

羧甲基化白及多糖-壳聚糖载姜黄素聚电解质复合膜的制备及其表征

王玉蓉^{1,2}, 冯 斌², 巨 佳², 成黎霏², 王 济², 顾 宜², 王晓娟^{2*}

1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046

2. 军事口腔医学国家重点实验室, 口腔疾病国家临床医学研究中心, 陕西省口腔生物工程技术研究中心, 空军军医大学口腔医院 药剂科, 陕西 西安 710032

摘要: 目的 制备羧甲基化白及多糖-壳聚糖载姜黄素聚电解质复合膜, 进行处方、制备工艺优化, 并进行质量评价。方法 对白及多糖进行羧甲基化修饰, 羧甲基化白及多糖与壳聚糖通过静电结合形成水不溶性复合物。以姜黄素为模型药物, 采用溶剂挥发法制备载药聚电解质复合膜; 通过单因素和正交设计法进行处方优化, 用扫描电子显微镜和显微红外光谱对复合膜的形态和结构进行表征。结果 最优处方为羧甲基白及多糖 117 mg, 壳聚糖 233 mg, 甘油含量为 25%, 姜黄素为 20 mg。平均厚度为 $(74.0 \pm 2.0) \mu\text{m}$, 载药量为 95.41%, 体外累积释放率可达 93.78%。结论 优化条件下制备的载药复合膜外观光滑平整, 分布均匀, 载药量和累积释放度良好。

关键词: 羧甲基化; 白及多糖; 壳聚糖; 姜黄素; 聚电解质复合膜; 处方优化; 质量评价; 溶剂挥发法; 正交设计

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)04-0978-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.04.023

Carboxymethyl *Bletilla striata* polysaccharide-chitosan@curcumin polyelectrolyte complex films: Preparation and characterization

WANG Yu-rong^{1,2}, FENG Bin², JU Jia², CHENG Li-fei², WANG Ji², GU Yi², WANG Xiao-juan²

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. State Key Laboratory of Military Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Shaanxi Engineering Research Center for Dental Materials and Advanced Manufacture, Department of Pharmacy, Hospital of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: **Objective** To prepare carboxymethyl *Bletilla striata* polysaccharide-chitosan@curcumin (CM-BSP) polyelectrolyte complex films, optimize their preparation technology, and evaluate its quality. **Methods** CM-BSP was synthesized, then CM-BSP and CS formed water-insoluble complex by electrostatic bonding, the Cur-loaded polyelectrolyte complex films were prepared by a volatilization of solvent method. The formulation and preparation technology were optimized using an orthogonal design method and the morphology and structure were observed by scanning electron microscopy and fourier transform microscopic infrared spectroscopy. **Results** The optimal prescription was of CM-BSP 117 mg, CS 233 mg, glycerol 25%, Cur 20 mg. The mean thickness of Cur-loaded polyelectrolyte complex films was $(74.0 \pm 2.0) \mu\text{m}$, drug loading capacities was 95.41%, and *in vitro* release rate was 93.78%. **Conclusion** The obtained polyelectrolyte complex films displayed an smooth exterior inspection, uniform distribution, good drug loading capacities and *in vitro* release rate.

Key words: carboxymethylation; *Bletilla striata* polysaccharide; chitosan; curcumin; polyelectrolyte complex films; formulation optimization; quality evaluation; solvent evaporation method; orthogonal design

临床上口腔黏膜疾病以局部对症治疗为主, 研究显示, 局部缓释给药是治疗口腔疾病较合理的方法^[1]。在市面上最常见且应用最为广泛的局部缓释

给药剂型为膜剂, 其具有黏附性好、使用便捷、性能稳定、工艺简便、适用范围广等特点^[2]。

聚电解质复合膜 (polyelectrolyte complex films,

收稿日期: 2019-10-01

基金项目: 陕西省中医管理局中医药科研课题 (JCMS053)

作者简介: 王玉蓉 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。Tel: (029)84773998 E-mail: 2995296639@qq.com

*通信作者 王晓娟 (1962—), 女, 主任药师, 研究方向为天然药物化学与中药新制剂。Tel: (029)84773189 E-mail: wxjyh@fmmu.edu.cn

PCF) 是近年来新发展的一种膜剂, 属于黏附控释膜, 一般是指带有相反电荷的大分子与大分子或者是大分子与小分子之间通过静电吸引力的相互作用所形成的大分子复合网络^[3], 是一种新型高分子复合材料。由于是水不溶性复合物, 所以具有缓释的特点, 减少了给药次数, 同时也提高了病灶部位的有效药物浓度, 且制备过程中不使用有毒溶剂或交联剂, 对人体基本无害^[4]。

