常

数,因此近似认为光敏化产生 ¹O₂ 反应遵循的是一级动力学模型。用 DPBF 消耗速率(即溶液在 417 nm 处吸光度的变化)表示 ¹O₂ 生成速率方程如式(2)。

$$\ln \frac{A_0}{A_t} = kt \quad (2)$$

式中: A_0 :起始浓度下 417 nm 处的吸光度; A_t :某一时点 417 nm 处的吸光度; t :激光辐照的时间; k :¹O₂ 生成速率。

1.6 光灭活癌细胞能力的测定

肝癌细胞 BEL7402 (引自中科院上海生命科学研究院细胞库),培养基 RPMI1640(Gibco 公司),细胞 2 d 传代 1 次,培养于 50 mL 细胞培养瓶中。(SPEO)₄PcM 均用含 5% CEL 的 DMSO 溶液配制成 1.0 mmol·L⁻¹ 的浓溶液。接着用培养基稀释浓溶液,使加药终浓度为 10、5、1、0.5、0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,溶剂对照组加入 10 μL 含 5% CEL 的 DMSO 溶液,空白对照组只加入 200 μL 培养基,实验中同步进行了暗毒性实验和无取代 ZnPc 阳性对照实验。

光灭活能力的测定方法采用 MTT 分析法^[14],药物对癌细胞抑制率的计算方法如式(3)。

$$\text{Inhibition\%} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: A :受测试样组吸光度平均值; A_0 :溶剂对照组吸光度平均值。

2 结果与讨论

2.1 (SPEO)₄PcM 的表征

实验中选择了 4 种不同中心金属离子作为合成酞菁配合物的模板,产物经 2 次柱层层析分离提纯后,傅里叶红外光谱、质谱和元素分析的表征结果见表 2 和表 3。从表征结果看,实验中合成的产物为目标产物。

表 2 (SPEO)₄PcM 的红外光谱数据
Table 2 FTIR spectra data of (SPEO)₄PcM

Complex	Pc-H	Pc skeleton	CH-H	Ar-O-C	C-N	M-N
3a	2 927	1 596	1 470	1 255, 1 017	1 095	740
4a	2 926	1 607	1 467	1 262, 1 046	1 092	747
3b	2 924	1 607	1 479	1 260, 1 014	1 092	740
4b	2 932	1 606	1 467	1 271, 1 036	1 105	746
3c	2 928	1 622	1 486	1 279, /	1 093	754
4c	2 927	1 591	1 478	1 245, 1 013	1 087	749
3d	2 933	1 603	1 473	1 267, 1 037	1 092	742
4d	2 935	1 605	1 473	1 251, /	1 094	748

表 3 (SPEO)₄PcM 的质谱和元素分析结果
Table 3 Mass spectra and element analysis of (SPEO)₄PcM

Complex	MS	N / %	C / %	H / %
		Found / Calcd.	Found / Calcd.	Found / Calcd.
3a	1524([M+H] ⁺)	13.95/14.71	48.62/50.47	5.58/5.29
4a	1524([M+H] ⁺)	13.45/14.71	48.98/50.47	5.65/5.29
3b	1518([M+2H] ⁺)	13.99/14.78	48.36/50.69	5.78/5.32
4b	1516([M] ⁺)	14.12/14.78	48.29/50.69	5.65/5.32
3c	1517([M] ⁺)	13.66/14.78	48.72/50.68	5.54/5.32
4c	1519([M+2H] ⁺)	13.74/14.78	48.87/50.68	5.42/5.32
3d	1522([M+H] ⁺)	13.56/14.73	49.12/50.53	5.45/5.30
4d	1521([M] ⁺)	13.49/14.73	48.95/50.53	5.47/5.30

