

鲑鱼降钙素柔性脂质体大鼠鼻腔给药的降血钙效应

陈 铭¹, 邓 秋², 李馨儒¹, 刘 艳^{1*}

(1. 北京大学 药学院, 北京 100083; 2. 北京市同仁医院 耳鼻喉科研究所, 北京 100005)

摘要: 本文采用薄膜分散-超声挤压过膜法制备鲑鱼降钙素柔性脂质体, 对其形态学及粒径进行了考察。以大鼠为实验动物, 鼻腔给药, 采用 OCPC 比色法测定大鼠血清钙离子浓度, 计算降血钙百分率 $F\%$ 和降血钙效应 $D\%$, 与鲑鱼降钙素普通脂质体、鲑鱼降钙素水溶液比较, 以此评价鲑鱼降钙素柔性脂质体经大鼠鼻腔给药后的降血钙效应和附加剂对降钙素柔性脂质体的降血钙效应的影响。另外还对柔性脂质体的纤毛毒性进行考察。结果表明鲑鱼降钙素水溶液仅轻微降低血钙浓度, 鲑鱼降钙素普通脂质体能提高降血钙效果, 鲑鱼降钙素柔性脂质体呈现了最强的降血钙效果, 其降血钙效果与脂质体中附加的表面活性剂的用量和种类相关, 用去氧胆酸钠修饰的脂质体的降血钙效果最好, 并且附加的表面活性剂用量越高, 降血钙效果越强。柔性脂质体可以显著地降低去氧胆酸钠的纤毛毒性。结果显示, 柔性纳米脂质体能显著提高降钙素经鼻腔给药的降血钙效果, 柔性脂质体是蛋白多肽类药物鼻腔给药的一种有效的载体。

关键词: 柔性脂质体; 鲑鱼降钙素; 鼻腔给药; 降血钙作用

中图分类号: R943.4 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)06 - 0681 - 06

The hypocalcemia effect of salmon calcitonin ultra-flexible liposomes after intranasal administration in rats

CHEN Ming¹, DENG Qiu², LI Xin-ru¹, LIU Yan^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China;

2. The Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery of Beijing TongRen Hospital, Beijing 100005, China)

Abstract: This article describes the preparation of salmon calcitonin ultra-flexible liposomes and their hypocalcemia effect after intranasal administration in rats. Both the conventional liposomes and ultra-flexible liposomes were prepared by rotary evaporation-sonication and extrusion. The morphology of ultra-flexible liposomes was observed with transmission electronic microscope. The size and size distribution and their zeta potential were determined by dynamic light scattering. The mean size of ultra-flexible liposomes with DC-Chol was no more than 120 nm, while the mean size of the conventional liposomes was 256.5 nm. The results showed the content of sodium deoxycholate have significant effect on the mean particle size of liposomes. The ultra-flexible liposomes were intranasally administered at the dose of $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; the concentration of serum calcium was determined by OCPC method. The results showed that the salmon calcitonin solution only slightly lowered serum calcium levels and the conventional liposomes could improve the effect of decreased serum calcium level ($D\%$), and the ultra-flexible liposomes had the best effect on the decreased serum calcium level, and the hypocalcemia effect was correlated with the content of sodium deoxycholate which was present in the liposomes. Moreover the ciliotoxicity of ultra-flexible nanoliposomes on nasal mucocilia was investigated with the electron microscope scanning. The results showed that the ultra-flexible liposomes markedly reduced the ciliotoxicity of sodium deoxycholate on nasal mucous. Thereby the ultra-flexible liposomes significantly enhanced the hypocalcemia effect of serum calcium after

收稿日期: 2006-12-01.

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 82801508, E-mail: yanliu@bjmu.edu.cn

intranasal administration in rats. The ultra-flexible liposomes could be an effective carrier for intranasal delivery of the peptide and protein drugs.

