

葡聚糖-两性霉素 B 的制备及其抑菌活性研究

邱立朋, 曹莹, 朱梦琴, 赵丽, 陈敬华*

(江南大学药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 通过高碘酸钠氧化, 合成了 3 种氧化度的葡聚糖衍生物(D-CHO), 并利用 D-CHO 醛基和两性霉素 B(AmB)氨基的席夫碱反应, 制备了水溶性葡聚糖-AmB(D-CHO-AmB)共轭物。多角度激光散射凝胶色谱仪结果表明, 随着葡聚糖的相对分子质量随着氧化度的增大而降低。不同 D-CHO-AmB 的载药量在 18.9%-36.7%之间, 且氧化度越高, 载药量越大。D-CHO-AmB 的溶血作用比 AmB 注射剂显著性降低, 且具有较好的抑菌效果。

关键词: 两性霉素 B; 葡聚糖; 溶血; 抑菌作用

中图分类号: R 978 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)07-0692-06

Preparation and Antibacterial Activities of Dextran-Amphotericin B Conjugates

QIU Lipeng, CAO Ying, ZHU Mengqin, ZHAO Li, CHEN Jinghua*

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Three oxidation degree of dextran derivatives (D-CHO) were synthesized with oxidation of sodium periodate. Dextran-amphotericin B (D-CHO-AmB) conjugate was prepared by Schiff's base reaction between aldehyde groups of D-CHO and amino groups of AmB. MALS/GPC results indicated that the molecular weight of dextran was reduced with the increase of oxidation degree. The drug loadings of D-CHO-AmB were 18.9% to 36.7%, which increased with the oxidation degree. Compared with AmB injection, the hemolytic effect of D-CHO-AmB was decreased significantly and the critical concentration of hemolysis was almost tenfold. The inhibition zone test proved that D-CHO-AmB conjugates had an excellent antifungal effect.

Keywords: amphotericin B, dextran, hemolysis, inhibition effect

两性霉素 B(Amphotericin B, AmB)是一种优良的大环多烯类抗生素, 具有广谱抗真菌作用, 对多种真菌、原生病原菌都有良好的抑制效果, 而且不易对菌株产生耐药性^[1-2]。但是 AmB 的水溶性差, 导

致它口服利用度较低, 限制了其口服给药的应用^[3]。因此, 通常改变 AmB 的剂型来提高它在非肠道给药时的疗效。目前临床上使用的是用去氧胆酸钠作为增溶质制成的 AmB 注射剂^[4-5]。近年来, AmB 脂质

收稿日期: 2015-07-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(21574059); 国家自然科学基金青年基金项目(81503007)。

作者简介: 邱立朋(1984—), 男, 山东临沂人, 理学博士, 讲师, 主要从事纳米给药系统研究。E-mail: flyqlp@163.com

* 通信作者: 陈敬华(1971—), 男, 湖北黄石人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物功能材料研究。E-mail: jhchenwhut@126.com

引用本文: 邱立朋, 曹莹, 朱梦琴, 等. 葡聚糖-两性霉素 B 的制备及其抑菌活性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(07): 692-697.

体等新型制剂的上市,在一定程度上降低了 AmB 的副反应,提高了疗效,但该脂质体剂型在人体内的消除速率很慢,易在人体内积聚^[6-7]。多糖具有毒性小、生物可降解等特点,作为药物载体材料已引起了研究者的重视^[8]。其中,葡聚糖来源丰富,其作为载体材料在体内具有类似聚乙二醇的“隐形”特点^[9-11]。此外,葡聚糖可以在体内被葡聚糖酶降解,具有较好的生物可降解性,因此常作为药物载体材料使用^[12-13]。作者选择具有良好生物相容性的葡聚糖,合成氧化葡聚糖(D-CHO)后,与 AmB 链接制备水溶性较好的葡聚糖-两性霉素 B (D-CHO-AmB)共轭物,为后续安全有效的 AmB 注射剂的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

两性霉素 B: 购于上海生工生物工程股份有限公司; 葡聚糖:(相对分子质量 40 000)、高碘酸钠(NaIO_4)、氢氧化钠(NaOH)、二甲亚砜(DMSO)和葡萄糖等: 国药集团上海化学试剂有限公司; 蛋白胨、酵母膏提取物: Sigma-Aldrich 公司。