白及多糖 (*Bletilla striata* polysaccharide, BSP) 具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等多种生物学活性^[5-6]。作为天然高分子材料, 具有功能缓释性、自身降解性、无毒副作用、廉价易得等特性^[7-9]。研究发现, 在牙膏中添加 BSP 可有效防治咽喉肿痛和口腔溃疡等疾病, 并可以有效地抑制口腔细菌的滋生, 对改善口腔健康有显著作用^[10]。壳聚糖 (CS) 是甲壳素的脱乙酰化衍生物^[11-12]。近几年因其黏膜/生物黏附性在黏膜领域引起了关注^[13]。作为自然界唯一带有阳离子的天然多糖, CS 凭借其优异的生物学特性在药物缓释体系、组织工程等领域应用迅速发展^[14-15]。而实验药物姜黄素 (curcumin, Cur) 已发现其具有抗炎、抗病毒、抗感染等药理活性, 且毒性低、不良反应小^[16-17]。近几年有研究表明 Cur 对口腔疾病牙周炎^[18]和口腔溃疡^[19]等有显著效果。

本实验采用生物可降解性的 BSP 和 CS 为原材料, 通过醚化法^[20]对 BSP 进行羧甲基化改性, 使中性多糖带上负电荷, 增大了多糖的活性, 提高了多糖的药效。羧甲基化法由于其制备简单、成本低、低毒性等优点, 已成为一种多糖分子修饰的常用方法^[21]。改性后的 BSP 与带正电的 CS 通过静电作用形成聚电解质复合物^[22]。制备用于口腔溃疡应用的载有 Cur 的羧甲基化白及多糖 (CM-BSP)-CS 聚电解质复合膜 (CM-BSP-CS@Cur PCF), 为研发新型

口腔溃疡治疗药物准备条件。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Lambda 35 紫外-可见分光光度仪, Perkin Elmer 公司; 78HW-1 数显恒温磁力搅拌器, 杭州仪表电机有限公司; BT125D 电子天平, 德国赛多利斯公司; 透析袋, 截留相对分子质量 3 500, 北京索莱宝生物科技有限公司; FD-1A-50 型冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; PHS-3C 型精密 pH 计, 上海雷磁仪器厂; 黏附力测定装置, 实验室自制; 水浴恒温振荡器, 金坛市杰瑞尔电器有限公司; 0~25 mm 厚度测量仪, 温州韦度电子有限公司; Bruker Avance 400 MHz 核磁共振仪、VERTEX70 显微红外光谱仪, 瑞士 Bruker 公司; S-4800 扫描电子显微镜, 日本日立公司。

1.2 试剂

BSP, 质量分数 90%, 西安朗泽生物科技有限公司; CS, 脱乙酰度 80~95, 国药集团化学试剂有限公司; Cur 原料药, 质量分数 98%, 批号 201406, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 人工唾液, 空军军医大学第三附属医院院内制剂; 纯化水, 实验室自制; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 BSP 的羧甲基化

采用醚化法制备 CM-BSP。1 g 多糖在冰浴条件下加入到 20 mL 20% NaOH 中搅拌至完全溶解, 然后加入 30 mL 异丙醇继续搅拌 30 min, 3.25 g 一氯乙酸少量水溶解后缓慢滴加, 升温至 55 °C 搅拌 70 min 后, 加冰醋酸调 pH 至中性, 用截留相对分子质量 3 500 的透析袋透析 3 d 后旋蒸浓缩冷冻干燥即得羧甲基化修饰的 BSP^[23-24], 即 CM-BSP。取代度 (DS) 为 0.84。反应式见图 1。

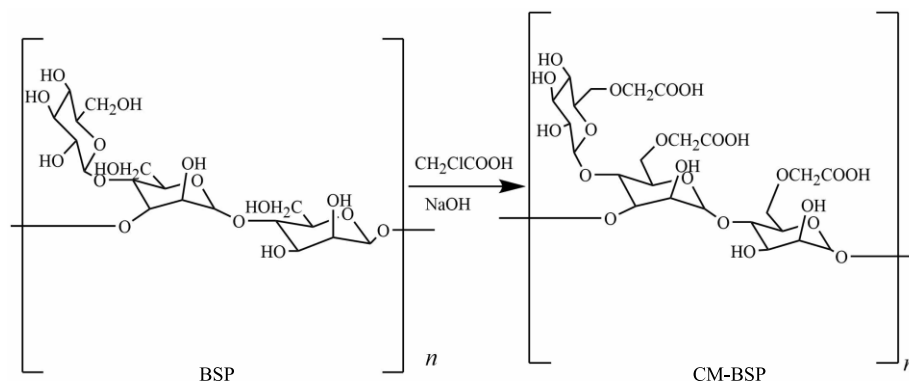


图 1 CM-BSP 的合成

Fig. 1 Synthetic route of CM-BSP

2.2 CM-BSP 的 DS 测定

羧甲基多糖和羟基乙酸在 100 °C 的浓硫酸溶液中都可以定量地释放甲醛，甲醛与特定试剂作用显紫色，当羟基乙酸质量浓度在 15~100 $\mu\text{g/L}$ 时，其溶液的吸光度服从朗伯-比尔定律，适用于任何取代度的羧甲基醚化多糖^[24]。

