



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111053947 A

(43)申请公布日 2020.04.24

(21)申请号 201911221613.7

A61K 47/36(2006.01)

(22)申请日 2019.12.03

A61P 31/04(2006.01)

A61P 15/00(2006.01)

(71)申请人 青岛职务帮网络服务有限公司

地址 266000 山东省青岛市高新区火炬路
91号蓝湾智谷1号楼4层

(72)发明人 陈浩 陈传钦 周丽萍 续庭玮
闫吉成 李鑫

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限
公司 37221

代理人 张晓鹏

(51)Int.Cl.

A61L 26/00(2006.01)

A61K 9/06(2006.01)

A61K 31/4375(2006.01)

A61K 47/42(2017.01)

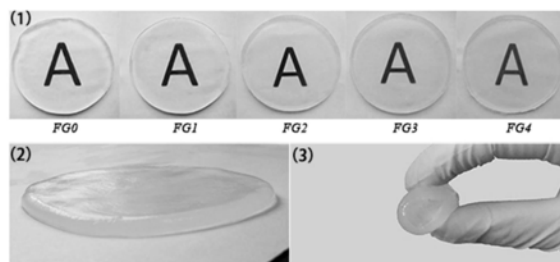
权利要求书1页 说明书14页 附图10页

(54)发明名称

一种魔芋葡甘聚糖/鱼明胶水凝胶、其制备
方法及应用

(57)摘要

本公开属于水凝胶技术领域,具体涉及一种
魔芋葡甘聚糖/鱼明胶水凝胶、其制备方法及应
用。水凝胶是一种具有良好应用前景的医用敷
料,魔芋葡甘聚糖和明胶由于具有良好的生物相
容性,可以用于创伤敷料的制备,但上述材料在
单独使用时还存在机械性能不足等缺陷。本公开
提供了一种魔芋葡甘聚糖/鱼明胶复合水凝胶,
魔芋葡甘聚糖与鱼明胶以高度交联的形式形成
凝胶。经验证,该水凝胶具有良好的强度、韧性及
保水性,体外不易降解,是一种良好医用敷料。另
外,该水凝胶作为载药基质具有良好包封效果及
血液相容性,包载苦参碱后对大肠杆菌和金黄色
葡萄球菌具有良好的抑菌性能,有望作为一种妇
科疾病外用药物加以推广。



1. 一种水凝胶,其特征在于,所述水凝胶以魔芋葡甘聚糖及鱼明胶交联而成。
2. 如权利要求1水凝胶,其特征在于,所述水凝胶中,交联区由氢键形成。
3. 如权利要求1水凝胶,其特征在于,所述水凝胶中,凝胶含量为84. %~93。
4. 权利要求1-3任一项所述水凝胶的制备方法,其特征在于,所述制备方法如下:向鱼明胶溶液中加入碱液调节pH,搅拌条件下向调pH后的鱼明胶溶液中加入魔芋葡甘聚糖,使其充分溶胀获得混合溶胶,加热使其成胶状液体后冷却成为凝胶,通过缓冲液洗涤使其pH为中性既得。
5. 如权利要求4所述水凝胶的制备方法,其特征在于,所述鱼明胶溶液的浓度(w/v)为1.9~3.2%;
或所述魔芋葡甘聚糖的浓度(w/v)为1.6~2.4%;
或所述制备方法中,所述鱼明胶溶液的制备步骤如下:称取一定质量的FG加入水中在室温下溶胀12~18h,之后在40~50℃水浴加热20~40min使其溶解。
6. 如权利要求4所述水凝胶的制备方法,其特征在于,所述加入碱液调节pH至10~12;
或所述混合溶液消泡后水浴加热一段时间成为胶状液体。
或所述缓冲液为pH为5~6的PBS缓冲液。
7. 权利要求1-3任一项所述水凝胶作为医用敷料或载药基质的应用。
8. 一种苦参碱水凝胶制剂,其特征在于,所述苦参碱水凝胶制剂采用权利要求1-3任一项所述水凝胶作为载药基质。
9. 如权利要求8所述苦参碱水凝胶制剂,其特征在于,所述苦参碱水凝胶制剂的载药量为2~3%;
或所述苦参碱水凝胶制剂的制备方法如下:将苦参碱加入调节pH后的鱼明胶溶液中,待苦参碱溶解后再加入魔芋葡甘聚糖。
10. 权利要求8或9所述苦参碱水凝胶制剂在治疗妇科疾病中的应用。

一种魔芋葡甘聚糖/鱼明胶水凝胶、其制备方法及应用

技术领域

[0001] 本公开属于水凝胶技术领域,具体涉及一种魔芋葡甘聚糖/鱼明胶载药水凝胶,所述水凝胶的制备方法及其作为医用敷料或药物载体的应用。

背景技术

[0002] 公开该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本公开的总体背景的理解,而不必然被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已经成为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

[0003] 医用敷料直接覆盖于伤口表面,作为伤口与外界环境之间的屏障,可保护伤口免受感染,提供创面愈合所需的环境。传统的伤口敷料如纱布、棉绒、膏药、绷带等使用一定时间后需更换,易粘连伤口,造成二次损伤,最重要的是这类敷料不能保持创面湿润因而会延缓创面愈合。基于传统敷料性能不足,更先进的现代敷料如海绵、纤维、薄膜、水凝胶等逐渐被开发出来。其中水凝胶能吸收组织渗出物,保持创面湿润,透过氧气并冷却创面,减轻患者疼痛,因而更适用于创面护理。湿润的环境有利于细胞生长,能加快伤口愈合,但同时也有利于有害微生物的滋长,此外,对严重感染性和难愈性创面,水凝胶促进其愈合的效果较差,而外用生物活性制剂如溶液、药膏和软膏等用于输送药物到伤口的效果不佳,因为它们会迅速吸收伤口渗液变得具有流动性,载药水凝胶敷料由此应运而生,成为创面修复研究的新热点。

[0004] 水凝胶是一种具有三维网络结构的亲水聚合物,具有较高的含水量、孔隙度及柔软度,具有与天然的生物组织相似的结构和功能,具有良好的生物相容性、生物降解性和无毒性,因此在药物缓控释、组织工程支架、创伤敷料等生物医学工程领域备受关注。载药水凝胶是基于水凝胶的载体与治疗药物的组合,在保留水凝胶本身特性的同时为伤口提供了修复的微环境,并且能够控制药物的释放速率,对创面的愈合具有良好的效果。

[0005] 魔芋葡甘聚糖是一种从魔芋块茎中分离出来的一种天然高分子多糖,具有很高的吸水和溶胀能力,在碱性和加热条件下能形成热不可逆凝胶。近年来,魔芋葡甘聚糖因其高吸水性和促进创面愈合等特性被报道用于创面敷料。明胶是从动物的皮、骨等结缔组织中提取得到的大分子蛋白质。由于其生物相容性、生物降解性和无抗原性,以及其活化巨噬细胞和止血的功能,在临床上常被用来制造创伤敷料。魔芋和明胶单独在创伤敷料领域的应用在国内外都有较深入的研究,但二者的单一凝胶机械性能较差,限制了它们的进一步应用。Huiqun Yu等人之前的研究中提供了一种氧化魔芋葡甘聚糖与明胶交联形成的水凝胶制剂,将魔芋葡甘聚糖通过高碘酸氧化后与明胶溶液混合获得一种水凝胶制剂。发明人认为上述研究中采用高碘酸氧化魔芋葡甘聚糖的过程中容易造成强氧化试剂的残留,作为敷料应用具有一定的安全隐患。

[0006] 苦参碱是豆科植物苦参、苦豆子、广豆根等中草药的主要活性成分。目前,据文献报道苦参碱具有多种药理作用,包括抑菌、抗炎、抗肿瘤等,并已经在临床上广泛应用,如苦参碱栓(妇炎栓)主要用于滴虫或念珠菌性阴道炎、慢性宫颈炎、老年性阴道炎、盆腔炎等治

疗。

发明内容

[0007] 基于上述研究背景,本公开提供了一种魔芋葡甘聚糖(KGM)/鱼明胶(FG)为制成的水凝胶及相应的制备方法。本公开方法制备的水凝胶具有良好的力学性能,克服了魔芋葡甘聚糖和鱼明胶单用力学性能差、易破碎的技术缺陷。所述水凝胶具有良好的溶胀能力,可吸收伤口渗液、并起到良好的保湿效果,有望作为一种医用敷料。本公开还针对该水凝胶的载药性能进行研究,研究结果表明该水凝胶作为载药基质具有良好的包载效果及血液相容性,还可以作为一种体外给药基质。

[0008] 根据上述研究结果,本公开提供以下技术方案:

