

Study on Application and Synthesis of Polypeptide Drug Carrier Nano-Hydroxyapatite

Minsi Tan^{1*}, Zhijie Yang^{1,2}, Ning Yao¹, Yi Liu^{1,2,3#}

¹School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

²School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

³The First Affiliated Hospital, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong

Email: #liuyi915@126.com, 1031132970@qq.com

Received: Feb. 1st, 2019; accepted: Feb. 15th, 2019; published: Feb. 22nd, 2019

Abstract

In this work, nano-hydroxyapatite (nHAP) particles, with uniform particle size and approximate spherical shape, were prepared by hydrothermal method using magnesium ion as nucleation inducer. nHAP was characterized by FTIR, SEM and TEM etc. The effects of insulin loading, such as loading time, loading temperature, pH of the solution for loading, and so on, were discussed. Insulin loaded nano-hydroxyapatite (INS-nHAP) was prepared. At the same time, release properties of INS-nHAP were evaluated. The results showed that the effective content of INS-nHAP was 3.98%wt, and the encapsulation efficiency was 92.66%wt when the concentration of insulin was used in 1 mg/mL, with pH = 3, 30°C of the adsorption system temperature and 3 hours of the adsorption time. The cumulative release rate of INS-nHAP was 72.71%wt during the first six hours, which was about 55.58 units of INS, and was closed to the rate of insulin secretion under normal physiological conditions. The gel based on alginate polysaccharide and INS-HAP has obvious promotion effect on diabetic wound healing.

Keywords

Nucleation Inducer, Hydrothermal Method, Hydroxyapatite, Drug Carrier, Wound Healing

多肽类药物载体纳米羟基磷灰石的合成及应用研究

谭敏斯^{1*}, 杨志杰^{1,2}, 姚宁¹, 刘意^{1,2,3#}

*第一作者。

#通讯作者。

¹广东药科大学药学院, 广东 广州
²广东药科大学医药化工学院, 广东 广州
³广东药科大学附属第一医院, 广东 广州
Email: #liuyi915@126.com, 1031132970@qq.com

收稿日期: 2019年2月1日; 录用日期: 2019年2月15日; 发布日期: 2019年2月22日

摘要

以镁离子为成核诱导剂, 采用水热法制备出颗粒均匀的近似球形的纳米羟基磷灰石(nHAP), 并利用 FTIR、SEM、TEM等手段对其进行表征。将nHAP作为多肽类药物载体, 重点探讨了时间、温度、pH等条件对nHAP负载胰岛素的影响, 制备负载胰岛素的纳米羟基磷灰石(INS-nHAP), 并评价其释药性能。结果显示: 当胰岛素浓度为1 mg/mL, 吸附3 h, 吸附体系温度为30℃, 且pH = 3时, INS-nHAP中有效含量3.98%wt, 包封率高达92.66%wt; 前6 h内对应体外药物释放呈零级释放特征, 累积释放率达到72.71%wt, 约为55.58个单位的INS, 接近人正常生理条件下的胰岛素分泌速率; 以INS-HAP基础制备的海藻多糖凝胶贴具有明显的糖尿病创口愈合促进作用。

关键词

成核诱导剂, 水热法, 羟基磷灰石, 药物载体, 创口愈合

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

羟基磷灰石($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAP)是人和动物骨骼、牙齿的主要无机成分, 具有无毒、无刺激、无免疫原性、不致过敏反应、不致突变、不致溶血、不破坏生物组织的特性。纳米 HAP 已被广泛研究报道其是一种良好的药物缓释载体[1] [2] [3] [4] [5]: 杨辉等[2]以合成的多孔球形碳酸钙为模板, 最终制得粒度均匀、分散良好、比表面积为 $16.07 \text{ m}^2/\text{g}$ 的多孔微米级球状 HAP, 对于庆大霉素具有良好的负载性能和缓释作用; 史振等[3]采用化学共沉淀法制备平均尺寸为 183 nm 的纳米羟基磷灰石, 并以阿霉素为模板药研究其载药性能, 包封率最大可达到 11.75%wt; 石景涛[4]采用沉淀法合成出多孔 HAP 微球, 选择胰岛素作为负载对象, 通过控制吸附温度、吸附时间、胰岛素浓度、pH 值等条件最终获得了理想的载药率 (3.2%wt)和包封率(92%wt)。