准确称取羧甲基化多糖 10 mg，用 0.25 mol/L NaOH 溶液溶解，转移至 25 mL 量瓶中定容 (0.4 mg/mL)。取待测样品 1 mL 加入 25 mL 具塞试管中，加入 0.1% 铬变酸溶液 (100 mg 铬变酸置于 100 mL 量瓶中，用 10 mL 蒸馏水分散后，置冷水浴中用浓硫酸定容) 5 mL，1 mL 浓硫酸，水浴加热 0.5 h，将试管冷至室温，滴加 30% 乙酸铵溶液，使各具塞试管内溶液至刻度，测吸光度 (A)^[23]。按标准曲线所得回归方程计算药物质量浓度后带入公式计算 DS。

$$\text{DS} = 162 m / [76 - (81 - 1)m]$$

m 为每克羧甲基糖样品中相当羟基乙酸的量 (g)，162 为多糖的失水葡萄糖 (或甘露糖) 单元的摩尔质量 (g/mol)，76 为羟基乙酸摩尔质量 (g/mol)，81 为 CH_2COONa 摩尔质量 (g/mol)

2.2.1 检测波长确定 取羟基乙酸显色液及空白液适量，在 200~800 nm 波长进行紫外扫描。显色液在 570 nm 处有最大吸收波长且空白液无吸收，因此确定 570 nm 为 DS 的检测波长。

2.2.2 线性关系考察 吸取羟基乙酸对照品液 (1 mg/mL，纯化水配制) 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 25 mL 具塞试管中，用 0.25 mol/L NaOH 溶液补足，使其体积至 1 mL，然后各加入 0.1% 铬变酸溶液 5 mL，浓硫酸 1 mL，水浴加热 0.5 h，将试管冷至室温，滴加 30% 乙酸铵溶液，使各具塞试管内溶液至刻度，显色后溶液为紫色，在 570 nm 处测定 A 值。以显色溶液的 A 值 (Y) 对其质量浓度 (X) 进行线性回归，得回归方程为 $Y = 23.611 X + 0.004 5$ ， $r^2 = 0.994 7$ 。结果表明显色液在 0.008~0.040 mg/mL 与 A 值呈良好的线性关系，此法形成的有色络合物较稳定。

2.3 CM-BSP 的结构表征

2.3.1 CM-BSP 的红外光谱 (FT-IR) 分析 取适量 CM-BSP，放入红外光谱仪中，4 000~400 cm^{-1} 波数范围内扫描，分辨率 4 cm^{-1} ，扫描次数 32 次。结果见图 2。FT-IR 图谱中出现了新的较强吸收峰，在 1 590、1 415 cm^{-1} 附近，分别是羧甲基中 ($\text{C}=\text{O}$)

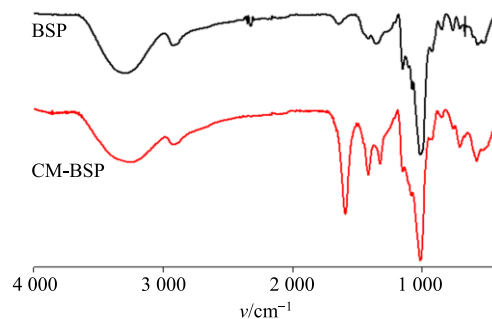


图 2 BSP 和 CM-BSP 的红外光谱

Fig. 2 FT-IR spectra of BSP and CM-BSP

的非对称和对称的伸缩振动引起的；3 300 cm^{-1} 附近为多糖-OH 的吸收峰，羧甲基化后此峰变得平缓且向高波数方向移动，说明-OH 数量减少，都表明了多糖分子中 (COO^-) 基团的引入成功，说明多糖分子确实发生了醚化反应。

2.3.2 CM-BSP 的 ^{13}C -NMR 分析 取适量 CM-BSP 和 BSP 测定 ^{13}C -NMR。结果见图 3。从 BSP 的谱图中看出， δ 100.11 和 δ 76.15 分别代表 β -1,4-甘露糖的 C-1 和 C-4 位置。 δ 101.26 和 δ 77.28 分别代表 β -1,4-葡萄糖的 C-1 和 C-4 位置^[8]。CM-BSP 相较于 BSP ^{13}C -NMR 图明显增加了 δ 177.76 的峰，归属于羧甲基结构中的-COOH，典型的特征峰证明了羧甲基取代的成功。在 CM-BSP 的 ^{13}C -NMR 谱图中，原未改性的多糖中 C-3 (δ 91.88) 峰消失，而在 δ 79~85 出现的一系列信号峰为 C-2、C-4、C-6 取代对 C-3 的影响。说明取代反应在 C-2、C-4、C-6 位上都有发生。CM-BSP 谱图中部分原 BSP 的 C-6 信号峰由于羧甲基化而向低场移动，从 δ 48.71 (C-6) 位移至 δ 60.75 (C-6')，这是由于在 C-6 上 - CH_2COOH 基团取代了羟基，C-6 从 δ 48.71 向低场 (左区域)

