

文章编号: 1004-1656(2008)04-0475-04

# 环丙沙星 聚羟基丁酸酯电纺纤维毡的制备、性质及抑菌活性研究

李 梅<sup>1,2</sup>, 韩高义<sup>1</sup>, 张立伟<sup>1\*</sup>

(1. 山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 分子科学研究所, 山西 太原 030006

2. 山西职工医学院, 山西 太原 030012)

关键词: 电纺纤维毡 聚羟基丁酸酯; 环丙沙星; 缓释; 抑菌活性  
中图分类号: O633.14 文献标识码: A

术后粘连是腹腔、妇科、矫形外科及心脏手术之后遇到的一个普遍的问题。大约 80-90% 的腹腔粘连直接起因于先前的手术<sup>[1]</sup>。这些粘连可以通过二次手术治疗, 但这不仅耗时、花费高, 而且增加了再次粘连、疤痕组织形成和细菌感染的潜在性。粘连的预防能减少医疗费用及治疗的复杂程度。以前的局部应用的抗感染方法包括使用加有抗炎剂的灌洗液在术后持续灌洗; 将浸泡抗菌剂的纱条或抗生素干粉直接投药于感染部位; 庆大霉素 PMMA (聚甲基丙烯酸甲酯) 珠链或庆大霉素明胶海绵的缓释剂埋植于创伤部位等<sup>[2]</sup>。但是这些方法没有一种在预防手术引起的粘连方面完全有效, 而且全身药物治疗因剂量过大易引起对机体的副作用, 治疗效果不如局部定位给药好。所以设计建立一个具有局部给药能力的屏障系统 (如生物降解聚合物的微球<sup>[3]</sup>、电纺纤维毡<sup>[4,5]</sup>) 是一个好的策略。聚羟基丁酸酯 (PHB) 为微生物合成的新型可降解生物材料, 生物相容性好, 具有中长期降解周期, 较适合作为中长期控释药物的载体<sup>[6]</sup>。环丙沙星 (CPX) 属于第三代氟喹诺酮类人工合成抗菌剂, 它具有长效、广谱、抗菌活性高的特点。我们以其作为载药, 通过静电纺丝法<sup>[4,5,7]</sup> 制备了 PHB 缓释纤维毡, 期望其可作为埋植剂用于防治术后感染粘连。本试验中, 我们选择在外科手术中最可能引起感染的金黄色葡萄球菌<sup>[8]</sup> 作为试验菌株, 通过平板法测定抑菌圈的大小和比浊法测定细菌抑制率来评价 PHB-CPX 电纺纤维毡的体外抑菌效果。

## 1 材料和仪器

### 1.1 药品和试剂

聚羟基丁酸酯 (由山西大学生物工程技术研究所提供, 通过分批喂料发酵法 fed-batch fermentation 制备, 平均相对分子质量 117 万 Da 和 20 万 Da); 盐酸环丙沙星 (浙江华义医药有限公司 20040617 将盐酸环丙沙星溶解于适量的双蒸水中, 加入氨试液, 使环丙沙星沉淀, 过滤, 将滤渣多次洗涤后真空干燥制得环丙沙星备用); 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 美国 DIFCO 公司; 营养 (MH) 肉汤, 杭州天和微生物试剂有限公司; 水解酪蛋白 (MH) 琼脂, 杭州天和微生物试剂有限公司; PHB-CPX 纤维毡, 由本实验室自制。

### 1.2 实验仪器

高压直流电源 (0-40000 V 天津东文高压电源厂); LEO438VP 扫描电子显微镜 (England); HP8452 紫外可见吸收光谱仪, 美国惠普公司; 恒温培养箱, 上海医用恒温设备厂。

## 2 实验方法

### 2.1 CPX-PHB 纤维毡的制备

称取适量的环丙沙星, 滴入冰醋酸使其恰好溶解, 加入一定体积的氯仿稀释为澄清溶液, 然后将一定量的 PHB 加入至氯仿液中, 水浴 70℃ 使 PHB 溶解, 超声处理 3 分钟使环丙沙星与 PHB 混合均匀, 得到澄清的混合溶液。利用电纺技术将其制备成电纺纤维毡。电纺条件为: PHB (117 万

