

基于羧甲基壳聚糖-氧化透明质酸自组装行为构建的 pH 响应型纳米乳水凝胶给药系统

汤小涵^{1,2}, 王哲², 闫巧², 秦祉剑¹, 袁海龙^{1,2*}

1. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

2. 空军特色医学中心 药学部, 北京 100142

摘要: 目的 基于羧甲基壳聚糖 (carboxymethyl chitosan, CMC)-氧化透明质酸 (oxidized hyaluronic acid, OHA) 的自组装行为, 构建一种用于局部递送难溶性药物的 pH 响应型纳米乳水凝胶给药系统。方法 采用自乳化法制备丹参酮 II_A (tanshinone II_A, Tan II_A) 纳米乳, 通过平衡溶解度的考察和伪三元相图的绘制优化纳米乳处方, 对纳米乳进行理化性质考察。高碘酸钠氧化法制备 OHA, 以成胶时间为指标优选 CMC 和 OHA 的浓度。将 OHA 溶解于纳米乳中与 CMC 溶液自组装形成 Tan II_A 纳米乳水凝胶 (CMC-OHA/Tan II_A-NBHs)。对得到的 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 进行理化性质和体外抑菌活性评价。结果 优化处方可制备得到 O/W 型 Tan II_A 纳米乳, 粒径为 (52.18±0.15) nm, PDI 为 0.165±0.012。自组装得到的 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 具有良好的稳定性、酸响应性和药物缓释性能。抑菌圈实验表明 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 体外可显著抑制痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的生长。结论 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 制备方法简便、稳定性好, 可以有效改善难溶性药物的体外溶出行为, 为纳米乳局部递送难溶性药物提供了新的思路和方法。

关键词: 自组装; 水凝胶; 药物递送; pH 响应性; 缓释; 丹参酮 II_A

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)16-4992-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.16.008

pH-responsive nanoemulsion hydrogel drug delivery system based on self-assembly behavior of carboxymethyl chitosan-oxidized hyaluronic acid

TANG Xiao-han^{1,2}, WANG Zhe², YAN Qiao², QIN Zhi-jian¹, YUAN Hai-long^{1,2}

1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. Department of Pharmacy, Air Force Medical Center, PLA, Beijing 100142, China

Abstract: Objective To construct a pH-responsive nanoemulsion hydrogel drug delivery system based on the self-assembly behavior of carboxymethyl chitosan (CMC)-oxidized hyaluronic acid (OHA) for the topical delivery of in poor solubility drugs. **Methods** The optimum prescription of nanoemulsion was determined according to the amount of tanshinone II_A (Tan II_A) dissolved in various excipients and the pseudo-ternary phase diagram and the physicochemical properties of the nanoemulsion were investigated. Furthermore, OHA was prepared by sodium periodate oxidation and the concentration of CMC and OHA is optimized by using the gel formation time as an indicator. CMC-OHA Tan II_A nanoemulsion-based hydrogels (CMC-OHA/ Tan II_A-NBHs) were prepared by dissolving OHA in nanoemulsion and self-assembling the mixture with CMC solution. Physicochemical properties and *in vitro* antibacterial activity of CMC-OHA/Tan II_A-NBHs were observed and detected. **Results** The mean particle size of the prepared Tan II_A nanoemulsion was (52.18 ± 0.21) nm and PDI was 0.165 ± 0.012. The *in vitro* evaluation results showed CMC-OHA/Tan II_A-NBHs had good centrifugal stability, light stability, pH responsiveness, and sustained-release properties. The bacterial inhibition ring test showed that CMC-OHA/TanII_A-NBHs could significantly inhibit the growth of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus in vitro*. **Conclusion** With the advantages of simple preparation and good stability, CMC-OHA/Tan II_A-NBHs could effectively improve the *in vitro* dissolution behavior of insoluble drugs, providing a new idea and method for topical delivery of poorly soluble drugs by nanoemulsion.

收稿日期: 2022-02-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81873092)

作者简介: 汤小涵, 硕士研究生, 研究方向为中药新型给药系统研究。E-mail: 3206820156@qq.com

*通信作者: 袁海龙, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新型给药系统研究。Tel: (010)66928505 E-mail: yhlpharm@126.com

Key words: self-assembly; hydrogel; drug delivery; pH-sensitive; sustained-released; tanshinone II_A

透明质酸是一种广泛分布于人体组织细胞外基质中的成分,具有良好的生物相容性和生物降解性^[1]。氧化透明质酸(oxidized hyaluronic acid, OHA)是透明质酸氧化后的产物,其分子中的活泼醛基能与羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMC)中的氨基发生席夫碱反应自组装生成水凝胶(CMC-OHA hydrogels)^[2-3]。这种自组装水凝胶具有很好的抗菌性、生物降解性和无毒性,并可在微酸性环境下断裂席夫碱键从而释放药物,具有一定的酸响应性,适合人体皮肤的微酸性环境,在医药、食品、包装、环保等领域有着广阔的应用前景^[4-5]。这种水凝胶的载药方式通常是将固化后的药物粉末添加至CMC或OHA的前体溶液,通过前体溶液的自组装完成载药,制备过程复杂,且不适用于难溶性药物的应用^[6-7]。因此本实验拟构建一种以纳米化的液体制剂本身作为前体溶液利用CMC和OHA的自组行为形成水凝胶的新型给药系统。

