

红色诺卡氏菌细胞壁骨架药膜的制备与含量测定*

杨煌建, 王娟, 陈洲琴, 程贤, 严凌斌, 林仙菊, 张祝兰, 连云阳**

(福建省微生物研究所 福建省新药(微生物)筛选重点实验室, 福州 350007)

摘要 **目的:**制备红色诺卡氏菌细胞壁骨架(N-CWS)药膜并考察其含量测定方法。**方法:**以N-CWS为模型药物,壳聚糖、聚乙烯醇为成膜材料,通过溶液浇铸法制备N-CWS药膜;使用扫描电子显微镜(SEM)、红外光谱仪、万能试验机对药膜性能进行表征;采用柱前衍生化高效液相色谱法测定药膜中D-阿拉伯糖的含量,采用Kromasil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,以50 mmol·L⁻¹(pH 7.0)磷酸盐缓冲液-乙腈(80:20, v/v)为流动相,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长254 nm,柱温40℃。**结果:**当壳聚糖与聚乙烯醇质量比为3:2,膜材与甘油质量比为1:2时,断裂拉伸应变为136.67%,拉伸应力为2.47 mPa。扫描电镜观察到N-CWS主要分布在膜的底面,呈不对称分布;制备的药膜中D-阿拉伯糖在1.1~220 μg·mL⁻¹范围内线性关系良好,平均加样回收率为99.5%,测得3批次药膜中D-阿拉伯糖分别为(0.988±0.041)mg·g⁻¹、(1.035±0.049)mg·g⁻¹、(1.088±0.046)mg·g⁻¹。**结论:**N-CWS药膜制备工艺简单易行,含量测定方法准确快速,本研究可为N-CWS的新剂型开发提供参考依据。

关键词:红色诺卡氏菌细胞壁骨架;壳聚糖;聚乙烯醇;药膜;柱前衍生化;含量测定;D-阿拉伯糖

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2024)01-0051-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.01.05

Preparation and content determination of a *Nocardia rubra* cell wall skeleton film*

YANG Huang-jian, WANG Juan, CHEN Zhou-qin, CHENG Xian, YAN Ling-bin, LIN Xian-ju, ZHANG Zhu-lan, LIAN Yun-yang**

(Fujian Key Laboratory of Screening for Novel Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007, China)

Abstract Objective: To prepare and investigate the content determination of *Nocardia rubra* cell wall skeleton (N-CWS) loading film. **Methods:** Taking chitosan and polyvinyl alcohol as film-forming materials, N-CWS film was prepared by solution casting method. The film was characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and universal tensile testing machine. Determination of arabinose in N-CWS film was carried out by HPLC. The Kromasil C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, with the elution of 50 mmol·L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.0) - acetonitrile (80:20, v/v). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 254 nm, and the column temperature was 40℃. **Results:** When

* 福建省属公益类研究所基本科研专项(2021R1005007、2022R1005007);福州市科技创新平台项目(2021-P-25)

** 通信作者 Tel:13860677709;E-mail:ylianfim@139.com

第一作者 杨煌建 Tel:15980110311;E-mail:15980110311@163.com

王娟 Tel:13559198895;E-mail:282785304@qq.com

the mass ratio of chitosan to polyvinyl alcohol was 3:2 and the mass ratio of membrane material to glycerol was 1:2, the tensile modulus reached 2.47 mPa and the tensile strain at break was 136.67%. Scanning electron microscopy showed that N-CWS was distributed asymmetrically on the bottom of the film. The linear relationship of D-arabinose in the prepared film was good in the range of 1.1–220 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the average recovery rate was 99.5%. The determination results of three batches N-CWS films showed that the contents of D-arabinose in the films were $(0.988 \pm 0.041) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $(1.035 \pm 0.049) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $(1.088 \pm 0.046) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively.

Conclusion: The preparation process of N-CWS loading film is simple and feasible, and the content determination method is accurate and fast. This study can provide reference for the development of new dosage forms of N-CWS.

