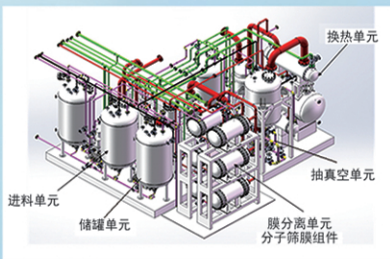




浙江汇甬新材料有限公司

微波合成第二代脱水膜

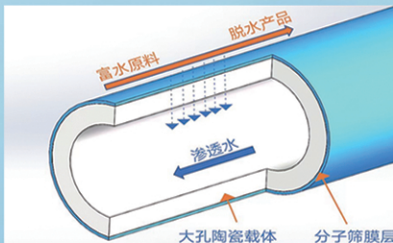


国家自然科学基金二等奖 成果转化

IChemE全球 创新产品冠军

微波分子筛膜 脱水性能遥遥领先

共沸体系、热敏体系、含水有机物脱水精制换代技术



收率高、能耗低、连续脱水、无需再生

在如下领域的有机物脱水精制已有工业化应用

锂电池电解液溶剂及NMP生产、回收
BDO产业链、煤化工、石油化工精细化学品
制药行业、溶媒回收、燃料乙醇、超纯溶剂

广泛适用于醇类、醚类、酯类、酮类、苯系物、卤代烃的脱水精制



网址: www.hymater.com

固定电话: 0574-87648996

电话: 13396592011

地址: 浙江省宁波市江北高新园区庆丰路联东U谷国际港56号楼

淀粉基凝胶包封药物复合物制备 及清除牙菌斑性能

张玉媛^{1,2}, 洪流^{1,2*}, 杨成^{1,2}

(1. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 合成与生物胶体教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为提升盐酸米诺环素 (MH) 对牙菌斑的清除效果, 利用羧甲基淀粉 (CMS) 与 Sn^{2+} 物理交联制备纳米凝胶 (CSN), 并通过复配壳聚糖 (CS) 增强靶向黏附性, 最后包封 MH 制备了凝胶包封药物复合物 (CS/CSN@MH)。通过 ¹HNMR、FTIR、粒径和 Zeta 电位、TEM 表征了 CS/CSN@MH 结构组成及微观形貌。测试了 CS/CSN@MH 的药物包封率、载药率, 并考察了其抗菌活性、生物相容性。结果表明, CS/CSN@MH 的 MH 包封率和载药率分别可达 76.48% 和 10.64%; CS/CSN@MH 在 48 h 内的 MH 累积释放率为 47.46%。经 CS/CSN@MH 处理后的变形链球菌生物膜残留量仅为 13.76%, 抗菌性优于游离 MH 处理的 (69.87%), 并通过活/死菌染色及 SEM 技术进一步验证了材料的抗菌性能。细胞毒性实验结果表明, CS/CSN@MH 处理过的人牙龈成纤维细胞的存活率 >90%, 说明材料具备较好的生物相容性。

关键词: 牙菌斑生物膜; 缓释; 羧甲基淀粉; 纳米凝胶; 氟化亚锡; 壳聚糖; 淀粉化学品

中图分类号: TQ460.4 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 02-0402-09

Preparation of starch-based drug-loaded nanogel and its effect on dental plaque biofilm removal

ZHANG Yuyuan^{1,2}, HONG Liu^{1,2*}, YANG Cheng^{1,2}

(1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids, Ministry of Education, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: To improve the dental plaque removal efficacy of minocycline hydrochloride (MH), the gel-encapsulated drug complex (CS/CSN@MH) was prepared by encapsulation of MH with nanogel (CSN) synthesized from physical cross-linking of carboxymethyl starch (CMS) and Sn^{2+} , which was further compounded with chitosan (CS) for enhancement in targeted adhesion, and characterized by ¹HNMR, FTIR, particle size and Zeta potential as well as TEM. The encapsulation rate and drug loading rate of CS/CSN@MH were measured, while its antibacterial activity and biocompatibility were further analyzed. The results showed that encapsulation rate and drug loading rate were 76.48% and 10.64%, respectively. The cumulative MH release rate from CS/CSN@MH within 48 h was 47.46%. After CS/CSN@MH treatment, the residual amount of *Streptococcus mutans* biofilm was only 13.76%, higher than that by free MH treatment (69.8%). The antibacterial performance of the material were further verified by live/dead bacteria staining and SEM technology. The results from cytotoxicity experiment displayed that the survival rate of human gingival fibroblasts treated with CS/CSN@MH was >90%, indicating that good cytocompatibility of the material.

Key words: dental plaque biofilm; slow release; carboxymethyl starch; nanogels; stannous fluoride; chitosan; starch chemicals

收稿日期: 2024-02-08; 定用日期: 2024-03-12; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240137

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2017175)

作者简介: 张玉媛 (1999—), 女, 硕士生, E-mail: 6210610025@stu.jiangnan.edu.cn。联系人: 洪流 (1985—), 男, 副教授, E-mail: hongliu@jiangnan.edu.cn。

龋齿是口腔中一种常见的细菌性疾病, 如不及时处理, 可引发根尖周炎和牙髓炎等严重问题, 甚至导致牙齿脱落^[1]。因此, 预防和治疗龋齿的形成是至关重要的。细菌生物膜(也叫牙菌斑)是由多种微生物和细胞外多糖基质构成, 是导致龋齿的主要致病因素。基质为嵌入的微生物细胞提供了保护, 但其也阻碍了药物向更深层次的渗透^[2-3]。解决这些问题的传统方法主要是通过刷牙或局部使用漱口水冲洗。然而, 牙间区域和牙缝区域通过刷牙等机械手段难以清洁完全, 并且由于唾液的流动性, 大多数药物在口腔中的流失非常迅速, 不能长期发挥功效^[4-5]。

局部药物缓释系统在口腔中的应用一定程度上可以解决上述问题^[4], 其能够使生物膜表面的药物浓度相对较高, 可以促进药物更好地渗透进生物膜内层, 从而杀死细菌, 提高药物的生物利用度, 并且减少多种给药方案的需求, 改善患者依从性^[2,6]。近几十年来, 清漆^[7]、聚合物薄膜^[8]、凝胶^[9]等缓释系统已被应用到口腔给药中, 其中, 凝胶作为一种具有高度生物相容性和药物包容能力的材料更是在口腔领域被广泛研究^[10]。RIBEIRO 等^[11]展示了一种可注射和可光交联的明胶甲基丙烯酰基(GelMA)水凝胶, 此水凝胶可以将环丙沙星(CIP)洗脱短纳米纤维用于口腔感染的治疗。XU 等^[12]以壳聚糖、B-甘油磷酸钠和明胶为原料, 制备了一种热敏型水凝胶, 此水凝胶可持续释放阿司匹林和促红细胞生成素用于治疗牙周炎。尽管如此, 为实现有效和可持续的口腔细菌抑制效果, 设计一种低毒性和生物膜黏附性的缓释纳米凝胶仍至关重要。