Key words: ultra-flexible liposome; salmon calcitonin; intranasal administration; decreased serum calcium level effect

内源性多肽降钙素 (calcitonin, CT)是由 32 个氨基酸组成的活性肽,在维持血中钙离子平衡和抑制破骨细胞的活性而有效地降低血钙和促进骨骼对钙的吸收中起着关键作用,在临床上被广泛用于治疗和预防骨质疏松和骨折、变形性关节炎、高血钙等多种疾病^[1,2]。鲑鱼降钙素 (salmon calcitonin, sCT)的比活性最高,约是人降钙素的 30 倍;作用时间长,稳定性好,其半衰期是人降钙素的 3~6 倍,并且副作用小,因而 sCT 在临床上被广泛应用。目前临床上使用的降钙素制剂为注射剂和喷雾剂。考虑到治疗的长期性,鼻腔给药比频繁的注射给药更为方便和易于被患者所接受。然而,鲑鱼降钙素水溶液鼻腔给药后生物利用度很低,如上市的密钙息喷雾剂的生物利用度仅为 3%^[3],其临床应用受到一定的限制。Gregor 等^[4]研究表明,由磷脂和适当的表面活性剂制备得到的脂质体,即柔性脂质体,除具有普通脂质体的性能外,附加了充分的变形性,能携带大分子药物透过黏膜,从而达到全身给药的目的。本文制备了 sCT 柔性脂质体,通过考察 sCT 水溶液和几种不同处方 sCT 脂质体经大鼠鼻腔给药后的降血钙效应,为蛋白多肽类药物选择合适的鼻腔给药系统提供了依据。

材料和方法

材料与仪器 注射用大豆磷脂 (PC,上海东尚实业有限公司);胆固醇 (Chol,北京化学试剂有限公司);去氧胆酸钠 (SDC,北京欣经科生物技术有限公司);DC 胆固醇 (3 β -[N-[2-(N,N-dimethylamino)ethyl]carbamoyl]cholesterol, DC-Chol,自制);鲑鱼降钙素 (sCT,上海延长生化公司);邻甲酚酞融合酮 (OCPC,沈阳市试剂三厂);8-羟基喹啉 (8-HQ,北京西中化工厂);二乙胺 (国药集团化学试剂有限公司);其他试剂均为分析纯。

紫外可见分光光度计 (惠普上海分析仪器厂 6010);超声仪 (上海超声波仪器厂 CQ50);高速离心机 (上海安亭科学仪器厂 TCL-16G 型);扫描电镜 (JSM-5600LV)。

实验动物 SD 雄性大鼠,体重 180~210 g,由北京大学医学部实验动物部提供。

脂质体的制备

普通脂质体的制备 精密称取 PC 100 mg, Chol 40 mg 置于茄形瓶中,加入乙醚-甲醇 (3:1, v/v) 混合溶剂 4 mL,室温旋转蒸发去除有机溶剂,在茄形瓶壁形成均匀类脂薄膜,加入 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 鲑鱼降钙素 PBS 溶液 2 mL,旋转洗膜,再涡旋振荡使膜分散得脂质体混悬液。冰水浴条件下超声 5 min,经 0.8, 0.45 及 0.2 μm 微孔滤膜过滤即得分散均匀的普通脂质体混悬液。

柔性脂质体的制备 在制备普通脂质体的处方中加入不同量的 SDC (SDC 与 PC 的质量比为 8:100 和 32:100,摩尔比约为 1:7 和 4:7),按制备普通脂质体的步骤得均匀分散的鲑鱼降钙素柔性脂质体 1, 2。

含 DC 胆固醇的鲑鱼降钙素柔性脂质体的制备 在膜材中分别加入不同量的 Chol, DC-Chol 和 SDC,按柔性脂质体的制备步骤分别制备 PC: Chol: DC-Chol: SDC = 100:35:5:32, 100:30:10:32 和 100:20:20:32 (w/w) 含 DC 胆固醇的鲑鱼降钙素柔性脂质体 1, 2 和 3。