AVANCE III 型核磁共振仪: 瑞士 Bruker 公司产品; UV-2550 型紫外分光光度计: 日本岛津仪器有限公司产品; FreeZone 型冷冻干燥仪: 美国 Labconco 公司产品; 5804R 型冷冻高速离心机: 德国 Eppendorf 公司产品; MALS/GPC 型凝胶色谱系统: 美国 Wyatt 公司产品。

试验菌株: 白色念珠菌, 作者所在实验室保存。

1.2 D-CHO 的合成及结构确证

制备氧化度 (Oxidation Degree, OD) 分别为 50%, 75%, 100% 的葡聚糖。称取一定量的葡聚糖溶于适量去离子水中, 加入不同量的高碘酸钠溶解搅拌, 室温避光反应 4 h。得到的溶液去离子水透析 3 天除去杂质, 冻干得 D-CHO 产物, $^1\text{H-NMR}$ 谱确认其结构。如无特别说明, OD 值指理论值, 得到的产物分别标记为 D-CHO₅₀, D-CHO₇₅, D-CHO₁₀₀。

1.3 D-CHO 相对分子质量的测定

通过多角度激光光散射凝胶色谱联用仪测量 3 种不同氧化度 D-CHO 的相对分子质量。首先精确配制质量浓度梯度为 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL 的葡聚糖样品, 依次进样测定(dn/dc)值。然后选择型号分别为 Shodex OHPak SB-803 和 SB-804 的两根色谱

柱串联连接, 0.2 mol/L 氯化钠-质量分数 0.01% 叠氮钠溶液为流动相。配制样品质量浓度为 5 mg/mL, 0.22 μm 滤膜过滤后, 进样, 采集数据, 计算相对分子质量。

1.4 D-CHO 氧化度的测定

称取 0.1 g D-CHO 溶解于 25 mL 盐酸羟胺溶液中, 室温搅拌 6 h。然后用 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定。OD 值按下列公式计算:

$$\text{OD} = 0.5 M_w \times V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} / m \times 10^{-3}$$

其中, M_w 为 D-CHO 单元平均相对分子质量, V_{NaOH} 为消耗氢氧化钠的体积 (mL), C_{NaOH} 为氢氧化钠的摩尔浓度 (mol/L), m 为样品的质量 (g)。

1.5 D-CHO-AmB 的合成及结构确证

根据文献报道^[14], 称取不同氧化度的 D-CHO 和 AmB 溶解于 25 mL 四硼酸钠缓冲液中, 室温条件下, 避光搅拌 3 h。反应液去离子水透析 3 d, 除去杂质, 冻干得黄色产物, 标记为 D-CHO₅₀-AmB、D-CHO₇₅-AmB、D-CHO₁₀₀-AmB。

合成产物通过紫外可见吸收光谱的吸收峰情况进行表征。将药物共轭物、AmB、葡聚糖、D-CHO 分别溶于甲醇-水溶液中, 用紫外分光光度计进行全波长扫描。

1.6 载药量的测定

1.6.1 AmB 标准曲线的测定 称取 5 mg AmB 于 100 mL 容量瓶中, 甲醇溶液溶解并定容至刻度, 得到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液。然后量取适量的 AmB 母液, 稀释成质量浓度为 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列溶液, 用紫外分光光度计在 383 nm 处测得吸光度, 以吸光度值 A 对浓度 C 进行线性回归, 得标准曲线。

1.6.2 精密度和回收率 按上述方法配制 2, 6, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AmB 溶液, 重复测定 5 次吸光度计算日内精密度, 连续测定 5 天吸光度计算日间精密度。

取 AmB 适量, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶内, 配成 2, 6, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液, 分别测定吸光度, 按照标准曲线计算回收率。

1.6.3 载药量的测定 分别称取 D-CHO₅₀-AmB、D-CHO₇₅-AmB 和 D-CHO₁₀₀-AmB 溶于甲醇溶液中, 配成一定质量浓度的溶液后, 于 383 nm 处测量吸光度。根据 AmB 标准曲线, 计算样品中 AmB 的质量浓度。