糖尿病人伤口愈合缓慢是糖尿病的一种常见并发症[5]-[11]。伤口处于持续的炎症状态, 其中促炎性的巨噬细胞、细胞因子和蛋白酶不断积累, 从而使其发生溃疡、感染甚至截肢。然而, 目前临床上针对糖尿病人伤口愈合缓慢这一问题, 解决方法仍仅停留在换药、控制血糖和控制感染等方面, 且没有发现其它行之有效的方法[6] [7] [8]。胰岛素是临床治疗糖尿病的一线药物, 其在伤口的愈合中发挥诸多作用[5] [6] [7]: 激活调节 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 两大创伤愈合通路; 修复伤口处胰岛素信号转导缺陷; 提高有关蛋白质的表达; 加速新生细胞的再上皮化和肉芽组织的再生进而提高愈合质量等。胰岛素还可以通过调节氧化反应改善伤口状态, 抑制活性氧物质的产生和其对伤口中蛋白质、脂类以及 DNA 的氧化损

伤, 并促进中性粒细胞在伤口中的早期募集。考虑到糖尿病创口特殊的生理环境, 在局部强化使用胰岛素可能是一种行之有效的办法[11]。

本研究选用镁离子为成核诱导剂, 采用水热法制备出颗粒均匀的球形纳米羟基磷灰石。选择胰岛素为模板药, 探究影响 HAP 负载胰岛素(INS)主要因素, 以及 INS-HAP 的释药性能, 并考查对应凝胶制剂促创口愈合的效果, 为糖尿病创口难愈合问题提供一种新的解决思路。

2. 实验部分

2.1. 仪器和药品

2.1.1. 主要仪器

透射电子显微镜(TEM), H-7650, 日本日立公司; 傅里叶变换红外光谱仪(FTIR), Affinity, 日本岛津公司; 紫外可见光光度计(UV), RF-5301, 天美(中国)科学仪器有限公司; pH 计, PB-10, 赛多利斯科学仪器有限公司; 高速离心机, JW-2017H, 安徽嘉文仪器装备有限公司; 集热式恒温加热磁力搅拌器, DF-101S, 巩义予华仪器有限公司; 箱式电阻炉, S-101, 沈阳市节能电炉厂等。

2.1.2. 主要药品

主要实验药品有: 磷酸氢二铵、磷酸氢二钠、氯化镁、硝酸钙, 分析纯, 天津市大茂化学试剂厂; 明胶、盐酸, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 磷酸二氢钾, 分析纯, 阿拉丁; 牛胰岛素, 生化制剂(≥ 27 u/mg), 酷尔化学试剂。

2.2. 样品制备

2.2.1. 球形纳米羟基磷灰石(nHAP)的合成

溶液配制: 称取 1.321 g 的 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶于 100 mL 去离子水中, 配置成 0.1 mol/L 的磷酸氢二胺溶液, 标记为 A 液; 同样称取 12 g 明胶溶于 100 mL 去离子水中, 60°C 下磁力搅拌溶解配成 12%明胶溶液, 标记为 B 液; 称取 3.542 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 2.691 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 150 mL 去离子水中, 配置成 C 液。

近似球形的 nHAP 的制备: 量取 10 mL A 液置于 50 mL 聚四氟乙烯内衬中, 在玻璃棒的搅拌下各添加 11.5 mL B 液, 待 A 液与 B 液混合均匀后, 搅拌下各加入 16.7 mL C 液。混合均匀后, 用 2 mol/L 的硝酸水溶液调节体系的 $\text{pH} = 5.1$ 。将内衬置于反应釜, 在马弗炉中以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 的温度上升至 180°C , 保持温度恒定, 反应 10 h 后自然降温。

nHAP 后处理: 将制得的产物在 4000 r/min 下离心分离, 去除上清液, 将下层产物置于烧杯中, 磁力搅拌均匀, 加水量 150 mL, 离心去除上清液。重复上述操作 6 次, 将洗涤后样品取出, 在低于 60°C 烘箱中干燥得到土黄色粉末; 再将粉末置于管式炉中在 N_2 保护下 560°C 煅烧 3 h ($1^\circ\text{C}/\text{min}$ 上升), 最终得到近似球形的 nHAP。