[0009] 本公开第一方面,提供一种水凝胶,所述水凝胶以魔芋葡甘聚糖及鱼明胶交联而成。

[0010] 本公开提供的魔芋葡甘聚糖与鱼明胶为双重交联的形式,分子结合形式与上述背景技术中的水凝胶中分子结合形式不同,魔芋葡甘聚糖通过中暴露的羟基与鱼明胶的羰基通过氢键作用形成络合物使交联程度增大,使其具有良好的机械性及保湿性。

[0011] 本公开第二方面,提供第一方面所述水凝胶的制备方法,所述制备方法如下:向鱼明胶溶液中加入碱液调节pH,搅拌条件下向调pH后的鱼明胶溶液中加入魔芋葡甘聚糖,使其充分溶胀获得混合溶胶,加热使其成胶状液体后冷却成为凝胶,通过缓冲液洗涤使其pH为中性既得。

[0012] 本公开提供的制备方法,通过加入碱液使魔芋葡甘聚糖发生脱乙酰化,分子链完全暴露从而更容易与明胶产生氢键结合作用。并且,本公开方法中不引入强氧化物等,制备后的凝胶呈中性,使用安全性更高。

[0013] 本公开第三方面,提供第一方面所述水凝胶作为医用敷料或载药基质的应用。

[0014] 经本公开的研究表明,该水凝胶制剂具有良好的机械性能及溶胀性能,作为医用敷料或外用药物基质,放置于皮肤表面不易破碎,其溶胀性能决定该药物辅料可以对组织渗出液进行吸收,并且为创面恢复提供良好的保湿环境。

[0015] 本公开第四方面,提供一种苦参碱水凝胶制剂,所述苦参碱水凝胶制剂采用第一方面所述水凝胶作为载药基质。

[0016] 本公开第五方面,提供第四方面所述苦参碱水凝胶制剂在治疗妇科疾病中的应用。

[0017] 优选的,所述妇科疾病为金黄色葡萄球菌或大肠杆菌引发的妇科疾病。

[0018] 与现有技术相比,本公开的有益效果是:

[0019] 1. 单一KGM凝胶具有成胶快、平衡溶胀度和溶胀平衡含水率高,但易破碎的特点,FG的添加平衡了凝胶的吸水溶胀性能,改善了单一KGM凝胶水分蒸发速率快和体外降解慢的缺点,是一种相得益彰的搭配形式。

[0020] 2. 本公开研究表明,该水凝胶作为药物载体,对Mat的包埋效果随着FG浓度的增大而明显改善;用复合凝胶包埋不同浓度的Mat,制备的载药凝胶的抑菌性和血液相容性随着Mat的浓度增大而改善;作为一种药物基质进行应用,在临床使用方面具有良好的可控性,更加满足个体化的使用需求。

[0021] 3.通过本公开方法制备的水凝胶不引入强氧化剂、具有细胞毒性的化学物质。复合凝胶所用魔芋葡甘聚糖、明胶均为天然高分子材料,具有良好的生物相容性和生物可降解性,体外降解速率快,安全性能更好。

附图说明

[0022] 构成本公开的一部分的说明书附图用来提供对本公开的进一步理解,本公开的示意性实施例及其说明用于解释本公开,并不构成对本公开的不当限定。

[0023] 图1为实施例1中不同比例的KGM/FG水凝胶实物图;

[0024] 其中,图1(1)为不同原料配比的KGM/FG水凝胶实物图;图1(2)为凝胶成型效果图;图1(3)为凝胶弯折效果图。

[0025] 图2为实施例1中KGM溶液在80℃、1rad/s下G',G''随时间变化曲线图;

[0026] 图3为实施例1中FG溶液在80℃、1rad/s下G',G''随时间变化曲线图;

[0027] 图4为实施例1中KGM/FG溶液在80℃、1rad/s下G',G''随时间变化曲线图;

[0028] 图5为实施例1中不同FG浓度复合凝胶的凝胶含量直方图(**代表与FG0相比P<0.05);

[0029] 图6为实施例1中不同FG浓度复合凝胶的溶胀率折线图;

[0030] 图7为实施例1中不同FG浓度复合凝胶的平衡溶胀度(***)代表与FG0相比P<0.01,差异非常显著);

[0031] 图8为实施例1中不同FG浓度复合凝胶的平衡含水量(***)代表P<0.01,与FG0之间差异非常显著);

[0032] 图9为实施例1中不同FG浓度复合凝胶的水分蒸发速率;

[0033] 图10为实施例1中不同FG浓度复合凝胶的体外降解率;

[0034] 图11为实施例2中苦参碱的标准曲线;

[0035] 图12为实施例2中不同FG浓度复合凝胶的包埋率直方图;(***)代表与FG0相比P<0.01)

[0036] 图13为实施例2中不同FG浓度复合凝胶的载药量直方图(***)代表与FG0相比P<0.01)

[0037] 图14为实施例2中不同Mat浓度复合凝胶对大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)的抑菌效果图;

[0038] 其中,编号0~4分别代表Mat浓度为0、10、20、30、40mg/ml

[0039] 图15为实施例2中不同苦参碱浓度复合凝胶的抑菌圈大小直方图;

[0040] 图16为实施例2中不同苦参碱浓度复合凝胶的溶血率直方图(**和***)分别代表与0相比P<0.05和P<0.01);

[0041] 图17为实验例中pH=11.94成胶效果图;

[0042] 图18为实验例中KGM1%、FG1.5%加热温度45℃未成胶图;

[0043] 图19为实验例中KGM1%、不同浓度FG成胶图;

[0044] 图20为实验例中pH=11.09成胶效果图

具体实施方式

[0045] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本公开提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0046] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本公开的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0047] 正如背景技术所介绍的,魔芋葡甘聚糖(KGM)及鱼明胶(FG)作为常用的水凝胶敷料单独使用时存在机械强度不足的缺陷,本公开提供了一种魔芋葡甘聚糖与鱼明胶复合的水凝胶制剂,具有良好的机械性能及载药性能。

[0048] 本公开第一方面,提供一种水凝胶,所述水凝胶以魔芋葡甘聚糖及鱼明胶交联而成。

[0049] 优选的,所述水凝胶中,交联区由氢键形成。

[0050] 优选的,所述水凝胶中,凝胶含量为84. %~93%。当原料中鱼明胶添加量为3%时,复合凝胶的凝胶含量最高,可以达到92.95%,表明KGM和FG几乎完全交联。

[0051] 本公开第二方面,提供第一方面所述水凝胶的制备方法,所述制备方法如下:向鱼明胶溶液中加入碱液调节pH,搅拌条件下向调pH后的鱼明胶溶液中加入魔芋葡甘聚糖,使其充分溶胀获得混合溶胶,加热使其成胶状液体后冷却成为凝胶,通过缓冲液洗涤使其pH为中性既得。

[0052] 优选的,所述鱼明胶溶液的浓度(w/v)为1.9~3.2%。

[0053] 优选的,所述魔芋葡甘聚糖的浓度(w/v)为1.6~2.4%。

[0054] 优选的,所述制备方法中,所述鱼明胶溶液的制备步骤如下:称取一定质量的FG加入水中在室温下溶胀12~18h,之后在40~50℃水浴加热20~40min使其充分溶解。

[0055] 优选的,所述加入碱液调节pH至10~12。

[0056] 优选的,所述混合溶液消泡后水浴加热一段时间成为胶状液体。

[0057] 优选的,所述缓冲液为pH为5~6的PBS缓冲液。

[0058] 本公开第三方面,提供第一方面所述水凝胶作为医用敷料或载药基质的应用。

[0059] 本公开第四方面,提供一种苦参碱水凝胶制剂,所述苦参碱水凝胶制剂采用第一方面所述水凝胶作为载药基质。

[0060] 优选的,所述苦参碱水凝胶制剂的载药量(w/w)为2~3%。

[0061] 优选的,所述苦参碱水凝胶制剂的制备方法如下:将苦参碱加入调节pH后的鱼明胶溶液中,待苦参碱溶解完全后再加入魔芋葡甘聚糖。

[0062] 本公开第五方面,提供第四方面所述苦参碱水凝胶制剂在治疗妇科疾病中的应用。

[0063] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本公开的技术方案,以下将结合具体的实施例与对比例详细说明本公开的技术方案。

[0064] 表1以下实施例中所用主要材料与试剂

试剂名称	规格/型号	厂家
魔芋胶	K-32000	嘉吉亚太食品系统(北京)有限公司
鱼明胶	250BL-60	越南 Vinhwellness 公司
苦参碱	98%	宁夏盐池紫荆花制药有限公司
氢氧化钠	AR	天津市富宇精细化工有限公司
胰蛋白胨	BR	北京奥博星生物技术有限公司
酵母浸粉	BR	北京奥博星生物技术有限公司
[0065] 琼脂粉	BR	北京奥博星生物技术有限公司
氯仿	AR	烟台市双双化工有限公司
NaCl	AR	天津市光复科技发展有限公司
NaH ₂ PO ₄	AR	天津市永大化学试剂有限公司
Na ₂ HPO ₄	AR	天津市科密欧化学试剂有限公司
金黄色葡萄球菌	CMCC (B) 26003	上海鲁微科技有限公司
大肠埃希氏菌	ATCC25922	上海鲁微科技有限公司
抗凝绵羊全血	100ml	上海羽朵生物科技有限公司
乙醇	AR 95%	烟台市双双化工有限公司
[0066] 溴百里香酚蓝	IND	西陇科学股份有限公司
无水硫酸钠	AR	国药集团化学试剂有限公司