载药量 (%) = 样品中载有 AmB 的质量 / 载药样品的质量 $\times 100\%$ 。

1.7 D-CHO-AmB 溶血性考察

取适量健康志愿者血液加入生理盐水洗涤并配成体积分数 10% 的红细胞混悬液 (Red blood cell, RBC)。分别取 2.5 mL D-CHO-AmB 样品溶液后, 加入 2.5 mL 红细胞悬液, 使 AmB 终质量浓度为 50、100、250、500 和 1 000 $\mu\text{g/mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h, 3 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 用紫外分光光度计于 545 nm 处测量吸光度, 计算样品溶血性。

按照市售 AmB 注射剂处方, 配制对照组溶液。称取 10 mg AmB 和 8.2 mg 脱氧胆酸钠溶于 40 mL 生理盐水中, 加入红细胞悬液, 使 AmB 终质量浓度在 5、10、25、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 其余操作同上。

1.8 D-CHO-AmB 抑菌活性评价

1.8.1 最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 采用微量基稀释法检测抗真菌药物的敏感性^[15]。配制质量浓度为 1.2~640 $\mu\text{g/mL}$ 的 D-CHO-AmB 溶液及 0.06~32 $\mu\text{g/mL}$ 的 AmB 溶液, 分别取 100 μL 加入 96 孔板每排的 1~10 孔内, 第 11 孔加 100 μL 培养基作为生长对照, 第 12 孔加 200 μL 培养基作为空白对照。然后, 将白色念珠菌悬液 100 μL 加入每排的 1~11 孔中, 置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 24 h 后, 通过视觉法判定 MIC 值终点, 即与生长对照孔比较, 菌体生长完全被抑制, 培养基清亮

孔所对应的药物浓度为 MIC。

1.8.2 抑菌圈实验 采用管碟法测定 D-CHO100-AmB 的抑菌活性。将白色念珠菌混悬液与培养基混合后, 加注到底层培养基上, 转动平板, 使其均匀铺开。将小钢管均匀放置在双层培养基上, 并加入 200 μL 不同样品, 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后观察结果。每个平板放 3 个小钢管, 分别加入 AmB 终质量浓度为 2 mg/mL 的 D-CHO50-AmB 溶液和 AmB 悬浮液, 同时加入无菌用水作为空白对照。

2 结果与讨论

2.1 D-CHO 的合成

高碘酸钠与葡聚糖按不同摩尔比反应, 得到不同氧化度的 D-CHO, 合成反应原理如图 1。高碘酸根离子进攻葡聚糖单元相邻的两个羟基, 使 C3-C4 或者 C2-C3 间的 C-C 键断裂, 氧化成两个醛基。C3 位的醛基与邻近的羟基可进一步发生氧化反应, C3 从葡聚糖单元中断开, 形成甲酸。据 Joao 等人^[16]的报道, C3-C4 键的断裂速率大约是 C2-C3 键的 7.5 倍, 因此, C3-C4 间的氧化最具代表性。通过 D-CHO 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图 (图 2) 可以看出, δ 3.46~3.67 处葡聚糖环 2, 3, 4 位的 H 峰消失, 而 δ 9.22 处出现了新的醛基特征峰, 这表明 D-CHO 制备成功。