淀粉及其衍生物因为生产成本低、生物相容性好和生物降解性高等优点在生物医药领域发挥着重要作用^[13-14]。羧甲基淀粉(CMS)一般通过淀粉与氯乙酸在碱性条件下发生亲核反应而制备, 淀粉2、3、6号碳上的羟基氢原子被羧甲基取代, 使其具有阴离子特征^[15]。比起天然淀粉, CMS 具有更好的水溶性, 更容易装载各种类型药物^[16-17]。AN 等^[18]报道了利用 CMS 和溶菌酶的静电自组装行为形成纳米凝胶, 考察了对表没食子儿茶素没食子酸酯和花青素的包封与释放性能。此外, CMS 还可以通过静电相互作用、氢键或共价键与其他材料结合^[17]。SnF₂ 被证明是一种预防龋齿的安全、有效成分, 广泛用于牙膏、漱口水等口腔护理产品^[19]。壳聚糖(CS)是自然界中唯一带正电的天然多糖, 其很容易与带负电荷的材料反应结合, 并为材料提供生物膜黏附性^[20-21]。

本文拟使用物理交联法来制备纳米凝胶, 以其作为一种药物递送系统去除口腔生物膜中的致龋变形链球菌。先将淀粉改性成 CMS, 然后通过羟基和羧基与 SnF₂ 中的 Sn²⁺ 之间的配位、静电相互作用形

成聚合物聚集体, 再和 CS 离子交联得到稳定的凝胶, 最后将盐酸米诺环素(MH)作为模型药物包封在凝胶中制备凝胶包封药物复合物。考察复合物的制备条件, 并对其结构、形态、药物释放、抗菌活性等进行评价。旨在高效清除口腔中的牙菌斑, 预防龋齿及牙周炎等口腔疾病的发生, 以期为低毒性和生物膜黏附性的缓释纳米凝胶制备提供参考。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

高直链淀粉(HAS), 宜瑞安食品配料有限公司; CCK-8 试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司; 脑心浸出液(BHI)培养基, 青岛海博生物技术有限公司; 变形链球菌(ATCC 25175), 山东拓普生物工程有限公司; LIVE/DEAD[®]BacLight[™] 细菌活力试剂盒, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 羟基磷灰石(HAP, 直径 8 mm), 烟台信达医疗器械有限公司; 人牙龈成纤维细胞(HGF-1, ATCC[®] CRL-2014), 苏州赛拓生物科技有限公司; 胎牛血清(FBS-AU500), 澳大利亚 Newzerum 公司; 青霉素-链霉素双抗、DMEM 基础培养基, 美国 Gibco 公司; NaOH、一氯乙酸(MCA)、异丙醇(IPA)、无水乙醇、二甲基亚砜(DMSO), AR, 磷酸氢二钠缓冲液(PBS, pH=7.4), 国药集团化学试剂有限公司; CS(重均相对分子质量 250000)、罗丹明 B(RhB), AR, 上海麦克林生化科技股份有限公司; SnF₂, AR, 北京伊诺凯科技有限公司; MH, AR, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT), AR, 上海泰坦科技股份有限公司。

AVANCE III HD 400 MHz 型全数字化超导核磁共振波谱仪(NMR), 德国 Bruker 公司; Nicolet iS5 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; NanoBrook Omni 型多角度粒度及高灵敏 Zeta 电位分析仪, 美国 Brookhaven 仪器公司; JEM-2100Plus 型透射电子显微镜(TEM), 日本电子株式会社; TU-1950 型紫外-可见分光光度计(UV-Vis), 北京普析通用仪器有限责任公司; Tecan Infinite 200 PRO 型酶标仪, 上海帝肯国际贸易有限公司; TCS SP8 型共聚焦激光扫描显微镜(CLSM), 德国 Leica 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 CMS 的制备

CMS 的制备参照文献[22]方法略有改动。将 13.8 g (0.074 mol) HAS 加入到装有 108 mL 异丙醇的三颈烧瓶中; 随后, 在连续搅拌下缓慢滴加 10.3 mL

(10.78 mol/L) NaOH 水溶液。滴加完成后,在 40 °C 下搅拌反应 20 min。然后,加入 2.8 g (0.03 mol) MCA,并将混合物在 40 °C 下搅拌反应 2.5 h。反应结束后,将产物过滤后悬浮于体积分数 95% 的乙醇中,并用体积分数 50% 的乙酸溶液调节 pH 至 5.5~6.5。再次过滤,用体积分数 85% 的乙醇洗涤滤饼,直到用 AgNO₃ 溶液 (0.1 mol/L) 检测不到 Cl⁻,再用无水乙醇洗涤两次脱水。将所得沉淀物在 45 °C 烘箱中干燥 24 h。最后,将样品研磨成细粉,并过 60 目筛,得到白色固体粉末,即 CMS,记为样品 1,产率为 78.86%。¹HNMR (400 MHz, D₂O), δ: 5.40 (s, 1H, CH), 5.75 (s, 1H, CH), 4.30~3.20 (m, 1H, CH), 3.90 (s, 2H, CH₂)。

使用铜盐滴定法^[23]测量羧甲基取代度 (DS)。

1.2.2 纳米凝胶及凝胶包封药物复合物的制备

将 CS 用质量分数为 1% 的醋酸溶解,制备质量浓度为 1.25~7.50 g/L 的 CS 溶液,备用。

将 MH 溶解在质量浓度为 15.0 g/L CMS 水溶液中,制备 MH 质量浓度 2.0 g/L 的 MH-CMS 水溶液,备用。

将 pH≈4.5 的 CMS 水溶液 (10 mL, 质量浓度 1.25~20.00 g/L) 缓慢添加到磁力搅拌转速为 1000 r/min 的 SnF₂ 溶液 (10 mL, 质量浓度 6.28 g/L) 中,反应 10 min 得到羧甲基淀粉-亚锡离子复合物 (CSN)。随后加入 CS 溶液 (5 mL),反应 20 min 后离心沉淀得到凝胶,记为 CS/CSN。使用去离子水洗涤 3 遍去除多余的反应物,得到的产物经-80 °C 冷冻干燥 24 h 后,备用。

使用 MH-CMS 水溶液代替 CMS 水溶液 (质量浓度 15 g/L),其他过程和方法与上述相同,制备得到凝胶包封药物复合物并经-80 °C 冷冻干燥 24 h,记为 CS/CSN@MH。

使用 MH-CMS 水溶液代替 CMS 水溶液,依据上述方法,加入 SnF₂ 溶液反应 10 min,但不加入 CS 溶液,离心沉淀得到凝胶包封药物复合物并-80 °C 冷冻干燥 24 h,记为 CSN@MH。

将上述 CSN@MH 和 CS/CSN@MH 制备过程中的 MH-CMS 替换为 RhB-CMS (其中 RhB 质量浓度为 2 mg/L、CMS 质量浓度为 15.0 g/L),制备得到 CSN@RhB 和 CS/CSN@RhB。

1.3 结构表征

FTIR 测试:采用溴化钾压片法对 CMS、CSN 和 CS/CSN 样品进行测试,波数范围 4000~400 cm⁻¹。TEM 测试:将制备的样品分散液滴在铜网上,工作电压 200 kV。粒径与 Zeta 电位测试:将制备的 CSN 及 CS/CSN 经离心洗涤后重悬于去离子水或不同 pH 的柠檬酸/PBS 中,再通过多角度粒度及高灵敏 Zeta