2.2 (SPEO)₄PcM 摩尔消光系数的测定结果

(SPEO)₄PcM 在 DMF 溶剂中的 UV-Vis 吸收光谱测定结果如表 4。由于酞菁分子是一个大环共轭体系, 酞菁金属配合物在 UV-Vis 光谱出现 2 个属于酞菁环上 π 电子跃迁的特征吸收带 Q 带和 B 带, 根据电子跃迁的选择定则及各能级高低不同可以确定: Q 带是由酞菁 π 电子的 $a_{1u}(\pi) \rightarrow e_g(\pi^*)$ 跃迁形成的, 而 B 带是由 $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_g(\pi^*)$ 和 $b_{2u}(\pi) \rightarrow e_g(\pi^*)$ 跃迁

形成的。由于 Q 带处在可见光的范围内, 并且其最大吸收峰的摩尔消光系数达 $10^5 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$, 而 B 带则处在紫外光范围, 因此在酞菁金属配合物的实际应用中, 人们更多关注的是其 Q 带的性质。如 PDT 中, 理想光敏剂应在 600~800 nm 波长范围内有强吸收, 本实验合成的 (SPEO)₄PcM 最大吸收峰都落在这一范围, 有望开发成为 PDT 的光敏剂。

表 4 (SPEO)₄PcM 的 UV-Vis 吸收光谱数据
Table 4 UV-Vis absorption spectra data of (SPEO)₄PcM

Complex	3a	3b	3c	3d	4a	4b	4c	4d
Central ion of complexes	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺
Q-band absorption / nm	718	716	714	715	687	683	681	685
$\delta_Q [\times 10^5 \text{ L} \cdot (\text{cm} \cdot \text{mol})^{-1}]$	1.46	1.32	1.59	1.57	0.80	1.12	0.93	1.23
B-band absorption / nm	386	376	375	379	352	349	354	352

2.3 荧光量子产率的测定结果

由于 3a、3b、3c、3d 在 610 nm 处的吸收极弱, 荧光光谱的测定结果偏差较大, 因此实验中选择 640 nm 和 610 nm 分别作为 α -位和 β -位取代酞菁金属配合物的荧光发射光谱测定的激发波长, 实验

结果如表 5。实验所测得的荧光发射光谱与相应的紫外可见吸收光谱均呈镜像关系, 并都出现一定的 Stokes 位移, 说明 (SPEO)₄PcM 在光激发过程中, 没有出现明显的溶剂重组或配合物结构的变化。

表 5 (SPEO)₄PcM 的荧光性质
Table 5 Fluorescence properties of (SPEO)₄PcM

Complex	3a	3b	3c	3d	4a	4b	4c	4d
Maximum λ_{abs} / nm	718	716	714	715	687	683	681	685
Maximum λ_{flu} / nm	725	—	—	—	692	694	690	688
Stokes' shift / nm	9	—	—	—	5	11	9	3
Φ_{F}	0.08	≈ 0	≈ 0	≈ 0	0.18	0.04	0.01	0.01

2.4 单线态氧生成速率的测定结果

表 6 给出(SPEO)₄PcM 在激光辐照下产生单线态氧的生成速率常数。从表中数据可以看出:当中心金属离子为 Zn²⁺时,其光敏化产生 ¹O₂ 的能力较强,而中心金属离子为 Cu²⁺、Ni²⁺、Co²⁺时,光敏化产生 ¹O₂ 的能力较低。其原因是后者的中心金属离子具有开壳层结构,其单电子的中心金属离子受激发

后具有较强的旋轨偶合作用,使受激酞菁分子的系间窜跃(S₁ → T₁)几率减少,从而导致单线态氧量子产率的降低。此外,从表中还可以看出,中心金属离子为 Zn²⁺的 **3a** 的单线态氧生成速率常数明显高于 **4a**,而具有开壳层结构的中心金属 α 位取代酞菁配合物的单线态氧生成速率常数却略低于 β 位取代酞菁配合物,其作用机理还有待于进一步的研究。

表 6 (SPEO)₄PcM 光敏化产生单线态氧的生成速率
Table 6 Ratio of singlet oxygen yield of (SPEO)₄PcM by photosensitivity

