

文章编号: 1004-4353(2016)03-0207-05

*m*PEG-Cys-AFC 偶联体的合成、胶束化行为及酶促控释研究

纪西苹, 刘晓艳, 孟祥夫, 金慧娟*

(延边大学理学院 化学系, 吉林 延吉 133002)

摘要: 选择 L-半胱氨酸为中心分子, 设计合成了两亲性载体 *m*PEG-Cys-AFC 偶联体, 其中 4-三氟甲基-6-氨基香豆素(AFC)为模型药物. 通过¹H NMR、¹³C NMR 和 MALDI-TOF-MASS 对化合物结构进行了表征. 采用水溶法制备了胶束, 利用芘荧光探针法确定了临界胶束浓度(CMC)为 92.8 mg/L, 测得胶束的平均粒径为 141.1 nm, Zeta 电位为-6.11 mV. 经测定表明, 在 PGA 酶作用下载体化合物能迅速控释模型药物分子.

关键词: 药物载体; 两亲性; 胶束; 酶促控释

中图分类号: O621.2

文献标识码: A

Synthesis, micellezation and enzymatic controlled drug release of *m*PEG-Cys-AFC conjugate

JI Xiping, LIU Xiaoyan, MENG Xiangfu, JIN Huijuan*

(Department of Chemistry, College of Science, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: In this paper, L-cysteine was selected as center molecule, amphiphilic carrier conjugate *m*PEG-Cys-AFC, and AFC (4-trifluoromethyl-6-amino-coumarin) was designed and synthesized as a model drug. The structure of conjugate was characterized via ¹H NMR, ¹³C NMR and MALDI-TOF-MASS. Micelles were prepared by the solution method, and using Pyrene fluorescence probe method the critical micelle concentration (CMC) was determined as 92.8 mg/L. The particle size of the micelles and Zeta potential were 141.1 nm and -6.11 mV, respectively. The results showed it rapidly controlled and released of a model drug molecule under the influence of PGA enzyme.

Keywords: drug carrier; amphipathic; micelle; enzymatic controlled release

0 引言

药物载体体系(DDS)因具有毒性低、药效高、治疗时间较短、生物相容性好、循环时间长、对难溶性药物具有较高的溶解性以及病变的组织和细胞具有靶向性等优点^[1], 成为现代医学研究的热点之一. 研究表明, 纳米胶束作为药物载体在难溶性药物分子和基因治疗给药系统中有着广泛的应用前景^[2-6].

因肿瘤等病变组织血管壁之间的缝隙较大、组织结构不完整、淋巴系统不能顺畅回流等因素, 导致肿瘤细胞迅速增长, 进而增加了细胞的渗透性^[7], 这使得一定粒径范围内的载药体系可进入组织细胞, 释放药物分子^[8]. 同时, 因缺乏淋巴系统的回流, 大量的共聚物载体可长时间聚集在病变组织周围, 即形成高通透性和滞留效应(EPR)^[9]. 在两亲性嵌段聚合物中, 亲水部分与疏水部分的比例会影响药物载体的载药性能以及自组装形成

纳米微粒的大小与形态^[10],在亲水链长度不变的情况下,疏水部分的分子质量越大,临界胶束浓度(CMC)就越低^[11]. 聚合物胶束由于拥有比小分子活性剂临界胶束浓度低和稳定性好的特点,被作为药物载体而研究^[6,12-14]. 研究^[15-16]表明,聚乙二醇一端或者两端含有羟基,可以利用羟基的官能团反应合成两嵌段或者三嵌段的结构,经过改性的聚乙二醇端基可以提高药物与载体的结合能力或制备功能化的胶束. Moghimi 等^[17]将难溶性抗癌药物紫杉醇与 PEG 进行了键合,动物实验表明,该载体的半衰期为 45 h,而且大量聚集在癌细胞周围,并能够持久地保持药效浓度,从而提高治疗效果^[18]. 鉴于上述研究,本文制备了一种两亲性聚合物药物载体,该药物载体以 L-半胱氨酸作为中心核,通过酰胺、酚酯、氨基酯等稳定的化学键分别连接亲水链聚乙二醇(PEG)、对酶敏感的苯乙酰基和荧光分子香豆素(AFC),使其不仅具有两亲性,在水溶液中发生自组装形成胶束,还能达到智能靶向控释药物分子的目的.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