形态学、粒径分布和 zeta 电位测定 采用磷钨酸负染色法染色后透射电镜观察各脂质体的形态,采用动态光散射法测定脂质体的粒径分布和 zeta 电位。

大鼠降血钙实验 取大鼠随机分组,每组 5 只。实验前 18 h 禁食,可自由饮水。实验前腹腔内注射乌拉坦溶液麻醉动物 (1.5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), sCT 的给药剂量为 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。给药途径:①皮下注射给药:大鼠腹部皮下注射;②以滴入方式鼻腔给药:给药时使大鼠仰卧,鼻孔朝上,用微量进样器伸入大鼠鼻腔约 5 mm 处滴鼻方式给药。给药前从大鼠眼眶取血约 0.5 mL 作为对照,给药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 及 8.0 h 从大鼠眼眶取血 0.5 mL, 8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15~20 min,取血清按大鼠血清钙离子浓度测定方法测定血钙浓度。空白对照组给予相同体积的生理盐水。

试液配制

钙储备液 精密称取碳酸钙 250 mg,置于 100 mL 量瓶中,加入去离子水 50 mL 浓盐酸 0.5 mL,待

完全溶解后加去离子水定容得 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 钙离子溶液。

OCPC试液^[5] 分别精密称取 OCPC 32.5 mg, 8-HQ 1.1 g, 置于 500 mL 量瓶中。先加入去离子水 250 mL, 再加入浓盐酸 7.5 mL, 搅拌使之溶解, 再用去离子水定容。

二乙胺试液^[5] 量取二乙胺 21 mL, 加去离子水定容至 500 mL。

钙显色液^[5] 量取 OCPC 试液、二乙胺试液、甲醇按 15:15:10 比例配成钙显色液, 超声混合 5 min。临用前配制, 室温避光放置 1 h 后使用。

大鼠血清中钙离子浓度的测定

据文献^[5, 6]报道, 钙显色剂需临用前配制, 未加稳定剂的显色剂随放置天数增加其吸收度值增加^[6], 故不再观察日间精密度。

标准曲线的建立 精密吸取钙储备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 及 6.0 mL 置于 25 mL 量瓶中, 用去离子水定容得 40, 80, 120, 160, 200 及 240 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度的钙标准液, 分别用微量移液器吸取 40 μL 样品, 加入钙显色剂 5 mL 混合, 立即在 570 nm 波长处测定吸收度。以钙离子浓度 (C) 对吸收度 (A) 进行线性回归, 考察线性关系及线性范围。在大鼠血清 40 μL 中分别加入质量浓度为 40, 80 及 120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的钙标准溶液 40 μL , 按标准曲线制备方法测量, 于 1 d 内重复测定 5 次, 计算回收率和日内差异。

血清中钙离子浓度的测定 用微量移液器吸取血清 40 μL , 加入钙显色剂 5 mL 混合, 立即在 570 nm 波长处测定其吸收度。经标准曲线换算得血清钙离子浓度。

干扰试验 血中主要干扰离子为镁离子。本法通过加入 8-HQ 来掩蔽镁离子。于 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 钙标准液 40 μL 中加入 12 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 镁离子溶液 40 μL , 加入钙显色剂混合后测定, 比较其吸收值的变化。

数据处理 以给药前大鼠血清钙离子浓度作为 100%, 各时间点降血钙百分率按下述公式计算: 降血钙百分率 $F\% = C_T / C_0 \times 100\%$ (C_T 和 C_0 分别表示 T 时间点的大鼠血清钙离子浓度和给药前大鼠血清钙离子浓度)。以降血钙百分率 F% 对时间作曲线得降血钙百分率时间曲线。曲线下面积 AUC_{1-8h} 以梯形法计算。降血钙效应 D% 由下述公式^[7]: $D\% = \frac{AUC_0 - AUC_i}{AUC_0} \times 100\%$ (AUC_0 和 AUC_i 分别表示空白对照组曲线下面积和各给药组曲线下

面积) 计算。

相对生物利用度按 $D_{na}\% / D_{sc}\% \times 100\%$ 计算, 其中 $D_{na}\%$ 与 $D_{sc}\%$ 分别为同一剂量下鼻腔给药和皮下注射给药后的降血钙效应。