丹参酮II_A(tanshinone II_A, TanII_A)作为中药丹参中的主要活性成分,对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌有较好的抑制作用,但由于Tan II_A属于BCS II类药物,水溶性极差(2 μg/mL),严重影响了其在临床上的使用效果^[8]。因此本研究以Tan II_A为模型药物,制备了粒径小、分散均匀的Tan II_A纳米乳,然后将OHA溶于Tan II_A纳米乳形成药物前体溶液,与CMC溶液自组装形成Tan II_A纳米乳水凝胶给药系统(CMC-OHA Tan II_A nanoemulsion-based hydrogels, CMC-OHA/Tan II_A-NBHs),并对其稳定性、pH响应性和体外抑菌活性进行评价,为功能型水凝胶递送难溶性药物的研究提供新思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

DF101S型集热式恒温加热磁力搅拌器,北京恒丰长伟科技有限公司; Winner802型纳米激光粒度仪,济南微纳颗粒仪器股份有限公司; Tecnai G2 F30型场发射透射电子显微镜(TEM),美国FEI公司; KQ-100E型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; BT125D型电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司; TGL-16G型台式离心机,上海安亭科学仪器厂; LC-20A型高效液相色谱系统,日本岛津公司; Nicolet-5799型傅里叶红外光谱仪,美国热力公司; ZRS-8G型智能溶出试验仪,天津市天

大天发科技有限公司。

1.2 材料

Tan II_A原料药,质量分数95%,西安鸿生生物技术有限公司,批号150301; Tan II_A对照品,质量分数98%,中国食品药品检定研究院,批号110766-201520; 蓖麻油,湖南尔康制药股份有限公司; 油酸乙酯,国药集团化学试剂有限公司; 肉豆蔻酸异丙酯(isopropyl myristate)、聚氧乙烯蓖麻油(cremophor EL, CEL)购自长沙研邦化工科技有限公司; 聚氧乙烯氢化蓖麻油(cremopher RH 40, CRH),北京凤礼精求商贸有限责任公司; 乙醇、聚山梨酯80、聚乙二醇(PEG)400购自天津市复复精细化工研究所; 甘油、1,2-丙二醇购自北京化工厂; 辛癸酸甘油酯, Sigma 生物科技有限公司; 磷酸,天津福晨试剂厂; 色谱甲醇, Fisher Chemical公司; 蒸馏水由实验室超纯水机生产; 痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌标准株及培养基购自西安国联质量检测技术股份有限公司。

2 方法

2.1 Tan II_A HPLC分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Inerteil ODS-3柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(85:15); 柱温30℃; 体积流量1 mL/min; 检测波长270 nm; 进样量20 μL^[9]。

2.1.2 溶液的配制

(1) 对照品溶液的制备: 精密称定5.00 mg对照品Tan II_A置于10 mL量瓶中,加适当甲醇溶解后,甲醇定容至刻度得质量浓度为500 μg/mL的对照品储备液。精密吸取对照品储备液适量,用甲醇按不同比例稀释,得质量浓度为1.00、2.00、4.00、8.00、10.00、20.00、40.00 μg/mL系列对照品溶液。

(2) 供试品溶液的配制: 精密称取Tan II_A纳米乳1.0 g于50 mL量瓶中,加甲醇超声破乳,定容得母液; 再精密量取0.5 mL母液于10 mL量瓶中加甲醇定容,摇匀得Tan II_A纳米乳供试品溶液。

(3) 阴性对照溶液的配制: 精密称取空白纳米乳1.0 g于25 mL量瓶中,甲醇超声破乳,定容得母液; 精密量取0.5 mL母液至10 mL量瓶中加甲醇定容,摇匀得阴性对照溶液。

2.1.3 专属性考察 分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,0.22 μm微孔滤膜滤过后,按

“2.1.1”项下条件测定。图1显示, Tan II_A峰形对称且达到基线分离, 供试品与对照品溶液中 Tan II_A保留时间基本一致, 纳米乳辅料和水凝胶基质对测定无干扰。

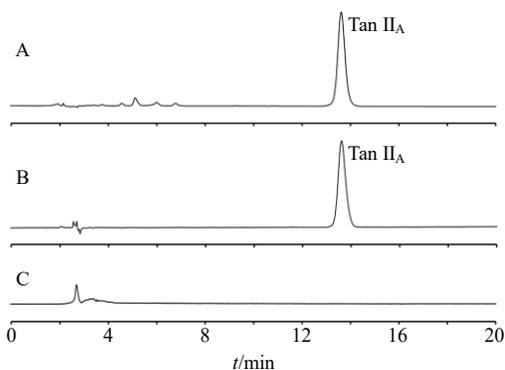


图1 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs (A)、Tan II_A对照品 (B) 和空白纳米乳水凝胶 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC diagrams of CMC-OHA/Tan II_A-NBHs (A), Tan II_A sample (B), and blank nanoemulsion hydrogel (C)

2.1.4 线性关系考察 以 Tan II_A 质量浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=127\ 733 X+28\ 346$, $r=0.999\ 6$, 表明 Tan II_A 在质量浓度为 1.00~40.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.2”项下质量浓度为 8.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Tan II_A 对照品溶液, 按“2.1.1”项下的色谱条件进样分析, 计算精密度。结果显示 Tan II_A 峰面积 RSD 为 1.35%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 吸取“2.1.2”项下的供试品溶液适量, 分别于 0、2、4、6、8、16、24 h 按“2.1.1”项下的色谱条件进样分析。结果显示 Tan II_A 峰面积 RSD 为 0.83%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批的 Tan II_A 纳米乳 3 份, 每个样品按“2.1.2”项下供试品的制备方法平行配制 6 个样品, 共制备 18 个样品, 按“2.1.1”项下的色谱条件进样分析, 记录峰面积。结果 RSD 为 1.38%, 表明此方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 按“2.1.2”项下供试品的制备方法制备供试品溶液 9 份, 分别加入对照品储备液适量, 配制成质量浓度为 12.85、14.35、15.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算加样回收率。结果低、中、高不同质量浓度的平均回收率分别为 99.53%、100.07%、99.03%, RSD 值均小于 1.5%。表明回收率符合要求。