实验仪器有: AV-300 型核磁共振仪(瑞士布鲁克), MALDI-TOF-MASS 基质辅助质谱仪(日本岛津), RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津), Delsa Nano A53878 纳米粒度及电位分析仪(美国贝克曼库尔特), ZD-8 型数显气浴恒温振荡器(金坛市金南仪器制造有限公司). PGA 酶购自浙江顺风海德尔公司,三乙基硅烷(TES)购自阿尔法埃莎,三光气(triphosgene)购自上海共价有限公司,三乙胺(TEA)和对二甲氨基吡啶(DMAP)购自国药集团化学试剂有限公司,三氟

乙酸(TFA)等其他试剂均购自天津市科密欧化学试剂有限公司.

1.2 实验过程

目标化全物 *m*PEG-Gys-AFC 的合成路线如图 1 所示.

1.2.1 化合物 2 的制备 化合物 2 的制备参考文献[19]中的合成方法.

1.2.2 化合物 4 的制备 将 58 mg (0.25 mmol) 化合物 3 和 90 mg (0.30 mmol) 三光气投入到 25 mL 双口瓶中,在氮气保护下加入二氯甲烷(DCM),冰浴 0 °C 条件下滴加三乙胺(71 μ L);搅拌 2 h 后,将溶解在 DCM (1 mL) 中的化合物 2 用注射器加入到反应体系,冰浴条件下将反应混合物继续搅拌 1 h,然后室温搅拌过夜. 反应结束后,将溶剂减压蒸除,经柱层析($V_{EA} : V_{PE} = 1 : 1$)分离提纯,得到 91 mg 黄绿色固体化合物 4,收率为 40%. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 7.40 (m, 24H), 7.05 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 6.67 (s, 1H), 6.40 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.08 (s, 1H), 5.20 (s, 2H), 4.61 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.84 (d, 2H, $J = 5.1$ Hz), 3.59 (s, 2H), 2.88 (dd, 1H, $J = 6.2, 12.8$ Hz), 2.65 (dd, 1H, $J = 4.5, 12.6$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz, δ): 171.87, 171.31, 168.90, 168.86, 159.47, 155.38, 152.84, 150.33, 144.06, 143.06, 134.33, 133.60, 129.72, 129.45, 129.40, 129.00, 128.13, 127.42, 127.05, 125.93, 123.36, 121.54, 115.33, 113.28, 108.61, 106.18, 67.27, 66.68, 60.47, 51.66, 43.25, 42.97, 33.40. MALDI-TOF-MASS $\text{C}_{50}\text{H}_{40}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_8\text{S}[\text{M}+\text{Na}]^+ 922.50$ (计算值 922.25).

1.2.3 化合物 5 的制备 将 124 mg (0.14 mmol) 化合物 4 加入到 25 mL 圆底烧瓶中,然后沿瓶壁加入 10 mL DCM 与 TFA 的混合溶液 ($V_{\text{DCM}} :$