2.2.2. 载药 nHAP(INS-nHAP)的制备

实验组: 取煅烧后的 nHAP 充分研磨; 分别称取不同量的 nHAP, 加入 10 mL 的不同离心管中(对应编号为 A_x); 后各加入 x mL $\text{pH} = 3$ 的盐酸溶液, 调节体系的 pH 值, 经超声分散 10 min; 后再向离心管中加入 3 mL 0.86 mg/mL 的胰岛素(INS)溶液, 将这 3 支离心管分别放置在不同温度的水浴锅中保温若干小时, 同时保持磁力搅拌, 即实现 INS 吸附; 随后在转速为 6000 r/min 下离心 15 min, 取其上清液并测定 274 nm 处吸光度, 所得下层固体沉淀负载胰岛素的纳米羟基磷灰石(INS-nHAP), 其对应编号为 B_x 。当 nHAP 用量为 70 mg 时, 本研究系统还探讨了吸附时间、溶剂种类、体系 pH 值与温度等因素对于 INS-nHAP 的载药量及包封率的影响。背景组的制备是, nHAP 添加量为 0 mg, 其他步骤跟实验组相同。

2.2.3. INS-nHAP 释药特性评价

实验组: 步骤 2.2.2 所得 B_x 在 30℃ 的鼓风干燥箱中干燥后, 分别取适量置于离心管中, 并加入 14 mL pH = 6.8 的胰岛素 PBS 磷酸盐缓冲溶液; 后将离心管分别放置在 30℃ 水浴锅中保温, 同时保持磁力搅拌; 间隔 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h 后, 以转速为 6000 r/min 离心 15 min, 取上清液 2 mL, 测定 274 nm 处吸光度。背景组制备方法同实验组。

2.3. 样品测试与表征

采用傅里叶变换红外光谱 (FTIR)、扫描电子显微镜 (SEM)、透射电子显微镜 (TEM) 等方法, 确定样品的外观形貌、颗粒尺寸等信息 (FTIR 测试范围 450~4000 cm⁻¹; SEM 样品先采用冷冻干燥, 经喷金处理后在 200 kV 条件下观察; TEM 样品负载于超薄碳网格上, 在 200 kV 条件下观察)。采用紫外-可见分光光谱 (UV) 等方法, 分析 HAP 载药、释药性能 (UV 测试范围 190~500 nm, 入射波长为 274 nm)。

2.4. 分析方法的建立

标准曲线的建立

称取 25 mg 胰岛素于 25 mL 的容量瓶中, 用 0.01 mol/mL 的盐酸溶液进行定容, 配制成 1 mg/mL 的胰岛素溶液。分别取上述浓度的胰岛素溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.5、4.0 mL 于 5 mL 的容量瓶中定容, 得到浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.7、0.8、1.0 mg/mL 的胰岛素溶液。在波长为 274 nm 处测定上述浓度的胰岛素溶液的吸光度。以胰岛素浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线见图 1, 该曲线方程: $y = 0.93032x + 0.03184$, $R^2 = 0.99942$ 。

INS 作为蛋白质在 274 nm 左右有紫外吸收, 这是采用紫外分光光度法进行胰岛素含量检测的定量依据。通过检测离心后上清液的胰岛素浓度, 计算出未被吸附的胰岛素的质量, 再用总的胰岛素的质量减去上清液中胰岛素的质量即得胰岛素被吸附量 [12] [13] [14] [15], 再通过下列公式计算有效含量和包封率。

