肝素/壳聚糖微胶囊的制备及其抗凝血性能

梁　艳，　宋家鸿，　陈荆晓，　陈敬华*
（江南大学 药学院，江苏 无锡 214122）

摘要：采用层层自组装(LbL)技术制备了肝素/壳聚糖$(HEP/CHI)_5$微胶囊，并研究了其抗凝血性能、胃肠道稳定性和毒副作用等。结果表明：该微胶囊具有球形结构；在pH 5.0、7.4中肝素能够缓慢可控地释放；在pH 5.0、7.4以及模拟胃液、肠液条件下具有稳定性；APTT法和全凝固实验验证了它在体外具有良好的抗凝血效果；并且对内皮细胞无细胞毒性。因此，该微胶囊有望作为口服剂型，用于临床肝素给药。

关键词：微胶囊；肝素；抗凝血；层层自组装；口服剂型
中图分类号：R 944.9　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2015)03—0295—07

Preparation of Heparin/Chitosan Microcapsule for Anticoagulation Study

LIANG Yan，　*SONG Jiahong*，　*CHEN Jingxiao*，　*CHEN Jinghua**
(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Heparin/chitosan$(HEP/CHI)_5$ microcapsules for anticoagulation were prepared by Layer-by-layer (LbL) technique. The stability of $(HEP/CHI)_5$ microcapsules under pH 5.0 and 7.4, simulated gastric and intestinal juices conditions was studied respectively, APTT anticoagulant time and cytotoxicity of microcapsules against endothelial cells were estimated. Results indicated that $(HEP/CHI)_5$ microcapsules were of spherical structure and stable in different simulated physiological milieus; they could behave favorable anticoagulant efficacy with no significant cytotoxicity. Thus, $(HEP/CHI)_5$ microcapsules were promising for clinical heparin administration as a novel oral dosage form.

Keywords: microcapsule, heparin, anticoagulation, LBL, oral dosage form

肝素(Heparin, HEP)是一种临床上广泛使用的抗凝血药物，一般采用静脉或皮下注射方式给药[1-2]。这一给药方式对于有血凝块危险的病人而言，具有可能引发感染、病患适应度低和成本高昂等问题[1]。口服肝素是近年研究的热点，但肝素在胃肠道中存在易被降解失活[3-4]，难以透过黏膜吸收[5]等问题。层层自组装(LbL)微胶囊是一种新型的多功能载体，其具有改善药物稳定性、控制药物释放

收稿日期：2014-04-11
基金项目：教育部博士点基金项目(20110093110008)；江苏省自然科学基金项目(BK2012557)。
* **通信作者**：陈敬华(1971—)，男，湖北黄石人，理学博士，教授，博士研究生导师，主要从事生物大分子和生物功能材料的研究。
E-mail: jhchenwhut@126.com

以及可功能化修饰等优点[6-7]。利用具有不同理化性质的生物活性材料制备微胶囊,可有效改善药物的稳定性[6]和生物利用度[8]。壳聚糖(Chitosan,CHI)是一种天然的阳离子聚合物,具有良好的生物相容性、低毒性、生物可降解性、强生物粘附能力以及促进药物跨上皮黏膜传递等优点[8-10]。将它作为载体,可以促进药物在胃肠道的渗透吸收[9,11]。本文作者通过 LbL 法制备$(HEP/CHI)_5$微胶囊,并对其抗凝血性能、胃肠道稳定性和毒副作用等性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂与仪器

肝素钠(分子量 15 kDa),购于生物工程(上海)有限公司;壳聚糖盐酸盐(分子量 50 kDa,脱乙酰度 91%),购自浙江澳兴生物科技有限公司;活化部分凝血活酶时间(APTT)测定试剂盒(鞣花酸),购自上海太阳生物技术有限公司;人血浆,由无锡市第四人民医院提供;兔血,取自成年新西兰兔。

S-4800 型扫描电子显微镜(SEM),H-7650 型透射电子显微镜(TEM),日本日立有限公司制造;C1-si 激光共聚焦电子显微镜(CLSM),日本尼康映像仪器有限公司制造;Zetasizer Nano ZS 纳米粒度仪,英国马尔文仪器有限公司制造;DMIL LED 倒置荧光显微镜,德国徕卡仪器有限公司制造;Fluoroskan Ascent FL 荧光和化学发光检测仪,Multiskan GO 通用微型孔板分光光度计,赛默飞世尔科技有限公司制造。