电位分析仪测试粒径及 Zeta 电位。

1.4 性能测试

1.4.1 药物包封率和载药率的测试

参照文献[24]方法,采用紫外吸收光谱法测定 CS/CSN@MH 的药物包封率和载药率。

将根据 1.2.2 节方法制备的新鲜 CS/CSN@MH 分散液以 10000 r/min 离心 10 min,收集上清液,通过紫外-可见分光光度计测定溶液吸光度,根据在 349 nm 处测定的 MH 质量浓度 (x, mg/L)-吸光度 (y) 标准曲线拟合方程 $y=5.5728x-0.0186$ ($R^2=0.99834$),计算测定溶液吸光度对应的 MH 的质量浓度,平行 3 次测量。根据式 (1) 和 (2) 计算包封率和载药率:

$$\text{包封率}/\%=(m_{\text{总}}-m_{\text{游离}})/m_{\text{总}}\times 100 \quad (1)$$

$$\text{载药率}/\%=(m_{\text{总}}-m_{\text{游离}})/m_{\text{复合物}}\times 100 \quad (2)$$

式中: $m_{\text{总}}$ 为添加到 CS/CSN@MH 中的 MH 总质量,mg; $m_{\text{游离}}$ 为上清液中剩余的游离 MH 质量,mg; $m_{\text{复合物}}$ 为 CS/CSN@MH 的质量,mg。

1.4.2 MH 释放动力学

通过透析方法研究 CS/CSN@MH 在模拟人工唾液中 MH 的动力学释放过程。人工唾液的配制参照 ISO/TR10271—2020 并略有修改。具体配方:NaCl、KCl、CaCl₂·2H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O、Na₂S·2H₂O、尿素质量浓度分别为 0.400、0.400、0.795、0.780、0.050、1.000 g/L,α-淀粉酶含量为 10 U/mL。用 1 mol/L NaOH 溶液将人工唾液的 pH 进一步调节至 6.7。

称取 20 mg 冻干 CSN@MH 或 CS/CSN@MH 置于含 2 mL 人工唾液的透析袋 (截留相对分子质量 3500 Da) 内,浸入 80 mL 模拟人工唾液释放介质中,在 37 °C 下 100 r/min 轻摇孵育 48 h。在孵育过程中,在预先确定的时间点取出 1 mL 释放介质,通过紫外-可见分光光度计测定溶液吸光度,根据在 349 nm 处测定的 MH 质量浓度 (μg/mL)-吸光度标准曲线拟合方程 $y=5.5728x-0.0186$ ($R^2=0.99834$),计算测定溶液吸光度对应的 MH 的质量浓度。同时加入等量的新鲜人工唾液,保持释放介质体积恒定。根据式 (3) 计算药物累积释放率:

$$\text{药物累积释放率}/\%=\sum_{t=0}^t \frac{m_t}{m_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: m_t 为时间 t 时介质中药物的累积释放量,μg; m_0 为冻干 CSN@MH 或 CS/CSN@MH 中药物的初始质量,μg。

1.5 复合物性能测试

1.5.1 生物膜黏附性能测试

以变形链球菌为制备细菌生物膜的模型细菌。将 1×10^6 CFU/mL 的变形链球菌在质量分数为 1% 的

蔗糖 BHI 培养基中厌氧培养 24 h 形成生物膜, 并用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染色 10 min。将质量浓度为 0.25 g/L CS/CSN@RhB 或 CSN@RhB 水分散液孵育 15 min。取出后用无菌 PBS 冲洗 3 次, 晾干, 通过共聚焦激光扫描显微镜在 408 和 522 nm 波长下观察其黏附图像, 并使用 Image J 软件计算黏附面积, 以此评价两者的生物膜黏附性能。

1.5.2 抗菌性能测试

抗菌性能评价过程参照文献[25]并略加修改。

在 48 孔板中加入含 1×10^6 CFU/mL 变形链球菌和质量分数为 1% 蔗糖的 BHI 培养基, 厌氧培养 24 h 形成生物膜。用无菌 PBS 洗去生物膜表面游离细菌后, 再分别加入质量浓度为 0.25 g/L 样品和质量浓度为 25 mg/L 游离 MH 与其共孵育 15 min, 用无菌 PBS 洗涤 3 次去除未附着样品。生物膜继续加培养基培养 24 h, 用 PBS 洗去浮游细菌, 加入质量浓度为 0.5 g/L 的 MTT 避光处理并孵育 3 h。去除 MTT, 每孔加入 300 μ L 的 DMSO, 将细胞中甲瓩完全溶解后, 转移至 96 孔板并用酶标仪在 550 nm 处测每孔的吸光度。

通过活/死细菌染色实验来检测样品的抗菌活性和生物膜中细菌的存活情况。将 HAP 片与菌液共孵育 24 h 制备生物膜, 再将其与质量浓度为 0.25 g/L 样品和质量浓度为 25 mg/L 游离 MH 共孵育 15 min, 随后用无菌 PBS 洗涤 3 次, 去除未附着样品。继续加培养基并厌氧培养 24 h 后, 将 LIVE/DEAD[®]BacLight[™] 细菌活力试剂盒中的 SYTO 9 (5 μ mol/L, 染活菌) 和碘化丙啶 (PI, 30 μ mol/L, 染死菌) 的混合溶液与 HAP 片在避光条件下共孵育 15 min。然后, 使用配备 20 倍镜的 CLSM, 通过波长为 488 nm 的激发光观察样品表面的细菌状态, 并使用 Image J 软件评估活/死细菌面积。

通过 SEM 评估生物膜的表面形貌。将被 CSN@MH、CS/CSN@MH 和游离 MH 处理过的生物膜用 PBS 洗涤 3 次, 以去除游离的细菌。再用体积分数为 2.5% 戊二醛固定 12 h, 然后用不同质量分数 (25%、50%、75%、95%、100%) 的乙醇各脱水 10 min, 样品风干后用金溅射镀膜, 并通过 SEM 观察样品上细菌生物膜的生长情况。

1.5.3 细胞毒性测试

采用 CCK-8 法测定 HGF-1 的细胞活力, 评价材料的细胞毒性。

HGF-1 在含体积分数 15% 的胎牛血清和体积分数 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 中培养, 环境温度 37 $^{\circ}$ C, 含质量分数 5% 的 CO_2 , 相对湿度 95%。将 HGF-1 接种在 96 孔板上, 细胞密度 1×10^4 个/孔。孵育 24 h 后, 将培养基替换为 100 μ L 含不同质量浓度 (0.0625~

0.5000 g/L) 的 CSN@MH 或 CS/CSN@MH 的新鲜培养基。在 37 $^{\circ}$ C 继续培养 24 h, 孵育后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 继续孵育 2 h, 测定在 450 nm 处的吸光度。根据式 (3) 计算 HGF-1 细胞存活率, 代表细胞活力:

$$\text{细胞活力}/\% = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100 \quad (3)$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 分别为用样品处理过的细胞、未处理细胞和培养基的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 反应条件对 CMS 取代度的影响

在合成 CMS 的过程中, 淀粉先与 NaOH 生成淀粉钠, 淀粉钠中的氧负离子再攻击 MCA 中的 C—Cl, 成功接枝羧甲基基团后生成 CMS^[26]。固定反应温度为 40 $^{\circ}$ C, 考察 $n(\text{NaOH}) : n(\text{MCA}) : n(\text{AGU})$ 对 CMS 取代度的影响, 其中 AGU 为无水葡萄糖单元, 结果如表 1 所示。