$$\text{包封率} = (\text{药物的总量} - \text{游离药物的量}) / \text{药物的总量} * 100\%$$

$$\text{有效含量} = (\text{药物的总量} - \text{游离药物的量}) / \text{nHAP 总质量} * 100\%$$

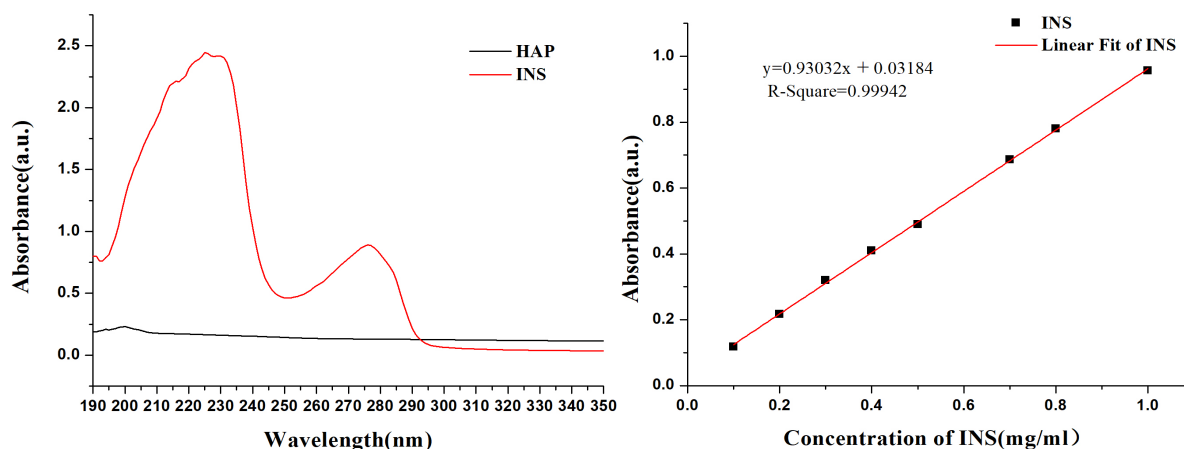


Figure 1. Ultraviolet absorption spectrum and standard curve of insulin

图 1. INS 和 nHAP 的紫外吸收光谱及标准曲线

2.5. INS-nHAP 凝胶贴促创口愈合实验

大鼠模型的建立 [16]: 将 SPF 级 SD 大鼠 40 只在标准实验室适应 3 天, 于造模前 12 h 禁食、自由饮水。

测空腹血糖和标准体重,造模时以新鲜配制的 2%wt 链脲佐菌素(STZ)柠檬酸钠水溶液(0.10 mol/L), pH = 4.5 混悬液腹腔注射,第 7 天测空腹血糖大于 11.0 mmol/L 者,属成功复制模型。将成模大鼠按血糖随机分为两组,分别为模型组,药物组。大鼠用 2%wt 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,背部剃毛 $4 \times 4 \text{ cm}^2$,局部碘酒常规消毒,酒精脱碘,用直径为 1.5 cm 的圆孔在鼠背上画圆圈,用手术剪沿圆圈的边缘剪下皮肤,深及筋膜层,止血后以消毒纱布包扎,自由饮水和喂食。3 d 后溃疡创面有肉芽开始生长,溃疡模型制备成功。

创口愈合实验: INS-nHAP 基海藻多糖凝胶(自制),实验前将此凝胶泡在溶解有/无特定浓度的胰岛素 PBS 缓冲溶液中,待其泡 7 h 后作为上述创口的敷料(备用)。各组大鼠溃疡创面覆盖相应的敷料,无菌包扎,每天换药 1 次。连续敷药 7d。观察并记录创口愈合情况。

3. 实验结果与分析

3.1. 羟基磷灰石(HAP)的表征

3.1.1. 样品结构分析

图 2(a)为 560°C 煅烧后 nHAP 样品的 FTIR 谱图。其中 560 cm^{-1} 、 602 cm^{-1} 对应 PO_4^{3-} 的弯曲振动峰(ν_4); $1200 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 处是 PO_4^{3-} 的特征吸收峰,对应 PO_4^{3-} 的非对称伸缩振动峰(ν_3); 963 cm^{-1} 处的吸收峰对应 PO_4^{3-} 的对称伸缩振动(ν_1)吸收峰; 3570 cm^{-1} 和 632 cm^{-1} 处的吸收峰分别对应羟基(-OH)的伸缩振动峰(ν_p)和摆动振动峰(ν_δ)。这些特征峰的存在证实 HAP 具有较强的极性,适当用作较强极性药物(如蛋白、多肽类等)的载体[17][18][19]。

3.1.2. 样品形貌分析

由图 2 中的扫描电镜可知:经典水热法通常制备纳米级棒状的纳米羟基磷灰石(nHAP)如图 2(b);当合成体系中添加镁离子作为成核诱导剂,有助于水热法合成近似球形的纳米羟基磷灰石如图 2(c);且当镁离子浓度增加,可导致制备样品其颗粒更加均匀如图 2(d),该样品的透射电镜可佐证这,其平均粒径小于 50 nm 如图 2(e)。