[0067] 实施例1 KGM/FG水凝胶的制备及性能评价

[0068] 1.1 KGM/FG水凝胶的制备

[0069] 用量筒量取30ml蒸馏水于烧杯中,根据表3,称取一定质量的FG于烧杯中配制成相应质量浓度的FG溶液,在室温下溶胀过夜后于45℃恒温水浴锅加热30min使其充分溶解。往FG溶液中滴加0.5mol/L的NaOH溶液调节pH=11。再称取一定质量的KGM粉末,边搅拌边加入FG溶液,室温下磁力搅拌2h使KGM充分溶胀,将混合溶胶倒入培养皿中,超声消泡30min,60℃水浴加热4h至成胶后取出,用流动的自来水冷却至室温,用pH5.8的PBS缓冲液浸泡5min至凝胶pH值下降到中性,倒掉PBS缓冲液将凝胶放置4℃冰箱冷藏24h。从冰箱取出凝胶在室温放置1h使凝胶温度恢复至室温后对凝胶进行感官评价及性能测定。

[0070] 表2不同质量浓度复合凝胶样品编号

编号	FG0	FG1	FG2	FG3	FG4
[0071] FG 浓度 (g/100ml)	0.00	1.0	2.0	3.0	4.0
KGM 浓度 (g/100ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

[0072] 1.2凝胶性质评价

[0073] 1.2.1凝胶感官评价

[0074] 从冰箱取出凝胶在室温放置1h使凝胶温度恢复至室温,用吸水纸吸干表面水分,然后按表3所示方法对凝胶进行感官评价。

[0075] 表3感官评价方法

评价指标	测定方法
强度	用手扯碎胶体,扯碎凝胶用力越大强度越高
[0076] 韧性	将胶体向中间对折观察其发生破碎时对折的程度
颜色、透明度	将凝胶放置在白色背景上观察其颜色和透明度
泌水性	用滤纸吸干表面水分,水分多则泌水性强

[0077] 如图1所示,图1为2.0% (w/v) KGM中添加不同质量浓度FG制成的复合凝胶。用吸水纸擦干凝胶表面水分,评价其泌水性,发现相比于单一KGM凝胶,复合凝胶泌水性明显减弱,较少出现泌水现象。在打印了黑色字体的白纸上比较凝胶的透明度,如图1(1)所示,复合凝胶均具有良好的透明度,随着FG浓度增大,透明度稍有降低;图1(2)为凝胶的成型效果图,可见所制备的凝胶成形性较好,厚度为3mm左右;如图1(3)所示,把凝胶对折,感受其韧性和强度,发现随着FG浓度增大,复合凝胶强度和韧性先增强后减弱;FG浓度为2%和3%时,复合凝胶的强度和韧性最强。

[0078] 1.2.2流变性能测定

[0079] 通过流变试验表征KGM、FG及KGM/FG水凝胶的凝胶化过程。使用hakke mars 3型号的流变仪测定了样品溶液的流体动力学性质。配制0.5% (w/v) KGM溶液、4%FG溶液及0.5% KGM+4%FG (w/v)的复合溶液,在80℃恒定温度下研究了凝胶动力学。转子型号为P35TiL,平行板直径为35mm,平行板间距为1mm,剪切频率为1Hz,应变为0.1%。用移液枪吸取2ml样品于流变仪的样品台上,样品台边缘用香柏油覆盖一层以防止水分蒸发。

[0080] 聚合物溶液的粘弹性可通过动态存储模量 G' 和耗损模量 G'' 两个参数来描述,分别表示网络结构的弹性和聚合物链的局部摩擦。据报道,在剪切模量随时间变化的过程中, G' 和 G'' 的交点为凝胶点。本研究通过流变试验对KGM、FG及KGM/FG水凝胶的凝胶化过程进行了表征。图2、图3和图4分别显示PH=11的0.5% (w/v)的KGM溶液、4% (w/v) FG溶液和0.5% KGM+4%FG (w/v)在80℃和1rad/s频率下 G' 和 G'' 随时间变化的关系。由图3可知 $t=800s$ 处为单一KGM溶液的凝胶点。在 $t<800s$ 时, $G''>G'$,表示凝胶化过程还没发生,样品是溶液状态。随后 G' 和 G'' 都经历一个剧增的阶段,且 G' 增加的速率比 G'' 快,且 $G'>G''$,说明样品正由溶液状

态转变为凝胶状态,即这一阶段对应于凝胶形成过程。随后G'和G''进入平台期,表示当所有的交联都已形成,凝胶化过程完成。由图2可知单一的FG溶液在80℃和1rad/s频率下G'和G''随时间变化均很微小且G'恒小于G'',说明单一FG溶液在此过程中没有形成凝胶。由图2可发现KGM/FG复合溶液的凝胶化过程与单一KGM溶液相似。t=930s处为复合溶液的凝胶点。相比于单一KGM溶液,复合溶液形成过程中G'和G''增加的速率较慢,持续时间较长,说明FG的加入减慢了凝胶化速率及延长了凝胶形成所需的时间。但是经对比发现,凝胶形成后,复合凝胶的G'为90Pa,而单一KGM的G'只有70Pa,说明FG的加入增强了凝胶的弹性。

[0081] 1.2.3凝胶含量的测定

[0082] 将厚度为3mm的水凝胶切成 $2 \times 2 \text{cm}^2$ 的小块,置于37℃烘箱中干燥48h至恒重,精确称其质量后将其浸泡于蒸馏水中,室温下浸泡4天以除去未交联的凝胶基质,浸泡后的凝胶再次置于37℃烘箱中干燥48h至恒重,再次称其质量,利用下列公式计算凝胶含量(Gel fraction,GF):

$$[0083] \quad GF = \frac{W_f}{W_i} \times 100\% \quad (1)$$

[0084] 式中:

[0085] W_i —浸泡前干燥凝胶的质量(g)

[0086] W_f —浸泡后再次干燥的凝胶质量(g)

[0087] 干燥凝胶在浸泡漂洗和未浸泡漂洗条件下的重量比可以作为两种基质交联度的指标。不同FG含量的水凝胶的凝胶含量见图5,样品编号见表2。单一KGM凝胶的凝胶含量为83.9%。在FG浓度为1~4%(w/v)的范围内,随着FG浓度的增加,复合凝胶的凝胶含量在84.80%~91.75%之间,整体上呈先上升后下降趋势且变化显著($p < 0.05$),而且各浓度FG与KGM复合凝胶样品的凝胶含量均高于单一KGM凝胶。因此,FG的加入提高了复合凝胶的凝胶含量。当FG添加量为3%时,复合凝胶的凝胶含量最高,为92.95%,表明KGM和FG几乎完全发生了交联。该结果可从凝胶形成的机理进行解释:在强碱性条件下,KGM发生脱乙酰反应,使KGM分子链变为裸露状,部分分子间形成氢键而产生结晶作用,以这种结晶为结节点形成了网状结构体,即形成KGM凝胶。KGM和明胶凝胶都是物理凝胶,交联区由氢键形成。KGM具有大量的羟基,很容易与KGM分子和FG分子形成氢键。KGM与明胶分子之间形成氢键的原因是KGM的羟基与明胶的羰基之间的作用,由于氢键具有饱和和方向性,键角一般在 180° 左右,因此当KGM和FG分子数量达到最佳比例时,两者之间通过氢键作用相互缠结形成络合物的交联度最大,此时的凝胶含量达到最高。相对于KGM和FG分子之间的氢键作用,单一KGM分子之间的氢键作用较弱,导致单一KGM分子发生自我交联的能力较弱,因此形成的凝胶交联度较低。

[0088] 1.2.4溶胀行为的测定

[0089] 将厚度为3mm的水凝胶切成 $3 \times 3 \text{cm}^2$ 的小块,置于37℃烘箱中干燥48h至恒重并精确称重。将干燥的凝胶置于37℃的生理盐水中溶胀。每隔1h取出样品,用滤纸吸干表面水分后精确称重。当溶胀到凝胶质量不再增加时,精确称重。水凝胶在各时间点的溶胀率(Swelling degree,SD)可由公式(2)计算,溶胀达到平衡时的溶胀度即平衡溶胀度(Equilibrium degree of swelling,EDS)可由公式(3)计算,溶胀平衡时含水量(Equilibrium water content,EWC)可由公式(4)计算:

$$[0090] \quad SD = \frac{m_t - m_1}{m_1} \times 100\% \quad (2)$$

$$[0091] \quad EDS = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100\% \quad (3)$$

$$[0092] \quad EWC = \frac{m_2 - m_1}{m_2} \times 100\% \quad (4)$$

[0093] 式中：

[0094] m_1 —水凝胶在烘箱中干燥后的重量(g)