Complex	3a	3b	3c	3d	4a	4b	4c	4d
Central ion	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺
k / min ⁻¹	2.8	0.40	0.26	0.39	1.0	0.45	0.37	0.42

2.5 (SPEO)₄PcM 对肝癌细胞的光灭活作用

(SPEO)₄PcM 及 ZnPc 对 BEL7402 肝癌细胞的光灭活作用测定结果见表 7。从实验结果看,**4a** 的光灭活性最好,当浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,用 670 nm 激光辐照,光剂量为 1.2 J,对癌细胞的抑制率可达 82%。从表中还可以看出,**3a** 和 **4a** 对 BEL7402 肝癌细胞的光敏灭活作用明显优于其他配合物。这

显然与前面实验所得出的具有较高的单线态氧生成速率常数的结果相一致,也与目前一般认为的酞菁类光敏剂在 PDT 中的作用机制为 II 型机制相吻合^[1,2]。从表中还可以看出,与 ZnPc 相比,**4a** 的光敏活性仍稍低,但从溶解度和聚集行为看,却比 ZnPc 优越,因而总体上看 **4a** 是有进一步开发的前景的。

表 7 (SPEO)₄PcM 对 BEL7402 肝癌细胞灭活结果
Table 7 Inhibition ratio of BEL 7402 liver cancer cell of (SPEO)₄PcM

Complex	Inhibition ratio / %				
	0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
ZnPc	11	27	53	80	88
3a	38	49	53	62	69
4a	35	45	49	68	82
3b	3	7	14	4	7
4b	17	14	12	4	7
3c	2	2	6	4	29
4c	24	26	40	36	47
3d	31	18	41	21	19
4d	6	5	12	46	60

参考文献:

- [1] Marcus S L. *Proceedings of the IEEE*, **1992**,**80**(6):869~889
[2] YU Kai-Chao(俞开潮), CHENG Hong(程红), JIN Ling(金

- 玲). *Photographic Sci. and Photochem. (Guangxue Yu Guanghuaxue)*, **2003**,**21**(2):138~146
[3] Ben-Hur E, Rosenthal I. *Photochem. Photobiol.*, **1985**,**42**(2): 129~133

- [4] McKeown N B. *Phthalocyanine Materials Synthesis, Structure and Function*. London: Cambridge University Press, **1998**.1~11
- [5] Li Y S, Kenney E M. *The United State Patent*, 5763602, **1998**.
- [6] Stranadko E F, Skobelkin O K, Litvin G T, et al. *Proceedings of the SPIE*, **1996**,(2625):440~448
- [7] Dirk D V, Huwyler J, Eberle A, et al. *Canada Int. J. Cancer*, **2002**,(101):78~85
- [8] HUANG Jin-Ling(黄金陵), CHEN Nai-Sheng(陈耐生), LIU Er-Sheng(刘尔生), et al. *CN Patent No.ZL96117137.5, Opening No.CN1053906C*, **1996**.
- [9] LIU Er-Sheng(刘尔生), HUANG Jian-Dong(黄剑东), DAI Zhi-Fei(戴志飞), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **1997**,**13**(4):411~415
- [10] WEI Jian-Hua(魏建华), LUO Xiao-Xing(罗晓星). *Foreign Medical Sciences: Section of Pathophysiology and Clinical Medicine(Guowai Yixue Shengli, Bingli Kexue Yu Linchuang Fence)*, **1997**,**17**(3):271~273
- [11] Aroveg W L F, Perrin D R, Translated by SHI Yu(时雨). *The Purifying Method of Chemicals for Laboratory(实验室化学试剂的提纯方法)*. Beijing: Chemical Industry Press, **1997**.78,171
- [12] Zhang X F, Xu H J. *J. Chem. Soc. Faraday Transition*, **1993**, **89**(18):3347~3351
- [13] Abimbola O, David M, Tebello N. *J. Molecular Structure*, **2003**,(650):131~140
- [14] Mossman T. *J. Immunol. Method*, **1983**,(65):55~64