Keywords: *Nocardia rubra* cell wall skeleton; chitosan; polyvinyl alcohol; film; pre-column derivatization; content determination; D-arabinose

红色诺卡氏菌细胞壁骨架 (*Nocardia rubra* cell wall skeleton, N-CWS) 是由红色诺卡氏菌经发酵、细胞破碎、酶处理、溶剂提取等工艺制备而成, 主要成分为诺卡氏菌酸、阿拉伯半乳糖和粘肽^[1-2], 能增强体内 T 细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞的活性, 促进细胞因子产生, 具有免疫活性强和副作用小的特点。研究表明 N-CWS 可通过提高 IL-1、IL-2、IL-6、TNF、IFN($\alpha\beta\gamma$) 多种细胞因子的水平, 增强巨噬细胞、杀伤性 T 细胞、LAK 细胞、NK 细胞的杀伤活性, 发挥抗肿瘤、抗病毒、抗感染、促伤口愈合等作用^[3-7]。当前皮肤伤口愈合是外科领域常见的疾患之一。开发具有抗感染、促愈合等多种功能的皮肤医用材料, 对促进患者康复、减轻病痛及减少医疗卫生负担具有积极的经济和社会价值。本试验以壳聚糖/聚乙烯醇为载体, 甘油作为保湿剂和增塑剂, 制备 N-CWS 药膜, 并建立高效液相色谱法测定药膜中 N-CWS 的含量, 以期为 N-CWS 薄膜剂型开发提供依据。

1 仪器与试剂

AG-50KNIS 电子万能材料试验机(岛津公司); Nicolet iS5 红外光谱仪(Thermo Fisher Scientific 公司); 扫描电子显微镜(ZEISS); JY10002 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司, 精度 0.01 g); DHG-9070A 鼓风干燥箱(上海培因实验仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司); MDF-382E 型低温冰箱(三洋公司); SECURA225D-1CN 分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司, 精度 0.000 01 g); S-210S 台式酸度计(梅特勒托利多仪器(上海)有限公司); D-500 高剪切匀质乳化机(维

根技术(北京)有限公司)。

N-CWS(由福建省微生物研究所提供, 含 D-阿拉伯糖 67.21 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); 壳聚糖(国药集团化学试剂有限公司, 脱乙酰度为 80.0%~95.0%, 批号 20211027); 聚乙烯醇(江西阿尔法高科药业有限公司, 型号 24-88, 批号 20151001); 甘油(湖南新绿方药业有限公司, 批号 22052901); 盐酸(西陇科学股份有限公司); 氢氧化钠(西陇科学股份有限公司); D-阿拉伯糖(纯度 >98%, 国药集团化学试剂有限公司); 三氟乙酸(TFA)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈(色谱级, 默克公司)。

2 方法与结果

2.1 N-CWS 药膜的处方工艺及制备方法

称取壳聚糖 2 g, 加入 0.9% 盐酸溶液 100 mL 中, 搅拌使之完全溶解。另称取聚乙烯醇 2 g, 加入蒸馏水 100 mL 中, 于 95 °C 水浴中搅拌至溶解。分别量取壳聚糖溶液和聚乙烯醇溶液按 30:20 的体积比进行混合, 得到壳聚糖-聚乙烯醇溶液 50 mL。取甘油 2 g, 加入 N-CWS 100 mg, 用高剪切匀质乳化机匀质 10 min 后, 加入壳聚糖-聚乙烯醇溶液中, 于 60 °C 水浴中搅拌 30 min, 冷却至室温, 用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 至 5.5, 然后倒入 10 cm × 10 cm × 2 cm 的硅胶模具中, 静置消泡后, 置于 50 °C 鼓风干燥箱中干燥 12 h 后成膜, 冷却至室温, 脱膜, 得尺寸约为 10 cm × 10 cm 的药膜。