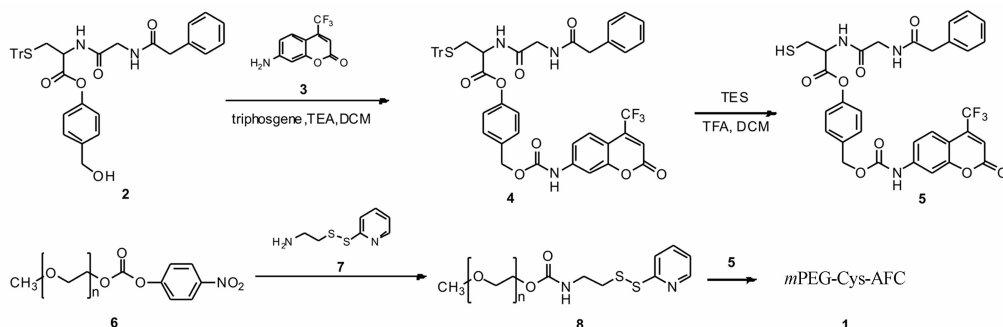


图 1 目标化合物的合成路线

$V_{\text{TFA}}=1:1$)及 $2\ \mu\text{L}$ TES,反应体系由淡黄色变为无色透明.反应结束后,将溶剂减压蒸除,经硅胶柱层析($V_{\text{EA}}:V_{\text{PE}}=2:1$)分离提纯,得到 $74\ \text{mg}$ 化合物 **5**,收率为 80% . $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , $300\ \text{MHz}$, δ): $8.61(\text{d}, J=7.0\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $8.37(\text{s}, 1\text{H})$, $7.66(\text{d}, J=8.1\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $7.50(\text{t}, J=8.2\ \text{Hz}, 2\text{H})$, $7.27(\text{d}, J=1.6\ \text{Hz}, 3\text{H})$, $7.16(\text{d}, J=6.8\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $6.88(\text{s}, 1\text{H})$, $5.21(\text{s}, 1\text{H})$, $4.70(\text{d}, J=6.4\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $3.82(\text{s}, 1\text{H})$, $3.49(\text{s}, 1\text{H})$, $2.97(\text{s}, 1\text{H})$, $2.75\sim 2.66(\text{m}, 1\text{H})$.

1.2.4 化合物 8 的制备 在 $50\ \text{mL}$ 圆底烧瓶中依次加入 $277\ \text{mg}$ ($0.30\ \text{mmol}$) 化合物 **6**, $135\ \text{mg}$ ($0.61\ \text{mmol}$) 化合物 **7**, $130\ \text{mg}$ ($1.06\ \text{mmol}$) DMAP, $10\ \text{mL}$ DCM, 室温搅拌过夜.反应结束后,将溶剂减压蒸除,经柱层析($V_{\text{DCM}}:V_{\text{EA}}=2:1$, $V_{\text{MC}}:V_{\text{EA}}:V_{\text{MeOH}}=8:4:1$)分离提纯,得到 $199\ \text{mg}$ 黄色黏稠状化合物 **8**,收率为 86% . $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , $300\ \text{MHz}$, δ): $8.51(\text{d}, J=4.4\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $7.60(\text{t}, J=5.8\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $7.52(\text{d}, J=8.0\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $7.28(\text{s}, 1\text{H})$, $7.11(\text{t}, J=6.0\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $4.26(\text{t}, J=4.5\ \text{Hz}, 2\text{H})$, $4.20(\text{t}, J=4.5\ \text{Hz}, 2\text{H})$, $3.86(\text{t}, J=4.5\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $3.70(\text{s}, 1\text{H})$, $3.68\sim 3.54(\text{m}, 58\text{H})$, $3.53(\text{d}, J=6.0\ \text{Hz}, 2\text{H})$, $3.36(\text{s}, 5\text{H})$, $2.92(\text{t}, J=6.1\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $2.38(\text{s}, 1\text{H})$.