2.2 Tan II_A 在纳米乳成分中的溶解度测定

取各辅料 1.00 g 于 2 mL 离心管中, 分别加入过量 Tan II_A, 涡旋混匀 5 min 后超声 4 h 助溶, 静置过夜后, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液用甲醇稀释至适当质量浓度, 过 0.22 μm 微孔滤膜后, 使用 HPLC 法测定 Tan II_A 在各辅料中的平衡溶解度^[10]。平衡溶解度测定结果如图 2 所示, 结合辅料的性质, 初步选择对 Tan II_A 溶解度大的聚山梨酯 80 和 PEG 400 作为纳米乳的乳化剂和助乳化剂, 辛酸甘油酯为油相。

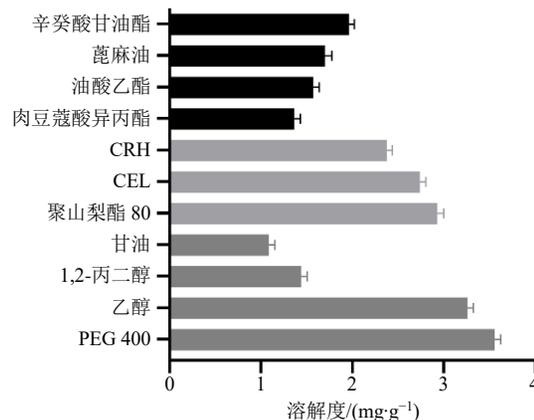


图2 Tan II_A 在不同辅料中的溶解度

Fig. 2 Solubility of Tan II_A in different excipients

2.3 伪三元相图的绘制及 K_m 值的确定

将确定的乳化剂 (聚山梨酯 80) 和助乳化剂 (PEG 400) 分别按质量比 (K_m) 为 3:1、2:1、1:1、1:2 的比例混合, 然后将油相和混合乳化剂按 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 的比例加入西林瓶中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下搅拌 15 min 混匀, 缓慢滴加蒸馏水继续搅拌直至形成澄清透明的纳米乳, 记录体系从黏稠变为流动性良好时的临界点用水量, 以该点为相图中可形成纳米乳的边界点。用 Origin 7.5 软件绘制伪三元相图, 比较不同比例油相、乳化剂、助乳化剂所形成纳米乳区域的大小。结果如图 3 所示, K_m 值 (聚山梨酯 80 和 PEG 400 的质量比) 为 2:1 时, 该体系形成的纳米乳区面积最大。根据伪三元相图确定聚山梨酯 80 和 PEG 400 比例为 2:1。

2.4 Tan II_A 纳米乳的制备

按处方量加入乳化剂、助乳化剂、油相和 Tan II_A 原料药粉末, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下 600 r/min 搅拌 15 min 混匀, 缓慢滴加 1 mL 蒸馏水, 即得 Tan II_A 纳米乳。取同法制备的空白纳米乳于西林瓶中, 不同比例油相形成的纳米乳放置 7 d 后观察乳液形态, 结果显

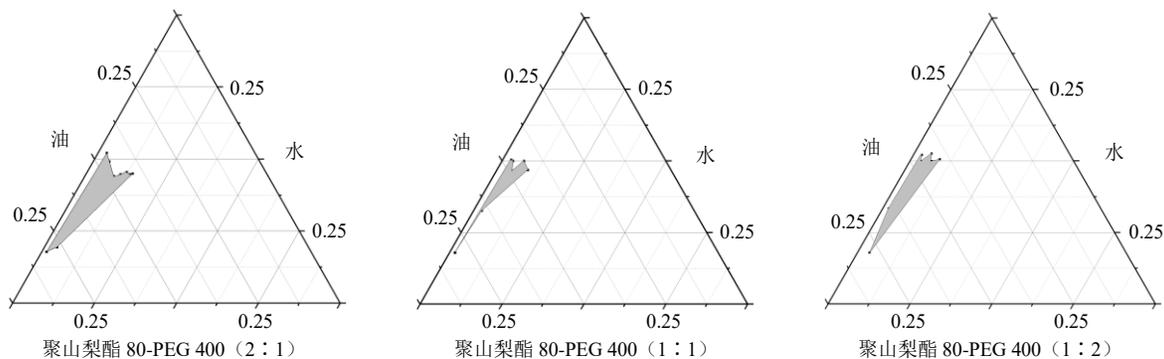


图3 不同 K_m 值的伪三元相图

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagrams of different K_m values

示辛酸甘油酯与混合乳化剂的比例为 1 : 9 时形成的乳液更加稳定, 没有出现分层, 絮凝或粒径增大的情况。最终确定 Tan II_A 纳米乳的最佳处方为聚山梨酯 80-PEG 400-辛酸甘油酯 (6 : 3 : 1)。

2.5 Tan II_A 纳米乳的表征

为鉴定纳米乳的类别分别加入适量苏丹红和亚甲蓝染料, 静置 3 min 后观察 2 种染料的扩散速度。如图 4-A 所示, 最优处方制备的 Tan II_A 纳米乳为澄清透明的橙红色液体, 没有沉淀或絮凝。如图 4-B 和 4-C 所示, 亚甲蓝的扩散速度快于苏丹红, 表明所制备的 Tan II_A 纳米乳为水包油型。