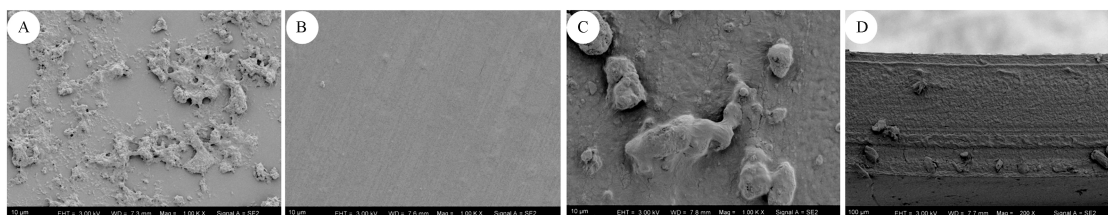
2.2 N-CWS 药膜的基本性能表征

2.2.1 N-CWS 药膜的扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)形貌分析

对 N-CWS 药膜, 喷金处理, SEM 观察其正面

(薄膜与空气接触面)、底面(薄膜与模具接触面)和截面的表面形貌,结果见图1。图1-A为N-CWS分散于超纯水中的形貌特征图;由图1-B、C、D可看出,药膜面向空气的表面较少出现药物颗粒,而面向

底物的一侧则出现较多的药物颗粒,表明由于重力的原因,随着水分的挥发,N-CWS会向膜的底部沉积,因此底部会出现较多的药物颗粒。可见该薄膜中药物分散属于不对称分布。



A. N-CWS B. 药膜正面 (surface of the film) C. 药膜底面 (bottom of the film) D. 药膜截面 (cross-section of the film)

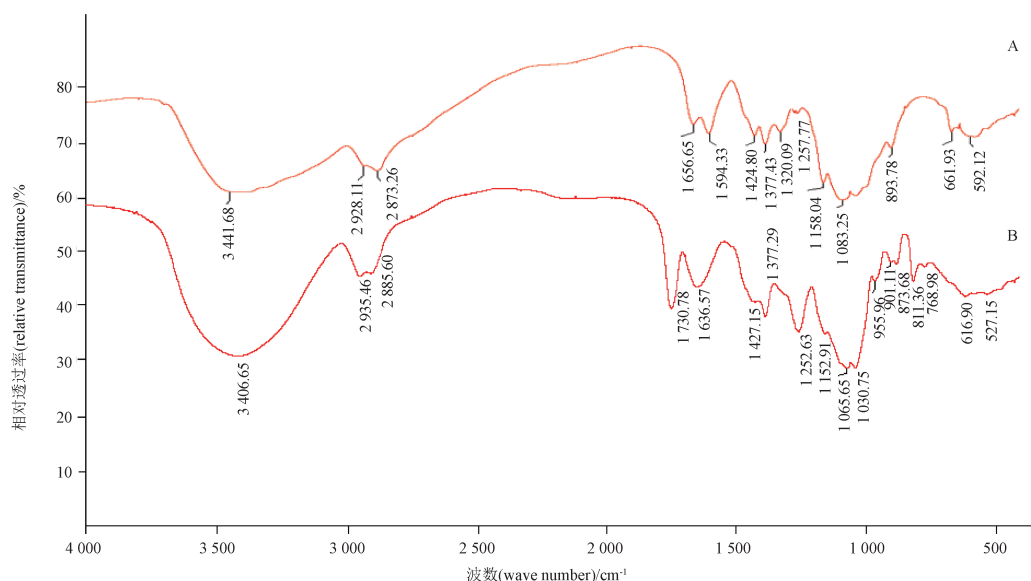
图1 N-CWS药膜的扫描电镜图

Fig. 1 The SEM images of N-CWS film

2.2.2 红外光谱分析

采用傅里叶变换红外光谱仪对药膜进行扫描。扫描波数为 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$,分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描次数32次,结果见图2。由于N-CWS和成膜材料都属于多糖类物质,从IR谱图中可以看出,药膜具有多糖的特征吸收峰:在 $3700 \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$ 处(3406.65 cm^{-1})的宽峰为羟基和氨基的伸缩振动吸收峰重叠所致; 2935.45 和 2885.60 cm^{-1} 处的双吸收峰为典型的碳氢键的伸缩振动峰; 1738.78 cm^{-1} 处的吸收峰可归属为O-乙酰基上