1.2.5 *m*PEG-Cys-AFC 的制备 在 $25\ \text{mL}$ 圆底烧瓶中加入 $53\ \text{mg}$ ($0.079\ \text{mmol}$) 化合物 **5** 与 $72\ \text{mg}$ ($0.095\ \text{mmol}$) 化合物 **8**,在氮气保护下注入 $4\ \text{mL}$ 去氧甲醇,室温下反应过夜.反应结束后,减压蒸除溶剂,用少许甲醇将粗产品溶解后加入适量乙醚,过滤除去固体杂质,滤液减压蒸馏,用乙醚洗涤后经柱层析($V_{\text{DCM}}:V_{\text{MeOH}}=15:1$)分离提纯得到 $58\ \text{mg}$ *m*PEG-Cys-AFC,收率为 48% . $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , $300\ \text{MHz}$, δ): $7.69(\text{s}, 1\text{H})$, $7.60(\text{d}, J=7.3\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $7.49(\text{d}, J=7.3\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $7.40(\text{t}, J=6.4\ \text{Hz}, 2\text{H})$, $7.31\sim 7.26(\text{m}, 7\text{H})$, $7.10(\text{m}, 1\text{H})$, $5.77(\text{s}, 1\text{H})$, $5.19(\text{s}, 2\text{H})$, $5.13(\text{s}, 1\text{H})$, $4.26(\text{t}, J=4.5\ \text{Hz}, 1\text{H})$, $4.17(\text{s}, 1\text{H})$, $3.99(\text{d}, J=5.0\ \text{Hz}, 2\text{H})$, $3.78(\text{s}, 2\text{H})$, $3.76\sim 3.63(\text{m}, 58\text{H})$, $3.54(\text{d}, J=4.7\ \text{Hz}, 2\text{H})$, $3.36(\text{s}, 5\text{H})$, $3.25(\text{d}, J=5.0\ \text{Hz}, 2\text{H})$, $2.78(\text{dd}, J=6.8, 14.6\ \text{Hz}, 2\text{H})$. MALDI-TOF-MASSC₆₉H₁₀₃F₃N₄O₂₆S₂

$[M+\text{Na}]^+ 1561.8$. *m*PEG-Cys-AFC 的结构如图 2 所示.

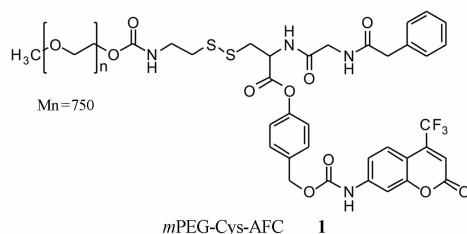


图2 目标化合物 *m*PEG-Cys-AFC 的结构

1.3 临界胶束浓度、载体粒径及 Zeta 电位的测试

选用芘荧光探针法对载体化合物进行 CMC 测定,使用动态激光光散射仪(DLS)对粒径及 Zeta 电位进行测试.

1.4 米氏常数(K_m)的测定

为判断该药物载体与 PGA 酶的亲和能力与匹配程度,用载体化合物作为底物,对 PGA 酶的 K_m 值进行测定.配制浓度分别为 4.33×10^{-6} 、 6.5×10^{-6} 、 1.08×10^{-5} 、 3.24×10^{-5} 、 5.40×10^{-5} 、 $7.56\times 10^{-5}\ \text{mol/L}$ 的载体化合物 PBS 缓冲溶液($\text{pH}=7.4$),然后各取 $3\ \text{mL}$ 加入 $113\ \mu\text{L}$ 的 PGA 酶,并测定加酶 $5\ \text{min}$ 时 AFC 的荧光强度($\lambda_{\text{em}}=494\ \text{nm}$ 处).

1.5 体外酶促控释

将载体化合物配制成 $7.36\times 10^{-6}\ \text{mol/L}$ 的 PBS 缓冲溶液($\text{pH}=7.4$),放置在恒温气浴振荡仪内,设置温度 $37\ ^\circ\text{C}$,然后将 10 倍和 30 倍酶用量(相对于目标化合物)分别加入到所配溶液中,每隔 $10\ \text{min}$ 进行一次荧光强度测试,同时对没有加入 PGA 酶的溶液进行对比测试.

2 结果与讨论

2.1 自组装形成胶束

利用 $^1\text{H NMR}$ 对载体化合物 *m*PEG-Cys-AFC 的结构进行了表征,结果发现在不同的氘代溶剂中,其谱图有明显的变化(见图 3).在 CDCl_3 中能够观测到所有的氢吸收峰,其原因是目标化合物以单分子形式存在;而在 D_2O 溶液中只能观测到亲水链 PEG 中的氢吸收峰,其原因是载体化合物在水中自组装形成了疏水内核和亲水外壳的纳米胶束.