[0095] m_t —水凝胶在生理盐水中溶胀后的质量(g)

[0096] m_2 —水凝胶在生理盐水中充分溶胀后的恒重(g)

[0097] 水凝胶的溶胀特性例证了水凝胶吸收伤口渗液的能力。不同FG浓度复合凝胶的溶胀率随溶胀时间而变化的趋势见图6,样品编号见表2。所有的凝胶在前3h内均呈现较快的溶胀速率,表明这些水凝胶均具有迅速溶胀的能力。图7和图8分别体现了不同FG添加量对水凝胶的平衡溶胀度和溶胀平衡含水率的影响。凝胶的平衡溶胀度在250%以上,溶胀平衡含水量为73%~82%。随着FG浓度的增加,水凝胶的平衡溶胀度和溶胀平衡含水率整体上均呈先下降后升高的趋势且变化显著($p < 0.05$)。从凝胶含量与平衡溶胀度和溶胀平衡含水率的数据对比发现,凝胶的溶胀特性与凝胶含量之间存在逻辑关系,即凝胶含量越高,平衡溶胀度或溶胀平衡含水率越低。造成该结果的原因是凝胶含量越高,即表明KGM和FG这两种基质的交联度越高,KGM和FG分子之间排列越紧凑,形成的凝胶孔径越小,导致其吸水溶胀的能力降低。另外,鱼明胶的加入使KGM与FG分子链上的交联点增多,从而缩短了相邻交联点间的距离,使交联点间链段松弛的速率降低,因此链段松弛因素对水凝胶的溶胀过程存在影响。虽然与单一KGM凝胶相比,复合凝胶的溶胀性能有所下降,但其溶胀能力已经足够高,可以用作愈合渗出性伤口的合适敷料。

[0098] 1.2.5水分蒸发速率的测定

[0099] 将厚度为3mm的水凝胶切成 $3 \times 3 \text{cm}^2$ 的小块,精确称其质量。将凝胶样品放置于温度为 37°C ,湿度为50%的环境中,每隔1h取出,精确称其质量,连续测量24h。水凝胶烘干至恒重后再次称其质量。按(5)式计算水凝胶的水分蒸发速率:

$$[0100] \quad \text{Water lost} = \frac{m_1 - m_t}{m_1 - m_3} \times 100\% \quad (5)$$

[0101] 式中：

[0102] m_1 —水凝胶初始重量(g)

[0103] m_t —定期测量的水凝胶重量(g)

[0104] m_3 —水凝胶完全干燥后的重量(g)

[0105] 湿润的环境可以促进伤口的愈合。湿润创面床已被广泛接受为最理想的伤口愈合环境。临床上创面愈合前需反复更换创面敷料。水凝胶敷料具有较小的水蒸发率,减少了更换次数,使愈合速度更快,减少了疼痛,节约了大量成本不同FG添加量对凝胶水分蒸发速率的影响见图9。样品编号见表2。随着FG添加量的增加,凝胶水分蒸发速率整体呈下降趋势。这是由于复合凝胶体系内的氢键作用能够将水分子束缚在凝胶内部,明胶浓度越高,凝胶内氢键作用越强,水分蒸发速率也就越慢。24小时后,单一KGM凝胶只剩下3.1%的水分,而复合水凝胶仍然保留10-20%的水。结果表明,复合凝胶相对于单一KGM凝胶具有较好的水

分蒸发速率。

[0106] 1.2.6凝胶体外降解的测定

[0107] 将厚度为3mm的水凝胶切成 $2 \times 2 \text{cm}^2$ 的小块,置于 37°C 烘箱中干燥48h至恒重并精确称重,放入预先放置在 37°C 恒温水浴锅内装有20mL的PBS缓冲液($\text{pH}=7.4, 0.1\text{M}$)的烧杯中,每4天取出凝胶,放置在 37°C 的烘箱中干燥48h至恒重,再次精确称其质量。凝胶降解率(degradation rate)计算如下式(6):

$$[0108] \quad \text{Degradation rate} = \frac{W_1 - W_t}{W_1} \times 100\% \quad (6)$$

[0109] 式中:

[0110] W_1 —复合凝胶最初的质量(g)

[0111] W_t —定期测定的凝胶质量(g)

[0112] 不同凝胶的体外降解速率曲线如图10所示。结果表明,FG的比例对复合凝胶的体外降解速率有显著影响,且在FG浓度为0%~4%的范围内复合凝胶的体外降解速率会随FG浓度的增加而增大。可能的原因是:随着FG浓度的提高,形成的KGM分子链穿插于FG所形成的三维网状结构的半互穿网络增多,由于支架的降解速率取决于三维网络的降解速率,明胶交联网络的降解速率远大于KGM交联网络的降解速率,因此使得复合凝胶的降解速率得到提高。

[0113] 实施例2 KGM/FG载药水凝胶的制备及性能表征

[0114] 2.1 KGM/FG载药水凝胶的制备

[0115] 用量筒量取30ml蒸馏水于烧杯中,根据表2,称取一定质量的FG于烧杯中配制成相应质量浓度的FG溶液,在室温下溶胀过夜后于 45°C 恒温水浴锅加热30min使其充分溶解。往FG溶液中滴加 0.5mol/L 的NaOH溶液调节 $\text{pH}=11$,称取一定质量的Mat溶于FG溶液中使其浓度为 30mg/ml ,待苦参碱(Mat)溶解完全后根据表2称取一定质量的KGM粉末加入Mat/FG混合溶液,室温下磁力搅拌2h使KGM充分溶胀,将混合溶胶倒入培养皿中,超声消泡30min, 60°C 水浴加热4h至成胶后取出,用流动自来水冷却至室温,用 $\text{pH}5.8$ 的PBS缓冲液浸泡5min至凝胶 pH 值下降到中性,倒掉PBS缓冲液将凝胶放置 4°C 冰箱冷藏24h。从冰箱取出凝胶在室温放置1h使凝胶温度恢复至室温后对凝胶进行载药效果测定。

[0116] 2.2凝胶载药性能评价

[0117] 2.2.1苦参碱标准曲线的测定

[0118] 精确称取苦参碱样品10mg,置于100ml容量瓶中配成 $0.1 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的溶液。用移液枪吸取200、400、600、800、1000 μl 溶液,分别置60ml分液漏斗中,先后加入 $2 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴麝香草酚蓝 $\text{pH}7.6$ 的缓冲液6.0ml,氯仿6.0ml,密塞振摇2min,静置2h使水层和氯仿层完全分清后,分出氯仿层,在420nm波长下测定吸收度。测定时用溴麝香草酚蓝 $\text{pH}7.6$ 的缓冲液6.0ml,加氯仿6.0ml,如上振摇,分出氯仿层作为比色空白。用测得的吸收度为纵坐标,苦参碱的浓度为横坐标作线性回归得苦参碱标准曲线方程,结果如图11所示,标准曲线的拟合方程为 $y=0.05812x-0.0628$,拟合度为 $R^2=0.9972$ 。

[0119] 2.2.2包埋率和载药量的测定

[0120] 取约0.5g的载药凝胶,精确称重后置于100ml的小烧杯中,将凝胶研碎,加入50ml的PBS缓冲液($\text{PH}=7.4, 0.1\text{M}$),静置24h使包埋在凝胶中的苦参碱充分溶解到PBS缓冲液中。

取上清液100 μ l,置于60ml分液漏斗中,先后加入6.00ml的 2×10^{-4} mol/L溴麝香草酚蓝pH7.6的缓冲液和6.00ml氯仿,密塞振摇2min,静置2h,待水和氯仿完全分层后,分出氯仿层,用紫外分光光度计测定420nm波长处吸收度。结合苦参碱的标准曲线,可通过式(7)求得药物的包埋率(encapsulation efficiency,EE),通过公式(8)求得载药量(loading efficiency,LE)

$$[0121] \quad EE\% = \frac{W_c}{W_0} \times 100\% \quad (7)$$

$$[0122] \quad LE\% = \frac{W_c}{W_i} \times 100\% \quad (8)$$

[0123] 式中:

[0124] W_c —包埋入凝胶的苦参碱含量(g)

[0125] W_0 —制备时加入的苦参碱总量(g)

[0126] W_i —凝胶的质量(g)