C=O的伸缩振动,主要是所用壳聚糖脱乙酰度为 $80\% \sim 95\%$ 。 1636.57 cm^{-1} 处为吸附水的无定形区域的吸收峰; 1427.15 cm^{-1} 附近的吸收峰由 CH_2 的剪切振动和弯曲振动引起; 1377.29 cm^{-1} 处为CH和 CH_3 上C-H的弯曲振动吸收峰; 1252.63 cm^{-1} 处为多糖类物质C-O-C或C-O的伸缩振动吸收峰; 1152.91 cm^{-1} 处为O-乙酰基上C-O的弯曲振动吸收峰; 1065.65 和 1030.75 cm^{-1} 处分别为C-O的伸缩振动或C-OH的弯曲振动吸收峰。



A. 空白膜 (the blank film) B. N-CWS药膜 (the N-CWS film)

图2 N-CWS药膜的红外光谱图谱

Fig. 2 The IR spectrum of N-CWS film

2.2.3 力学性能测试

将药膜裁切成 50 mm × 10 mm 的矩形,用万能材料试验机测定其拉伸强度和断裂拉伸应变。测试参数:载荷 50 N,测量时的夹具间距为 50 mm,拉伸速度为恒定速率 5 mm · min⁻¹。药膜拉伸测试所得到的应力-应变曲线与 GB/T1040.1-2006 中曲线 d 的类型相符,故该药膜属于无屈服点的韧性材料^[8-9]。无甘油膜和空白药膜的制备按“2.1”项下方法,分别不加入甘油和 N-CWS。由图 3 可看,加入适量的甘油对薄膜有良好的增塑效果,薄膜的断裂拉伸应变增大而拉伸应力减小,加入甘油时,薄膜断裂拉伸应变和拉伸应力分别为 181.33%、3.37 mPa。薄膜载药后,薄膜的断裂拉伸应变和拉伸应力均有所减小,断裂拉伸应变由 181.33% 减小至 136.67%,拉伸应力由 3.37 mPa 减小至 2.47 mPa。

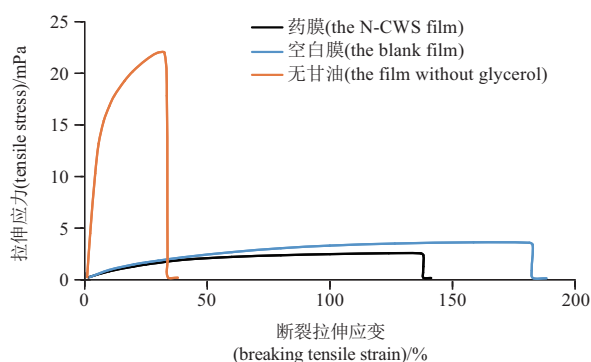


图 3 N-CWS 药膜的拉伸应力-应变曲线图

Fig. 3 The tensile stress-strain curve of N-CWS film

2.3 含量测定

建立柱前衍生化高效液相色谱法测定药膜中 N-CWS 的含量。N-CWS 含有类脂化合物、多糖(阿拉伯半乳聚糖)、粘肽(主要为丙氨酸、谷氨酸、二氨基庚二酸、葡萄糖胺、胞壁酸),其中组成多糖的单糖以 D-阿拉伯糖含量最高^[2,10]。本试验通过柱前衍生化将 N-CWS 分解成单糖,通过测定其中阿拉伯糖单糖含量确定 N-CWS 含量。

2.3.1 色谱条件

采用 Kromasil C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,柱温 40 °C,以 50 mmol · L⁻¹(pH 为 7.0)磷酸盐缓冲液-乙腈(80:20, v/v)为流动相,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 254 nm,进样量 10 μL。

2.3.2 溶液的制备

2.3.2.1 对照品储备溶液 精密称取 D-阿拉伯糖对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成每 1 mL 含 1 mg D-阿拉伯糖的溶液,即得。

2.3.2.2 供试品溶液^[11-12] 精密称取药膜样品 100 mg,加入 2 mol · L⁻¹三氟乙酸 2.0 mL,120 °C 水解 2 h,加入甲醇 10 mL,45 °C 水浴蒸干,重复 3~5 次,直至完全蒸除三氟乙酸为止。精密加入超纯水 2.0 mL 溶解残渣,离心(4 000 r · min⁻¹)10 min,取上清液,即得。