取 Tan II_A 纳米乳稀释 20 倍后用激光粒度分析仪测定其平均粒径。粒径测定结果 (图 5) 表明, Tan II_A 纳米乳粒径为 (52.18 ± 0.21) nm, 多分散系

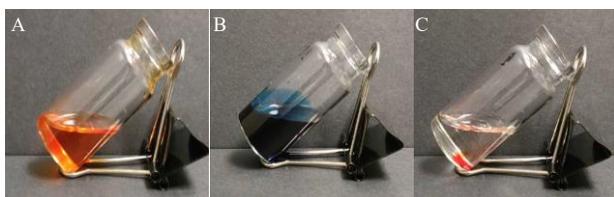


图4 Tan II_A 纳米乳的外观 (A) 及鉴定研究示意图 (B, C)
Fig. 4 Appearance (A), diagram of identification (B, C) of Tan II_A nanoemulsion

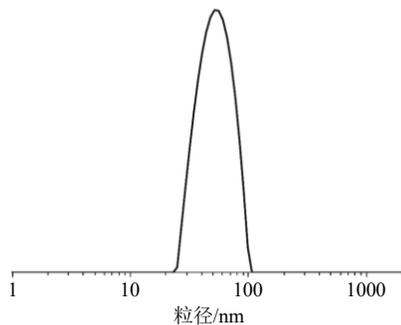
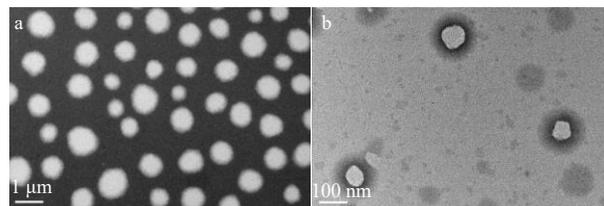


图5 Tan II_A 纳米乳的粒径分布

Fig. 5 Particle size of Tan II_A nanoemulsion

数为 0.165 ± 0.012 , 说明该处方制备的纳米乳粒径小, 分布范围窄, 是均一稳定的分散体系。

将 Tan II_A 纳米乳稀释 5 倍和 20 倍后滴于覆有支持膜的铜网上, 滤纸吸去多余液体后, 静置 10 min 自然晾干, 再滴加入质量浓度为 10 mg/mL 的磷钨酸溶液于铜网上负染 10 min, 自然挥干, TEM 观察纳米乳外观。Tan II_A 纳米乳的形态可见图 6-a、b 所示, 稀释倍数为 5 倍时 Tan II_A 纳米乳的乳滴大多团聚在一起, 粒径大小均在 1 μm 内, 稀释倍数为 20 倍时 Tan II_A 纳米乳的乳滴被均匀分散, 呈类圆形, 粒子间无黏连。



a-5 倍稀释 b-20 倍稀释
a-5 times dilution b-20 times dilution

图6 Tan II_A 纳米乳的 TEM 图

Fig. 6 TEM diagrams of Tan II_A nanoemulsion

2.6 氧化透明质酸的制备和表征

采用高碘酸钠氧化法制备 OHA^[11], 将 2.00 g 透明质酸溶于 50 mL 蒸馏水中, 37 °C 水浴以 600 r/min 的速度搅拌直至完全溶解, 室温冷却后加入 1.30 g 高碘酸钠, 在 25 °C 水浴条件下持续搅拌 12 h 后, 加入 1 mL 乙二醇淬灭未反应的高碘酸钠, 继续搅拌 1 h, 随后将产物装入透析袋 (截留相对分子质量 3500), 以蒸馏水透析 48 h, 然后冷冻干燥得到 OHA。

取少许新鲜制备的 OHA 于研钵中, 加入 100 倍左右的溴化钾粉末, 研磨后压片利用红外吸收光谱对合成产物进行表征。结果如图 7 所示, 与 HA

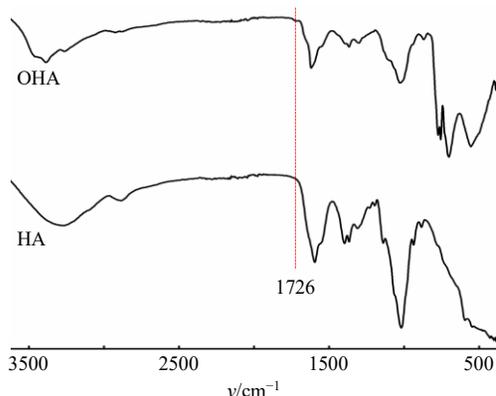


图7 HA和OHA的FT-IR图

Fig. 7 FT-IR spectra of HA and OHA

的红外光谱图对比, 1726 cm^{-1} 处醛基的特征吸收峰表明使用该方法成功制备 OHA。

2.7 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的制备

2.7.1 成胶时间的测定和空白水凝胶基质的选择
采用倾斜法测定成胶时间, OHA 和 CMC 溶液接触后开始计时, 然后倾斜西林瓶, 观察溶液的流动情况, 待倾斜西林瓶时体系不再流动则停止计时, 该时间即为成胶时间。以成胶时间为评价指标, 优化凝胶的处方比例。取制备好的 OHA 粉末溶解在蒸馏水中, 形成质量浓度为 10、20、30 mg/mL 的均匀溶液; CMC 溶解在蒸馏水中, 形成质量浓度为 10、20、30、40 mg/mL 的均匀溶液。将等体积的 OHA 和 CMC 溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下混合均匀, 并保持在 37 $^{\circ}\text{C}$ 直至成胶。形成的空白基质根据组成基