[0127] 苦参碱包埋率检测结果如图12、13所示,样品编号见表4。KGM浓度为2% (w/v) 时,包埋率和载药量均随着FG质量浓度的升高呈现先上升后下降的趋势,其中FG质量浓度为3% (w/v) 时,包埋率取得最大值89.46%,包埋效果最好,此时载药量也最大,为2.8% (w/w)。此外,各浓度FG与KGM复合凝胶样品对苦参碱的包埋效果均优于KGM单一凝胶。分析结果推测可能是由于FG浓度的增加,与KGM交联生成致密的网络结构,故能更有效的苦参碱截留在凝胶内部,这与凝胶含量的结果一致。

[0128] 2.2.3 抑菌性能的测定

[0129] 用金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)和大肠杆菌(*E.coli*)分别代表革兰氏阳性菌和阴性菌,测定载药凝胶的抑菌性。取胰蛋白胨2.5g、酵母粉1.25g、NaCl 2.5g、琼脂粉2.5g,加200mL纯化水溶解并调pH值至7.4左右,定容至250mL,将配制好的培养基和所需的器具置于高压蒸气灭菌锅内121 $^{\circ}$ C灭菌20min,待冷却至50~60 $^{\circ}$ C时向无菌培养皿中加约20mL培养基,打开盖子紫外灭菌30min,待冷却后制成LB固体培养基。将培养基倒置放于4 $^{\circ}$ C保存备用。用无菌生理盐水把各种菌种配制成浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ CFU/mL的悬菌液。用移液枪吸取100 μ L悬菌液均匀涂抹到培养基上。将水凝胶切成直径为6mm的圆盘形,置于涂有菌液的LB固体培养基上,在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养24小时,测量抑菌圈直径。平行3次实验,取平均值。

[0130] 制备不同Mat包埋量的复合凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进行抑菌性测试。抑菌效果如图14所示,包埋不同Mat浓度时的抑菌圈大小如图15所示。图14(A)为大肠杆菌的抑菌效果,图(B)为金黄色葡萄球菌的抑菌效果。由图可见当Mat浓度达到30mg/ml及以上时,载药凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有较明显的抑制作用。当Mat浓度达40mg/ml时,载药凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的平均抑菌圈直径分别为12mm和11.5mm(凝胶直径为6mm),表明载药凝胶具有良好的抑菌性能。

[0131] 2.2.4 血液相容性的测定

[0132] 取2mL肝素抗凝绵羊全血,加入2.5mL生理盐水稀释后备用。称取一定量的载药水凝胶样品放于试管中,研碎,加入10mL生理盐水,同时取10mL去离子水作阳性对照,10mL生理盐水作阴性对照。将全部试管置于37 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中保温30min,取出后分别加入稀释全

血0.1mL,混匀后再于37℃保温60min。取出试管,将温浴后的混合溶液以3000r/min的转速离心20min,取上清液在545nm波长处测定吸收度,每组样品平行重复测3次,取平均值,按下列公式(9)计算溶血率。根据溶血试验结果将材料按溶血指标分为三类:(a)溶血材料溶血率(%)>5%,(b)轻度溶血材料溶血率(%) 在2%~5%之间,(c)非溶血材料溶血率(%)<2%

$$[0133] \quad \text{溶血率} = \frac{A_1 - A_3}{A_2 - A_3} \times 100\% \quad (9)$$

[0134] 式中:

[0135] A_1 —样品组的吸光度

[0136] A_2 —阳性对照组的吸光度

[0137] A_3 —阴性对照组的吸光度

[0138] 溶血率是判断材料抗凝血性质的一种方法,其结果可用来判定试验材料能否作为生物材料使用。载不同苦参碱含量的复合凝胶的溶血率见图16。随着Mat含量的增加,复合凝胶的溶血率程先下降后上升的趋势且变化显著($p < 0.05$),且所有凝胶的溶血率均小于2%,表明复合凝胶具有非常好的血液相容性。且Mat能显著提高KGM的血液相容性。所制备额复合载药凝胶具有优异的血液相容性是因为KGM和FG都是生物相容高分子材料,且本研究中凝胶的制备仅涉及物理交联,因此制备的凝胶具有良好的抗凝血性能。

[0139] 2.3数据统计与分析

[0140] 所有的图都用Origin8.5软件绘制,通过Excel 2016软件进行数据处理。所有样品至少做3组平行,测定3次以上。所有指标均为3组以上数据平均值,并采用SPSS 21.0软件中One-Way ANOVA分析评价组间显著性差异($p < 0.05$)。

[0141] 实验例

[0142] 1.1明胶的选择

[0143] 鱼明胶中的脯氨酸和羟脯氨酸的含量比动物明胶低得多,而蛋氨酸的含量却比猪皮明胶高得多。此外,鱼皮明胶与猪皮明胶相比,其固有的粘度、热变性温度均比较低。使用控制应力流变仪测得鲤鱼皮明胶的凝胶温度范围为6~15.7℃,融化温度范围是17.9~23.7℃,猪皮明胶的凝胶和熔化的温度则相对会更高,利用鱼明胶制作水凝胶,其机械强度和热稳定性都更好,由液态转变成凝胶状态时的温度更低,利于药物的包埋。

[0144] 1.2单一KGM凝胶的制备

[0145] 取一定质量的KGM溶于30ml蒸馏水中,配成浓度(w/v)分别为0.4%、0.5%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4%、1.5%、2.0%的KGM溶液。往溶液中滴加0.5mol/L的NaOH溶液调节pH=9,在常温下搅拌2h,超声消泡15min,90℃水浴加热2h后取出冷却。

[0146] 结果均不成胶,KMG浓度为1.0%以上时能够成胶。2.0%KGM溶液有少量块状未溶解的KGM粉末,加入KGM粉末时不能太快。超声后0.5%、1.0%溶液的气泡浮于溶液表面,1.5%、2.0%溶液无效果。

[0147] 重复实验,调高pH,结果如表4所示:

[0148] 表4

编号	1	2	3	4
[0149] KGM 浓度(g/100ml)	1	1.50	2.0	2.50
pH 值	11.25	11.15	11.13	11.23
成胶效果	成胶, 较软	成胶, 较软	成胶, 气泡多	成胶, 气泡多

[0150] 单一KGM凝胶选用浓度1.5%及以上,成胶pH为11及以上。

[0151] 1.3 KGM/FG水凝胶的制备

[0152] 用量筒量取30ml蒸馏水于烧杯中,称取一定质量的FG于烧杯中配制成质量浓度为1.5%的FG溶液,在室温下溶胀过夜后于45℃恒温水浴锅加热30min使其充分溶解。往FG溶液中滴加0.5mol/L的NaOH溶液调节pH,再称取一定质量的KGM粉末,边搅拌边加入FG溶液,使KGM浓度为1.50%。室温下磁力搅拌2h使KGM充分溶胀,将混合溶胶倒入培养皿中,超声消泡30min,60℃水浴加热4h后取出,用流动的自来水冷却至室温,放置4℃冰箱冷藏24h。结果如下表5所示:

[0153] 表5

编号	1	2	3	4
[0154] KGM 浓度 (g/100ml)	1.75	1.75	1.75	1.75
FG 浓度(g/100ml)	1.50	1.50	1.50	1.50
pH 值	7.12	8.48	10.48	11.94
气泡	少, 易消去	少, 易消去	一般, 易消去	较多, 很难消去
成胶效果	未成胶	未成胶	未成胶	成胶, 凝胶显淡黄色, 质地软

[0155] 1.4温度优化

[0156] 取一定质量的KGM和FG溶于30ml蒸馏水中,配成浓度(w/v)为1.5%的FG溶液4份,在室温下溶胀过夜后于45℃恒温水浴锅加热30min使其充分溶解。在常温下搅拌2h,往FG溶液中滴加0.5mol/L的NaOH溶液调节pH=11,加入一定质量的KGM粉末,使其浓度为1%,分别在50℃、60℃、70℃、80℃水浴下加热3h,结果如下表6所示:

[0157] 表6

编号	0	1	2	3	4
[0158] KGM 浓度(g/100ml)	1	1	1	1	1
FG 浓度 (g/100ml)	1.5	1.50	1.50	1.50	1.50
加热温度	45℃	50℃	60℃	70℃	80℃
成胶效果	未成胶	成胶	成胶, 韧性好	成胶, 强度弱	成胶, 强度弱

[0159] 1.5 KGM浓度优化

[0160] 用量筒量取30ml蒸馏水于烧杯中,称取一定质量的FG于烧杯中配制成质量浓度为

1.5%的FG溶液,在室温下溶胀过夜后于45℃恒温水浴锅加热30min使其充分溶解。加入一定质量的KGM粉末,混合均匀后进行溶胀,0.5mol/L的NaOH溶液调节pH,超声消泡30min,80℃水浴加热2h取出冷却,结果如表7所示:

[0161] 表7

编号	1	2	3	4	5	6
KGM 浓度(g/100ml)	1	1.25	1.50	1.75	2.0	2.25
[0162] FG 浓度 (g/100ml)	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
pH 值	11.25	11.15	11.02	11.14	11.13	11.23
成胶效果	未成胶	未成胶	未成胶	未成胶	未成胶	未成胶