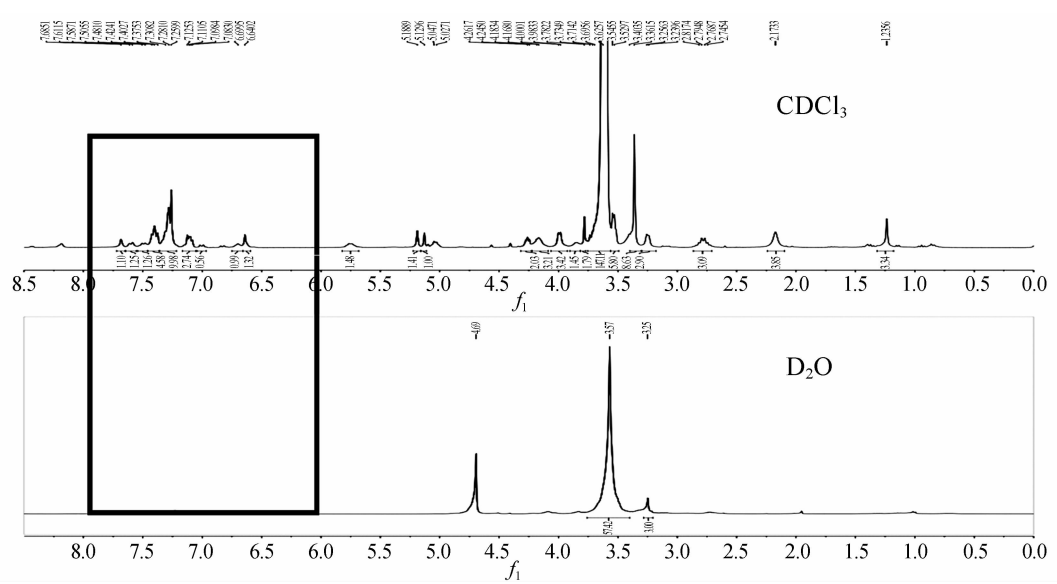


图 3 *m*PEG-Cys-AFC 在 CDCl_3 和 D_2O 中的 ^1H NMR 图

2.2 临界胶束浓度、载体粒径及 Zeta 电位的测定

芘在水溶液中的激发波长为 334 nm, 吸收峰分别在 373, 379, 384, 394 nm 及 480 nm 处. 其中 384 nm 与 373 nm 处的荧光强度之比 (I_3/I_1) 随芘所在溶液环境极性的不同有很明显的变化, 根据其变化规律可以计算出 CMC 值. 如图 4 所示, 当载体化合物浓度较低时 (CMC 以下), 其以单分子形式存在, 对芘的溶解度基本没有影响, 所以 I_3/I_1 基本保持稳定; 随着浓度的增加, I_3/I_1 值迅速上升, 说明胶束开始形成, 因芘被包裹在胶束内部, 因此其荧光强度受到影响. 利用切线法计算得该载体化合物的 CMC 为 92.8 mg/L. 通过电位分析仪测得该载体化合物 (浓度为 1 g/L 水溶液) 的 Zeta 电位为 $-6.11\text{ mV}^{[20]}$. 通过 DLS 测得载体化合物浓度在 1 g/L 时的粒径为 141.1 nm, 多分散指数为 0.175 (图 5).