2.3.2.3 衍生化试剂 精密称取 PMP 1.0 g,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制得 0.5 mol · L⁻¹的 PMP 甲醇溶液,即得。

2.3.2.4 衍生化产物^[11-13] 取对照品储备溶液和药膜供试品溶液各 100 μL,分别加入衍生化试剂 100 μL 和 0.3 mol · L⁻¹氢氧化钠溶液 100 μL,充分混匀,70 °C 恒温水浴中加热 30 min。取出,放冷至室温,加入 0.3 mol · L⁻¹盐酸溶液 100 μL,漩涡震荡混匀。加入三氯甲烷 0.5 mL,混匀后抽提剩余的 PMP,吸去三氯甲烷层,保留水层溶液,重复操作 2 次。水层溶液用 0.22 μm 滤膜过滤,即得。

2.3.3 方法学考察

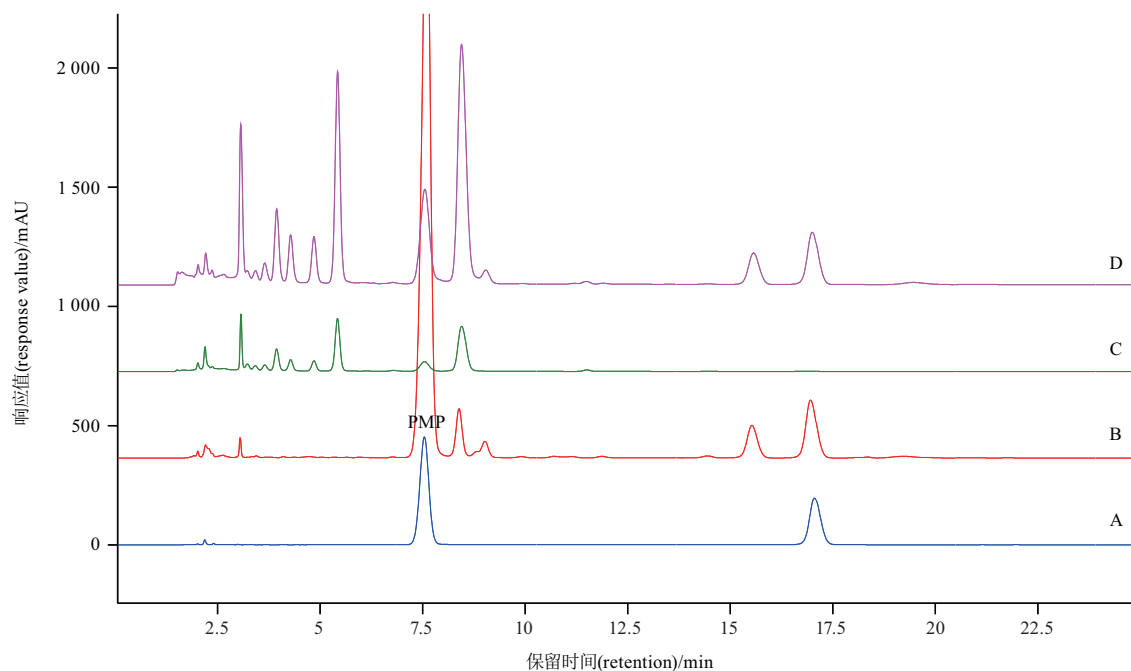
2.3.3.1 专属性 按“2.3.2.4”项下的方法对对照品储备溶液、N-CWS、空白膜和药膜供试品溶液进行衍生化,按“2.3.1”项下条件进样分析,试验结果见图 4,D-阿拉伯糖保留时间为 17.131 min。结果表明空白溶剂和药物辅料均不干扰测定,方法专属性良好。