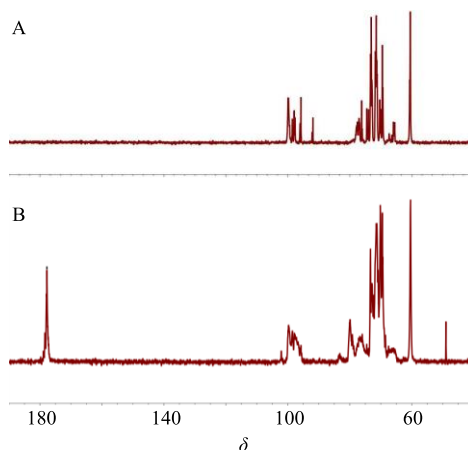


图 3 BSP (A) 和 CM-BSP (B) 的 ^{13}C -NMR 图

Fig. 3 ^{13}C -NMR spectra of BSP (A) and CM-BSP (B)

转移^[25]。从这些峰的面积来看,对应取代量,羧甲基的引入程度为 C-6>C-4>C-2。

2.3.3 CM-BSP 的扫描电子显微镜(SEM)分析 取适量干燥的 CM-BSP 于样品台上,置于离子溅射仪中镀一层导电金膜后进行观察,结果见图 4。由 SEM 图可以看出, BSP 样品呈片状或碎屑状堆积,表面形貌光滑,无孔洞,呈片状聚合在一起。而 CM-BSP 呈分散、单片状分布,表明 BSP 的规则纤维状结构被破坏,结构疏松,变为不规则的层状,并且可看到其表面形状规则的圆形小孔。

2.4 CM-BSP-CS@Cur PCF 的制备

称取 CS 233 mg, Cur 20 mg, 甘油 92.5 mg 于

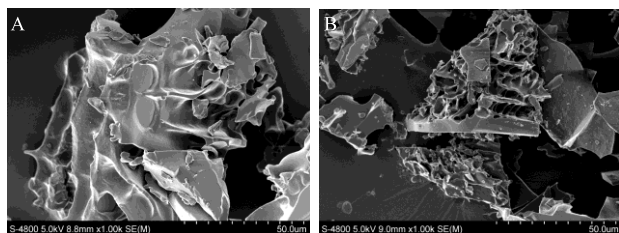


图 4 BSP (A) 和 CM-BSP (B) 的 SEM 图

Fig. 4 SEM of BSP (A) and CM-BSP (B)

100 mL 锥形瓶中,向瓶中加入 25 mL 0.5% HCl 溶液于磁力搅拌器搅拌至完全溶解后用 0.25 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 5.5 备用。称取 133 mg CM-BSP 用 25 mL 纯化水完全溶解后在超声条件下缓慢将 CM-BSP 溶液滴加至 CS 混合液中,将得到的混合溶液倒入聚乙烯培养皿中放入烘箱 40 ℃ 烘干,紫外灯下灭菌 15 min 后揭取,即得 CM-BSP-CS@Cur PCF,避光密封保存。

2.5 正交试验优选 CM-BSP-CS@Cur PCF 处方

根据文献与反复试验探索^[26-27],以外观性状、溶胀度、黏附力、载药量及药物累积释放度为评价指标,对 CM-BSP 与 CS 的比例、总量及甘油用量以及投药量进行单因素考察。其中 CM-BSP 与 CS 的比例、总量以及投药量明显影响着膜剂的性能。CM-BSP 与 CS 的比例选择 1:5、1:3、1:2、1:1.5、1:1、3:1 进行考察,CM-BSP 与 CS 总量选择 200、250、300、350、400、450 mg 进行考察,甘油用量选择 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40% 进行考察,Cur 投药量选择 10、15、20、25、30 mg 进行考察,结果见表 1。

表 1 单因素处方考察

Table 1 Prescription of single factor

处方	比例	总量/mg	投药量/mg	甘油用量/%	厚度/ μm	外观性状	黏附力	载药量/%	溶胀度/%	体外累积释放度/%
1	1:5	300	20	25	71.4 $\pm$ 1.6	6.0	3	74.43	306	98.37
2	1:3	300	20	25	71.0 $\pm$ 3.0	6.5	3	104.60	331	83.07
3	1:2	300	20	25	85.6 $\pm$ 15.6	8.0	8	75.00	258	82.32
4	1:1.5	300	20	25	86.0 $\pm$ 4.0	4.0	3	43.19	269	87.52
5	1:1	300	20	25	—	—	—	—	—	—
6	3:1	300	20	25	—	—	—	—	—	—
7	1:2	200	20	25	—	—	—	—	—	—
8	1:2	250	20	25	54.6 $\pm$ 4.5	2.0	3	65.32	232	46.52
9	1:2	350	20	25	77.6 $\pm$ 13.2	10.0	10	84.10	231	84.35
10	1:2	400	20	25	84.6 $\pm$ 11.4	8.5	5	75.82	280	81.42
11	1:2	450	20	25	108.0 $\pm$ 18.0	6.0	2	92.21	265	61.37
12	1:2	300	20	15	—	—	—	—	—	—
13	1:2	300	20	20	69.4 $\pm$ 12.6	5.0	4	104.83	329	65.50
14	1:2	300	20	30	71.6 $\pm$ 13.2	7.0	7	69.04	264	68.32
15	1:2	300	20	35	88.0 $\pm$ 15.0	6.0	5	96.11	254	63.60
16	1:2	300	20	40	88.0 $\pm$ 24.0	3.5	5	57.90	288	86.20
17	1:2	300	10	25	82.0 $\pm$ 6.0	5.5	8	68.37	280	82.66
18	1:2	300	15	25	77.0 $\pm$ 5.4	7.0	8	81.97	293	90.73
19	1:2	300	25	25	68.6 $\pm$ 4.7	7.0	5	84.26	288	93.76
20	1:2	300	30	25	71.8 $\pm$ 3.2	6.0	4	77.52	258	35.15