表 1 制备条件对 CMS 取代度的影响

Table 1 Effect of reaction conditions on degree of substitution of CMS

样品	$n(\text{NaOH}) : n(\text{MCA}) : n(\text{AGU})$	时间/h	DS
1	1.5 : 0.4 : 1.0	2.5	0.24
2	1.5 : 0.6 : 1.0	2.5	0.38
3	1.5 : 0.8 : 1.0	2.5	0.30
4	2.0 : 0.8 : 1.0	2.5	0.50
5	2.0 : 1.0 : 1.0	2.5	0.48
6	3.0 : 1.4 : 1.0	1.5	0.71

从表 1 可以看出, 当 $n(\text{NaOH}) : n(\text{AGU}) = 1.5 : 1.0$ 时, 随着 $n(\text{MCA}) : n(\text{AGU})$ 的增加, CMS 的 DS 先增大后减小, 当 $n(\text{MCA}) : n(\text{AGU}) = 0.6 : 1.0$ 时, DS (0.38) 最大。这是因为, 当 MCA 过量时, 体系中的 NaOH 被中和, 碱性环境变弱, 副反应增加导致 DS 下降。适当升高 NaOH 的相对用量, 有利于生成更多的淀粉钠盐, 提高反应效率^[27-28]。当 $n(\text{NaOH}) : n(\text{MCA}) : n(\text{AGU}) = 3.0 : 1.4 : 1.0$ 时, CMS 的 DS 可达 0.71, 此时反应时间为 1.5 h, 这是因为, 随着接入羧甲基 DS 的逐渐增加, 糊化温度降低, 在反应后期糊化结块, 因此, 提前结束反应, 选择此反应条件制备的 CMS (样品 6) 进行后续实验。

2.2 结构表征分析

图 1 为 CMS 的 ¹H NMR 谱图。

从图 1 可以看出, δ 5.40 和 5.75 处的信号峰分别归属于 CMS 中无水葡萄糖单元的 C-1b 和 C-1a 上的质子。由于这些碳原子与两个电负性很强的氧原子直接相连, 质子被高度去屏蔽, 因而转移到低场^[29]。CMS 的 C-2~C-7 碳原子的质子信号峰范围在 δ 3.20~4.30, 由于其屏蔽性质, 质子峰呈高场分布^[30]。

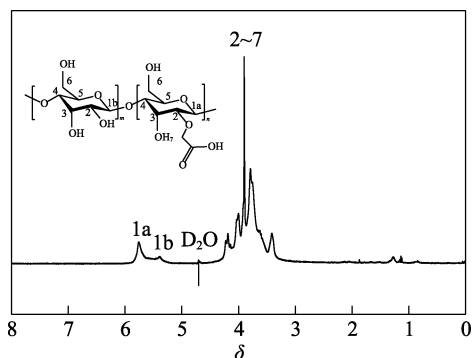


图 1 CMS 的 ¹H NMR 谱图
Fig. 1 ¹H NMR spectrum of CMS

图 2 为 HAS 和 CMS 的 FTIR 谱图。

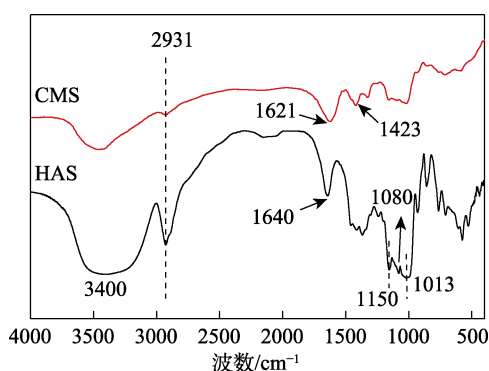


图 2 HAS 和 CMS 的 FTIR 谱图
Fig. 2 FTIR spectra of HAS and CMS

从图 2 可以看出, HAS 在 3400、2931 cm^{-1} 处的吸收峰分别归属于—OH 的伸缩振动和 C—H 的伸缩振动; 1013 和 1150 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 HAS 骨架上 C—O—H 的拉伸振动, 1080 处的吸收峰归属于 C—H 键的弯曲振动; 1640 cm^{-1} 处的吸收峰是由淀粉非晶态区 H—O—H 的弯曲振动引起, 当 HAS 经改性为 CMS 时, 此吸收峰红移到 1621 cm^{-1} , 归因于—COO⁻的存在^[31]。同时, 1423 cm^{-1} 处新的吸收峰可以归属于 CMS 中—COO⁻的对称伸缩振动^[32]。

2.3 制备条件优化分析

图 3 为 CMS 的质量浓度对 CSN 的 Zeta 电位和粒径的影响。

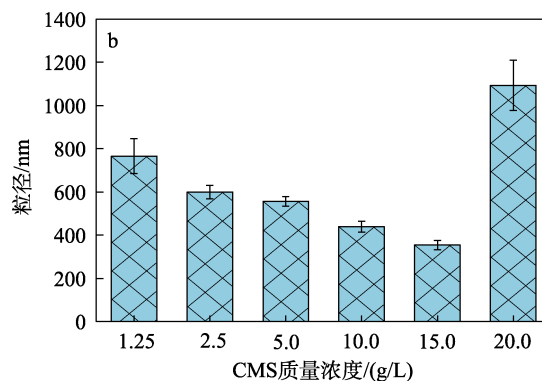
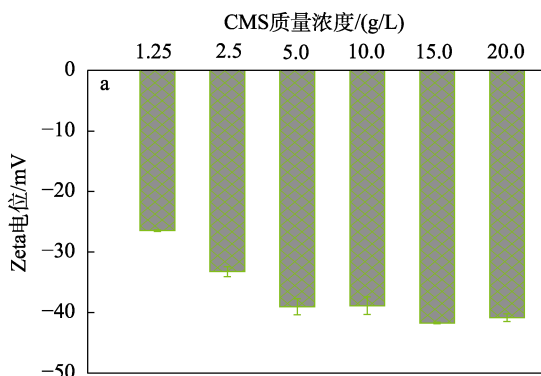


图 3 CMS 质量浓度对 CSN 的 Zeta 电位 (a) 和粒径 (b) 的影响

Fig. 3 Effects of CMS mass concentration on Zeta potential (a) and particle size (b) of CSN

从图 3a 可以看出, 随着 CMS 质量浓度的增加, CSN 的 Zeta 电位绝对值整体上呈增大趋势, 粒径逐渐减小后突然增加。当 CMS 质量浓度为 15.0 g/L 时, CSN 的 Zeta 电位稳定在 -41.7 mV, 并且此时平均粒径 (354.17 nm) 最小。因此, 确定 CMS 的最适质量浓度为 15.0 g/L, 后续实验均采用此质量浓度进行。