1.2 $(HEP/CHI)_5$微胶囊的制备

将 CHI 1 mg 溶于 0.33 mol/L K_2CO_3 溶液 5 mL 中,将等量 $CaCl_2$ 快速加入其中,制备 $CaCO_3$ 球形模板(Template)[12]。利用层层自组装(LbL)技术[13]制备$(HEP/CHI)_5$-Template 微胶囊。将 $CaCO_3$ 微球 150 mg 浸没到 2 g/L 肝素溶液 1 mL 中,37 ℃孵育 15 min 至静电吸附达到平衡,用去离子水小心洗净微球,之后再浸没到 2 g/L 壳聚糖溶液 1 mL 中,继续 37 ℃下孵育 15 min。重复上述操作,至$(HEP/CHI)_5$微胶囊制备完成。加入 0.4 mol/mL pH 7.4 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)溶液 4 mL,除去 $CaCO_3$ 模块,得到$(HEP/CHI)_5$微胶囊。为进行荧光观测,用异硫氰酸荧光素(FITC)对 HEP 进行标记。

1.3 LbL 自组装条件优化

首先对微球加入聚电解质溶液中的吸附时间进行优化。操作步骤如 1.2 中所述,孵育时间为 15 min 或 2 h。每吸附一次聚电解质,取样用去离子水洗净后再分散于水中,此时微球浑浊液 pH 为 9.4,测定微球表面的 ζ-电势。随后对 LbL 自组装过程中聚电解质的浓度进行优化。将 $CaCO_3$ 微球 150 mg,分别加入不同浓度的等体积肝素或者壳聚糖溶液中,37 ℃孵育 15 min,收集沉淀,再分散到 pH 7.4 或 pH 9.4 的缓冲液中,分别测量微球表面的 ζ-电势。检测壳聚糖浓度影响时,$CaCO_3$ 微球将先吸附一层肝素后,再吸附不同浓度的壳聚糖。误差棒由 3 组平行样品计算标准偏差所得。

1.4 LbL 自组装过程中微球表面 ζ-电势和粒径的变化趋势

将 $CaCO_3$ 微球 150 mg 使用层层自组装技术(LbL)装配微胶囊壁,操作过程如 1.2 所述。将微球再分散到 pH 7.4 缓冲液后,使用 Nano ZS 纳米粒度仪测量 ζ-电势和粒径。误差棒由 3 组平行样品计算标准偏差所得。

1.5 $CaCO_3$ 微球与$(HEP/CHI)_5$微胶囊形貌观察

将少量 $CaCO_3$ 微球滴至铝箔片上,干燥后喷金处理,用扫描电子显微镜(SEM)观察 $CaCO_3$ 微球的形貌。将$(HEP/CHI)_5$微胶囊用 0.2 g/mL 磷钨酸钠溶液染色,使用透射电子显微镜(TEM)观察其干态下形貌。将$(HEP/CHI)_5$微胶囊用激光共聚焦电子显微镜(CLSM)观察其在水溶液中的形貌,微胶囊中 HEP 用 FITC 标记。

1.6 抗凝血活性分析

将 0.1、0.5、2 g/L $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊、0.25 g/L 肝素、生理盐水各 1 mL,分别加入兔血 2 mL 中,于 0 h 和 1 h 后拍摄照片。肝素作为阳性对照,生理盐水作为阴性对照。

利用 APTT 法检测$(HEP/CHI)_5$微胶囊的抗凝血时间。将 0.445 g/L$(HEP/CHI)_5$微胶囊于 37 ℃中孵育,待 HEP 释放 1 h 或 24 h 后,分别取样品 15 μL 和人血浆 100 μL 混合,按照活化部分凝血活酶时间(APTT)测定试剂盒说明书操作,记录凝血时间。生理盐水作为对照组。

随后检测微胶囊质量浓度对凝血时间的影响。将梯度质量浓度$(HEP/CHI)_5$微胶囊置于 37 ℃中孵育,待 HEP 释放 24 h 后,APTT 法检测溶液的抗凝血时间,肝素作为对照组。