2.3.3.2 线性与范围 精密吸取“2.3.2.1”项对照品储备溶液适量,用水分别稀释成 220、110、44、22、11 和 1.1 μg · mL⁻¹ 溶液,按“2.3.2.4”项下方法进行衍生化处理,精密吸取处理后溶液 10 μL,按“2.3.1”项下条件进行 HPLC 分析,以阿拉伯糖衍生物峰面积(Y)与相应浓度(X, μg · mL⁻¹)进行线性回归分析,其回归方程(n=6)为

$$Y = 84.661X - 8.429 \quad r = 0.9999$$

结果表明阿拉伯糖质量浓度在 1.1 ~ 220 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.3.3.3 精密度试验 取“2.3.2.1”项下对照品储备溶液,用水稀释得 110.0 μg · mL⁻¹ D-阿拉伯糖对照品溶液,按“2.3.2.4”项下方法进行衍生化,



A. *D*-阿拉伯糖(*D*-Arabinose) B. N-CWS C. 空白膜(the blank film) D. N-CWS 药膜(the N-CWS film)

图4 单糖衍生物 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC of the monosaccharide derivation product

按“2.3.1”项下条件连续进样6次,以*D*-阿拉伯糖衍生物峰面积代入标准曲线计算,*D*-阿拉伯糖含量的RSD($n=6$)为1.0%,表明本测定方法的精密度良好。

2.3.3.4 稳定性试验 取“2.3.2.1”项下对照品储备溶液,用水稀释得 $25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ *D*-阿拉伯糖对照品溶液,按照“2.3.2.4”项下方法进行衍生化,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h进行测定,以*D*-阿拉伯糖衍生物峰面积代入回归方程计算,*D*-阿拉伯糖浓度的RSD($n=6$)为1.3%。表明*D*-阿拉伯糖衍生化产物在12 h内稳定性良好。

2.3.3.5 重复性试验 取同一批(20221102)药膜样品按“2.3.2.2”项下的方法制备供试品溶液6份,照“2.3.2.4”项下方法进行衍生化,在“2.3.1”项色谱条件下分别进样 $10 \mu\text{L}$,记录色谱图。以*D*-阿拉伯糖衍生物峰面积代入回归方程计算,药膜中*D*-阿拉伯糖含量分别为0.98、1.01、1.02、1.02、1.01、1.08 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD($n=6$)为2.9%。

2.3.3.6 回收率试验 采用加样回收法,取已知含量的药膜样品(20221102)9份,平均分为3组,每组按低、中、高浓度分别精密加入*D*-阿拉伯糖对照品110.21、220.42、330.63 μg ,按“2.3.2.2”项方法制备

供试溶液,再按“2.3.2.4”进行衍生化,在“2.3.1”项色谱条件下进行HPLC分析,结果见表1。平均回收率($n=9$)为99.5%。

表1 回收率试验结果

Tab. 1 Results of recovery tests

原有量 (original)/ μg	加入量 (added)/ μg	测得量 (found)/ μg	回收率 (recovery)/%	RSD/ %
196.91	110.21	309.76	100.9	2.2
		301.24	98.1	
		314.32	102.3	
196.91	220.42	424.36	101.7	2.6
		418.82	100.4	
		403.42	96.7	
196.91	330.63	524.61	100.4	1.8
		506.55	97.9	
		512.18	97.1	

2.3.4 药膜中*D*-阿拉伯糖含量的测定

分别精密称取3批药膜,按照“2.3.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.2.4”项下方法进行衍生化,在“2.3.1”项色谱条件下进行HPLC分析。以*D*-阿拉伯糖衍生物峰面积代入回归方程计算*D*-阿拉伯糖

含量。药膜中 N - CWS 含量按下列公式计算:

$$C = \frac{A_{\text{膜}}}{A_{\text{药}}} \times 1000$$

其中 $A_{\text{膜}}$ 为药膜中 D - 阿拉伯糖含量, $A_{\text{药}}$ 为 N - CWS 中 D - 阿拉伯糖含量(即 $67.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), C 为药膜中 N - CWS 的含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。结果见表 2。

表 2 3 批 N - CWS 药膜的含量测定结果

Tab. 2 The determination results of three batches N - CWS films

批号 (batch)	含量(content)/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	
	D - 阿拉伯糖(D - arabinose)	N - CWS
20221101	0.988 ± 0.041	14.70 ± 0.61
20221102	1.035 ± 0.049	15.40 ± 0.73
20221103	1.088 ± 0.046	16.19 ± 0.69