质的初溶液质量浓度进行命名, 例如 20 mg/mL 的 OHA 溶液和 30 mg/mL 的 CMC 溶液形成的空白基质命名为 O2C3。各组水凝胶的成胶时间和混合 1 min 时的成胶状态见图 8、9。可以发现 OHA 和 CMC 的质量浓度均对凝胶的成胶时间有显著影响, 随着二者质量浓度的增大凝胶时间逐渐缩短。当 OHA 质量浓度和 CMC 质量浓度均为 10 mg/mL 时, 无法形成稳定的水凝胶。当 OHA 质量浓度为 10 mg/mL , 随着 CMC 的质量浓度由 20 mg/mL 增大到 40 mg/mL , 成胶时间由 261.67 s 缩短至 176.33 s。当 OHA 质量浓度为 30 mg/mL 时, 随着 CMC 的质量浓度由 10 mg/mL 增大到 40 mg/mL , 成胶时间进一步由 152.00 s 缩短至 24.00 s。进一步提高质量浓度会延长前体溶液的制备时间, 导致总制备时间增大, 因此, 最终优选 O3C4 进行后续研究。

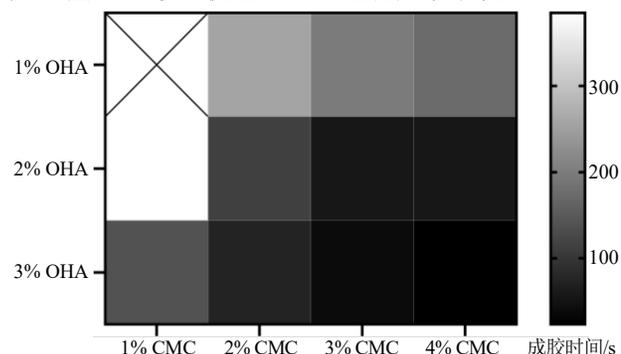


图8 不同质量分数 CMC 和 OHA 形成水凝胶的成胶时间
Fig. 8 Gelation time of hydrogels formed with different concentrations of CMC and OHA

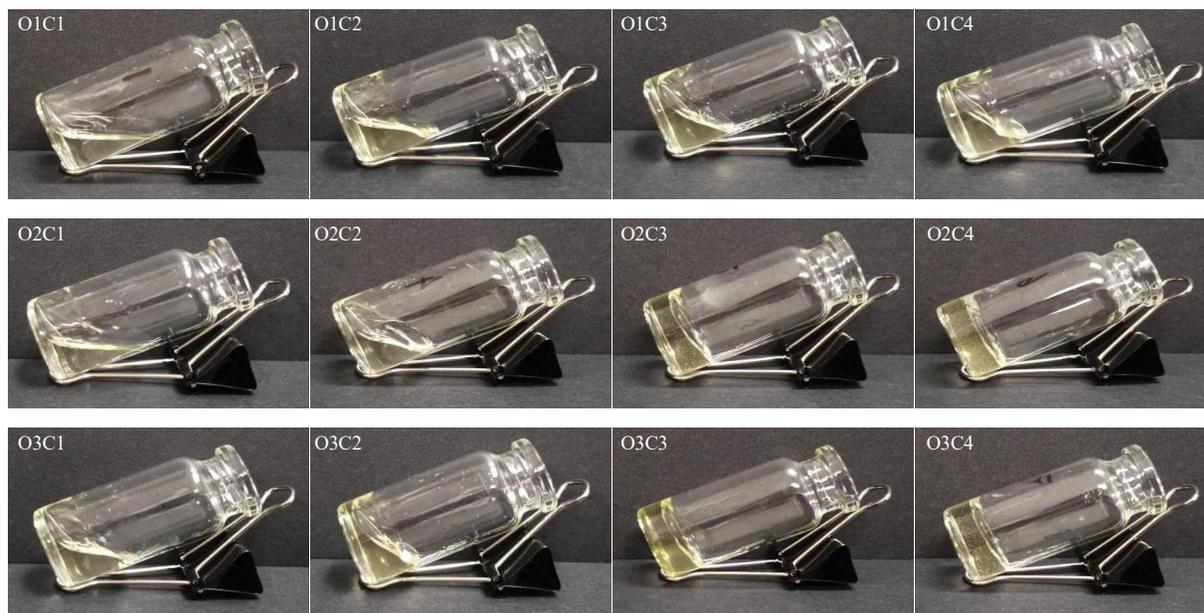


图9 1 min 时各组水凝胶的状态

Fig. 9 State of different groups of hydrogels in 1 min

2.7.2 载药水凝胶的制备和载药量的测定 取制备好的 OHA 粉末用 Tan II_A 纳米乳溶解, 随后与等体积的 CMC 溶液在 37 °C 水浴下混合均匀直至成胶, 即得 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs。最佳处方制备得到的 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 可见图 10, 其外观均匀且成胶性能良好。经测定, CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的成胶时间为 (24.32±0.03) s, 与 O3C4 空白水凝胶基质的成胶时间没有显著性差异。取 1.00 g CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 置于 10 mL 量瓶中, 加入适量甲醇超声 15 min 后用甲醇定容至刻度, 过 0.22 μm 滤膜后用 HPLC 法测得 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 中 Tan II_A 的质量分数为 1.0 mg/g。

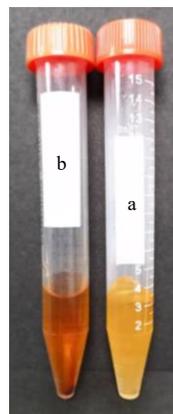


图 10 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的外观
Fig. 10 Appearance of CMC-OHA/Tan II_A-NBHs