图 4 为不同 CS 质量浓度对凝胶包封药物复合物包封性能的影响。

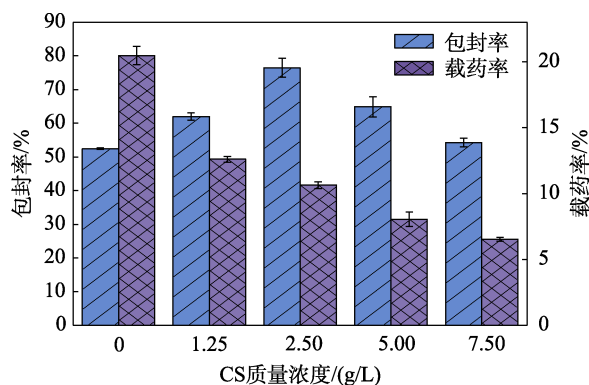


图 4 CS 质量浓度对凝胶包封药物复合物包封性能的影响
Fig. 4 Effect of CS mass concentration on the encapsulation properties of gel-encapsulated drug complex

从图 4 可以看出, 不加 CS 时, CSN@MH 的包封率为 52.44%, 载药率为 20.48%。而当 CS 质量浓度 2.50 g/L 时, CS/CSN@MH 的包封率最高, 为 76.48%, 载药率为 10.64%。随着 CS 质量浓度的继续增加, CS/CSN@MH 载药率逐渐降低。这可能是因为, 加入的 CS 使 CS/CSN@MH 质量增加。因此, 选用药物包封率最高时的 2.50 g/L 作为 CS 的最适质量浓度进行后续实验。

2.4 CS/CSN 表征分析

图 5 为 CMS、CS、CSN 和 CS/CSN 的 FTIR 谱图。

从图 5 可以看出, 与 CMS 相比, CSN 在 1733 cm^{-1} 处出现新峰, 为 C=O 键的伸缩振动, 可能因为 CMS

中的 -COO^- 在酸性条件下与 H^+ 结合形成 -COOH 基团。CSN 中的 -OH 波段 (3423 cm^{-1}) 向更高的波数偏移, 且波峰变窄, 表明 CSN 中的 -OH 基团受到 -COO^- 和亚锡离子之间静电作用的影响, CSN 中 -COO^- 基团 (1625 和 1405 cm^{-1}) 的光谱位移也有类似现象^[33]。CS 的 FTIR 谱图中, 出现在 1650 和 1596 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 C=O 键的拉伸振动 (酰胺 I) 和 N-H 的弯曲振动 (酰胺 II)^[34]。CS/CSN 谱图中 -COO^- 波段红移, N-H 的弯曲振动 (酰胺 II 带) 的峰被该峰所掩盖, 但峰形变宽。

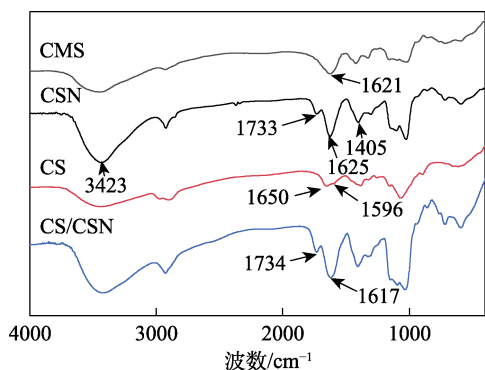


图 5 CMS、CS、CSN 和 CS/CSN 的 FTIR 谱图
Fig. 5 FTIR spectra of CMS, CS, CSN and CS/CSN

图 6 为 CSN 和 CS/CSN 的粒径和 Zeta 电位。

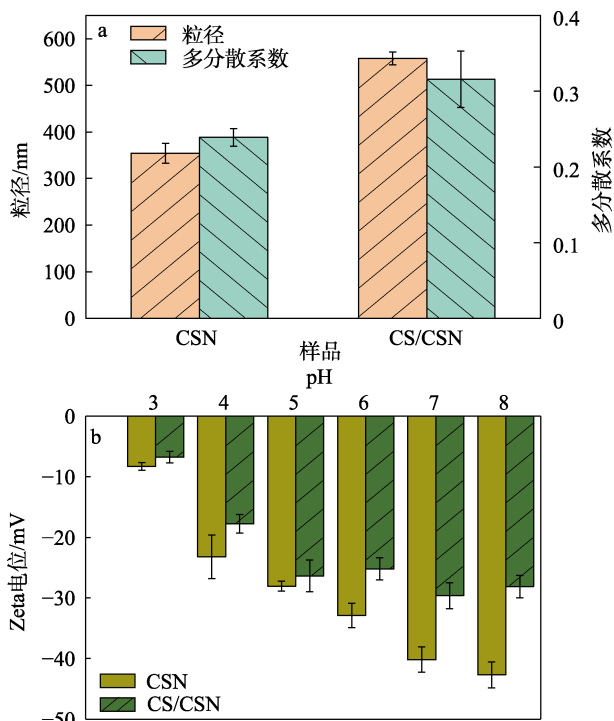


图 6 CSN 和 CS/CSN 的粒径 (a) 及 Zeta 电位 (b)
Fig. 6 Particle size (a) and Zeta potential (b) of CSN and CS/CSN

从图 6a 可以看出, CS/CSN 的平均粒径和多分散系数 (PDI) 分别为 557.56 nm 和 0.319 , 均大于 CSN。从图 6b 可以看出, CSN 和 CS/CSN 的 Zeta 电位绝

对值都随着 pH 的升高而增大, 这是因为, 在高 pH 下, 质子会从 CMS 的羧基解离。CSN 的 Zeta 电位绝对值高于 CS/CSN, 这是因为, CS 是带正电的高分子, 部分中和了 CMS 中羧基的负电荷, 这也侧面验证了 CS 与 CSN 的成功复合。

图 7 为 CSN 和 CS/CSN 的 TEM 图。

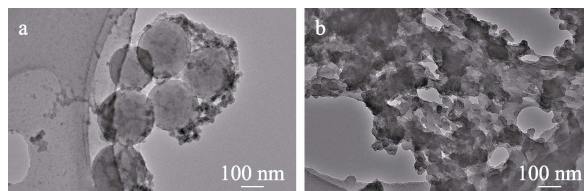


图 7 CSN (a) 和 CS/CSN (b) 的 TEM 图
Fig. 7 TEM images of CSN (a) and CS/CSN (b)

从图 7 可以看出, CSN 整体呈现为平均直径约为 $150\sim 300\text{ nm}$ 的球形或近似球形的颗粒 (图 7a), 而 CS/CSN 呈现为表面颗粒状的复合物聚集体 (图 7b)。这可能是因为, CMS-CS 与 CMS-Sn^{2+} 静电作用之间的竞争关系, 导致 CSN 原有的均一球状结构被打破。