3 讨论

药膜是一种将药物溶解、均匀分散在成膜材料中制成的医用材料^[14-15]。相比传统纱布敷料组织粘连严重,细菌感染频发,性能单一等缺点,它可贴敷在皮肤或黏膜创伤表面或溃疡表面,药物直接经黏膜吸收,达到良好的治疗效果。

N - CWS 是一种非特异性免疫调节剂,具有抗菌、抗病毒、抗感染、抗肿瘤活性,应用前景广阔。目前临床上使用的 N - CWS 制剂主要有 2 种,N - CWS 冻干粉注射剂应用于抗肿瘤辅助治疗;N - CWS 搽剂应用于各种类型宫颈糜烂的治疗。近年来,研究发现 N - CWS 可大大提高巨噬细胞的吞噬能力,显著抑制白色念珠菌或分支杆菌的生长,具有较强的抗感染作用。研究表明^[16],N - CWS 可提高创面 CD68 和 F4/80 的表达,活化创面的巨噬细胞,增加 TGF - β 1 的表达,增强血管生成,从而促进皮肤全层缺损创面的愈合。因此,开展 N - CWS 载药薄膜研究具有一定临床价值和意义。本实验以壳聚糖和聚乙烯醇为成膜材料,甘油作为保湿剂和增塑剂,包载 N - CWS 制备了医用薄膜。SEM 显示,该薄膜中药物分散属于不对称分布,面向模具底部的一侧分布较多的药物颗粒,这种不对称分布对于含量的均匀性可能会造成一定的影响,后期实验将进一步通过微粉化、微乳化等方式改善 N - CWS 的溶解性以及粒度,优化成膜材料浓度、干燥方式等加以改善。加入适量的甘油对薄膜有良好的增塑效果,薄膜的断裂拉

伸应变增大而拉伸应力减小,这与文献[17]报道一致,主要是因为甘油较容易地插入壳聚糖和聚乙烯醇高分子链之间,并与其中众多的羟基、氨基形成氢键,增大了高分子链之间的距离,软化了膜的刚性结构,从而改善了膜的机械性能^[17]。同时本实验进一步考察了载药薄膜中 N - CWS 含量测定方法。目前有关 N - CWS 含量测定多采用硫酸苯酚法^[2,10],但该方法稳定性、重现性、精密度较差,而且应用在制剂的质量控制中会受到多糖类成膜材料的干扰。本实验对 N - CWS 进行定量衍生反应,专属性良好,且通过 HPLC 法对 N - CWS 中 D - 阿拉伯糖进行测定,准确度和精密度良好,适用于 N - CWS 皮肤用膜含量的测定。

综上所述,本实验提供了一种新型 N - CWS 药膜,具有一定的临床意义和广阔的应用前景。课题组后期将进一步考察 N - CWS 药膜的溶化性能、药物的释放和吸收,以及对难愈性伤口如糖尿病溃疡,特别是免疫功能低下慢性损伤的修复效果,为 N - CWS 的产品开发进行更深入的研究和实践。

参考文献

- [1] TAO Y, WANG G, ZHAI J, et al. Functional modulation of CD8 + T cell by approved novel immune enhancer: *Nocardia rubra* cell - wall skeletons (Nr - CWS)[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78: 106023
- [2] 张祝兰, 林善, 唐文力, 等. 红色诺卡氏菌细胞壁骨架的理化性质化学成分及含量测定的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(9): 532
ZHANG ZL, LIN S, TANG WL, et al. Studies on the physico - chemical properties, composition and content determination of *Nocardia rubra* cell wall skeleton[J]. Chin J Antibiot, 2002, 27(9): 532
- [3] AZUMA I, TANIYAMA T, YAMAWAKI M, et al. Adjuvant and antitumor activities of *Nocardia* cell wall skeletons[J]. Gan, 1976, 67(5): 733
- [4] IZUMI S, OGAWA T, MIYAUCHI M, et al. Antitumor effect of *Nocardia rubra* cell wall skeleton on syngeneically transplanted P388 tumors[J]. Cancer Res, 1991, 51(15): 4038
- [5] 张祝兰, 唐文力, 杨煌建, 等. N - CWS 灌胃对小鼠移植性肿瘤及免疫功能的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(2): 228
ZHANG ZL, TANG WL, YANG HJ, et al. Effect of *Nocardia rubra* cell wall skeleton (N - CWS) on transplanted tumor and immunological function in mice given through oral administration[J]. Nat Prod Res Dev, 2010, 22(2): 228
- [6] 杨煌建, 张祝兰, 唐文力, 等. N - CWS 对小鼠皮肤创伤愈合的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(11): 1413