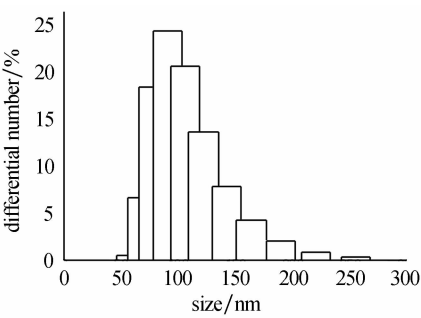


图 5 载体化合物的粒径分布

2.3 米氏常数的测定

通过双倒数法对米氏常数进行测定. 图 6 中所得直线与横轴截距的倒数即为 K_m 值, 为 $3.66 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$, 文献[21]中测得相同厂家的 PGA 酶对青霉素的 K_m 值为 $2.92 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$, 这表明 PGA 酶对该载体化合物的亲和能力较好.

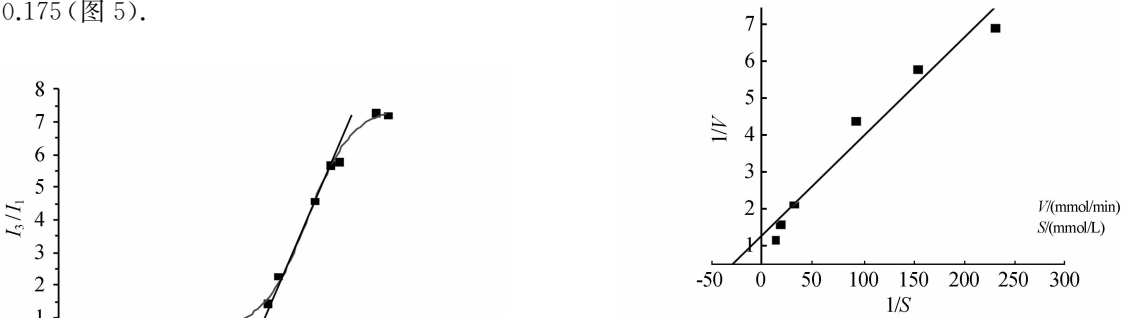


图 6 双倒数法计算 K_m 值

2.4 体外酶促控释

释药机理图如图 7 所示.

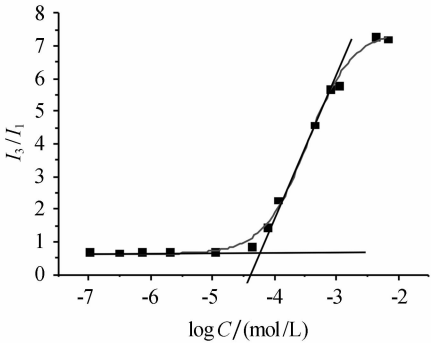


图 4 临界胶束浓度测定

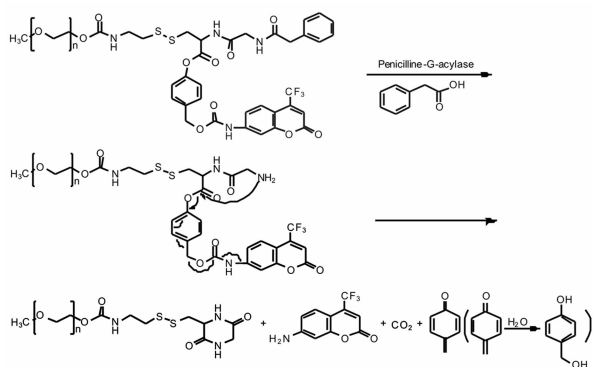


图 7 目标化合物药物释放机理示意图

经荧光测定,当激发波长为 350 nm 时,载体化合物与 AFC 在 PBS 缓冲溶液(pH=7.4)中的发射波长分别为 444 nm 和 494 nm(图 8a).加入 PGA 酶后,AFC 的荧光强度逐渐增加,而载体化合物的荧光强度逐渐降低(图 8c、d).这表明,该载体化合物在此条件下,通过酶促作用能够释放出模型药物分子.在没有酶存在的溶液中,载体化合物的荧光强度基本没有发生变化,说明该药物载体化合物在 PBS 缓冲溶液中基本处于稳定状态(图 8b).