1.7 细胞毒性试验

将内皮细胞(ECs)在 DMEM 培养基中培养,培养基加入了质量分数 10%胎牛血清 FBS 和质量分数 1%双抗(青霉素与链霉素,10 000 U/mL),37 ℃,质量分数 5% CO_2 湿润环境培养。MTT 法测试 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊对 ECs 的细胞毒性。将细胞用胰酶消化后加入 96 孔细胞板中,每孔 8 000 个细胞。每孔加入含质量分数 10%小牛血清的 DMEM 培养基 100 μL,培养 24 h,弃去培养基。再加入梯度质量浓度的 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊 100 μL,培养 24 h 后,PBS 冲洗,每孔加入 MTT(0.5 mg/mL,PBS)110 μL,继续培养 4 h。弃去孔中液体,加入二甲亚砜 100 μL,充分溶解生成的甲瓒,使用通用微型孔板分光光度计测量 570 nm 处的 UV 吸收 OD 值,通过公式(1)计算细胞存活率。肝素作为对照组。

$$R_C=(OD_{yp}/OD_{dz})\times100\% \quad (1)$$

式(1)中:OD_{yp} 为加入药物时的 UV 吸收值,OD_{dz} 为不加药物时的 UV 吸收值,R_C 为细胞存活率。

1.8 稳定性分析

利用肝素的释放行为检测 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊在 pH 5.0 或 7.4 条件下的稳定性。将 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊约 75 mg 分散于 1 mL 水中,两等分,分别加入透析袋(MWCO 25 kDa)中,之后将透析袋置于 pH 5.0 或 7.4 PBS 溶液 6 mL 中进行透析。间隔一定时间取样,样品在激发波长 480 nm、发射波长 520 nm 处测定 FITC 的荧光强度,并由公式(2)计算 HEP 的累积释放率。每个实验都进行 3 组平行实验,取平均值。

$$R_S=(M_t/M_o)\times100\% \quad (2)$$

式(2)中:M_t 为 t 时刻 HEP 的累积释放量,M_o 为微胶囊中 HEP 总量,R_S 为 HEP 累计释放率。

为了测量 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊中 HEP 的总量,将微胶囊 12.5 mg 加入 6 mol/L HCl 溶液 1 mL 中,测量 FITC 荧光强度,通过标准曲线计算 HEP 总量,激发波长为 485 nm,发射波长为 520 nm。

随后检测 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊在模拟胃液、肠液条件下的稳定性。将 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊 25 mg 分别加入到模拟胃液 1 mL(胃蛋白酶活力>1 200 U/mL,pH 2)或模拟肠液 1 mL(胰酶,pH 6.8)中,于 37 ℃孵育,间隔一定时间取样,样品置于沸水中 3 min 使酶失活后,使用倒置荧光显微镜拍摄图像。PBS 作为对照组。

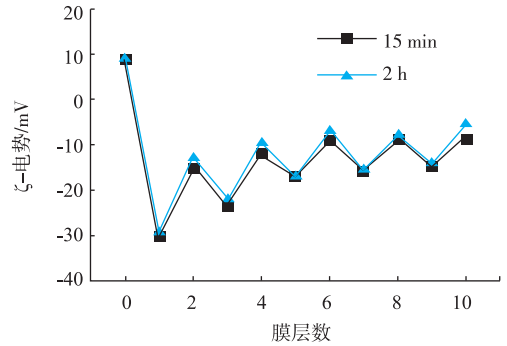
2 结果与讨论

2.1 LbL 自组装条件优化

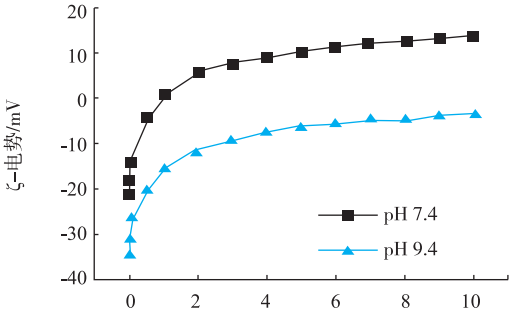
2.1.1 聚电解质沉积时间选择 在 LbL 自组装过程中,微球吸附聚电解质的时间长短,可能影响聚电解质吸附到微球表面的量。如图 1(a)所示,不同的吸附时间 15 min 和 2 h 导致的 ζ-电势变化差异并不明显,这说明 15 min 的时间长度已经足够聚电解质在微球表面吸附达到平衡状态,延长时间并不能使更多的聚电解质沉积到微球表面。相反,2 h 反而会使实验误差增大,稳定性下降。因此 15 min 更适合作为聚电解质的沉积时间。