收稿日期: 2007-09-18 修回日期: 2007-12-05

基金项目: 国家自然科学基金 (20604014) 资助项目 科技部科技支撑计划 (2006BA106A20-10) 资助项目

联系人简介: 张立伟 (1963-), 男, 教授, 主要研究方向: 药物制剂。E-mail: lwzhang@sxu.edu.cn

Da) 聚合物溶液浓度为 0.062 (每毫升  $\text{CHCl}_3$  中所加 PHB 的克数)、电压 9.6KV、电极间距离 18cm、载药量 10% (相对于 PHB 的质量)、喷头内径为 0.7mm。PHB (20 万 Da) 聚合物溶液浓度为 0.16、电压 12KV、电极间距离 15cm、载药量 10%、喷头内径为 0.6mm。然后样品经扫描电镜进行表征, 观察组成纤维毡的纤维形态。

## 2.2 CPX-PHB 电纺纤维毡的包封率测定<sup>[9]</sup>

精密称定 CPX-PHB 电纺纤维毡样约 5mg 置于氯仿中, 70℃ 恒温水浴加热使其溶解, 氯仿定容后超声震荡混合均匀, 于 281nm 波长处测定吸光度, 根据回归方程  $A=0.1207C-0.0404$  ( $r=0.9994$ ), 计算环丙沙星的含量, 并进一步计算包封率。

包封率 =  $W_1/W_0$ 。其中,  $W_1$  为电纺纤维毡中环丙沙星的含量,  $W_0$  为制备电纺纤维毡时实际加入的环丙沙星量。

## 2.3 CPX-PHB 电纺纤维毡的体外释放度测定

精密称定电纺纤维毡约 20mg 置于透析袋中<sup>[10]</sup>, 并在透析袋中加入 5mL PBS (pH 7.4), 把透析袋两端扎紧后, 置于盛有 45mL PBS (pH 7.4) 的具塞三角瓶中, 在水浴振荡器中孵育振荡 (37℃, 70 rpm)。每隔一定时间点从具塞三角瓶中取 1mL 释放液, 同时补充等体积的新鲜缓冲液。将所取样品用 PBS (pH 7.4) 稀释至 5mL 后, 以相同时间点所取的未载药 PHB 纤维膜的释放液作为空白, 在 271nm 处测定吸收度。根据回归方程  $A=0.1032C+0.0016$  ( $r=0.9997$ ), 计算环丙沙星的累积释放率。

## 2.4 载药纤维毡 (PHB 相对分子质量为 20 万

Da) 的抑菌活性测定

2.4.1 琼脂培养板的铺设 称取水解酪蛋白 (MH) 琼脂 36g 加蒸馏水 1000mL, 加热溶解后分装烧瓶, 经 115℃ 高压蒸汽 20 分钟灭菌, 于无菌条件下, 吸取 15mL 培养基倾注于直径 6cm 的灭菌平皿备用。

2.4.2 营养肉汤培养基的配置 称取营养肉汤 22g 加蒸馏水 1000mL, 加温溶解后, 分装三角瓶中, 经 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 分钟备用。

2.4.3 金葡菌的孵育 将金黄色葡萄球菌 (ATCC25923) 接种于营养肉汤中, 于恒温培养箱中 37℃ 培养 16h 并校正浓度至 0.5 麦氏标准。

2.4.4 抑菌圈的测定 取无菌棉棒蘸取菌液, 在试管内壁旋转挤去多余菌液后, 以 K-B 划线法<sup>[11]</sup> 将菌液均匀涂布于 MH 琼脂平板上, 平板在室温下干燥 3min 用无菌镊子将 ① 未载药纤维毡 ② 载药纤维毡 ③ 滴有与样品 2 等药量的环丙沙星溶液的空白纤维毡 (0.8×0.8cm<sup>2</sup>) 紧贴于琼脂平板上, 37℃ 恒温培养 16h 和 48h 后, 用毫米尺测量抑菌