2.8 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的稳定性考察

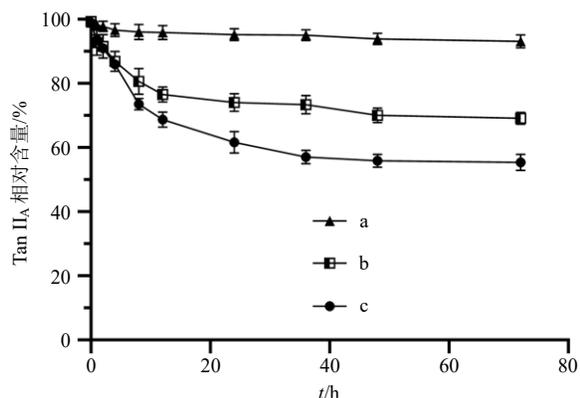
2.8.1 离心稳定性 将 Tan II_A 和 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 以 8000 r/min 的速度离心 20 min, 观察离心后其外观是否有变化^[12]。离心稳定性结果如图 11 所示, 8000 r/min 离心 20 min 后 Tan II_A 纳米乳 (b) 仍澄清透明, 未产生分层破乳现象, 但有少量药物析出沉积在底部, 而 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs (a) 经过离心处理没有药物析出, 表明 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 离心稳定性良好。

2.8.2 光稳定性 Tan II_A 作为一种具有醌式结构的化合物, 易被氧化, 并有研究显示其光稳定性较差, 因此对 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs (a) 的光稳定性进行了考察, 与 Tan II_A 纳米乳 (b) 和 Tan II_A 乙醇溶液 (c) 进行对比。将 Tan II_A 乙醇溶液、Tan II_A 纳米乳和 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 置于透明西林瓶中, 于 25 °C、日光灯下 (4500 lx) 保存。分别于 0、1、2、4、8、12、24、36、48、72 h 取样 0.50 g, 用甲醇稀释并超声后定容至刻度, 过 0.22 μm 滤膜后用 HPLC 法测定 Tan II_A 含量。如图 12 所示, 在 25 °C、日光灯下 (4500 lx) 保存 3 d 后, Tan II_A 乙醇溶液中 Tan II_A 的含量下降了 44.66%, Tan II_A



a-CMC-OHA/Tan II_A-NBHs b-Tan II_A 纳米乳
a-CMC-OHA/Tan II_A-NBHs b-Tan II_A nanoemulsion

图 11 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的离心稳定性
Fig. 11 Centrifugal stability of CMC-OHA/Tan II_A-NBHs



a-CMC-OHA/Tan II_A-NBHs b-Tan II_A 纳米乳 c-Tan II_A 乙醇溶液
a-CMC-OHA/Tan II_A-NBHs b-Tan II_A nanoemulsion c-Tan II_A ethanol solution

图 12 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的光稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 12 Light stability of CMC-OHA/Tan II_A-NBHs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

纳米乳含量下降了 30.92%, 而 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 中 Tan II_A 含量变化最小, 仅下降了 6.92%。说明将 Tan II_A 制备成纳米乳水凝胶能显著提升其光稳定性。

2.8.3 长期稳定性 将 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 置于密闭器皿中, 于 4、25、40 °C 不同温度条件下避光放置, 在 0、3、7、14、21、30 d 取样, HPLC 法测定 Tan II_A 的含量。如图 13 所示, 于 4 °C 和 25 °C 条件下储存的 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 在 30 d 内 Tan II_A 质量分数分别下降 2.82% 和 2.99%, 在 40 °C 条件下储存的 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 在 30 d 内 Tan II_A 含量下降 8.48%。因而 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 在室温或冷藏的避光储存条件下具备较好的药物稳定性, 但热稳定性较差。

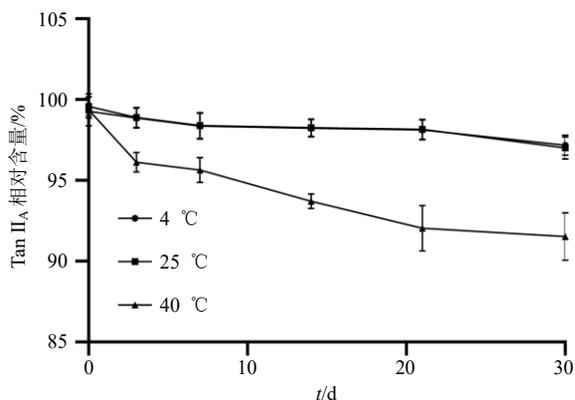


图 13 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的长期稳定性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 13 Long-term storage stability of CMC-OHA/Tan II_A-NBHs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.9 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的体外响应性释放

采用透析袋法考察 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 在 pH 为 5.0、5.5、7.4 的 PBS 缓冲溶液中的释放。取 10.00 g CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 于活化好的透析袋（截留相对分子质量 14 000）中，两端夹紧，置于盛有 200 mL PBS 的溶出杯中，温度为 37 °C，转速为 100 r/min，分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、32、48、54、72 h 取样 0.5 mL，同时补充同温同体积的溶出介质，样品用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过，HPLC 法测定 Tan II_A 含量，并计算 Tan II_A 累积释放量。CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的体外响应性释放结果如图 14 所示，在 pH 5.0、5.5 的 PBS 缓冲液中，72 h 内 Tan II_A 的释放度分别为 73.74% 和 67.56%，而在 pH 为 7.4 的缓冲溶液中，72 h 内 Tan II_A 的释放度仅为 37.11%。此外，在酸性缓冲溶液中，CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 在 24 h 内释放率超过 40%，而在中性缓冲溶液中的释放度不足 30%。结果表明 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 具有明显的酸响应