两组间的比较采用 F 检验和 t 检验, $P < 0.05$ 被认为有显著性差异。

柔性脂质体纤毛毒性的评价^[8] 取大鼠 9 只, 随机分成 3 组, 每组 3 只, A 组给予 25 $\mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生理盐水, 作为阴性对照; B 组给予等体积的浓度为 1.6% (w/w) 的 SDC 水溶液, 作为阳性对照。C 组给予等体积的含 DC 胆固醇的柔性脂质体 3。用微量进样器伸入大鼠鼻腔约 5 mm 处滴鼻方式给药, qd \times 7。d 8 处死大鼠, 取鼻中隔黏膜, 洗净血块及黏液。2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定, 梯度浓度乙醇脱水, 醋酸正戊酯置换, CO_2 临界点干燥, 离子溅射仪喷金, 制备电镜标本进行扫描电镜观察。

结果

1 不同处方脂质体的形态学、粒径分布和 zeta 电位

所制备的脂质体为半透明、具有蓝色乳光的混悬液。经表面活性剂修饰后的柔性脂质体在透射电镜下观察, 多数粒子圆整, 为球形或近球形, 可见清晰的指纹环状螺旋结构 (图 1), 图中可见其中个别脂质体在挤压下产生较大的形变, 这与普通脂质体明显不同。不同处方的脂质体的粒径分布和 zeta 电位列于表 1。

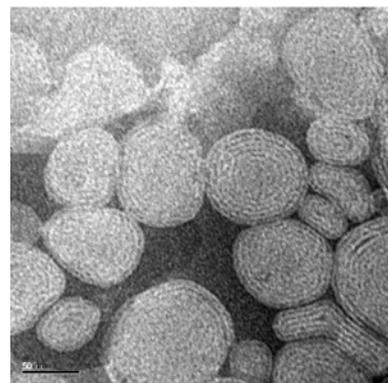


Figure 1 The transmission electronic microphotograph of ultra-flexible liposome (the bar represents 50 nm)

2 血钙测定的标准曲线及影响因素

以钙离子浓度 (C) 为横坐标, 以吸收度 (A) 为纵坐标进行线性回归得回归方程为 $A = 0.0303C +$

0.018 3 ($R^2 = 0.999 2$), 说明钙离子质量浓度在 40 ~ 240 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸收度具有良好的线性关系。由于钙显色液需要在临用前现配, 每次配制过程中的误差反映在测定同一浓度的钙离子时吸收度值的差异。为了减少由此带来的误差, 每次新配钙显色液后均重新建立标准曲线, 血清钙离子浓度由新的标准曲线方程求算。

Table 1 The particle size distribution and zeta potential of liposomes

Liposome	Mean particle size /nm	PDI	Zeta potential/mV
CL	256.5	0.270	- 38.8
UL-1	157.6	0.228	- 32.1
UL-2	114.0	0.258	- 33.6
UL with DC-Chol-1	98.5	0.312	+13.5
UL with DC-Chol-2	75.8	0.268	+28.4
UL with DC-Chol-3	73.1	0.234	+31.4

CL: Conventional nano-liposome; UL: Ultra-flexible nano-liposome

经方法学考察, 高、中、低 3 个浓度的平均回收率 (%) 分别为 97.4 ± 0.9 , 97.3 ± 1.2 , 97.8 ± 1.0 ; 日内 RSD (%) 分别为 2.0, 2.2, 1.4, 均符合要求。