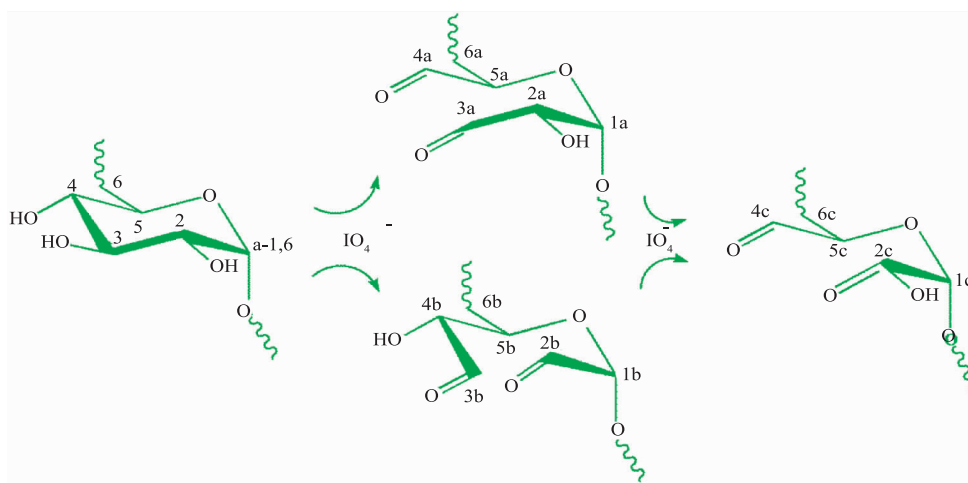


图 1 葡聚糖氧化示意图

Fig. 1 Schematic of dextran oxidation

2.2 D-CHO 相对分子质量的测定

相对分子质量是聚合物的一个重要性质, 它与聚合物的溶解性、粘度和体内清除率等性质都密切相关。作者采用多角度激光光散射凝胶色谱仪测得葡聚糖的 (dn/dc) 值线性方程为 $y=0.136\ 4x+0.000\ 01$

($r=0.999\ 1$), 线性拟合良好。葡聚糖及其氧化产物的相对分子质量分布如图 3 所示, 氧化后的葡聚糖出峰时间延长, 即相对分子质量变小。由表 1 看出, 与葡聚糖相比, 氧化葡聚糖的相对分子质量明显变小, 且氧化度越高, 相对分子质量越小, 表明该氧化

反应导致葡聚糖的降解。

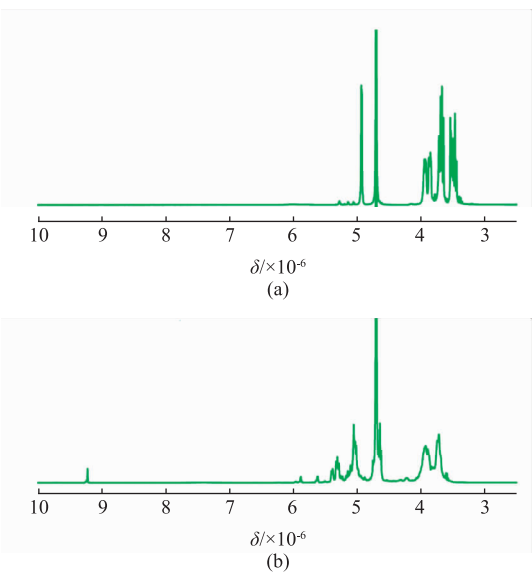


图2 葡聚糖和D-CHO的¹H-NMR谱图
Fig. 2 ¹H-NMR spectra of dextran and D-CHO

表1 葡聚糖及其氧化产物的相对分子质量

Table 1 Molecular weight of dextran and D-CHO

样品	M_w	PDI(M_w/M_n)
Dextran	4.15×10^4	1.499
D-CHO ₅₀	1.62×10^4	1.620
D-CHO ₇₅	1.56×10^4	1.624
D-CHO ₁₀₀	7.5×10^3	1.552

2.3 D-CHO 氧化度的测定

盐酸羟胺法是测定葡聚糖氧化度的一个经典方法,该方法反应迅速,2 h 内即有 80%以上的醛基反应^[17]。D-CHO 氧化度的测定结果如表 2 所示。可以看出,盐酸羟胺测得的 OD 比理论 OD 低,这可能是被氧化葡聚糖形成的醛基与本身未反应的羟基易发生半缩醛反应,形成稳定的六元环,阻止醛基与盐酸羟胺反应,使测得的结果偏低。