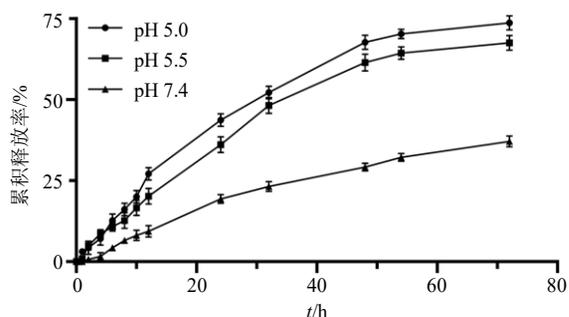


图 14 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 在 PBS 缓冲液中释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 14 In vitro release of CMC-OHA/Tan II_A-NBHs in PBS buffer solution ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

性，并具有良好的缓释作用，可以在接触微酸性皮肤时缓慢释放药物。

2.10 抑菌效果评价

为了考察 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的抑菌活性，分别考察了 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌能力。痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌于培养平板上活化，将 2 种菌转移至硫乙醇酸盐培养基中，分别于 37 °C 培养箱进行无氧和有氧培养，然后使用无菌水将二者稀释至活菌量在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cfu/mL，作为供试菌液备用。精密量取 2 种供试菌液各 150 μL，分别均匀涂抹于培养基，并平行制备 3 份。使用直径为 0.5 cm 的圆形模圈在含菌培养基表面分别涂抹等质量 0.20 g 的 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs、阳性药红霉素、O3C4 空白凝胶和卡波姆空白凝胶后痤疮丙酸杆菌于 37 °C 培养箱内进行无氧培养，金黄色葡萄球菌于 37 °C 培养箱内进行有氧培养。48 h 后观察测量各给药部位的抑菌圈直径，并按表 1 评判标准进行评判^[13]。

表 1 抑菌圈评分

Table 1 Scoring table of bacteriostatic ring

抑菌圈直径	敏感度	评分
直径 > 20 mm	极度敏感	4
20 mm > 直径 ≥ 15 mm	高度敏感	3
15 mm > 直径 ≥ 10 mm	中度敏感	2
10 mm > 直径 ≥ 7 mm	低度敏感	1
直径 < 7 mm	不敏感	0

CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的体外抑菌活性评估结果如表 2 所示。对于痤疮丙酸杆菌，阳性药红霉素抑菌圈大小为 (27.30 ± 1.27) mm，敏感程度评分 4 级，CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的抑菌圈大小为 (23.70 ± 0.71) mm，敏感程度评分 4 级，O3C4 空白凝胶的抑菌圈大小为 (15.60 ± 1.12) mm，敏感程度评分 3 级。对于金黄色葡萄球菌，阳性药红霉素抑菌圈大小为 (29.10 ± 1.00) mm，敏感程度评分 4 级，CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 的抑菌圈大小为 (33.10 ± 1.40) mm，敏感程度评分 4 级，O3C4 空白凝胶的抑菌圈大小为 (17.60 ± 1.33) mm，敏感程度评分 3 级，卡波姆空白凝胶对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌没有抑菌能力。结果证明 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs 具有良好的抑菌活性，体外能抑制痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的生长。

表2 CMC-OHA/Tan II_A-NBHs的体外抑菌活性
Table 2 Antibacterial activity of CMC-OHA/Tan II_A-NBHs *in vitro*

药物	痤疮丙酸杆菌		金黄色葡萄球菌	
	抑菌圈直径	评分	抑菌圈直径	评分
红霉素	27.30±1.27	4	29.1±1.00	4
CMC-OHA/Tan II _A -NBHs	23.70±0.71	4	33.1±1.40	4
O3C4	15.60±1.12	3	17.6±1.33	3
卡波姆凝胶	1.40±0.97	0	2.9±0.75	0

3 讨论

制备简单、工艺成熟的纳米乳液近年来在食品和药品领域引起了广泛关注,制备纳米乳的辅料具有生物相容性好毒性低的特点,因此,纳米乳很适合封装和递送亲脂性活性成分。然而由于其低黏度性和不稳定性,纳米乳不适合局部给药,为了解决这些问题,将纳米乳和凝胶剂结合是一个很有效的解决方案^[14-15]。在成胶时间的测定中发现,随着OHA和CMC质量浓度的升高,凝胶的成胶时间会显著缩短。这是因为OHA-CMC水凝胶是通过席夫碱反应形成,OHA的氨基和CMC的醛基生成具有pH响应性的亚胺键,因此水凝胶的成胶时间主要和溶液中的活性氨基和醛基数有关,随着OHA和CMC质量浓度的升高,溶液中发生交联的活性基团密度会增加,凝胶的成胶时间会显著缩短^[16]。

皮肤面部的pH与多种因素有关,有研究显示在多种皮肤屏障受损的疾病中,均观察到了不同程度的皮肤表面pH的升高^[17-18]。因此本研究选择考察CMC-OHA/Tan II_A-NBHs中Tan II_A在pH为5.0、5.5的缓冲溶液中的释放,同时以pH为7.4的缓冲溶液组作为对照。体外释放实验结果表明,CMC-OHA/Tan II_A-NBHs在pH为5.0的PBS缓冲液中,Tan II_A 72 h的累积释放度可达到70%以上,而在pH 7.4时仅仅不到30%,表明具有较好的酸响应性。根据Chen等^[19]实验结果发现,席夫碱结构在弱酸性环境下降解缓慢,完全降解需要10 d左右,因此CMC-OHA/Tan II_A-NBHs在72 h内难以释放完全。而在pH 7.4的缓冲液中,席夫碱键较为稳定,CMC和OHA水凝胶网络结构降解程度较低,不利于药物释放。因此这种pH响应型的药物载体在药物递送领域有着巨大的应用潜力。