镁离子加入前后钙离子的吸收度值分别为 0.283 ± 0.002 和 0.284 ± 0.001 ($n = 3$)。说明镁离子的加入对钙离子的测定无影响。

3 大鼠的降血钙效应

图 2 为皮下注射生理盐水和 sCT 水溶液及鼻腔给药生理盐水、sCT 水溶液、sCT 的普通脂质体和各种处方的柔性脂质体的降血钙百分数与时间的关系图。由图可见, sCT 柔性脂质体 2 和含 DC 胆固醇的柔性脂质体 1, 2, 3 鼻腔给药后均能快速降低血钙水平, 一般在 2 ~ 3 h 达峰底, 而后缓慢回升, 能长时间维持低血钙水平。图 3 为各种情况的相对生物利用度。结果表明, 大鼠皮下注射 sCT 的水溶液, 降血钙作用显著, 给药 8 h 后降血钙效应为 $(31.1 \pm 2.5)\%$, 而 sCT 的水溶液鼻腔给药 8 h 后降血钙效应仅为 $(2.3 \pm 1.6)\%$, 只有少量药物能透过鼻黏膜进入体循环, 仅表现为轻微地降低血清钙离子浓度, 与皮下注射相比, 相对生物利用度仅为 $(7.3 \pm 6.1)\%$; sCT 普通脂质体鼻腔给药 8 h 后降血钙效应为 $(3.7 \pm 1.7)\%$, 相对生物利用度为 $(11.6 \pm 5.4)\%$, 是 sCT 水溶液组的 1.6 倍; 而柔性脂质体组鼻腔给药后降血钙效果明显高于 sCT 水溶液组 ($P < 0.05$), 其降血钙效果与脂质体中 SDC 含

量相关。sCT 柔性脂质体 1 (PC: SDC = 7: 1) 和 2 (PC: SDC = 7: 4) 鼻腔给药 8 h 后降血钙效应分别为 $(4.6 \pm 2.3)\%$ 和 $(19.1 \pm 4.1)\%$, 相对生物利用度分别为 $(14.5 \pm 7.3)\%$ 和 $(59.9 \pm 10.1)\%$ 。含 DC-胆固醇的柔性脂质体 1, 2, 3 的降血钙效应分别为 $(20.6 \pm 1.8)\%$, $(21.2 \pm 3.3)\%$ 和 $(22.3 \pm 2.4)\%$, 相对生物利用度分别为 $(64.8 \pm 5.9)\%$, $(66.7 \pm$

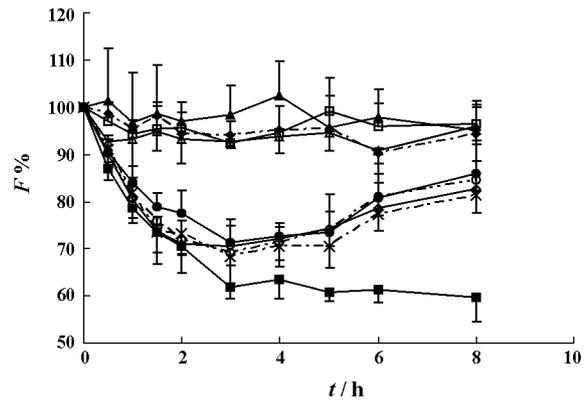


Figure 2 The relationship between decreased serum calcium percentage ($F\%$) of serum calcium and time after administration of sCT ($5.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) of various formulations in rats ($n = 5$). Controlled group without sCT (\blacktriangle , intranasal); sCT solution (\blacksquare , subcutaneous); sCT solution (\square , intranasal); Conventional nano-liposome (\blacklozenge , intranasal); Ultra-flexible nano-liposome-1 (PC: SDC = 7: 1, \triangle , intranasal); Ultra-flexible nano-liposome-2 (PC: SDC = 7: 4, \bullet , intranasal); Ultra-flexible nano-liposome with DC-Chol-1 (PC: DC-Chol = 20: 1, \circ , intranasal); Ultra-flexible nano-liposome with DC-Chol-2 (PC: DC-Chol = 10: 1, \diamond , intranasal); Ultra-flexible nano-liposome with DC-Chol-3 (PC: DC-Chol = 5: 1, \times , intranasal)

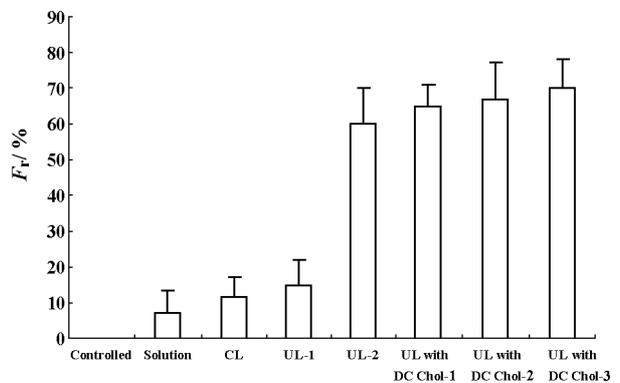


Figure 3 Relative bioavailability (F_r) of different formulations in rats ($n = 5$). CL: Conventional nano-liposome; UL: Ultra-flexible nano-liposome