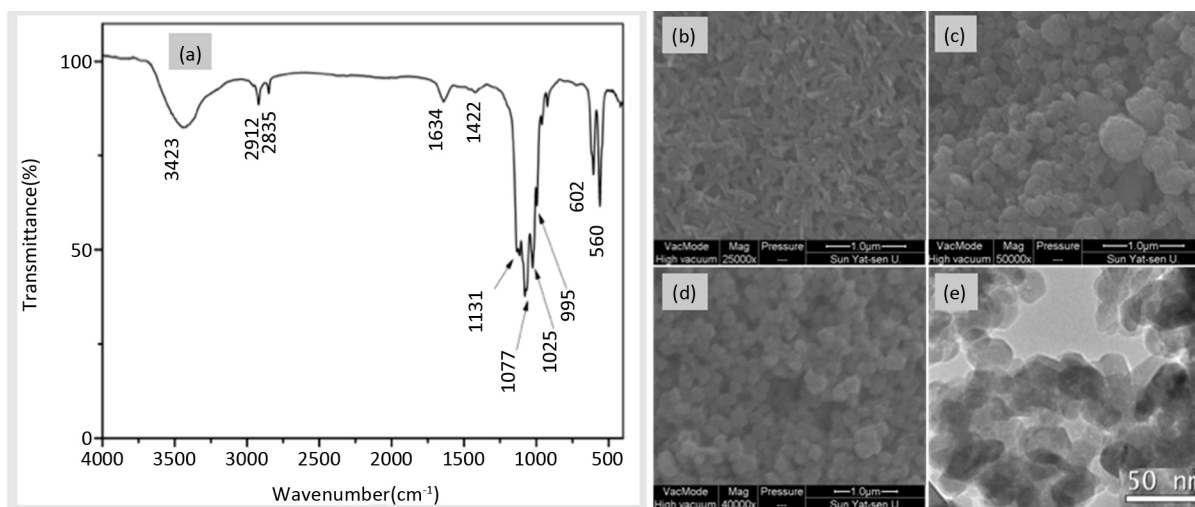


Figure 2. FTIR spectrum(a) and SEM(b,c,d), TEM(e) images of nHAP
图 2. nHAP 的 FTIR 谱(a)、SEM(b,c,d)和 TEM(e)照片

3.2. nHAP 载药主要影响因素

3.2.1. nHAP 用量对载药的影响

结合图 3(a)、包封率及总载药量实验可知:当 nHAP 用量为 70 mg 时有效含量和包封率达到较理想

的搭配, 即包封率约 76.92%wt, 有效含量约 3.30%wt; 当 nHAP 用量为 50 mg 时, 虽有效含量相对高, 但包封率过低, 会造成 INS 投料浪费; 当 nHAP 用量为 100 mg 时, 包封率高达 92.20%wt, 但载药量偏低, 会导致临床使用剂量增加。对比石景涛[4]的结果, INS 利用率相对更高。