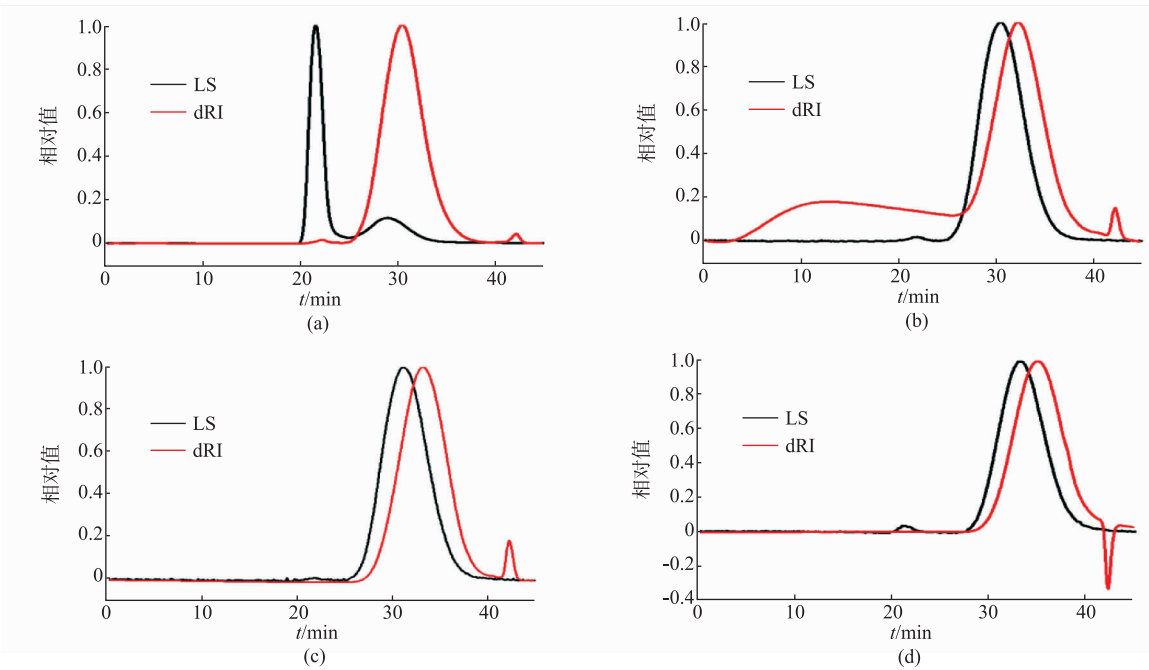


图3 葡聚糖(a)、D-CHO50(b)、D-CHO75(c)和D-CHO100(d)的相对分子质量分布图

Fig. 3 Molecular weight distribution of dextran(a), D-CHO50(b), D-CHO75(c) and D-CHO100(d)

表2 D-CHO 的氧化度

Table 2 Oxidation degree of D-CHO

样品	OD 理论值	OD 实测值
D-CHO ₅₀	50	32.8±3.5
D-CHO ₇₅	75	53.2±2.2
D-CHO ₁₀₀	100	72.1±1.8

2.4 D-CHO-AmB 的制备

葡聚糖经高碘酸钠氧化后,开环得到多聚醛葡聚糖,然后通过席夫碱反应,使 AmB 的氨基和 D-CHO 的醛基连接形成腙键,制备 D-CHO-AmB 共轭物,并利用紫外可见吸收光谱进行全波长扫描对其进行鉴定,结果如图 4 所示。由图可以看出,葡聚

糖及 3 种不同氧化度的 D-CHO 在 200~500 nm 范围内几乎没有吸收。AmB 的特征吸收峰分别是 363, 382, 406 nm, 制备得到的 3 种 D-CHO–AmB 的特征吸收峰与 AmB 基本相同, 分别是 363, 383, 406 nm, 表明成功合成了 D-CHO–AmB 共轭物。3 种 D-CHO–AmB 共轭物的扫描图谱基本相同, 表明醛基数量不影响 D-CHO–AmB 的结构。然而, D-CHO–AmB 和 AmB 的吸收峰略有差异, 且峰强度变为逆序, 这可能是由于 AmB 和 D-CHO 发生反应后, 其多烯的构象变化引起的。Neshi 等人的研究也表明, 多烯类的紫外吸收光谱很容易受构象的改变而发生改变^[18]。

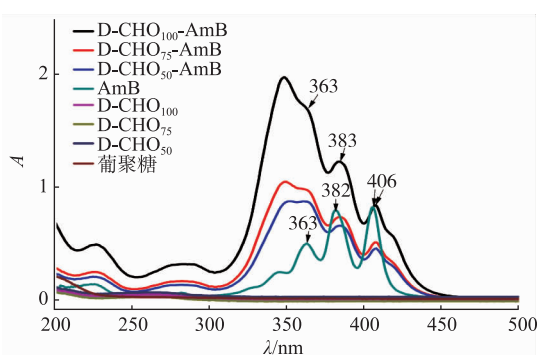


图 4 葡聚糖、D-CHO 和 D-CHO–AmB 的紫外可见光图谱
Fig. 4 UV-vis absorption spectra of dextran, D-CHO and D-CHO–AmB conjugates