10.4)%和(70.2±7.8)%。

4 柔性脂质体的纤毛毒性

A组大鼠鼻腔给予生理盐水 7 d后,扫描电镜显示表面的纤毛密集,且规律有序(图 4A)。B组大鼠鼻腔给予 1.6% SDC水溶液 7 d后,扫描电镜显示,鼻黏膜严重受损,上皮脱落,只剩下裸露的基部(图 4B),说明去氧胆酸钠有严重的鼻纤毛毒性。C组大鼠鼻腔给予等体积的含 DC胆固醇的柔性脂质体 3(其中 SDC的浓度与 B组 SDC水溶液的浓度相同),扫描电镜显示,虽有部分纤毛已脱落,但上皮细胞存在(图 4C),与 B组相比,柔性脂质体可以显著降低去氧胆酸钠的纤毛毒性。

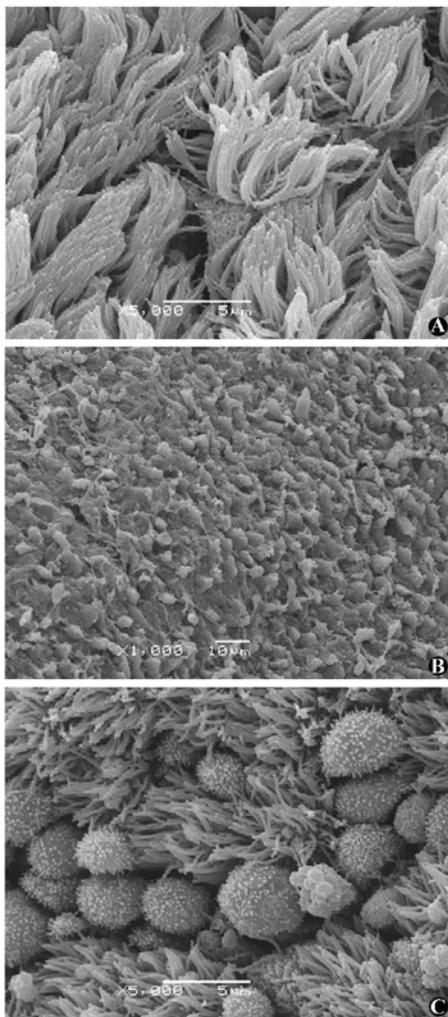


Figure 4 The nasal mucosa of rats after intranasal administration of saline (A), 1.6% SDC solution (B) and ultra-flexible liposomes (C). $\times 4000$

讨论

脂质体经鼻黏膜给药有很多好处,可防止蛋白多肽药物被黏膜上的酶降解,使给药部位药物浓度

增高,加速药物透过鼻黏膜吸收等。但普通脂质体并不能有效地提高药物的生物利用度。近年来的研究显示传递体(transfersomes),也称柔性脂质体,作为经皮给药载体已经将大分子的蛋白多肽类药物成功地转运至体循环。因此,利用柔性脂质体优越的变形性能,降低其透过鼻腔上皮黏膜进入血液循环的阻力,有望提高蛋白多肽类药物鼻腔给药的效率。

本文结果表明,由去氧胆酸钠修饰的 sCT柔性脂质体鼻腔给药后,可以迅速降低血清钙离子浓度,并长时间维持降血钙效应,与 sCT水溶液有显著性差异($P < 0.05$)。并且柔性脂质体的降血钙效应与柔性脂质体的变形性成正相关关系^[8]。脂质体的变形性越大,其降血钙效果越强,即其相对生物利用度越高。究其原因可能有两点:1)磷脂层由于表面活性剂的嵌入,极大地改善了脂质体膜的流动性和变形性,这种结构在受到外力及空间制约时就会发生变形,有效地运载 sCT通过鼻上皮细胞障碍进入血液循环;2)磷脂和表面活性剂等也是鼻腔给药系统的促渗剂,促进了药物的吸收。同时,将表面活性剂嵌入脂质膜,对鼻黏膜的刺激性也大大降低,与生理盐水对照组无显著性差异^[9]。