最终在单因素考察的基础上笔者选择了 CM-BSP 与 CS 的比例 (A)、总量 (B) 以及投药量 (C) 为考察对象, 以黏附力和药物累积释放度为考察指

标。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表, 直观分析法进行分析。因素与水平见表 2, 正交试验结果见表 2, 直观分析结果见表 3, 方差结果见表 4。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平及结果Table 2 $L_9(3^4)$ factors and results of orthogonal test

处方号	A	B/mg	C/mg	D(误差)	黏附力	累积释放度/%	总分
1	1 : 3 (1)	300 (1)	15 (1)	(1)	5	72.21	77.21
2	1 : 3 (1)	350 (2)	20 (2)	(2)	6	82.54	88.54
3	1 : 3 (1)	400 (3)	25 (3)	(3)	4	75.16	79.16
4	1 : 2 (2)	300 (1)	20 (2)	(3)	9	88.33	97.33
5	1 : 2 (2)	350 (2)	25 (3)	(1)	10	91.46	101.46
6	1 : 2 (2)	400 (3)	15 (1)	(2)	7	85.28	92.28
7	1 : 1.5 (3)	300 (1)	25 (3)	(2)	8	71.22	79.22
8	1 : 1.5 (3)	350 (2)	15 (1)	(3)	8	77.21	85.21
9	1 : 1.5 (3)	400 (3)	20 (2)	(1)	7	80.34	87.34

表 3 正交试验直观分析

Table 3 Visual analysis of orthogonal experiment

水平	黏附力				累积释放度			
	A	B	C	D	A	B	C	D
K_1	15	22	20	22	229.91	231.76	234.70	224.01
K_2	26	24	22	21	265.07	251.21	251.21	239.04
K_3	23	18	22	21	228.77	240.78	237.84	240.70
R	11	6	2	1	36.30	19.45	16.51	4.97

2.5.1 外观观察 对所制备药膜肉眼进行观察其柔软性, 均匀性, 光滑性, 揭取难易程度, 依据厚度不同, 每项得分 0~2.5 分, 计为外观观察值。

2.5.2 黏附力的测定 将待测膜用 502 胶贴于玻片 1 上, 取新鲜的鸡蛋壳膜用人工唾液浸泡约 30 min 后, 剪取 1 cm² 用 502 胶黏贴于玻片 2 上。用 1 滴人工唾液将玻片 1 待测膜表面润湿后, 迅速将黏有鸡蛋膜的玻片 2 覆盖于其上, 使鸡蛋膜与药膜紧密

表 4 方差分析结果

Table 4 Analysis of variance

误差来源	自由度	黏附力			累积释放度		
		偏差平方和	F 比	显著性	偏差平方和	F 比	显著性
A	2	21.555 6	97.000 0	$P < 0.05$	283.912 8	66.520 2	$P < 0.05$
B	2	6.222 2	28.000 0	$P < 0.05$	63.160 9	14.798 5	
C	2	0.888 9	4.000 0		51.244 1	12.006 4	
D(误差)	2	0.222 2			4.268 1		

$$F_{0.05}(2, 2)=19.00 \quad F_{0.01}(2, 2)=99.00$$

接触, 同时用 100 g 砝码压迫 5 min。5 min 后撤去外力, 调整输液流量为 2 滴/s, 称量玻片 2 脱落时塑料瓶中的水与玻片 2 的总质量, 即为药膜黏附力的大小, 黏附力在正交评价中用积分情况表述, 以 g/cm² 计, 0~10 g/cm² 为 1 分, 11~20 g/cm² 为 2 分, 21~25 g/cm² 为 3 分, 26~30 g/cm² 为 4 分, 31~35 g/cm² 为 5 分, 36~40 g/cm² 为 6 分, 41~45 g/cm² 为 7 分, 46~50 g/cm² 为 8 分, 51~55 g/cm² 为 9 分, 56~60 g/cm² 为 10 分, 计为黏附力值^[28]。