3.2.2. 吸附时间对载药的影响

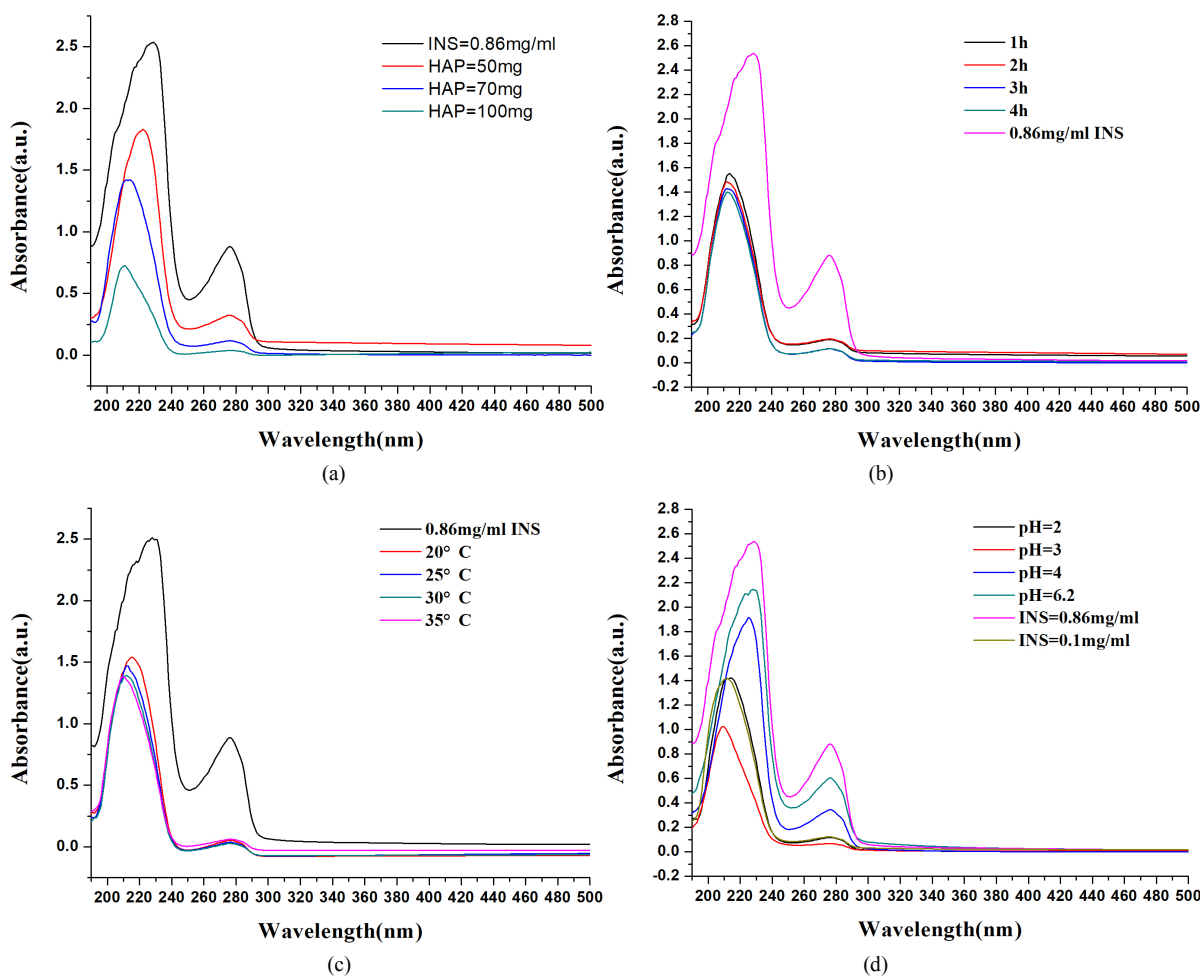
由图 3(b)可知: 随着反应时间的增加包封率和有效含量也增加, 且在 3 h 和 4 h 时有效含量、包封率基本一致, 故可认为反应时间到达 3 h 时 nHAP 对 INS 的吸附已达到饱和状态。

3.2.3. 吸附温度对载药的影响

由图 3(c)可知: 从 20℃到 30℃的范围内有效含量和包封率随温度上升而增大, 但影响不是特别明显。当温度达到 35℃时有效含量和包封率均出现下降, 这可能是由于温度达到 35℃对胰岛素有一定的破坏作用, 使吸附量下降。因此, 实验时选择 30℃作为最佳吸附温度。

3.2.4. 吸附体系 pH 对载药的影响

图 3(d)显示: 加载 INS 时, 体系的 pH 对 INS 包封率及有效 INS 含量有显著影响。随着 pH 的升高有效含量和包封率下降; pH = 6.2 时有效含量和包封率最低, pH = 3 时有效含量和包封率最高。根据 HAP 的吸附机理可能解释是: 晶体表面上吸附胰岛素分子的点是由于 OH 的瞬间空缺而产生的, 而随着 pH 值的升高, 氢离子浓度升高, OH 位置空缺的数目随之减少, 因此吸附点的数目减少, 导致胰岛素的吸附量