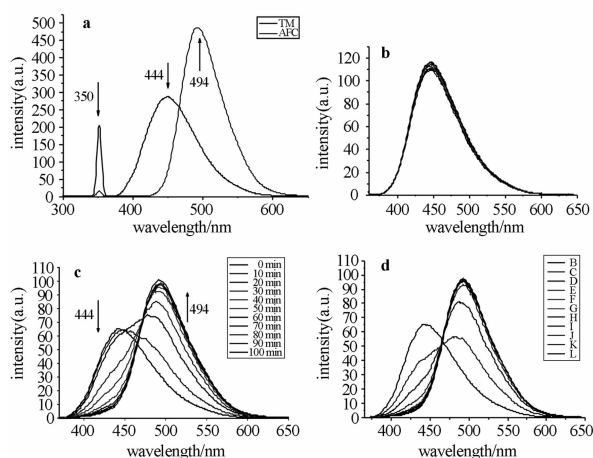


图 8 目标化合物(444 nm)与香豆素(494 nm)的荧光发射比(a)以及荧光发射强度随时间的变化曲线(b为未加酶;c为加酶 10 倍;d为加酶 30 倍)

将荧光强度对时间作图,结果如图 9a 所示.图 9a 显示,荧光分子在加酶初期释放速度比较快,而且酶的用量直接影响释药速率,但最终的药物释放率基本相近,均达到 48%.配制不同浓度 AFC 的 PBS 缓冲溶液,通过测定其荧光强度,绘制 AFC 荧光强度随浓度变化的标准曲线(图 9b).由标准曲线知,在 5 h 时,释放率达到 48%.

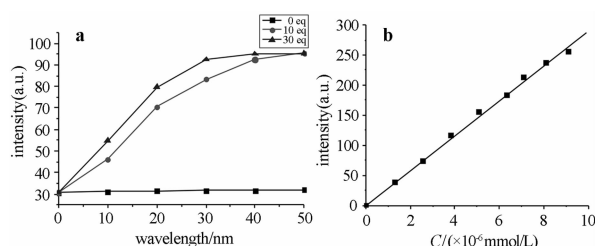


图 9 释药过程中 494 nm 处 AFC 荧光强度随时间变化示意图(a)以及 AFC 荧光强度随浓度变化的标准曲线(b)

3 结论

本文合成的载体化合物具有较低的临界胶束浓度,在水溶液中可以自组装形成具有合理尺寸的纳米胶束,并且可以通过酶促控释药物分子,但是否具有长循环特性需进一步证实.

参考文献:

- [1] Uhrich K E, Cannizzaro S M, Langer R S, et al. Polymeric systems for controlled drug release[J]. Chem Rev, 1999,99(11):3181-3198.
- [2] Danhier F, Feron O, Preatt V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery[J]. J Control Release, 2010,148(2):135-146.
- [3] Chasin M, Langer R, Dekker M. Biodegradable polymers as drug deliver system[J]. Drug and the Pharmaceutical Sciences, 1990,3:119-132.
- [4] Rieux A D, Fievez V, Garinot M, et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach[J]. J Control Release, 2006,116(1):1-27.
- [5] Mainardes R M, Fonseca L M D, Khalil N M. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells[J]. J Pharm Sci, 2009,98(1):257-267.
- [6] Park T G, Jeong J H, Kim S W. Current status of polymeric gene delivery system[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006,58(4):467-486.
- [7] Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting[J]. Adv Enzyme Regul, 2001,41(1):189-207.
- [8] Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review[J]. J Control Release, 2000, 65(1/2):271-284.