2.5.3 溶胀度测定 膜被剪裁成 1 cm² 大小, 称定质量, 放入 20 mL 人工唾液中, 将整体置于在 37 ℃, 50 r/min 恒温水浴振荡器中 2、5、10、20、40、60、120、240 min, 用滤纸吸干膜表面多余水分, 称定质量, 按照公式计算溶胀度 (SR)。

$$SR = (W_t - W_0) / W_0$$

W_0 为干燥膜的质量, W_t 为 t 时刻膜的质量

2.5.4 载药量的测定 取 CM-BSP-CS@Cur PCF 0.5 cm², 称定质量后剪碎至 50 mL 量瓶中, 先加入

2.5 mL 纯化水使其充分溶胀后加无水乙醇至刻度，超声使 Cur 充分溶解，0.45 μm 微孔滤膜滤过，测定 A 值，按标准曲线所得回归方程计算药物质量浓度，按公式计算载药量。

$$\text{载药量} = W_{\text{膜剂中药量}} / W_{\text{投药量}}$$

(1) 检测波长的确定：取 Cur 对照品及空白膜剂适量，用无水乙醇溶解并稀释至适当质量浓度后滤过，在 200~800 nm 波长进行紫外扫描。Cur 对照品在 422 nm 有最大吸收且空白膜液无吸收，因此确定 422 nm 为 Cur 检测波长。

(2) 线性关系考察：无水乙醇配制 0.1 mg/mL Cur 对照品溶液 50 mL，加无水乙醇配制成 0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8 mL 至 25 mL 量瓶中用无水乙醇定容，分别测定 422 nm 处 A 值。以对照品溶液的 A 值 (Y) 对其质量浓度 (X) 进行线性回归，得回归方程 $Y = 146.46X + 0.0166$ ， $r^2 = 0.9985$ 。结果表明 Cur 在 0.8~3.2 $\mu\text{g/mL}$ 与 A 值呈良好的线性关系。

2.5.5 药物体外释放度的测定 在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下在 50 mL 人工唾液中溶解，并以 50 r/min 振荡。将贴剂 (1 cm^2) 漂浮在溶解介质中，振荡，每隔一段时间取出 5 mL 溶液，利用紫外分光光度法进行测量并计算溶液中药物的含量。取样后及时补充相应体积的缓冲液。

2.5.6 结果分析 根据表 2 条件制备 CM-BSP-CS@Cur PCF，并测定黏附力与体外累积释放度，结果见表 2，方差分析结果见表 4。

由表 3 直观分析可知， $A > B > C$ ，其中 $A_2 > A_3 > A_1$ ， $B_2 > B_3 > B_1$ ， $C_2 > C_3 > C_1$ ，即 CM-BSP 与 CS 二者比例对黏附力和释放度影响最大，其次是二者总量，最后是投药量。由表 4 可以看出，CMBSP 与 CS 二者比例和二者总量对黏附力的影响具有显著性差异 ($P < 0.05$)，投药量在所选水平上无显著性差异；CM-BSP 与 CS 二者比例对体外累积释放度的影响具有显著性差异 ($P < 0.05$)，二者总量与投药量在所选水平上无显著性差异。因此，最优工艺条件为 $A_2B_2C_2$ ，即 CM-BSP 117 mg，CS 233 mg，Cur 20 mg，甘油用量 25%。

2.6 验证实验

结合既定的工艺和参数，按照最佳处方和制备工艺条件，制备 3 批载药聚电解质复合膜，观察和测定各项指标，结果见表 5。由表 5 可知，在优化工艺条件下的黏附力为 10 分，平均累积释放度为

表 5 验证实验结果 ($n = 3$)

Table 5 Results of verification test ($n = 3$)

编号	厚度/ μm	外观	黏附力	载药量/	溶胀度/	体外累积
				%	%	释放度/%
1	74.4 ± 5.4	10	10	96.24	236	93.25
2	74.0 ± 2.0	10	10	95.45	244	94.38
3	73.2 ± 6.9	10	10	94.55	233	93.72

93.78%，而且较为稳定，其余指标均较为理想，说明该方法可行，工艺的重复性良好。

2.7 CM-BSP-CS@Cur PCF FT-IR 分析

取适量 CM-BSP-CS@Cur PCF 样品，放入 FT-IR 中，4 000~400 cm^{-1} 波数扫描，分辨率 4 cm^{-1} ，扫描次数 32 次。结果见图 5。CS 在 1 652、1 598、1 320 cm^{-1} 有特征吸收峰，分别代表酰胺 I 带、酰胺 II 带、酰胺 III 带。其中 1 652、1 598 cm^{-1} 的吸收峰有部分重叠，CM-BSP 不对称和对称振动吸收峰分别在 1 593、1 417 cm^{-1} 。CS 与 CM-BSP 相互作用形成聚电解质复合物后，由于氨基与羧基间离子键及基团间氢键的形成，CS 在 1 652、1 598 cm^{-1} 处的条带重叠，1 320 cm^{-1} 酰胺 III 吸收峰消失。最初存在于 CM-BSP 中的 1 593、1 417 cm^{-1} 的峰被扩展并移至 1 623、1 417 cm^{-1} 。综合显示 CS 的氨基在酸性条件下变成 NH_3^+ ，与 CM-BSP 上的羧基负离子产生强的静电作用而生成聚电解质复合物。