圈的直径 ( $n=3$ )。

2.4.5 细菌抑制率的测定<sup>[5]</sup> 将金黄色葡萄球菌 (ATCC25923) 接种于肉汤培养基中, 细菌溶液被标准化到 0.5 麦氏标准, 然后将其等分为每份 10mL。将载药量 0.1、0.3、0.5mg 的纤维膜及 5mg 空白纤维膜加入细菌溶液中, 所有被测试溶液在 37℃ 不断振摇, 24h 后在 625nm 处测定其吸收度值 ( $n=3$ )。

细菌抑制率  $I(\%) = (I_c - I_s) / I_c \times 100$

其中,  $I_c$  为对照细菌溶液 (不含任何纤维毡) 24 小时后 625nm 处的吸光度值;  $I_s$  为细菌溶液 (含载药或空白纤维毡) 24 小时后 625nm 处的吸光度值。

## 3 结果与讨论

### 3.1 CPX-PHB 电纺纤维毡的形态

利用静电纺丝技术制备的 CPX-PHB 电纺纤维毡如图 1 所示, 类似一种具有柔韧性的无纺布。扫描电镜图 (图 2) 显示 CPX-PHB (20 万 Da) 电纺纤维毡由直径为 1.1~1.8μm 均匀的纤维丝组成。CPX-PHB (117 万 Da) 电纺纤维毡与图 2 相似, 由直径为 0.65~1.2μm 均匀的纤维丝组成。

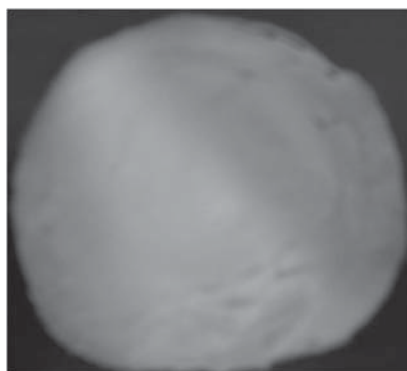


图 1 CPX-PHB (20 万 Da) 电纺纤维毡  
Fig 1 Fibrous mats of electrospun CPX-PHB (20×10<sup>4</sup> Da)

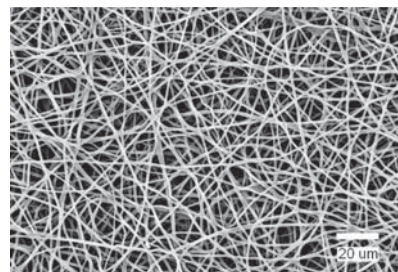


图 2 CPX-PHB (20 万 Da) 电纺纤维毡的扫描电镜照片 (×2000)  
Fig 2 SEM photographs of electrospun CPX-PHB (20×10<sup>4</sup> Da) fibrous mats (×2000)

### 3.2 CPX-PHB 电纺纤维毡的包封率

取 CPX-PHB 电纺纤维样品 3 份, 分别测定包

封率, 结果见表 1。从结果可知, 静电纺丝法制备的纤维毡包封率接近于 100%。由于静电纺丝法的操作特点, 药物是直接溶解在聚合物溶液中的, 所以药物几乎没有损失。

表 1 聚羟基丁酸酯环丙沙星电纺纤维毡的包封率  
Table 1 Entrapment efficiency of PHB-CPX fibrous mats

样品号*	1	2	3	4	5	6
实际药量 (mg)	0.47	0.55	0.49	0.44	0.47	0.52
理论药量 (mg)	0.47	0.53	0.50	0.45	0.47	0.53
包封率%	100.0	103.7	98.0	97.8	100.0	98.1
平均包封率 ±SD%	100.6 ± 2.9		98.6 ± 1.2			