2.1.2 聚电解质浓度对微胶囊制备的影响 已有研究文献[14]报道,聚电解质浓度的强弱也是影响LbL自组装的因素之一,因此对其进行优化。从图 1(b)可知,随着壳聚糖质量浓度的增大,微球表面 ζ-电势呈现明显上升趋势,质量浓度低于 0.5 g/L 时上升趋势迅猛,2 g/L 后才逐渐平稳。这一方面表明低质量浓度壳聚糖不足以使微球表面静电吸附达到平衡。另一方面质量浓度过大(>3 g/L)时,壳聚糖溶液黏度将大幅上升,降低它的分子扩散速度,影响自组装效率。因此,2 g/L 壳聚糖最为适合。另外,由图 1(c)可知,随着肝素质量浓度的增大微球表面 ζ-电势呈现明显下降趋势,低质量浓度时 ζ-电势迅速下降,2 g/L 后 ζ-电势几乎不再变化。但随着肝素质量浓度继续升高,误差有所增大。所以选取 2 g/L 肝素为宜。

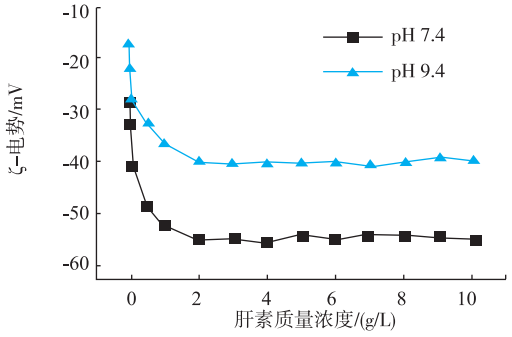
另外,在图 1(a)中所有 ζ-电势值均处于负值,这并不符合微胶囊 LbL 组装的原理。这种现象可能是由于测量时微球悬液的 pH 值所致。因此随后检测了 pH 9.4($CaCO_3$ 微球浑浊液 pH)和 pH 7.4(血液 pH)条件对 ζ-电势的影响。如图 1(b)(c)所示,pH 7.4 时 ζ-电势数值范围与 pH 9.4 时几乎均相差 20 mV 左右,但随质量浓度变化的趋势基本相同。这表明图 1(a)中 ζ-电势均为负值的现象主要是由于检测时 pH 为 9.4 所导致,而非为微胶囊制备工艺本身的原因。将检测时 pH 调节为 7.4 后,如图 1(d)所示,ζ-电势将随聚电解质膜层数的增加,呈现明显的正负值交替现象。这表明带有相反电荷的肝素和壳聚糖交替吸附到 $CaCO_3$ 模板的表面,完成了 LbL 自组装的过程。



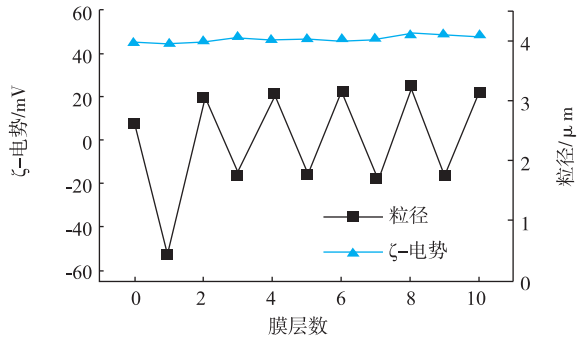
(a) 聚电解质吸附时间的影响(pH 9.4)



(b) 壳聚糖质量浓度的影响



(c) 肝素质量浓度的影响



(d) 粒径和 ζ -电势（pH 7.4）随膜层数的变化趋势

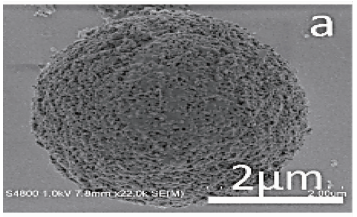
图 1　LbL 自组装过程

Fig. 1　During LbL self -assembly (a) impact of polyelectrolyte coating time, impact of (b) heparin or (c) chitosan ionic strength, (d) ζ-potential and size of each layers