2.5 CS/CSN@MH 的药物缓释性能分析

图 8 为游离 MH、CSN@MH 和 CS/CSN@MH 在人工唾液中的药物缓释曲线和拟合曲线。

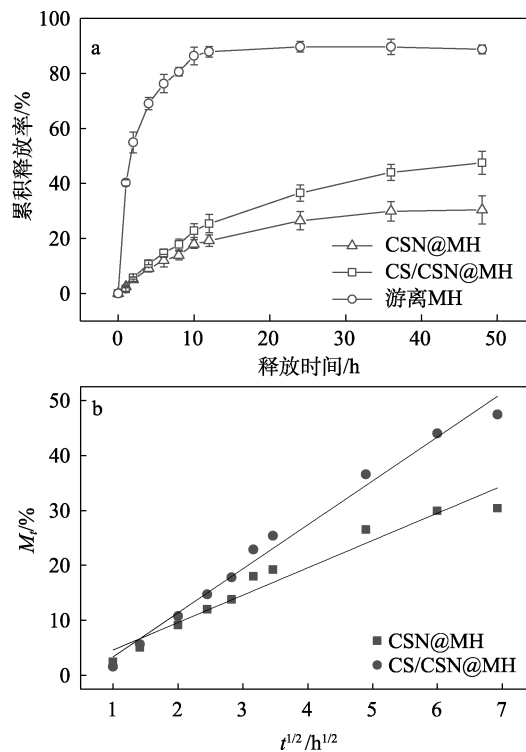


图 8 游离 MH、CSN@MH 和 CS/CSN@MH 在人工唾液中的药物缓释曲线 (a) 和拟合曲线 (b)

Fig. 8 Release curves (a) and fitting curves (b) of free MH, CSN@MH and CS/CSN@MH in artificial saliva

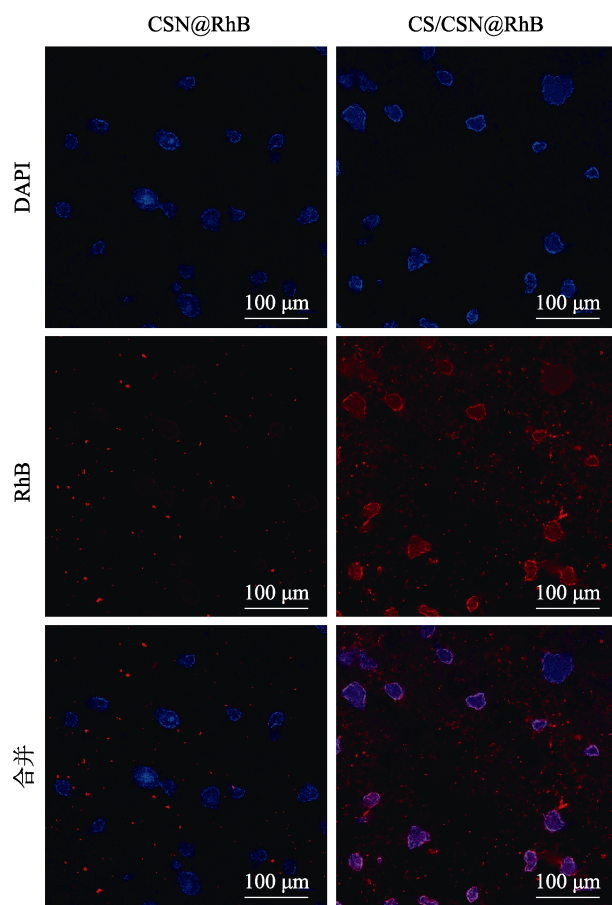
从图 8a 可以看出, 游离 MH 在前 4 h 累积释放达

69.06%，呈现“突释”效应，这样会导致药物生物利用度低，治疗效果差^[35]。CSN@MH 和 CS/CSN@MH 的释放较为缓慢，48 h 的累积释放率分别为 30.40% 和 47.46%，表明两种凝胶包封药物复合物较好地延缓了 MH 的释放，这得益于纳米复合物形成的凝胶屏障层。CS/CSN@MH 的 MH 释放略快于 CSN@MH，可能是因为，CS 与同为正电荷的 MH 之间有一定的排斥作用，导致 MH 在 CS/CSN 中的结合不如在 CSN 中紧密。

为了进一步研究两种凝胶包封药物复合物的药物缓释机理，根据 Higuchi 释放动力学模型 ($M_t = Kt^{1/2}$, M_t 为 t 时药物累积释放率，%； K 为速率常数， $h^{-1/2}$)^[36-37] 对上述结果进行了拟合，结果如图 8b 所示。CSN@MH 和 CS/CSN@MH 的拟合曲线方程分别为 $y=4.98x-0.36$ 和 $y=7.80x-4.62$ ，其相关系数 (R^2) 分别为 0.9554 和 0.9865，表明 MH 的释放与此模型较为符合，药物释放行为是一个时间平方根依赖过程^[38]。

2.6 生物膜黏附性能分析

图 9 为包载 RhB 的凝胶包封药物复合物在生物膜上的黏附性测试结果。



红色代表凝胶包封药物复合物；蓝色代表生物膜

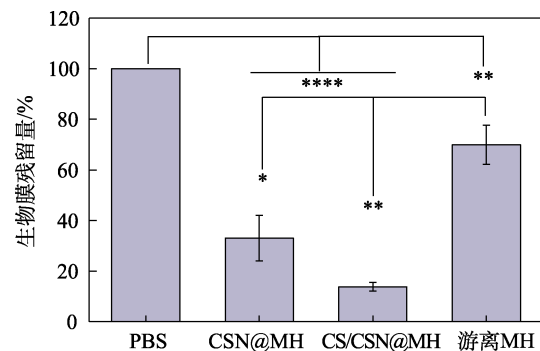
图 9 包载 RhB 的凝胶包封药物复合物在生物膜上的黏附性

Fig. 9 Adhesion of RhB-coated gel-encapsulated drug complex to biofilm

从图 9 可以看出，细菌附着后增殖聚集形成的小菌落^[39]被 DAPI 染色后，在 408 nm 激光下显蓝色^[24]，其余地方因为细菌膜初始黏附较为稀疏，荧光较弱未能呈现。RhB 包载后的凝胶包封药物复合物在 522 nm 下发出红色荧光，CSN 随机分散在生物膜表面，黏附量仅有 0.98%±0.08%；而 CS/CSN 对聚集体有着明显的黏附，并且整体黏附面积达到 10.58%±1.25%，两者与生物膜的面积比值分别为 0.08±0.02 和 0.92±0.11，表明 CS/CSN 具有更显著的生物膜靶向性。

2.7 抗菌性能分析

MH 是一种广谱抗生素，具有较好的杀菌作用。但游离 MH 不易停留在口腔组织表面。与此相反，被纳米微凝胶包裹的药物因为凝胶包封药物复合物特有的微球形貌、巨大的比表面积和骨架结构，使 MH 能够黏滞在细菌生物膜表面，并持续释放出药物破坏细菌生物膜。图 10 为使用 MTT 染色法量化的凝胶包封药物复合物对生物膜的破坏效果。



以 PBS 处理组为 100%；* 为 $p < 0.05$ ，代表差异性显著；** 为 $p < 0.01$ ，代表差异性较显著；*** 为 $p < 0.001$ ，代表差异性很显著；**** 为 $p < 0.0001$ ，代表差异性极显著，下同

图 10 凝胶包封药物复合物对生物膜的破坏效果

Fig. 10 Destruction effect of gel-encapsulated drug complex on biofilm

从图 10 可以看出，游离 MH 处理过的细菌生物膜残留量为 69.87%，远高于 CSN@MH 组的 33.01% 和 CS/CSN@MH 组的 13.76%。