[0163] 可能加热时间过短,均未成胶,但4号、5号、6号成型性较好,其中5号成型性最好,凝胶选用KGM浓度为1.75%及以上,2.0%KGM最好。

[0164] 1.6 FG浓度优化

[0165] 用量筒量取30ml蒸馏水于烧杯中,称取一定质量的FG于烧杯中配制成质量浓度为1.5%的FG溶液,在室温下溶胀过夜后于45℃恒温水浴锅加热30min使其充分溶解。加入一定质量的KGM粉末,混合均匀后进行溶胀,0.5mol/L的NaOH溶液调节pH=11,超声消泡30min,80℃水浴加热2h取出冷却,结果如表8所示:

[0166] 表8

编号	1	2	3	4	5
KGM 浓度(g/100ml)	1	1	1	1	1
[0167] FG 浓度 (g/100ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
成胶效果	未成胶	未成胶	未成胶	成胶,软	成胶软

[0168] 1.7 KGM/FG水凝胶成胶pH优化

[0169] 用量筒量取30ml蒸馏水于烧杯中,称取一定质量的FG于烧杯中配制成质量浓度为1.5%的FG溶液,在室温下溶胀过夜后于45℃恒温水浴锅加热30min使其充分溶解。往FG溶液中滴加0.5mol/L的NaOH溶液调节pH,再称取一定质量的KGM粉末,边搅拌边加入FG溶液,使KGM浓度为1.75%。室温下磁力搅拌2h使KGM充分溶胀,将混合溶胶倒入培养皿中,超声消泡30min,60℃水浴加热4h后取出,用流动的自来水冷却至室温,放置4℃冰箱冷藏24h。结果如下表9所示:

[0170] 表9

编号	1	2	3	4	5
KGM 浓度 (g/100ml)	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75
FG 浓度 (g/100ml)	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
[0171] pH 值	10.50	11.09	11.45	11.77	11.90
气泡	少, 易消 去	一般, 易消 去	一般, 易消 去	较多, 较难 消去	较多, 很难消 去
成胶效果	未成胶	成胶, 特软	成胶, 较软	成胶, 淡黄 色	成胶, 凝胶显 淡黄色

[0172] 以上所述仅为本公开的优选实施例而已,并不用于限制本公开,对于本领域的技术人员来说,本公开可以有各种更改和变化。凡在本公开的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本公开的保护范围之内。