另外,药效实验结果表明柔性脂质体与 3组含 DC胆固醇的柔性脂质体的药理生物利用度无显著性差异($P > 0.05$)。其促吸收作用主要是在脂质体膜材中加入了一定比例的去氧胆酸钠(PC: SDC = 100: 32, w/w),使脂质体具有充分的柔性,从而促进了鲑鱼降钙素(sCT)的鼻黏膜吸收。由于鼻腔黏膜表面带负电荷,加入带正电荷的 DC胆固醇是为了延长 sCT柔性脂质体鼻腔黏膜上的滞留时间,从而提高生物利用度。但结合各处方脂质体的 zeta电位和药效实验结果来看:各处方脂质体组间的 zeta电位差别较大,而它们的降血钙效应和相对生物利用度均无显著性差异($P > 0.05$)。其可能的原因是:1)鲑鱼降钙素(sCT)的等电点是 9.47,故 sCT在柔性脂质体混悬液(pH 7.0)和含 DC胆固醇的柔性脂质体混悬液(pH 7.0)中均带正电荷,从整体来看,柔性脂质体混悬液和含 DC胆固醇的柔性脂质体混悬液与鼻腔黏膜本身都有静电相互作用,而加入 DC胆固醇增加的静电相互作用不是很明显;2)柔性脂质体作为一种有变形性的载体,在促进药物透过黏膜吸收时,在鼻腔黏膜的水合作用下变形而产生穿透作用,从降血钙百分数和时间关系来看,皮下注射和各处方的柔性脂质体鼻腔给药后 2 h的血钙浓度下降的程度和速度相近,说明柔性脂质体在鼻

腔给药后可以滞留于鼻腔,迅速发挥促渗作用,因此加入 DC胆固醇增加其鼻腔滞留时间并不能十分显著地增强其促渗作用。

本文的研究表明,将 sCT包载于柔性脂质体后显著地提高了 sCT经鼻腔给药的相对生物利用度,这说明柔性脂质体是蛋白多肽类药物鼻腔给药的一种有效的载体,本文的结果为寻找高效、低刺激性的鼻腔给药载体系统提供了理论依据。

References

- [1] Zhang YL. Clinical application of calcitonin [J]. Shaanxi Med J (陕西医学杂志), 2005, 34: 835 - 836.
- [2] Zaidi M, Inzerillo AM, Moonga BS, et al. Forty years of calcitonin: where are we now? A tribute to the work of Iain Macintyre [J]. Bone, 2002, 30: 655 - 663.
- [3] Patton JS. Pulmonary delivery of drugs for bone disorders [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 42: 239 - 248.
- [4] Gregor C, Gabriele B, Andreas S, et al. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1996, 18: 349 - 378.
- [5] Qian DM, Shen GQ, Ke RL. Biological assay of calcitonin by blood calcium determination in rats [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1994, 14: 30 - 34.
- [6] Wang Y, Chen SQ, Wu Q, et al. Determination of calcium in human blood by spectrophotometry [J]. J Anhui Univ (Nat Sci) (安徽大学学报 自然科学版), 1996, 20: 68 - 73.
- [7] Selya K, Tatsuki S. Enhancement of nasal salmon calcitonin absorption by lauroylcamitine chloride in rats [J]. Pharm Res, 1996, 13: 739 - 743.
- [8] Zhang Y, Jiang XG, Zhang QZ. Evaluation of a nasal ciliotoxicity of a nasal insulin spray in rats [J]. Chin J Clin Pharm (中国临床药理学杂志), 1999, 8: 230 - 232.
- [9] Deng Q, Hu X, Liu Y, et al. The evaluation of ciliotoxicity of ultra-flexible nanoliposome on nasal mucocilia [J]. J Chin Clin Med (中华临床医药杂志), 2003, 4: 27 - 28.