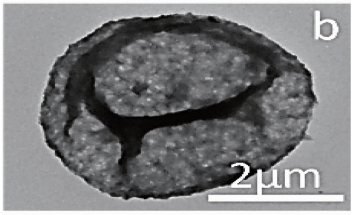
2.2　$CaCO_3$ 微球与 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊形貌观察

随后对微胶囊形貌特征和粒径变化进行了观察。从形貌上看,SEM 图 2(a)中 $CaCO_3$ 内核具有适于微胶囊制备的球霰石晶体微球形态[15-16],结构致密。TEM 图 2(b)显示$(HEP/CHI)_5$ 微胶囊为多孔松散的膜结构，表明这种微胶囊可能具有较强渗透性。CLSM 图 2(c)中还可观察到这种药物载体是内有空腔的圆形胶囊结构。

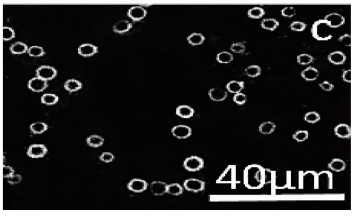
从粒径变化来说,图 1(d)显示在 LbL 自组装过程中微球的尺寸基本都保持在 4 μm 左右，没有随胶囊壁的组装而大幅增加。由 $CaCO_3$ 球 SEM 图 2(a)可知,$CaCO_3$ 微球模板尺寸大约在 3.9 μm 左右,两者差别较小,可推断微胶囊尺寸大小主要由模板的尺寸决定。另外 TEM 图 2(b)中微胶囊的粒径大约在 4.2 μm,CLSM 图 2(c)中粒径却大约为 5.2 μm。这种尺寸变化可能是由于 $CaCO_3$ 模板去除后微胶囊内腔中无机离子浓度增加使渗透压增加,从而使微胶囊发生膨胀的缘故,表现在 CLSM 图 2(c)中微胶囊尺寸偏大。拍摄 TEM 图像时微胶囊脱水又导致它收缩并塌陷,微胶囊尺寸缩小。



(a) $CaCO_3$微球的SEM图像



(b) (HEP/CHI)5微胶囊的TEM图像



(c) $(HEP/CHI)_5$微胶囊的CLSM图像

图 2　FITC 荧光标记微胶囊中 HEP

Fig. 2　(a) SEM observation of $CaCO_3$ template, (b) TEM and (c) CLSM images of $(HEP/CHI)_5$ microcapsule labelled by FITC

2.3　微胶囊的抗凝血活性和毒副作用

如图 3(a)(b)所示，0 h 时所有试管中血液均为未凝固状态，但 1 h 后生理盐水和 0.1、0.5 g/L 微胶囊试管中血液已经凝固，肝素和 2 g/L 微胶囊试管中血液没有凝固，这说明 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊具有抗凝血功效，能够延长凝血时间。

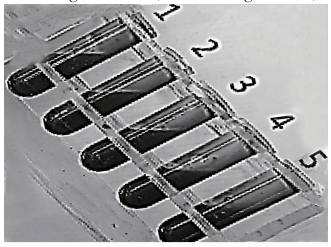
为了进一步研究 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊的抗凝血效果，使用 APTT 法测试了不同释放时间后微胶囊悬液的抗凝血时间。对比于对照组生理盐水(37±1) s 的凝血时间，不同时间后的微胶囊悬液都能延长血浆的凝血时间，1 h 后微胶囊悬液的抗凝血时间延长(11±3) s，而 24 h 后的抗凝血时间则为(90±6) s 左右。这表明微胶囊的抗凝血功效依赖于肝素的释放。此外，如图 3(c)所示，随着微胶囊质量浓度的增大，抗凝血时间也逐渐延长，并且微胶囊的质量浓度与抗凝血效果呈正相关。