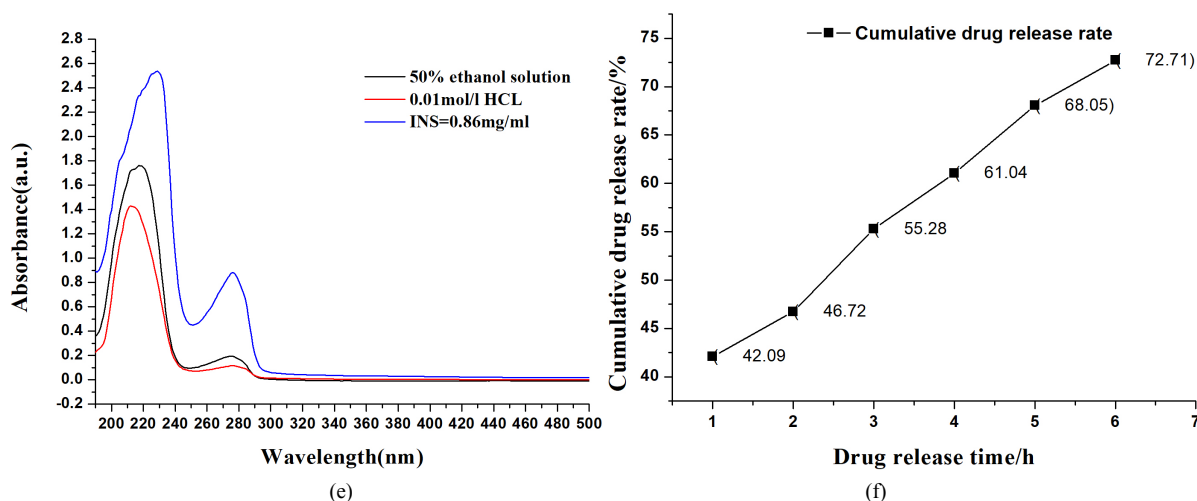


Figure 3. Analysis of influencing factors of INS loading and drug release performance of INS-nHAP

图 3. INS 加载影响因素分析、INS-nHAP 释药性能

减少[5] [6] [7]。pH = 2 时的有效含量和包封率比 pH = 3 时小，原因是 pH = 2 时酸对羟基磷灰石的破坏较 pH = 3 时大。

3.2.5. 胰岛素溶剂对载药的影响

由 3(e)可知：相同实验条件下 0.01 mol/l 盐酸作为胰岛素溶剂时胰岛素的吸附量比 50%wt 乙醇作为胰岛素溶剂的胰岛素吸附量大。低浓度的乙醇溶液可以作为胰岛素的溶剂，但是由于乙醇对蛋白类物质有一定程度的破坏作用[15]，故不选择稀乙醇溶液作为胰岛素的溶剂。

3.3. INS-nHAP 的释药性能评价

采用最优实验条件加载 INS，所得 INS-nHAP 有效含量为 3.97%wt，包封率为 92.66%wt，其对应的释药性能如图 3(f)所示，1 小时内 INS-nHAP 能够释放出 42.10%wt 的胰岛素，约为 32 单位的 INS。1 小时后，药物每小时释放率逐渐减小，以每小时约 7%的速率释放，每小时释放约 5.4 单位 INS。6 小时累积释放率达到 72.71%wt，约为 55.58 个单位的 INS。在基础状态下，人每小时约分泌 0.5~1.0 个单位胰岛素，每餐后胰岛素分泌升高 5~10 倍，人体每日的 INS 分泌量约为 50 单位[17]。应用于糖尿病人，在用药初期能够释放出足量的胰岛素，使血糖降低，在后期以缓慢的速率释放胰岛素，起到维持血糖平稳的作用，可见 INS-nHAP 具有较好的胰岛素缓释效果，使药物释放更接近正常人体生理。

3.4. INS-nHAP 基凝胶促创口愈合效果评价

实验分别记录了贴敷凝胶 0 天、7 天所对应的创口状态，如图 4 所示：相对于模型对照组而言，无负载 INS 的空白组的创口面积也一定程度的减小，表明本研究所用的空白凝胶贴具有一定的创口促愈合能力；载药组 C 伤口愈合效果进一步提高，说明海藻多糖凝胶基质与 INS-nHAP 对创口愈合具有协同作用，具体作用机制有待下一步深入探讨。

4. 结论

1、以镁离子为成核诱导剂，利于合成近似球形的纳米羟基磷灰石。

2、当 nHAP 煅烧温度为 560℃，用量为 70 mg，胰岛素浓度为 0.86 mg/mL，吸附时间为 3 小时，吸附温度为 30℃，反应体系 pH = 3 时，nHAP 对胰岛素具有最优的有效含量(3.98%wt)和包封率(92.66%wt)。



Figure 4. Promoting effect of gel wound healing experiment for 7 days (A model control group, B blank group, C drug loading group)

图 4. 凝胶贴 7 天内促创口愈合作用(A 模型对照组, B 空白组, C 载药组)

3、体外药物释放实验表明, INS-nHAP 在 1 小时内释放出 32 单位的 INS; 此后, 每小时释放约 5.4 单位 INS; 6 小时累积释放率达到 72.71%wt, 约为 55.58 个单位的 INS, 该释放特征接近人正常生理条件下的胰岛素分泌速率。