\* No 1~3 PHB Mw=20×10<sup>4</sup> Da No 4~6 PHB Mw=117×10<sup>4</sup> Da

### 3.3 CPX-PHB电纺纤维毡的体外释放度

CPX-PHB电纺纤维毡 (20万、117万 Da) 的体外释放曲线如图 3 所示。在释放的第一小时, 二者均有较明显的药物突释现象, 可能是由于吸附于纤维表面的药物结晶快速溶出引起的。高相对分子质量样品在 1h 时释放了 12.44%, 低相对分子质量样品释放了 14.99%。二者在起初的 23h 中, 释放没有明显差异, 都经过了一个快速的释放过程。在 24h 时, 高相对分子质量样品释放了 57.02%, 低相对分子质量样品释放了 57.60%。在 24h 后, 药物进入了一个缓慢的释药过程。但是在经过 622h 的释放后, 低相对分子质量的样品累积释放率达到 90.08%, 而高相对分子质量的样品只有 69.79%。说明聚合物相对分子质量越大, 药物的释放越慢。这可解释为在释放初期, 主要是负载于纤维表面或浅表面的药物溶解和扩散释放, 而在药物释放的中后期, PHB 在溶液体系中逐渐溶胀, 使得包埋于纤维内部的药物释放。由于

随着聚合物相对分子质量提高, 聚合物分子间作用力增大, 药物与高分子链的作用增强, 这时只有高分子降解后才能引起药物的释放。因而与低相对分子质量的聚合物相比, 高相对分子质量聚合物的药物释放较缓慢。

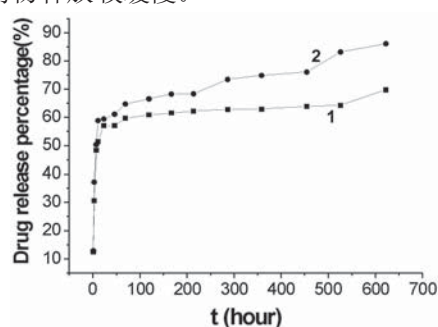


图 3 不同相对分子质量的 PHB 纤维毡的体外释药曲线  
Fig 3 In vitro release of Ciprofloxacin from PHB fibrous mats with different molecular weight  
(Curve1 Mw=117×10<sup>4</sup> Da Curve2 Mw=20×10<sup>4</sup> Da)

### 3.4 CPX-PHB电纺纤维毡的抑菌活性

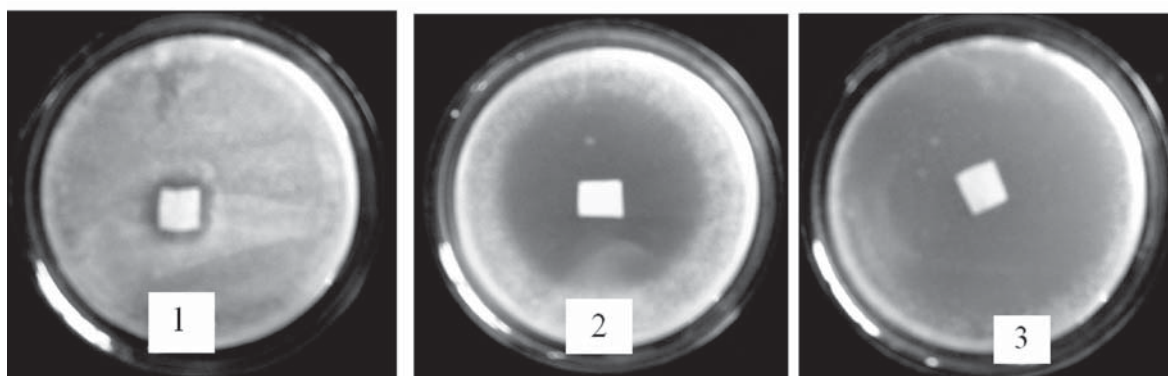


图 4 纤维毡体外抑菌圈

(1) 未载药纤维毡 (2) 载药纤维毡 (3) 含有与 2 等药量的空白纤维毡

Fig 4 Inhibition of bacterial growth on agar plates after 16h incubation at 37°C

(1) PHB fibrous mats (2) CPX-PHB fibrous mats (3) PHB fibrous mats with CPX on the surface

CPX-PHB电纺纤维毡抑菌圈的测定结果如图 4 所示, 载药的纤维毡对于细菌生长有明显的抑制作用, 37°C 恒温培养 16h 后抑菌圈的直径达到 44.0 mm。由于从纤维毡中释放出的药物的扩散