图 11 为生物膜活/死菌染色实验结果。

从图 11 可以看出，PBS 组中存在大面积的结构致密的生物膜，死菌与活菌面积比值为 0.17；在 CSN@MH 组中，生物膜结构破碎，细菌数量明显较少，死菌与活菌面积比值增至 0.55；CS/CSN@MH 处理组的细菌面积进一步减少，且死菌与活菌面积比值增至 1.02，这是因为，CS 可以增强纳米凝胶在生物膜上的黏附；在不易穿透生物膜的 MH 组中仍观察到大面积的致密生物膜。

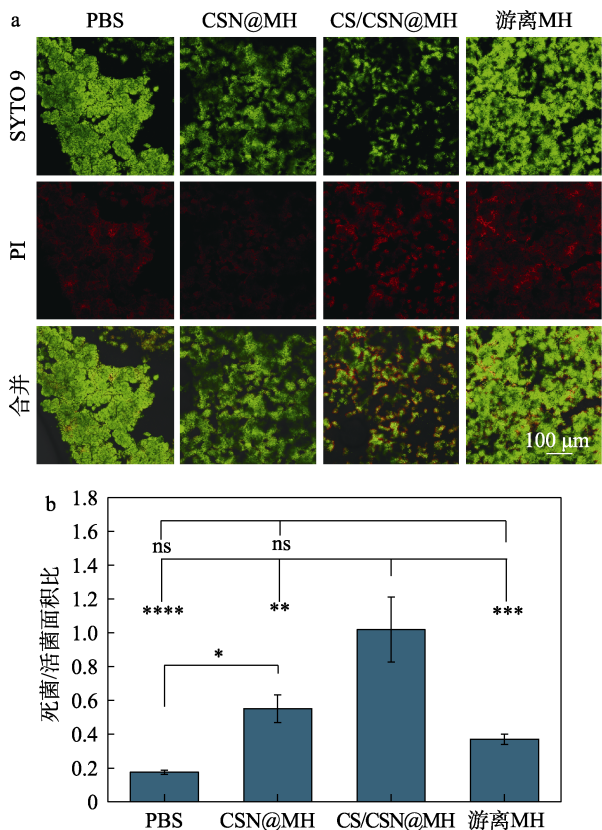


图 11 CSN@MH、CS/CSN@MH 和游离 MH 处理 24 h 后生物膜的荧光显微镜图像 (a) 及死菌/活菌面积比 (b)

Fig. 11 Fluorescence microscopic images of biofilms treated with CSN@MH, CS/CSN@MH, free MH for 24 h (a) and surface coverage ratio of live and dead bacteria (b)

图 12 为 PBS、CSN@MH、CS/CSN@MH 和 MH 处理 24 h 生物膜的 SEM 图。

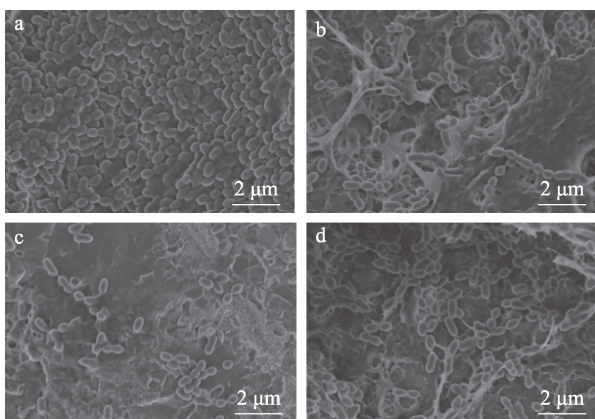


图 12 PBS (a)、CSN@MH (b)、CS/CSN@MH (c) 和 MH (d) 处理过生物膜的 SEM 图

Fig. 12 SEM images of biofilms treated with PBS (a), CSN@MH (b), CS/CSN@MH (c) and MH (d)

从图 12 可以看出, PBS 处理过的生物膜上变形链球菌分布紧密, 而 CSN@MH、CS/CSN@MH 和

MH 处理过的生物膜致密结构变得稀疏, 细菌数量明显减少。其中 CS/CSN@MH 组的生物膜面积最小、细菌数量相对最少, 表明 CS/CSN@MH 抗菌效果最好。

2.8 细胞毒性分析

图 13 为采用 CCK-8 法检测的 CSN@MH、CS/CSN@MH 对 HGF-1 细胞的毒性结果。

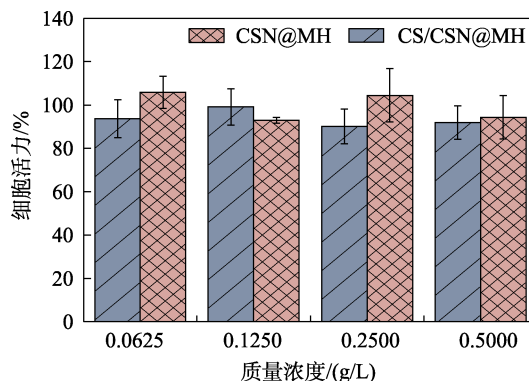


图 13 不同质量浓度 CSN@MH 和 CS/CSN@MH 对 HGF-1 细胞活力的影响

Fig. 13 Effects of CSN@MH and CS/CSN@MH with different mass concentrations on viability of HGF-1 cells

从图 13 可以看出, 不同质量浓度的 CSN@MH、CS/CSN@MH 处理后 HGF-1 细胞的存活率均 >90%, 表明两种凝胶包封药物复合物具有较好的生物相容性。

3 结论

(1) 通过简单的方法制备出了一种有效去除牙齿表面生物膜的凝胶包封药物复合物 CS/CSN@MH, 此复合物具有优异的生物膜靶向性。

(2) CS/CSN@MH 具有良好的药物缓释能力, 48 h 的 MH 累积释放率为 47.46%。这一性能提高了 MH 对生物膜的破坏能力, 经 CS/CSN@MH 处理后的变形链球菌生物膜残留量仅为 13.76%, 较之游离 MH (69.87%) 有很大提升。

(3) CS/CSN@MH 具有较好的生物相容性, 有适用于口腔护理产品的可能, 在未来口腔临床应用上具有很大潜力。但 CS/CSN 凝胶对其他非正电荷的药物的包封及缓释作用有待进一步探究。

参考文献:

- [1] SZKARADKIEWICZ-KARPINSKA A K, SZKARADKIEWICZ A. Effect of exopolysaccharides from cariogenic bacteria on human gingival fibroblasts[J]. International Journal of Medical Sciences, 2021, 18(12): 2666-2672.
- [2] RAMBURRUN P, PRINGLE N A, DUBE A, et al. Recent advances in the development of antimicrobial and antifouling biocompatible materials for dental applications[J]. Materials, 2021, 14(12): 3167.
- [3] WANG Z J, SHEN Y, HAAPASALO M. Antibiofilm peptides