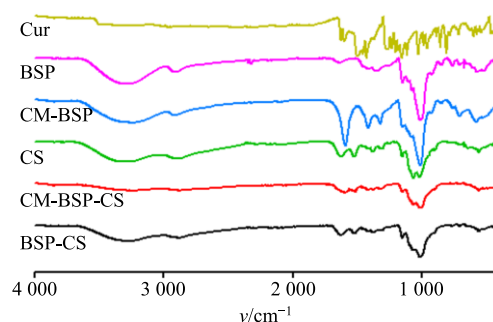
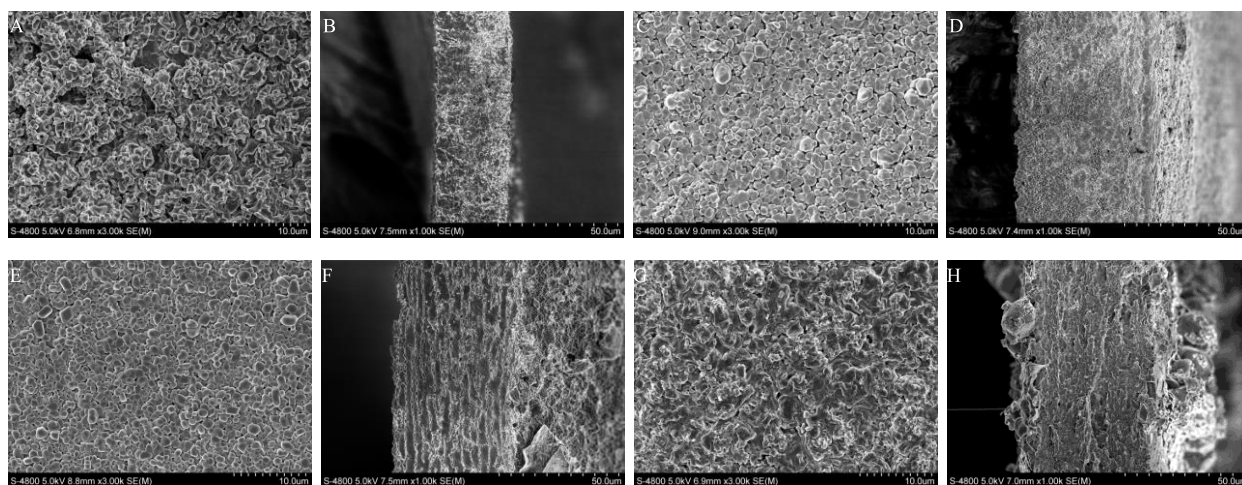


图 5 载药膜的 FT-IR 图

Fig. 5 FT-IR spectra of drug-loaded membranes

2.8 CM-BSP-CS@Cur PCF SEM 分析

取适量膜剂样品于样品台上，置于离子溅射仪中镀一层导电金膜后，进行观察。结果见图 6。由 SEM 图可见，从平面和截面上看 CS 药膜，CM-BSP 和 BSP-CS 药膜均由规则的、大小均一的颗粒状均匀而密集的聚合在一起；而 CM-BSP-CS@Cur PCF 则具有纤维状的不规则表面和内部结构，不出现相分离。



A、C、E、G 分别为 CS 载药膜、CM-BSP 载药膜、BSP-CS 载药膜、CM-BSP-CS 载药膜的平面图 B、D、F、H 分别为 CS 载药膜、CM-BSP 载药膜、BSP-CS 载药膜、CM-BSP-CS 载药膜的截面图

A, C, E, G are plane diagram of CS drug-loaded membrane, CM-BSP drug-loaded membrane, BSP-CS drug-loaded membrane, CM-BSP-CS drug-loaded membrane B, D, F, H are section diagram of CS drug-loaded membrane, CM-BSP-CS drug-loaded membrane, BSP-CS drug-loaded membrane

图 6 载药膜扫描电镜图

Fig. 6 SEM of drug-loaded membranes

3 讨论

在单因素考察的基础上,选择对 CM-BSP-CS@Cur PCF 黏附力与体外累积释放度影响最显著的因素进行正交试验设计,优选出最佳处方为 CM-BSP 117 mg、CS 233 mg、Cur 20 mg、甘油用量 25%。通过验证发现该处方与工艺优越、合理、可重复性高,可作为筛选处方和工艺的一种切实有效的手段。