4、基于 INS-nHAP 的海藻多糖凝胶, 7 天内表现出明显的创口愈合促进作用。

基金项目

广东省科技计划项目(2016A010103039); 广州市越秀区科技计划项目(2017-WS-016)。

参考文献

- [1] 邓迟, 翁杰, 周绍兵, 等. 羟基磷灰石表面吸附性能的研究综述[J]. 材料导报, 2007, 21(9): 84-87.
- [2] 杨辉, 黄菲菲. 多孔球形羟基磷灰石的制备及其药物控释性能的研究[J]. 功能材料, 2012, 43(4): 533-536.
- [3] 史振, 夏丹丹. 纳米羟基磷灰石的制备及对阿霉素载药性能的考察[J]. 沈阳药科大学学报, 2017(1): 1-6.
- [4] 石海涛. 胰岛素 - 多孔羟基磷灰石微球口服给药系统的研究[D]: [博士学位论文]. 四川: 四川大学药学院, 2005.
- [5] Karnoosh-Yamchi, J., Rahmati-Yamchi, M., Akbarzadeh, A., Davaran, S., Ostad Rahimi, A.R., Garnoosh, K., and Mobasseri, M. (2017) pH Sensitive Insulin-Loaded Nanohydrogel Increases the Effect of Oral Insulin in Diabetic Rats. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **45**, 1222-1226. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1216859>
- [6] 钮萌萌. 胆盐脂质体促进胰岛素口服吸收的研究[D]: [博士学位论文]. 上海: 上海复旦大学药学院, 2011.
- [7] Salazar, J.J., Ennis, W.J. and Koh, T.J. (2016) Diabetes Medications: Impact on Inflammation and Wound Healing. *Diabetes Complications*, **30**, 746-752. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.12.017>
- [8] Greenhalgh, D.G. (2003) Wound Healing and Diabetes Mellitus. *Clinics in Plastic Surgery*, **30**, 37-45. [https://doi.org/10.1016/S0094-1298\(02\)00066-4](https://doi.org/10.1016/S0094-1298(02)00066-4)
- [9] 李林, 李迪. 海参胶原低聚肽对糖尿病小鼠术后伤口愈合的促进作用[J]. 中国食物与营养, 2017, 23(7): 71-75.
- [10] 赵敏超, 赵敏越. 局部应用胰岛素促进糖尿病创面愈合的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 20(24): 4078-4085.
- [11] Paul, W., Nesamony, J. and Sharma, C.P. (2002) Delivery of Insulin from Hydroxyapatite Ceramic Microspheres: Preliminary *In Vivo* Studies. *Journal of Biomedical Materials Research*, **61**, 660-662. <https://doi.org/10.1002/jbm.10213>
- [12] 胡晓燕, 马向华. 2 型糖尿病患者血镁与胰岛素抵抗的相关性[J]. 江苏医药, 2013, 39(21): 2567-2569.
- [13] 王德平, 黄文岳. 纳米羟基磷灰石球状晶体的合成及其吸附特性的研究[J]. 功能材料, 2003, 34(4): 476-478.
- [14] 张立强, 陶安进. 肠溶包衣胰岛素 - 壳聚糖复合物纳米粒的制备及体内外性质[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(2): 65-69.
- [15] 吴美珍, 齐薛红. 紫外分光光度法测定胰岛素注射液的含量[J]. 药物分析杂志, 2003(6): 471-472.
- [16] 何雄文, 牛美兰. 活性生肌汤联合外周血干细胞移植干预大鼠糖尿病足溃疡模型的研究[J]. 中医研究, 2018, 31(5): 63-66.
- [17] 何晓梅, 古莉娜. 介孔羟基磷灰石纳米粒子的制备及作为蛋白类缓释药物载体的应用[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2015, 39(2): 89-96.
- [18] Morris, J.W.S., Mercola, D.A. and Arquilla, E.R. (1968) An Analysis of the Near Ultraviolet Circular Dichroism of Insulin. *Biochim Biophys Acta*, **160**, 145-150. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(68\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0005-2795(68)90080-9)
- [19] 李华, 夏霞. 细胞骨架与胰岛素分泌[J]. 生物学教学, 2012, 37(6): 67-68.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2161-086X，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：nat@hanspub.org