2.5 载药量测定

2.5.1 AmB 标准曲线的测定 由紫外可见吸收光谱可知, 修饰后的 AmB 特征吸收峰基本不变, 因此本实验选择 383 nm 作为最佳吸收波长。以 AmB 浓度(C)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 进行线性回归, 绘制标准曲线。线性回归方程为: $A = 0.0231C + 0.0254$ ($r = 0.9990$), 表明 AmB 在 2~10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内浓度和吸光度呈良好的线性相关性。

2.5.2 精密度和回收率 AmB 低中高 3 个浓度的精密度和回收率试验。各个质量浓度的精密度 RSD 值均小于 2%, 平均回收率在 98.0%–102.0% 之间, 表明本方法的日内精密度、日间精密度以及回收率符合方法学要求。

2.5.3 载药量的测定 通过紫外法测得 D-CHO50–AmB、D-CHO75–AmB 和 D-CHO100–AmB 的载药量分别为 18.9%、21.8% 和 36.7%, 表明载药量随着葡聚糖氧化度的提高而变大。这是由于葡聚糖氧化度越高, 可以与 AmB 反应位点越多, 致使链

接到 D-CHO 上的药物越多, 载药量增大。

2.6 D-CHO–AmB 溶血性 通过预实验发现, D-CHO–AmB 的溶血性较低, 因此, 选择了较高的质量浓度与 AmB 注射剂比较。AmB 质量浓度在 50~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, D-CHO–AmB 的溶血率变化缓慢, 而 AmB 注射剂中 AmB 质量浓度较低时, 溶血率较小, 当质量浓度超过 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 溶血率迅速增加, 具有较为严重的溶血作用。因此, AmB 经葡聚糖修饰后, 溶血性显著降低, 安全系数也明显高于 AmB 注射剂。

2.7 D-CHO–AmB 抑菌活性评价

2.7.1 MIC 的测定 通过微量基稀释法, 测定 D-CHO–AmB 和 AmB 的最小抑菌浓度, 观察 AmB 修饰前后的抑菌活性的变化。

葡聚糖修饰 AmB 后, 导致相对分子质量增大, MIC 值升高。此外, 由于 3 种共轭物的载药量不同, 其 MIC 值也有所不同。载药量最小的 D-CHO50–AmB 的 MIC 值最大, D-CHO100–AmB 的抑菌效果要好于 D-CHO75–AmB 的。

2.7.2 抑菌圈实验 通过 MIC 测定结果可知, 与 AmB 相比, 修饰后的 D-CHO–AmB 的 MIC 值增大, 即最低抑菌浓度升高。为了验证相同浓度 AmB 下, 两者的抑菌效果, 作者选择 D-CHO100–AmB 观察抑菌圈效果。D-CHO100–AmB 的钢管外部出现了一个明显的抑菌圈, 而 AmB 仅围绕钢管有一较小的抑菌圈, 空白对照则无抑菌圈出现。这表明制备的 D-CHO–AmB 通过增加 AmB 的水溶性, 达到更好的抑菌效果。因此, 改变 AmB 的疏水性, 不仅不会使其抗菌活性丧失, 而且增加其水中抗菌活性。这是由于 AmB 与大分子葡聚糖结合后, 虽然增加了 AmB 的水溶性, 但其抗菌活性中心的疏水性多烯侧链结构并没有发生改变, 因此发挥较好的抑菌活性。

3 结语

AmB 通过静脉滴注治疗深部真菌感染的效果较好, 但其水溶性差, 现有注射剂的不良反应较多, 并可造成血栓性静脉炎。因此, 制备 AmB 新剂型或者提高药物本身溶解性一直是研究的热点。作者选择葡聚糖与 AmB 通过席夫碱反应制备 D-CHO–AmB 共轭物。由于葡聚糖具有良好的生物适应性及水溶性, 因此, D-CHO–AmB 可以提高 AmB 的水溶

性,同时不影响药物作用。氧化度高的 D-CHO-AmB 载药量达到 36.7%,表明该共轭物可以较好地携带 AmB。D-CHO-AmB 与 AmB 注射剂相比,溶血性显著性降低,溶血临界浓度提高了 10 倍,注射安全性大大提高。此外,D-CHO-AmB 具有较好的抑