- against oral biofilms[J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2017, 9(1): 1327308.
- [4] STEINBERG D, FRIEDMAN M. Sustained-release drug delivery of antimicrobials in controlling of supragingival oral biofilms[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2017, 14(4): 571-581.
- [5] ASPINALL S R, PARKER J K, KHUTORANSKIY V V. Oral care product formulations, properties and challenges[J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2021, 200: 111567.
- [6] STEINBERG D, FRIEDMAN M. Sustained-release delivery of antimicrobial drugs for the treatment of periodontal diseases: Fantasy or already reality?[J]. *Periodontol*, 2020, 84(1): 176-187.
- [7] GROSS M, ASHQAR F, SIONOV R V, *et al.* Sustained release varnish containing chlorhexidine for prevention of *Streptococcus mutans* biofilm formation on voice prosthesis surface: An *in vitro* study[J]. *International Microbiology*, 2022, 25(1): 177-187.
- [8] NAIR V V, CABRERA P, RAMIREZ-LECAROS C, *et al.* Buccal delivery of small molecules and biologics: Of mucoadhesive polymers, films, and nanoparticles-An update[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2023, 636: 122789.
- [9] WU D T, FREEDMAN B R, VINING K H, *et al.* Tough adhesive hydrogel for intraoral adhesion and drug delivery[J]. *Journal of Dental Research*, 2023, 102(5): 497-504.
- [10] HUANG M S, HUANG Y S, LIU H Y, *et al.* Hydrogels for the treatment of oral and maxillofacial diseases: Current research, challenges, and future directions[J]. *Biomaterials Science*, 2022, 10(22): 6413-6446.
- [11] RIBEIRO J S, DAGHRERY A, DUBEY N, *et al.* Hybrid antimicrobial hydrogel as injectable therapeutics for oral infection ablation[J]. *Biomacromolecules*, 2020, 21(9): 3945-3956.
- [12] XU X W, GU Z, CHEN X Y, *et al.* An injectable and thermosensitive hydrogel: Promoting periodontal regeneration by controlled-release of aspirin and erythropoietin[J]. *Acta Biomaterialia*, 2019, 86: 235-246.
- [13] LIU L, ZHANG Y, YU S J, *et al.* pH- and amylase-responsive carboxymethyl starch/poly(2-isobutyl-acrylic acid) hybrid microgels as effective enteric carriers for oral insulin delivery[J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(6): 2123-2136.
- [14] JI Y. Synthesis of porous starch microgels for the encapsulation, delivery and stabilization of anthocyanins[J]. *Journal of Food Engineering*, 2021, 302: 110552.
- [15] NITA L E, CHIRIAC A P, RUSU A G, *et al.* Stimuli responsive scaffolds based on carboxymethyl starch and poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate) for anti-inflammatory drug delivery[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2020, 20(4): 1900412.
- [16] LIANG Y T, YAO Y, LIU Y, *et al.* Curcumin-loaded HKUST-1@ carboxymethyl starch-based composites with moisture-responsive release properties and synergistic antibacterial effect for perishable fruits[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 214: 181-191.
- [17] POORESMAEIL M, NAMAZI H. Developments on carboxymethyl starch-based smart systems as promising drug carriers: A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 258: 117654.
- [18] AN J J, LIU M Z, DIN Z U, *et al.* Toward function starch nanogels by self-assembly of polysaccharide and protein: From synthesis to potential for polyphenol delivery[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 247: 125697.
- [19] KHOSRAVI Y, PALMER S, DAEP C A, *et al.* A commercial SnF₂ toothpaste formulation reduces simulated human plaque biofilm in a dynamic tyodont model[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 133(3): 1341-1352.
- [20] KHAN F, PHAM D T N, OLOKETUYI S F, *et al.* Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria[J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2020, 185: 110627.
- [21] ABUSREWIL S, BROWN J L, DELANEY C, *et al.* Chitosan enhances the anti-biofilm activity of biodentine against an interkingdom biofilm model[J]. *Antibiotics-Basel*, 2021, 10(11): 1317.
- [22] ZHANG Y P, CHI C D, HUANG X Y, *et al.* Starch-based nanocapsules fabricated through layer-by-layer assembly for oral delivery of protein to lower gastrointestinal tract[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 171: 242-251.
- [23] STOJANOVIC Z, JEREMIC K, JOVANOVIĆ S, *et al.* A comparison of some methods for the determination of the degree of substitution of carboxymethyl starch[J]. *Starch-Starke*, 2005, 57(2): 79-83.
- [24] LI B H, SHI L Q, LIU R X, *et al.* A lingering mouthwash with sustained antibiotic release and biofilm eradication for periodontitis[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, 9(41): 8694-8707.
- [25] TRAFNY E A, LEWANDOWSKI R, ZAWISTOWSKA-MARCINIAK I, *et al.* Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganisms in metalworking fluids[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2013, 29(9): 1635-1643.
- [26] LAWAL O S, LECHNER M D, HARTMANN B, *et al.* Carboxymethyl cocoyam starch: Synthesis, characterisation and influence of reaction parameters[J]. *Starch-Starke*, 2007, 59(5): 224-233.
- [27] VOLKERT B, LOTH F, LAZIK W, *et al.* Highly substituted carboxymethyl starch[J]. *Starch-Starke*, 2004, 56(7): 307-314.
- [28] SANGSEETHONG K, CHATAKANONDA P, WANSUKSRI R, *et al.* Influence of reaction parameters on carboxymethylation of rice starches with varying amylose contents[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 115: 186-192.
- [29] XIAO Z G, WANG L S, LYU C Y, *et al.* Preparation and characterization of pH-responsive Pickering emulsion stabilized by grafted carboxymethyl starch nanoparticles[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 143: 401-412.
- [30] HAQ F, YU H J, WANG Y, *et al.* Synthesis of carboxymethyl starch grafted poly(methacrylic acids) (CMS-g-PMAAs) and their application as an adsorbent for the removal of ammonia and phenol[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2020, 1207: 127752.
- [31] DOU X (窦翔), WANG Z W (王政武), HE G H (贺高红), *et al.* Preparation and application of pH-responsive loaded with carboxymethyl chitosan microspheres[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(8): 1559-1563.
- [32] CHEN L, ZHANG D, WEI L F, *et al.* Structural and mechanistic insights into starch microgel/anthocyanin complex assembly and controlled release performance[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 213: 718-727.
- [33] WU Y C, HONG L, HU X F, *et al.* Efficient antimicrobial effect of alginate-catechol/Fe²⁺ coating on hydroxyapatite toward oral care application[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2022, 5(5): 2152-2162.
- [34] QUADRADO R F N, FAJARDO A R. Microparticles based on carboxymethyl starch/chitosan polyelectrolyte complex as vehicles for drug delivery systems[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2020, 13: 2183-2194.
- [35] MI Y Q, CHEN Y, GU G D, *et al.* New synthetic adriamycin-incorporated chitosan nanoparticles with enhanced antioxidant, antitumor activities and pH-sensitive drug release[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 273: 118623.
- [36] ASKARIZADEH M, ESFANDIARI N, HONARVAR B, *et al.* Kinetic modeling to explain the release of medicine from drug delivery systems[J]. *ChemBioEng Reviews*, 2023, 10(6): 1006-1049.
- [37] SEYED D M S, RASOULIFARD M H, MADADI S, *et al.* Synthesis and evaluation of the efficiency of antibacterial hydrogel beads based on the sodium alginate-ferula gum for delayed release of quercetin[J]. *Polymer Bulletin*, 2021, 78: 3667-3685.
- [38] CHANG Y, LIU T T, QI R J, *et al.* Cell-regulated hollow sulfur nanospheres with porous shell: A dual-responsive carrier for sustained drug release[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(16): 5138-5147.
- [39] LIU B H, YU L C. *In-situ*, time-lapse study of extracellular polymeric substance discharge in *Streptococcus mutans* biofilm[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 150: 98-105.