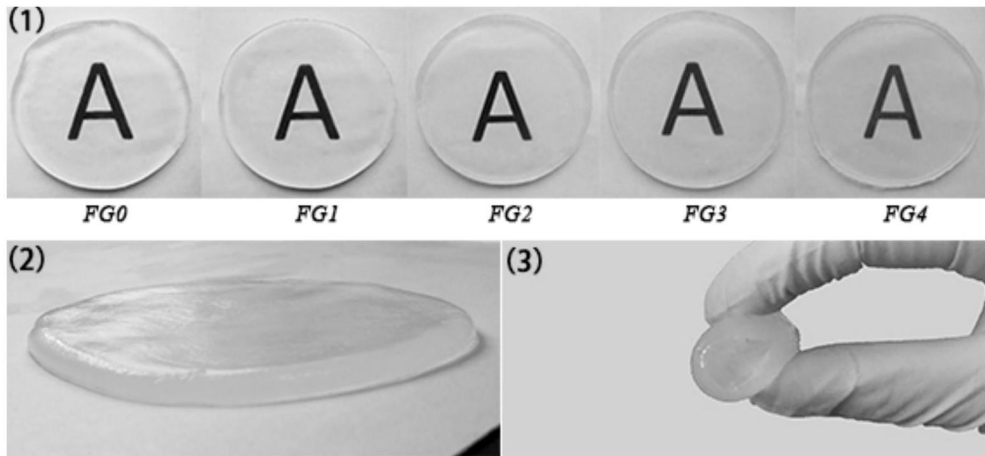


图1

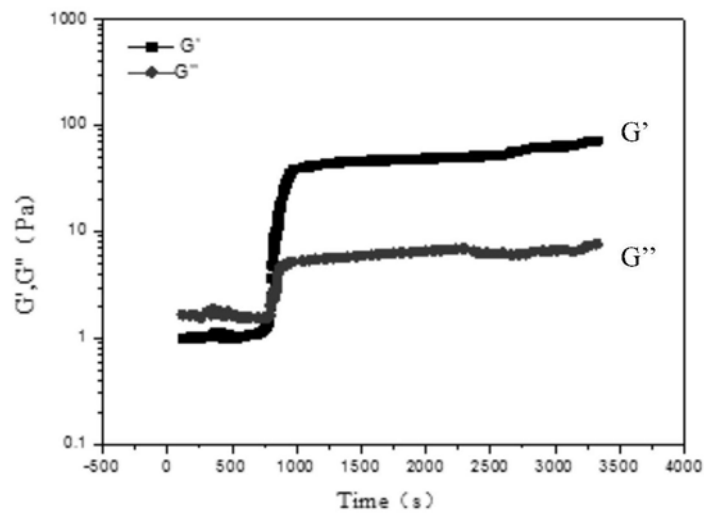


图2

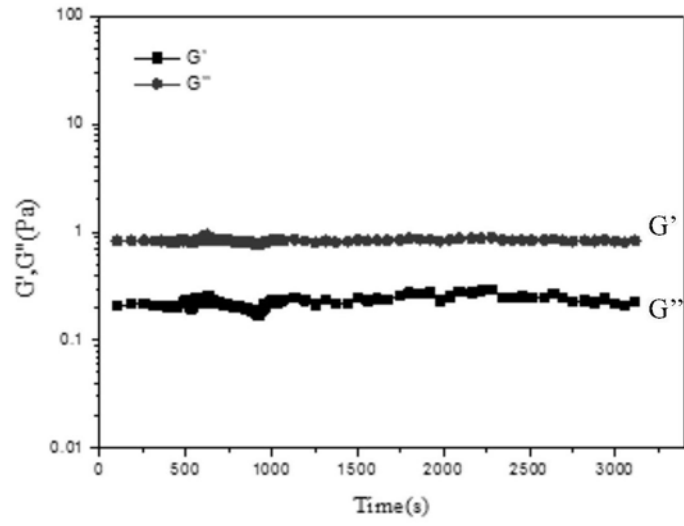


图3

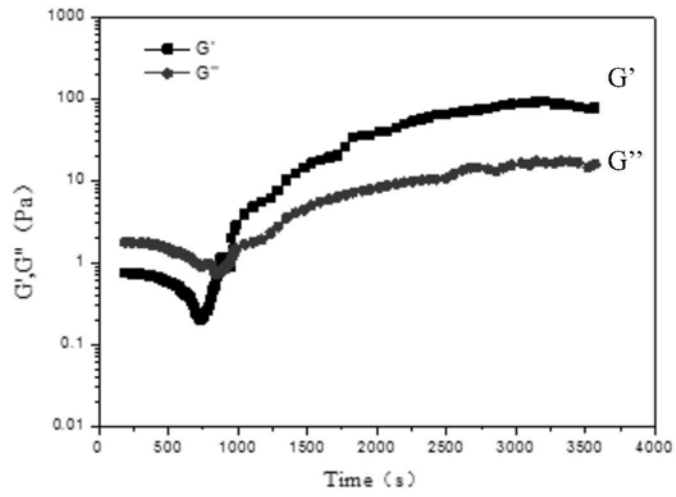


图4

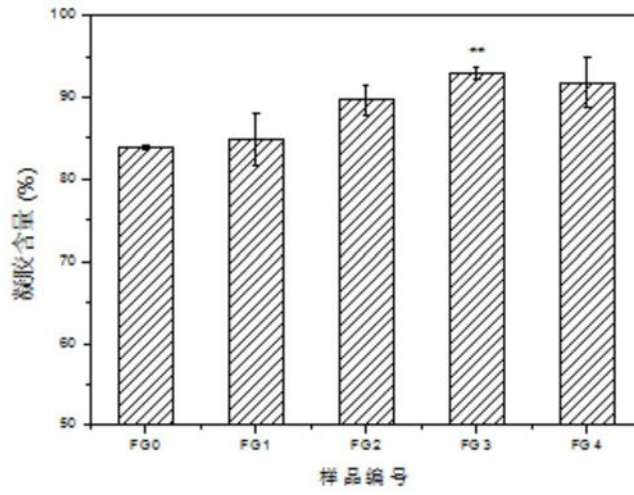


图5

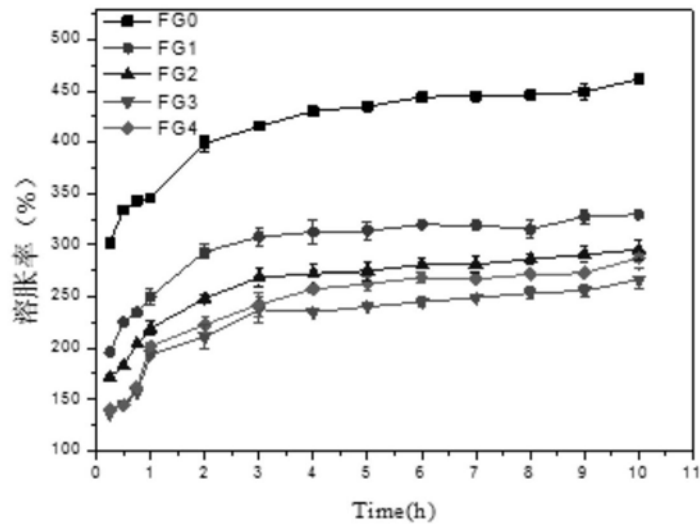


图6

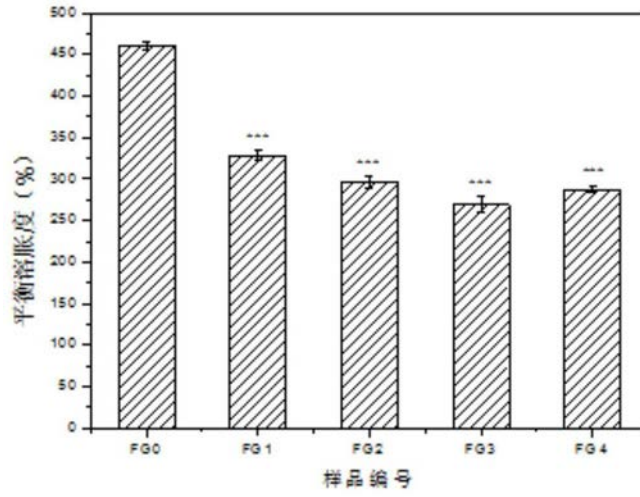


图7

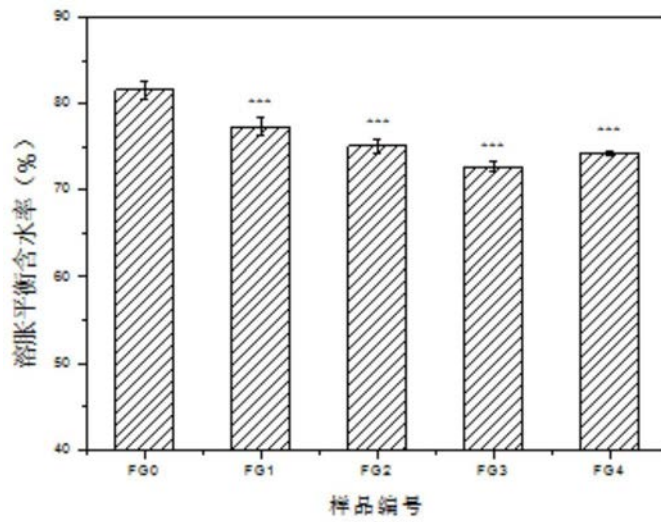


图8

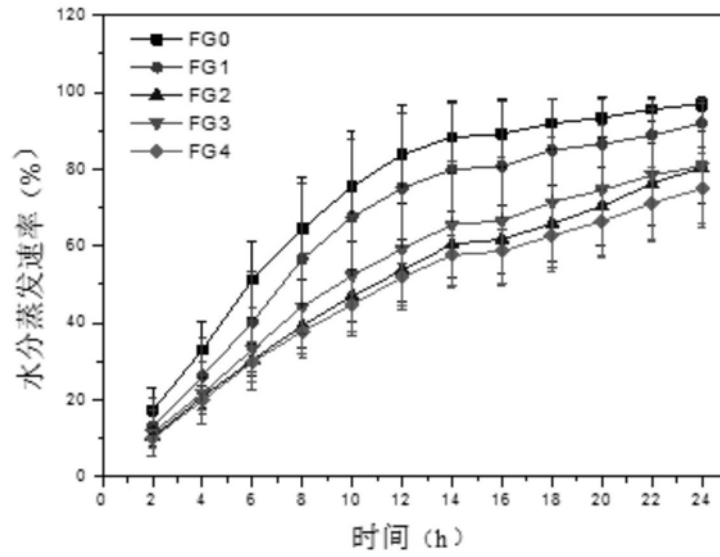


图9

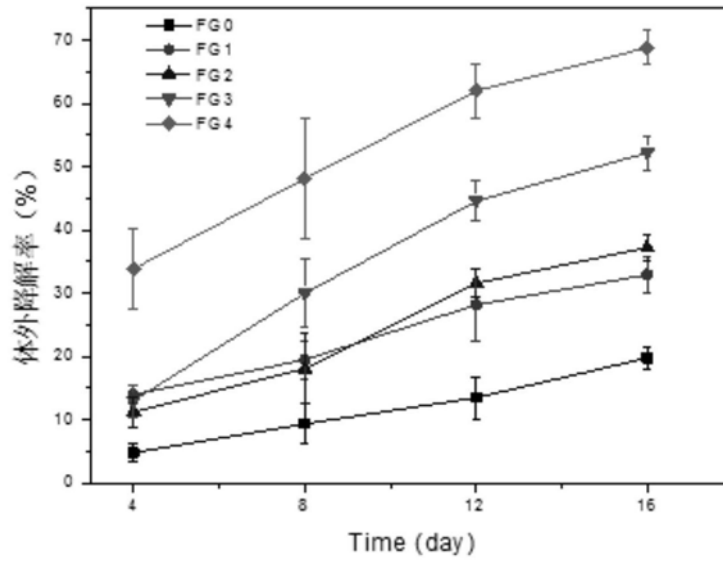