弯刚度逐渐减小;折叠角在 $10^{\circ} \sim 40^{\circ}$ 范围内变化时,波纹钢腹板的抗弯刚度变化最为明显. 2) 随着波纹钢腹板水平面板宽度 b 的增加,箱梁的抗弯刚度逐渐增大;但当水平面板宽度 b 取值太大时,箱梁的整体受力性能会受到影响,因此设计时应根据波纹钢腹板的整体受力性能来选择最优的板宽. 3) 增加波纹板的厚度能显著提高箱梁的抗剪性能,并在一定程度上能够提高箱梁的抗弯刚度,但板厚增加到 20 mm 时,其对提高箱梁的抗剪性能和抗弯性能的贡献会逐渐趋小. 4) 支座截面处的腹板剪应力随着倾斜角的增大逐渐减小,且倾斜角小于 25° 时腹板剪应力减小得最为明显,而跨中截面处的弯曲应力只是略有增加,因此波纹钢腹板的倾斜角宜小于 25° .

参考文献:

- [1] 陈宝春,黄卿维. 波形钢腹板 PC 箱梁桥应用综述[J]. 公路,2005,7(7):45-53.
 - [2] 李淑琴,万水,张长青. 波形钢腹板设计与制造[M]. 北京:人民交通出版社,2011.
 - [3] 闫鹏. 波形钢腹板 PC 组合弯箱梁桥力学性能研究[D]. 西安:长安大学,2011.
 - [4] Yang Xialin, Lin Minniu, Zhang Rongling. Study on web parameters of prestressed concrete composite box girder with corrugated steel web[J]. Advanced Materials Research, 2011; 255-260, 1087-1091.
 - [5] 牛黎明. 波形钢腹板 PC 组合箱梁桥腹板几何参数研究[D]. 兰州:兰州交通大学,2010.
 - [6] 许莉,房贞政,陈凌秀. 几何参数对预应力波纹钢腹板连续箱梁屈曲荷载的影响研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),2010,44(4):590-594.
-
- (上接第 211 页)
- [9] Tanaka T, Shiramoto S, Miyashita M, et al. Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME) [J]. Int J Pharm, 2004,277(1/2):39-61.
 - [10] Zhang L F, Eisenberg A. Multiple morphologies of crew-cut aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) block-copolymers [J]. Science, 1995, 268 (5218):1728-1731.
 - [11] Yu K, Eisenberg A. Bilayer morphologies of self-assembled crew-cut aggregates of amphiphilic PS-b-PEO diblock copolymers in solution[J]. Macromolecules, 1998,31(11):3509-3518.
 - [12] Eisenberg A, Liu F. Preparation and pH triggered inversion of vesicles from poly(acrylic Acid)-block-polystyrene-block-poly(4-vinyl Pyridine) [J]. J Am Chem Soc, 2003,125(49):15059-15064.
 - [13] Croy S R, Kwon G S. Polymeric micelles for drug delivery[J]. Current Pharmaceutical Design, 2006, 12(36):4669-4684.
 - [14] Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001,47(1):113-131.
 - [15] Achilleos M, Legge T M, Perrier S. Poly(ethylene glycol)-based amphiphilic model conetworks; synthesis by RAFT polymerization and characterization[J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2008,46:7556-7565.
 - [16] Zhu W P, Xie W H, Tong X W, et al. Amphiphilic biodegradable poly (CL-b-PEG-b-CL) triblock copolymers prared by novel rare earth complex: synthesis and crystallization properties [J]. Eur Polym J, 2007,43(8):3522-3530.
 - [17] Moghimi S M, Hunter A C, Murray J C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice[J]. Pharmacol Rev, 2001,53(2):283-318.
 - [18] Danhier F, Lecouturier N, Vroman B, et al. Paclitaxel-loaded PE-Gylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation[J]. J Control Release, 2009,133(1):11-17.
 - [19] JIN H J, LU J, WU X. Development of a new enzyme-responsive selfimmolative spacer conjugate applicable to the controlled drug release [J]. Bioorg Med Chem, 2012,20(11):3465-3469.
 - [20] Brouwer P H. The relationship between Zeta potential and ionic demand and how it affects wet-end retention [J]. Tappi Journal, 1991,48(1):170-179.
 - [21] 戴明华,王恩多,谢雍,等. 青霉素酰化酶活性中心的定点突变[J]. 生物化学与生物物理学报,1999, 31(5):558-562.