体外抑菌活性实验表明,CMC-OHA/Tan II_A-

NBHs在体外能够有效抑制痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的生长。此外O3C4水凝胶基质也有一定的抑菌活性,这是因为壳聚糖的高电荷多阳离子结构与带负电的细菌磷脂膜成分会产生强烈的静电相互作用,通过膜损伤和随后的内容物泄漏导致细菌死亡,因此适当提高壳聚糖的浓度有利于提高凝胶的抗菌性能^[20-21]。

本研究利用CMC和OHA的自组装行为,在温和的反应条件下,一步制备完成了纳米乳和水凝胶的结合,得到的CMC-OHA/Tan II_A-NBHs具有良好的稳定性、pH响应性和缓释能力,可在体外显著抑制痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的生长。为纳米乳和难溶性药物的外用产品开发与临床应用提供理论依据和实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yan S Q, Zhang Q, Wang J N, *et al.* Silk fibroin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction [J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(6): 6771-6782.
- [2] Su H Y, Zhang W, Wu Y Y, *et al.* Schiff base-containing dextran nanogel as pH-sensitive drug delivery system of doxorubicin: Synthesis and characterization [J]. *J Biomater Appl*, 2018, 33(2): 170-181.
- [3] Hu M, Yang J L, Xu J H. Structural and biological investigation of chitosan/hyaluronic acid with silanized-hydroxypropyl methylcellulose as an injectable reinforced interpenetrating network hydrogel for cartilage tissue engineering [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 607-619.
- [4] Moradi S, Barati A, Salehi E, *et al.* Preparation and characterization of chitosan based hydrogels containing cyclodextrin inclusion compounds or nanoemulsions of thyme oil [J]. *Polym Int*, 2019, 68(11): 1891-1902.
- [5] Liang Y P, Zhao X, Hu T L, *et al.* Adhesive hemostatic conducting injectable composite hydrogels with sustained drug release and photothermal antibacterial activity to promote full-thickness skin regeneration during wound healing [J]. *Small*, 2019, 15(12): e1900046.
- [6] Ma X Z, Xiang S Y, Xie H J, *et al.* Fabrication of pH-sensitive tetracycline releasing gel and its antibacterial bioactivity against *Ralstonia solanacearum* [J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3606.
- [7] Omidi S, Pirhayati M, Kakanejadifard A. Co-delivery of doxorubicin and curcumin by a pH-sensitive, injectable, and *in situ* hydrogel composed of chitosan, graphene, and cellulose nanowhisker [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 231:

- 115745.
- [8] 王秀环, 孙伟卫, 季新燕, 等. 丹参酮 II_A 微乳及微乳凝胶的抑菌效果及痤疮临床疗效的初步研究 [J]. 山西中医学院学报, 2015, 16(6): 36-38.
- [9] 郑娟, 沈成英, 庞建云, 等. 丹参酮 II_A 纳米结构脂质载体的体外评价及其对 HaCaT 细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4340-4344.
- [10] 钟钰, 胡鹏翼, 郑琴, 等. 紫苏精油纳米乳的处方工艺研究与初步质量评价 [J]. 中草药, 2020, 51(22): 5714-5722.
- [11] Zhang R Y, Li X, He K W, *et al.* Preparation and properties of redox responsive modified hyaluronic acid hydrogels for drug release [J]. *Polym Adv Technol*, 2017, 28(12): 1759-1763.
- [12] 邓茂, 李小芳, 陈慧娟, 等. 以茶皂素为天然乳化剂制备水飞蓟素纳米乳及其理化性质考察 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6528-6536.
- [13] 吕好新, 赵玲丽, 霍珊珊, 等. 肉桂-山苍子复合植物精油对发霉花生黑曲霉 BQM 菌的抑菌效果 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(12): 222-229.
- [14] Komaiko J, McClements D J. Food-grade nanoemulsion filled hydrogels formed by spontaneous emulsification and gelation: Optical properties, rheology, and stability [J]. *Food Hydrocoll*, 2015, 46: 67-75.
- [15] Hu Q, Lin H, Wang Y F, *et al.* Design, optimization and evaluation of a microemulsion-based hydrogel with high malleability for enhanced transdermal delivery of levamisole [J]. *Int J Pharm*, 2021, 605: 120829.
- [16] Hu B, Gao M Z, Boakye-Yiadom K O, *et al.* An intrinsically bioactive hydrogel with on-demand drug release behaviors for diabetic wound healing [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(12): 4592-4606.
- [17] 陈思璇, 李泓莹, 杨洋, 等. 点阵激光用于痤疮患者的临床治疗对疗效、皮损改善、经表皮失水量、皮肤表面 pH 值、血红素含量的影响观察 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊, 2021, 20(1): 60-62.
- [18] Schürer N. pH and acne [J]. *Curr Probl Dermatol*, 2018, 54: 115-122.
- [19] Chen T Y, Wen T K, Dai N T, *et al.* Cryogel/hydrogel biomaterials and acupuncture combined to promote diabetic skin wound healing through immunomodulation [J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120608.
- [20] Moeini A, Pedram P, Makvandi P, *et al.* Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 233: 115839.
- [21] Qu J, Zhao X, Liang Y, *et al.* Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing [J]. *Biomaterials*, 2018, 183(11): 185-199.

[责任编辑 郑礼胜]