图10

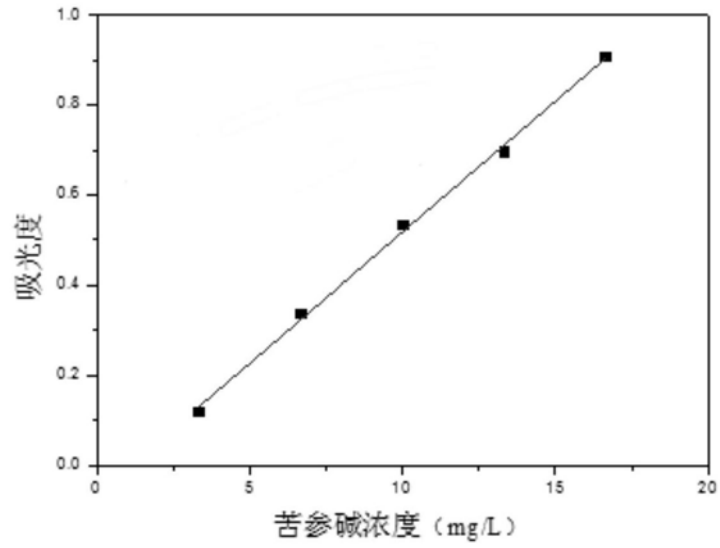


图11

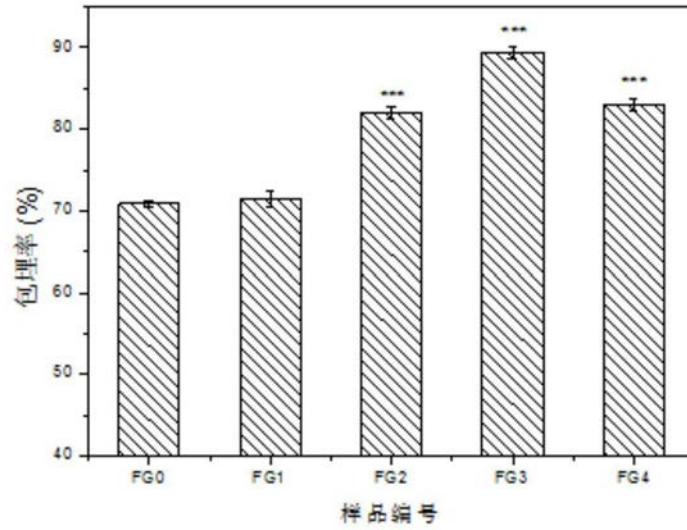


图12

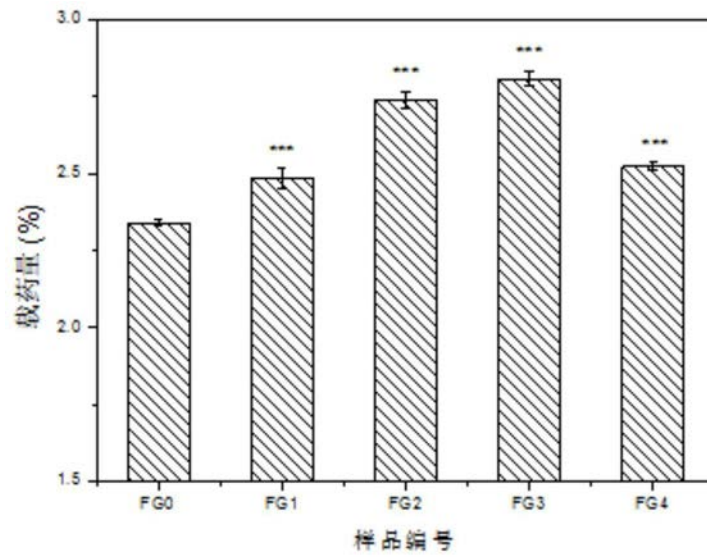


图13

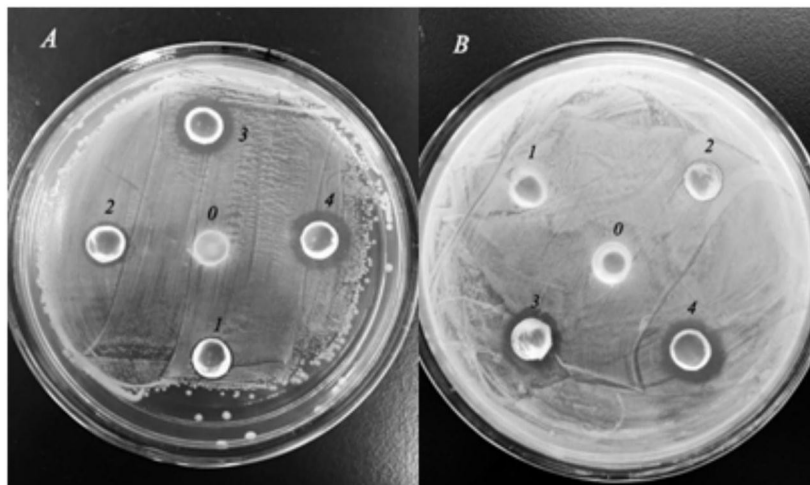


图14

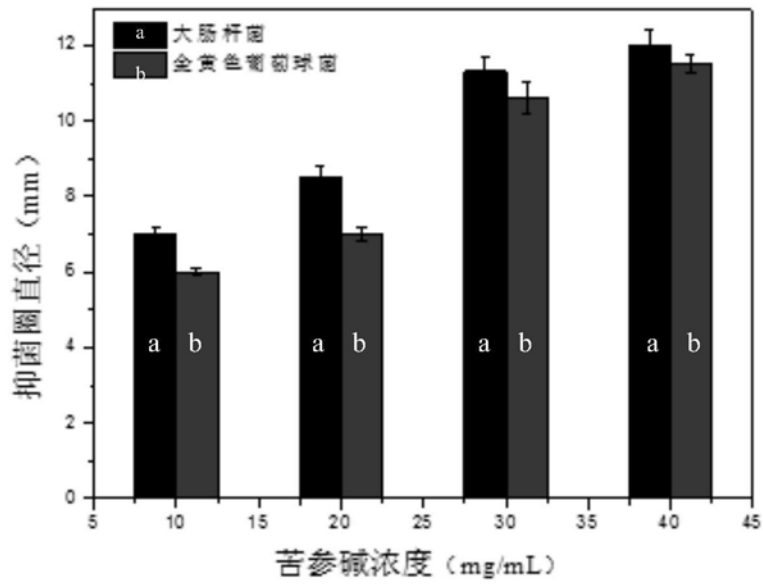


图15

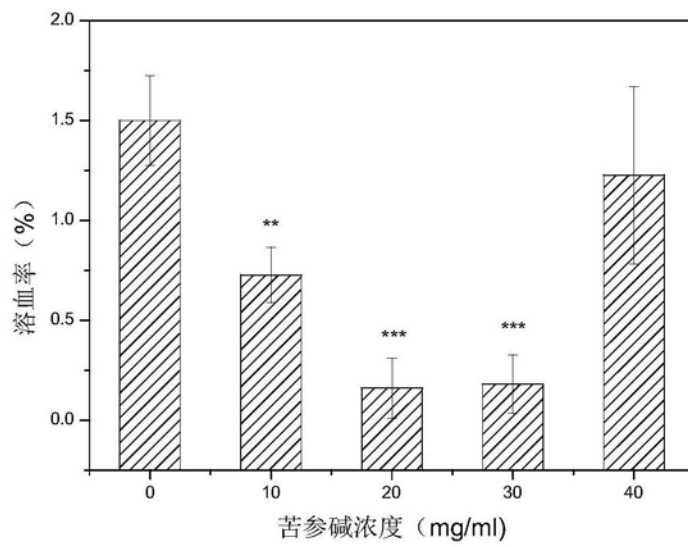


图16

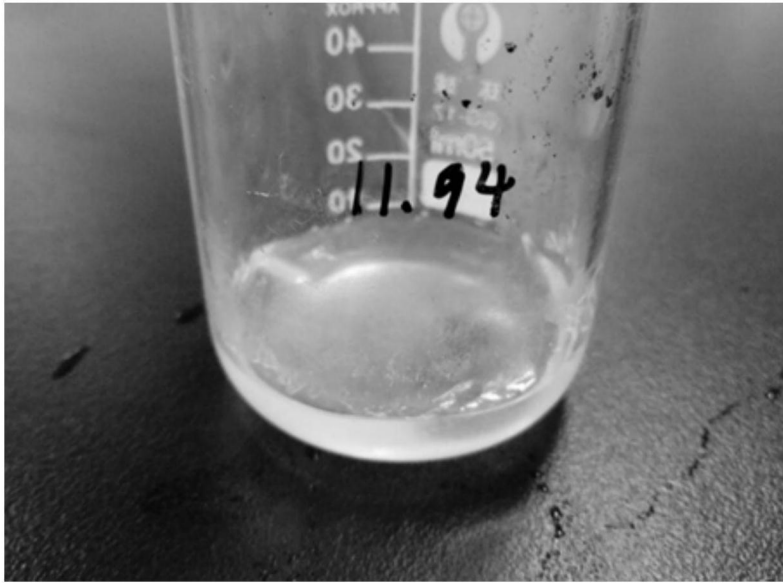


图17



图18

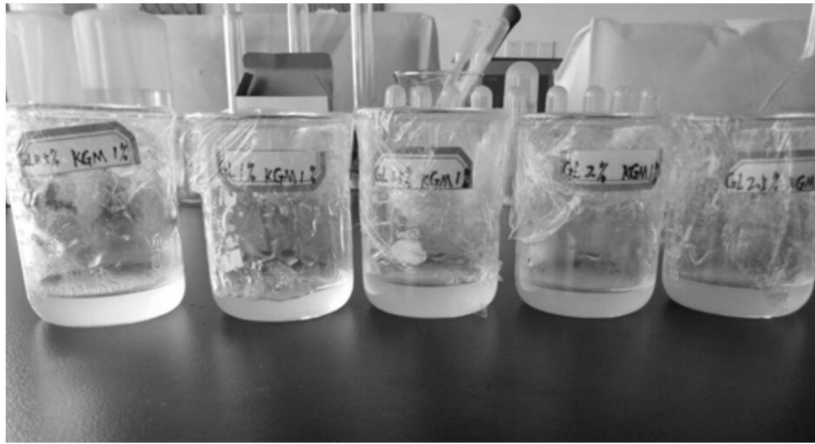


图19

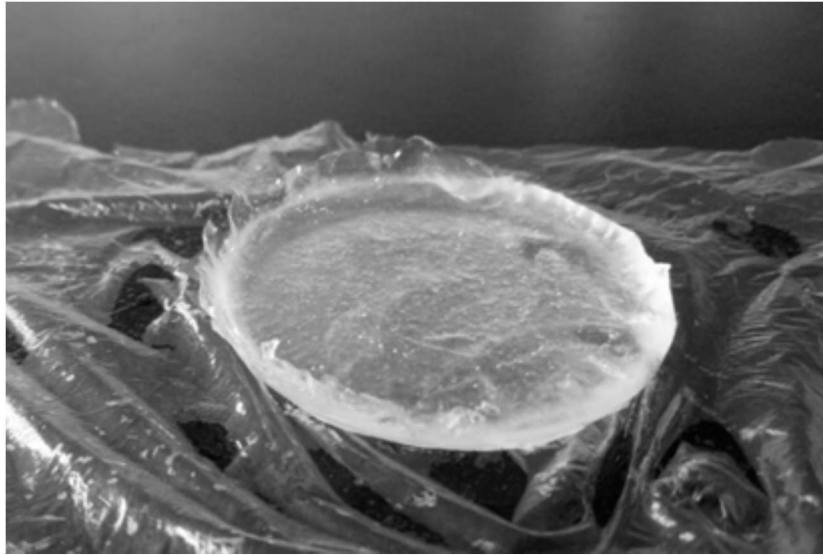


图20