另外，由图 3(d)内皮细胞 ECs 的 MTT 细胞毒性结果可知，$(HEP/CHI)_5$ 微胶囊对 ECs 细胞几乎没有毒性，说明这种微胶囊毒副作用极小。

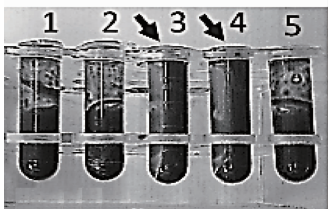
2.4　微胶囊稳定性

为了研究 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊在胃肠道中的稳定性，利用肝素在 pH 5.0 和 7.4 条件下的体外释放行为，检测微胶囊在十二指肠(pH 4.2~8.2)和肠道(pH 7.4) 环境的稳定性。微胶囊中肝素载药率为(37.5±0.3)%。如图 3(e)所示，两种 pH 下肝素都以极缓慢的速率释放，到 24 h 后 HEP 的释放量还不足微胶囊中肝素总量的 30%。这说明该微胶囊在 pH 5.0 和 7.4 条件下是稳定的。

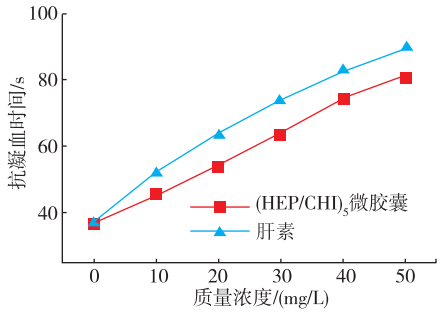
1—3：0.1、0.5、2 g/L微胶囊；4：0.25 g/L肝素；5：生理盐水



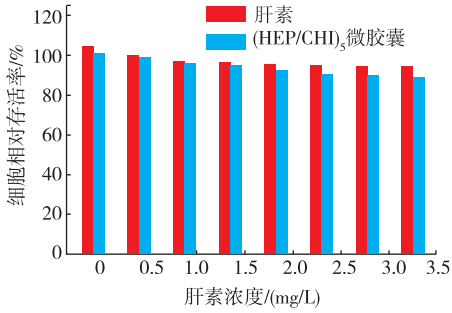
(a) 0 h时



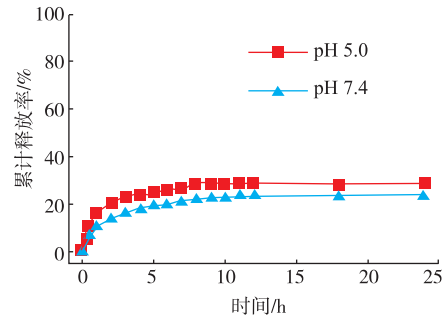
(b) 1 h后血液凝固状态



(c) $(HEP/CHI)_5$微胶囊浓度对APTT抗凝血时间的影响



(d) ECs细胞毒性分析



(e) 肝素释放行为研究

图 3　血液中加入微胶囊

Fig. 3　Blood coagulation state after (a) 0 h and (b) 1 h, (c) Impact of microcapsule concentration on anticoagulant effect, (d) ECs cell cytotoxicity assay, (e) Heparin release behavior

此外，还进一步检验了 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊在模拟胃液或模拟肠液中的稳定性，如图 4 所示。在经过 4 h 模拟胃液或模拟肠液处理后，微胶囊依然保持良好的圆环形状，绝大部分微胶囊都未被降解。由此可以推断，该微胶囊对胃肠道环境应当具有稳定性，有望作为口服剂型用于肝素给药。