- YANG HJ, ZHANG ZL, TANG WL, *et al.* Effects of N - CWS on wound healing of skin in mouse[J]. *Chin J Antibiot*, 2018, 43(11): 1413
- [7] CHEN W, ZHANG Y, ZHAO C, *et al.* *Nocardia rubra* cell wall skeleton up - regulates t cell subsets and inhibits PD - 1/PD - LI pathway to promote local immune status of patients with high - risk human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia[J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 612547
- [8] 刘文霞, 徐冬美, 时芳芳, 等. 壳聚糖/聚乙烯醇共混膜的制备与性能[J]. *包装工程*, 2016, 37(7): 40
- LIU WX, XU DM, SHI FF, *et al.* Preparation and properties of chitosan/PVA blend films[J]. *Pack Eng*, 2016, 37(7): 40
- [9] GB/T 1040.3 - 2006 塑料拉伸性能的测试[S]. 2006
- GB/T 1040.3 - 2006 Plastics Determination of Tensile Properties [S]. 2006
- [10] 中华人民共和国药典 2010 年版. 三部[J]. 2010: 223
- ChP 2010. Vol III [J]. 2010: 223
- [11] 叶梦娟, 俞年军, 刘峻麟, 等. 基于柱前衍生化 HPLC 分析 8 种石斛精制多糖的单糖组成及含量[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(9): 5126
- YE MJ, YU NJ, LIU JL, *et al.* Analysis of monosaccharide composition and content of eight kinds of dendrobium refined polysaccharides based on pre - column derivatization HPLC[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(9): 5126
- [12] 李明华, 孙红梅, 程显隆, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法用于生地黄和熟地黄中多糖的分析研究[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(4): 602
- LI MH, SUN HM, CHENG XL, *et al.* Study on polysaccharide in *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix praeparata* by high performance liquid chromatography with pre - column derivatization [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(4): 602
- [13] 王莹, 王赵, 许玮仪, 等. 灵芝提取物中多糖质量控制方法初探[J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(8): 1442
- WANG Y, WANG Z, XU WY, *et al.* Preliminary study on quality standard for polysaccharide in *Ganoderma lucidum* extracts [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(8): 1442
- [14] 刘卓冉, 李玉梅, 刘俊彦, 等. 口腔抗菌领域中壳聚糖及其衍生物的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(21): 3361
- LIU ZR, LI YM, LIU JY, *et al.* Role of chitosan and its derivatives in the field of oral antibacterial[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2023, 27(21): 3361
- [15] 古元安, 梁猛, 冯永良. 伤口愈合用高弹性抗菌纳米纤维薄膜的制备方法: 中国, CN114028602A[P]. 2021 - 11 - 22
- GU YA, LIANG M, FENG YL. Preparation Method of High Elastic Antibacterial Nanofiber Film for Wound Healing; China, CN114028602A[P]. 2021 - 11 - 22
- [16] WANG Y, YING H, BEN M, *et al.* *Nocardia rubra* cell wall skeleton accelerates cutaneous wound healing by enhancing macrophage activation and angiogenesis[J]. *J Int Med Res*, 2018, 46(6): 2398
- [17] 马焯. 壳聚糖医用敷料的制备及性能研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2018
- MA Y. Research on Preparation and Performance of Chitosan Wound Dressing[D]. Nanjing: Nanjing University of Science & Technology, 2018

(本文于 2023 年 3 月 3 日收到)