作用, 它所抑制细菌生长的区域要远远大于纤维毡所覆盖的区域。作为对照, 直接将药物加于空白纤维毡表面的 3 号样品, 抑菌圈的直径达到 55.3 mm, 说明药物在纤维表面释放和扩散速度



快,这间接证明了 CPX-PHB 电纺纤维毡中的药物是包封在 PHB 中的。而有趣的是未载药的空白纤维毡也有微弱的抑菌效果,抑菌圈直径为 13mm,而且在试验中我们注意到,37°C 恒温培养 48h 后,抑菌圈的直径没有改变,说明抑菌效果至 48h 时没有减弱。

### 3.5 细菌抑制率

在营养肉汤中载药的纤维毡对细菌繁殖的抑制率结果显示,在 10mL 的金葡菌溶液中,纤维毡中 CPX 的量为 0.15mg 时,细菌的抑制率为 51.14%,当纤维毡中 CPX 的量增大到 0.5mg 时,对细菌的抑制率达到 98.48%,接近于 100%。而未载药的纤维毡也具有 7.73% 的抑菌率,这和琼脂平板试验中的试验结果相吻合。

### 参考文献:

- [1] D. Menzies. Peritoneal adhesions incidence cause and prevention[J]. Surg. Annu., 1992, 24: 27-45.
- [2] Rushton N. Applications of local antibiotic therapy[J]. Eur J Sur Supl, 1997, 578: 27-30.
- [3] 尹承慧,侯春林,徐皓等. 羧甲基壳聚糖/环丙沙星植入缓释微球防治局部感染的实验研究[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(1): 72-74.
- [4] Kenawy E-R, Bowlin G L, Mansfield K, et al. Release of tetracycline Hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend[J]. J Controlled Release, 2002, 81: 57-64.
- [5] K Kim, Y K Luu, C Chang, et al. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds[J]. J. Controlled Release, 2004, 98: 47-56.
- [6] 陈建海,陈志良,侯连兵,等. 聚羟基丁酸酯缓释微球的制备和性能[J]. 功能高分子学报, 2000, 113(1): 61-64.
- [7] Zeng J, Yang L X, Liang Q Z, et al. Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation[J]. J Controlled Release, 2005, 105: 43-51.
- [8] F. D. Lowy. Staphylococcus aureus infections[J]. N. Engl J. Med., 1998, 339: 520-532.
- [9] 李梅,张立伟. 环丙沙星-聚羟基丁酸酯电纺纤维毡包封率的测定[J]. 光谱实验室, 2007, 24(3): 510-512.
- [10] 符旭东,高永良. 缓释微球的释放度试验及体内外相关性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(8): 608-612.
- [11] 张卓然. 临床微生物学和微生物检验实验指导[M]. 北京:人民卫生出版社, 1988: 39-42.

## Preparation, characteristics and bacteria inhibition of the electrospun polyhydroxybutyrate fibrous mats containing ciprofloxacin

LIMEI<sup>1,2</sup>, HAN Gao-yi, ZHANG Li-wei<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education

Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Shanxi Medical College of Continuing Education, Taiyuan 030012, China)

**Abstract:** Electrospun polyhydroxybutyrate fibrous mats containing ciprofloxacin are prepared by electrospinning and the surface morphology of the fibrous mats is investigated by scanning electron microscope. The efficiency of encapsulation, drug release behavior in vitro and anti-bacteria activity of the fibrous mats are studied. The results show that the entrapment efficiency of electrospun scaffolds nearly reached 100%; the drug release duration is about 25 days, and the drug release of about 57% can be observed in initial 24h. The conclusions are that the electrospun polyhydroxybutyrate fibrous mats containing ciprofloxacin have good function of controlled release and it can inhibit the growth of *S. aureus* very well.

**Key words:** electrospun fibrous mats; polyhydroxybutyrate (PHB); ciprofloxacin; controlled release; activity of anti-bacteria

(责任编辑 罗娟)