菌活性,抑菌圈明显。以上结果表明 D-CHO-AmB 具有良好的应用前景,它不但可以直接制备成注射剂,也可用于脂质体等新剂型,这为 AmB 的临床应用提供了更多选择。

参考文献:

- [1] HELGA K R, DOLORES R S, MARIA A D, et al. New amphotericin B- γ cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and Leishmania spp.[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2014, 473 (1-2): 148-157.
- [2] WEN Ye, LIU Hong, TANG Ren, et al. Preparation of amphotericin B magnetoliposomes and quality control[J]. **Chinese Journal of Hospital Pharmacy**, 2007, 27(10): 1344-1346. (in Chinese)
- [3] YANG Zhuoli, YANG Kewei, LI Xinru, et al. Preparation and in vitro release kinetics of amphotericin B-loaded poly (ethyleneglycol)-poly (dl-lac-tide) block copolymer micelles [J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 2007, 42 (7): 519-523. (in Chinese)
- [4] AFZAL H, ABDUS S, IRAM N, et al. Nanocarrier-based topical drug delivery for an antifungal drug[J]. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2014, 40(4): 527-541.
- [5] TIAN Qingping, LI Peng, WANG Lei, et al. Preparation of amphotericin B microemulsion and its transdermal absorption[J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 2009, 44(4): 283-287. (in Chinese)
- [6] HONGBO Y, PARESH C, ZHENG Y Z, et al. Budget impact analysis of liposomal amphotericin B and amphotericin B lipid complex in the treatment of invasive fungal infections in the United States[J]. **Apply Health Economic Health Policy**, 2014, 12 (1): 85-93.
- [7] SERRANO D R, LALATSA A, DEA A M A, et al. Oral particle uptake and organ targeting drives the activity of amphotericin B nanoparticles[J]. **Molecular Pharmaceutics**, 2015, 12(2): 420-431.
- [8] LIANG Yan, SONG Jiahong, CHEN Jingxiao, et al. Preparation of heparin/chitosan microcapsule for anticoagulation study[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(3): 295-301. (in Chinese)
- [9] LEMARCHAND C, GREF R, COUVREUR P. Polysaccharide-decorated nanoparticles[J]. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2004, 58(2): 327-341.
- [10] LI Y L, ZHU L, LIU Z Z, et al. Reversibly stabilized multifunctional dextran nanoparticles efficiently deliver doxorubicin into the nuclei of cancer cells[J]. **Angewandte Chemie International Edition**, 2010, 48(52): 9914-9918.
- [11] SUN H L, GUO B N, LI X Q, et al. Shell-sheddable micelles based on dextran-ss-poly (ϵ -caprolactone) diblock copolymer for efficient intracellular release of doxorubicin[J]. **Biomacromolecules**, 2010, 11: 848-854.
- [12] CAO Lixia, GUO Xiaona, ZHU Kexue, et al. Preparation of buckwheat protein isolate-dextran conjugates [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(7): 703-708. (in Chinese)
- [13] MEHVAR R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents[J]. **Journal of Controlled Release**, 2000, 69(1): 1-25.
- [14] HUDSON S P, LANGER R, FLINK G R, et al. Injectable in situ cross-linking hydrogels for local antifungal therapy [J]. **Biomaterials**, 2010, 31(6): 1444-1452.
- [15] XU Shengjing, CAO Shuanglin, XIA Jining, et al. Comparison of broth microdilution and agar dilution methods for antifungal susceptibility testing of Malassezia species in vitro[J]. **Chinese Journal of Dermatology**, 2011, 44(10): 704-707. (in Chinese)
- [16] MAIA J, CARVALHO R A, COELHO F J, et al. Insight on the periodate oxidation of dextran and its structural vicissitudes[J]. **Polymer**, 2011, 52(2): 258-265.
- [17] BRUNEEL D, SCHACHT E. Chemical modification of pullulan: 1. Periodate oxidation[J]. **Polymer**, 1993, 34(12): 2628-2632.
- [18] NISHI K K, ANTONY M, MOHANAN P V, et al. Amphotericin B-gum arabic conjugates: synthesis, toxicity, bioavailability, and activities against Leishmania and fungi[J]. **Pharmaceutical Research**, 2007, 24(5): 971-980.