3　结　语

在口服药物的研究中，药物胃肠道的吸收通常有 4 个主要影响因素——药物的溶解性、稳定性、膜通透性和首过效应[17]。一方面，药物的溶解性和稳

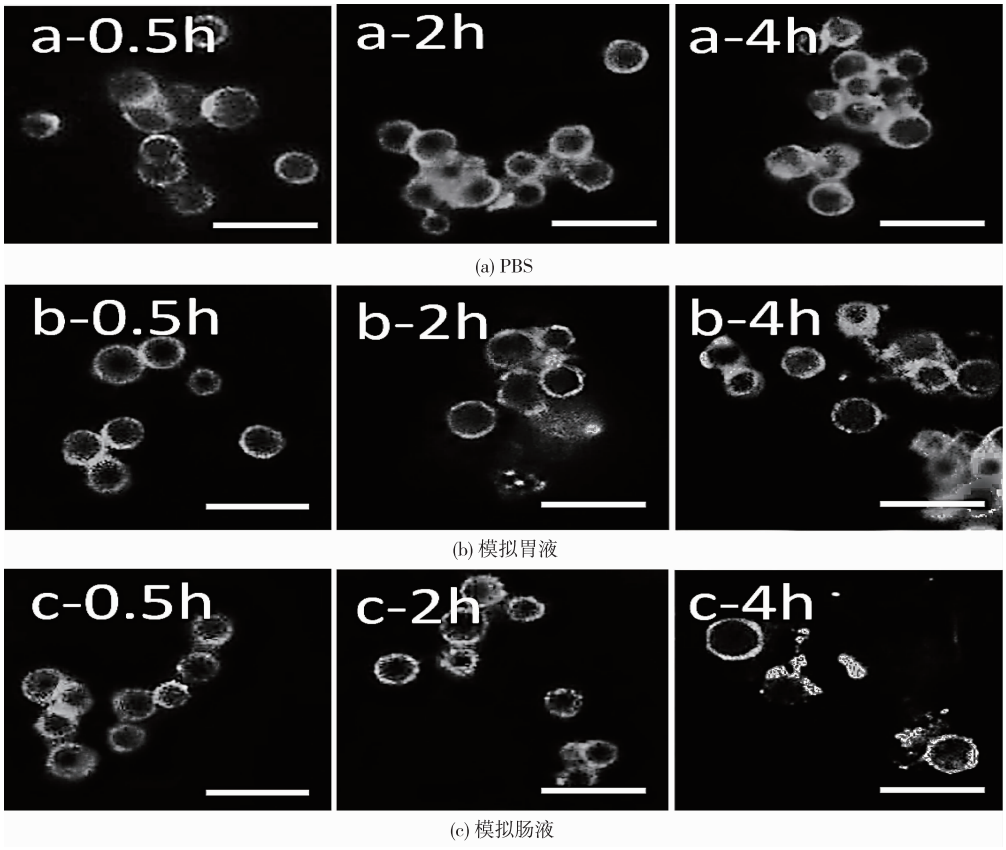


图 4 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊的 FITC 荧光标记图像(标尺为 10 μm)

Fig. 4 Fluorescence images of FITC labelled $(HEP/CHI)_5$ microcapsules incubating in (a) PBS, (b) simulated gastric fluid or (c) simulated intestinal fluid (The scale bar was 10 μm)

定性可以通过药物传递技术进行调节；另一方面，表面活性剂等吸收促进剂可以改善药物的跨胃肠道黏膜转运，提高药物的生物利用度[17]。

本文作者设计的微胶囊可以在胃肠道中为 HEP 隔离周遭不利环境，提高了 HEP 的稳定性。另已有文献报道，CHI 是一种具有良好生物相容性的黏膜传递吸收促进剂[10]，可以促使紧密连接的结构蛋白质(ZO-1、闭合蛋白质)和细胞骨架蛋白质(F-肌动蛋白质)等重新分布，改变上皮细胞的紧密连接和细胞骨架，使药物能够跨上皮黏膜传递[8]。CHI 的促进作用有可能增强 HEP 在胃肠道中的渗透吸收。此外，在微胶囊的 LbL 制备工艺中，常规载药方式制得的微胶囊往往在最初几个小时将大部分 HEP 释放。但在人机体内低质量浓度 HEP 就已经具备预防血栓形成的功效[18]。Frank Caruso 等人[19]提出的膜间载药新方式，将更适合微胶囊中 HEP 缓慢释放的需求。

根据上述思路制备的 $(HEP/CHI)_5$ 微胶囊，不仅有可能促进肝素的胃肠道吸收，有效地减缓 HEP 释放速率，并延长它在血液中的循环时间，还具有促进 HEP 口服吸收的潜力，有望作为口服剂型用于肝素给药，具有很大的市场前景。

参考文献：

[1] Paliwal R, Paliwal S R, Agrawal G P, et al. Recent advances in search of oral heparin therapeutics [J]. **Medicinal Research Reviews**, 2012, 32(2): 388-409.

[2] Arbit E, Goldberg M, Gomez-Orellana I, et al. Oral heparin: status review[J]. **Thrombosis Journal**, 2006(4): 6-12.

[3] Ubrich N, Hoffart V, Vigneron C, et al. Digestive absorption of heparin with alternative formulations [J]. **STP Pharm Sciences**, 2002, 12(3): 147-155.