本实验采用生物可降解性的 BSP 和 CS 为原材料,通过对 BSP 进行羧甲基化修饰后与带正电的 CS 通过 $-NH_3^+$ 与 $-CH_2COO^-$ 之间的静电作用形成水不溶性的聚电解质复合物,成功制备了用于口腔溃疡应用的载有 Cur 的 CM-BSP-CS 聚电解质复合药膜。拓宽了白及多糖的应用范围和口腔溃疡的剂型范围,同时也为其他剂型的开发与应用提供了新的选择与方向。

参考文献

- [1] 朱诗竟,李淞明,詹常森. 口腔黏膜给药系统研究进展 [J]. 中成药, 2018, 40(10): 2266-2271.
- [2] 魏欣欣,刘帮国,李明春,等. 牙周局部缓释药物治疗牙周炎的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(17): 1524-1529.
- [3] 肖 启. 海藻酸钠-壳聚糖聚电解质复合物超微结构及其稳定性研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2018.
- [4] Wang C, Luo W F, Li P W, *et al.* Preparation and evaluation of chitosan/alginate porous microspheres/*Bletilla striata* polysaccharide composite hemostatic sponges [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 174: 432-442.

- [5] 陈思思,吴 蓓,谭 婷,等. 白及多糖 BSP-1 的分离纯化、结构表征及抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(8): 1921-1926.
- [6] 陈正坤,王嘉兴,林 平,等. 白及多糖在药剂领域的应用 [J]. 中南药学, 2019, 17(1): 74-77.
- [7] 吴雨佳,王令充,张 雯,等. 生物黏附性三七总皂苷-白及多糖-海藻酸钠复合微球的制备及表征 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4896-4903.
- [8] 韩 丹. 白及多糖的提取分离、分子量测定及结构研究 [D]. 延边: 延边大学, 2013.
- [9] 党婷婷,王 济,唐 鹏,等. 活性氧响应的白及多糖载药胶束制备及其表征 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5548-5553.
- [10] 马世宏,金 玲,王守香,等. 中药白及在牙膏中的应用研究 [J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(3): 32-35.
- [11] 李雨秋,温华强,马家骅,等. 蛭螭疏水壳聚糖的制备及其止血活性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1141-1144.
- [12] Bao Y, Zhang H, Luan Q, *et al.* Fabrication of cellulose nanowhiskers reinforced chitosan-xylan nanocomposite films with antibacterial and antioxidant activities [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 184: 66-73.
- [13] Gjoseva S, Geskovski N, Szadovska S D, *et al.* Design and biological response of doxycycline loaded chitosan microparticles for periodontal disease treatment [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 186: 260-272.
- [14] 颜 洁,关志宇,朱卫丰,等. Box-Behnken 效应面法优化自组装法制备葛根素壳聚糖/海藻酸钠口服纳米粒的处方与工艺研究 [J]. 中草药, 2019, 50(23):

- 5706-5713.
- [15] 邹 竞, 肖惠宁, 何北海, 等. 壳聚糖纳米微粒的制备及其载药性能 [J]. 造纸科学与技术, 2017, 36(2): 30-34.
- [16] 张少波, 孔艳玲, 赵云峰. 姜黄素对肺纤维化小鼠的保护作用及其机制研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(11): 2141-2146.
- [17] 苗淑涵, 高晋生. 姜黄素药理作用的研究进展 [J]. 光明中医, 2017, 32(15): 2284-2287.
- [18] 肖长杰. 姜黄素对大鼠实验性牙周炎的作用及相关机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [19] Deshmukh R A, Bagewadi A S. Comparison of effectiveness of curcumin with triamcinolone acetonide in the gel form in treatment of minor recurrent aphthous stomatitis: A randomized clinical trial [J]. *Int J PharmInvestig*, 2014, 4(3): 138-141.
- [20] Silva D A, De Paula R C M, Feitosa P A, *et al.* Carboxymethylation of cashew-tree exudates polysaccharide [J]. *Carbohydr Polym*, 2004, 58(2): 163-171.
- [21] 谢建华. 青钱柳多糖的分子修饰及其生物活性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [22] Gierszewska M, Ostrowska-Czubenko J, Chrzanowska E. pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by tripolyphosphate [J]. *Eur Polym J*, 2018, 101: 282-290.
- [23] 刘晓宇. 黄药子中性多糖的结构分析及其抗肿瘤活性研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2013.
- [24] 焦中高. 红枣多糖的分子修饰与生物活性研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012.
- [25] Jin Y, Zhang H, Yin Y, *et al.* Comparison of curdlan and its carboxymethylated derivative by means of Rheology, DSC, and AFM [J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341(1): 90-99.
- [26] Muge K, Miray I, Ozge I, *et al.* Preparation and evaluation of clindamycin phosphate loaded chitosan/alginate polyelectrolyte complex film as mucoadhesive drug delivery system for periodontal therapy [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 123: 441-451.
- [27] 孟 欣. 壳聚糖-海藻酸钠聚电解质膜的制备及性能调控研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2010.
- [28] 赵锐帆, 潘 雯, 冯 斌, 等. 盐酸米诺环素单向释放膜的制备及质量控制 [J]. 中南药学, 2017, 15(2): 187-191.