[4] Khatun Z,Nurunnabi M,Reeck G R,et al. Oral delivery of taurocholic acid linked heparin-docetaxel conjugates for cancer therapy[J]. **Journal Controlled Release**,2013,170(1):74-82.

[5] Kim S K,Lee D Y,Kim C Y. A newly developed oral heparin derivative for deep vein thrombosis:non-human primate study[J]. **Journal Controlled Release**,2007,123(2):155-163.

[6] der Mercato L L,Rivera-Gil P,Abbasi A Z,et al. LbL multilayer capsules:recent progress and future outlook for their use in life sciences[J]. **Nanoscale**,2010,2(4):458-467.

[7] Yi Q,Sukhorukov G B. Externally triggered dual function of complex microcapsules[J]. **ACS Nano**,2013,7(10):8693-8705.

[8] 张俊颖,黄罗生. 壳聚糖及其衍生物在促进药物口服吸收中的应用[J]. 海峡药学,2004,16(2):24-27.
ZHANG Junying,HUANG Luosheng. The improving effect of chitosan and its derivatives in oral drug absorption [J]. **Strait Pharmaceutical Journal**,2004,16(2):24-27.(in Chinese)

[9] 朱丽英,姚善泾. 壳聚糖/纤维素硫酸钠复合膜性能的研究[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(2):166-170.
ZHU Liying,YAO Shanjing. Study on the properties of complex films based on chitosan and sodium cellulose sulfate[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(2):166-170.(in Chinese)

[10] Li J,Huang P S,Chang L,et al. Tumor targeting and pH-responsive polyelectrolyte complex nanoparticles based on hyaluronic acid-paclitaxel conjugates and chitosan for oral delivery of paclitaxel[J]. **Macromolecular Research**,2013,21(12):1331-1337.

[11] Bowman K,Sarkar R,Raut S,et al. Gene transfer to hemophilia a mice via oral delivery of FVIII-chitosan nanoparticles[J]. **Journal Controlled Release**,2008,132(3):252-259.

[12] Li C,Luo G F,Wang H Y,et al. Host-guest assembly of pH-responsive degradable microcapsules with controlled drug release behavior[J]. **Journal of Physical Chemistry**,2011,115(36):17651-17659.

[13] Driever C D,Mulet X,Johnston A P R,et al. Converging layer-by-layer polyelectrolyte microcapsule and cubic lyotropic liquid crystalline nanoparticle approaches for molecular encapsulation[J]. **Soft Matter**,2011,7(9):4257-4266.

[14] Milkova V,Radeva T. Effect of ionic strength and molecular weight on electrical properties and thickness of polyelectrolyte bi-layers[J]. **Colloids Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**,2013,424:52-58.

[15] 董文举,席君兰,张培培,等. 核壳结构聚苯胺-聚电解质-碳酸钙微球复合材料的制备、表征和应用[J]. 应用化学,2011,28(1):22-26.
DONG Wenju,XI Junlan,ZHANG Peipei,et al. Fabrication,characterization and application of polyaniline-polyelectrolyte coated $CaCO_3$ microparticles core-shell structure[J]. **Chinese Journal of Applied Chemistry**,2011,28(1):22-26.(in Chinese)

[16] 叶桂生. 生物高分子模板调控球形碳酸钙的仿生合成[J]. 应用化学,2006,23(12):1413-1415.
YE Guisheng. Biomimetic synthesis of spherical $CaCO_3$ induced by biomolecules [J]. **Chinese Journal of Applied Chemistry**,2006,23(12):1413-1415.(in Chinese)

[17] 高坤,孙进,何仲贵. 口服药物吸收中的生物药剂学性质[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(3):186-192.
GAO Kun,SUN Jin,HE Zhonggui. Impacts of biopharmaceutical characteristics on oral drug absorption[J]. **Journal of Shenyang Pharmaceutical University**,2007,24(3):186-192.(in Chinese)

[18] 张兆蓉. 低分子肝素口服制剂的研究进展[J]. 中国生化药物杂志,1998,19(5):220-221.
ZHANG Zhaorong. Research proceedings of oral low molecular weight heparin preparations[J]. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**,1998,19(5):220-221.(in Chinese)

[19] Yan Y,Ochs C J,Such G K,et al. Bypassing multidrug resistance in cancer cells with biodegradable polymer capsules[J]. **Advanced Materials**,2010,22(47):5398-5403.