

可控降解抗感染材料的体外释药机制研究*

李春艳^{1,2}, 胡从从¹, 温志国², 董声雄², 丁马太³

(1. 福建医科大学 药学院, 福建 福州 350108; 2. 福州大学 化学化工学院, 福建 福州 350108;
3. 厦门大学 材料学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 在前期合成并表征了可控降解抗感染材料环丙沙星聚氨酯(CFPU)的基础上, 建立高效液相色谱法(HPLC)测定其体外降解释放抗菌药物环丙沙星的含量; 通过制作累积药物释放曲线, 考察不同降解介质及其浓度对药物释放的影响; 并对累积药物释放曲线进行拟合, 研究其体外可控降解的药物释放机制。结果表明建立的 HPLC 法简单准确可靠。该材料的降解具有生物响应性, 且符合一级动力学; 药物释放是以 Ritger-Pappas 方程($0.45 < n < 0.89$)即扩散与骨架溶蚀相结合的机制进行, 在无炎症时以扩散为主, 而炎症发生时反之, 且炎症越严重, 骨架溶蚀越占优势。

关键词: 聚氨酯; 环丙沙星; 生物降解; 药物释放; 抗感染

中图分类号: R914.5; R978.5; O631.5 文献标识码: A
文章编号: 1001-9731(2011)10-1840-04

1 引言

随着医用内植物在临床上广泛使用, 以生物医用材料为中心的感染(biomaterial centered infection, BCI)日益增多。BCI 不仅发病率高, 且治疗效果差^[1], 因此, 有效消除 BCI, 是目前生物医用材料临床应用中的当务之急。

近年来, 以具生物相容性聚合物为载体的抗感染药物缓释系统成为研究热点。这些药物缓释系统大多由聚合物与药物经物理共混而成^[2-4], 两者之间没有化学键合, 其药物释放是不可控的, 不能安全、长效地消除 BCI。前文^[5,6]报道, 本课题组通过分子设计和聚合物组装, 即在聚己内酯(PCL)与六亚甲基二异氰酸酯(HDI)缩合体系中加入抗菌药物环丙沙星(CF), 成功地制备 CF 嵌入聚氨酯(PU)主链的聚氨酯前药(CF-PU)。CFPU 本身没有药理活性, 没有炎症时相对保持惰性, 炎症发生时, 可在炎症酶 CE 的作用下, 可控降解释放抗菌药物 CF, 且炎症越严重, 释放的 CF 越多; 从而能有效地消除 BCI。

本文采用高效液相色谱法, 研究 CFPU 分别在 CE 和 PBS 溶液中(相对于有无炎症发生)的降解规律, 并探讨其药物释放机制, 为进一步的体内研究打下基础。

2 材料和方法

2.1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; SHA-B 恒温振荡器, 常州国华电器有限公司; CFPU 按文献^[5]合成; 透析袋, R-25-8K, 山东济南皓博生物技术有限公司; 胆固醇酯酶 CE, 美国 Sigma 公司; 磷酸盐缓冲液 PBS, pH 值为 7.4, 上海 Solarbio 生物科技有限公司; 环丙沙星对照品, 中国药品生物制品检定所; 甲醇, 色谱级, 国药集团化学试剂有限公司; 三氟乙酸, 分析纯, 上海实验试剂有限公司。

2.2 高效液相色谱法

2.2.1 色谱条件

色谱柱为 AQ-C18 柱(4.6mm×250mm; 5 μ m); 流动相为 28/72(体积比)甲醇-0.05%三氟乙酸溶液; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 检测波长为 279nm; 流速为 1.0mL/min; 进样 10 μ L。

2.2.2 对照品溶液的配制

精准称取干燥至恒重的环丙沙星对照品 10mg, 用流动相溶解并配制成 50mL 浓度为 0.2mL/mg 溶液, 备用。

2.2.3 标准曲线的制备

分别精确吸取上述对照品溶液 0.5、1、2、3、4、5、6mL, 并各自置于不同的 50mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度配制成系列标准溶液。按上述色谱条件分别进样 10 μ L, 测定其峰面积, 并以峰面积与相应的对照品浓度进行线性回归制备标准曲线。

2.2.4 专属性实验

分别精密量取对照品溶液、CFPU 降解液、PU 降解液和流动相各 10 μ L 进样分析, 记录色谱图。

2.2.5 回收率和精密度测定

精密量取已知浓度的 CF 溶液 9 份, 每 3 份为 1 组分成 3 组, 分别加入不同浓度 CF 对照液, 配制成高中低 3 个浓度的 CF 溶液。按照前述色谱条件进样测定, 计算加样回收率。再将上述测定回收率的溶液分别于当天连续测定 5 次和在此后的连续 5d 每天测定 1 次, 计算日内和日间 RSD。

* 基金项目: 福建省科技厅国际合作处重点资助项目(2006I0019); 福建省科技厅资助省属高校资助项目(2008F5025)

收到初稿日期: 2011-07-25

收到修改稿日期: 2011-09-20

通讯作者: 李春艳

作者简介: 李春艳 (1965-), 女, 福建福州人, 副教授, 在读博士, 师承董声雄教授, 从事生物医用材料研究。

2.3 CFPU 的体外药物释放

2.3.1 CE 溶液的配制

精确称取 CE 粉末 0.0301g,用 PBS 溶液溶解并定容于 10mL 容量瓶中,摇匀即得浓度为 3.01mg/mL 的 CE 储备液,于 4℃ 保存备用。将储备液用 PBS 溶液进行 10、50 倍稀释后分别得到浓度为 0.301、0.0602 mg/mL 的 CE 溶液。

2.3.2 CFPU 的体外降解

精确称取 CFPU 约 6mg,置于事先用 0.1 mol/L EDTA 和 0.1 mol/L NaHCO₃ 煮沸 30min 的透析带内,加入 3mL PBS 缓冲液或不同浓度 CE 溶液,扎牢,浸入装有 5mL PBS 的试管中,置于恒温振荡器 37℃ 水浴中,隔天在透析袋中加入 0.1mL CE 溶液以维持酶活性,取降解液分析时补充等量的 PBS 缓冲液,得到 CFPU 在 PBS 缓冲液与 CE 溶液两种基质中以及在 3 种不同浓度的 CE 溶液中的降解液。

2.3.3 药物累积释放率计算

按照前述色谱条件,定期取降解液进样分析,由标准曲线求得相应取样时间的药物浓度,按下式计算药物累积释放率:

$$Q = \frac{\sum_{i=1}^n C_i V}{WF} \times 100\%$$

式中, Q 为药物累积释放率; C_i 为 CF 浓度 (mg/mL); W 为 CFPU 样品质量 (mg); V 为降解液体积 (mL); F 为 CFPU 载药率。

3 结果与讨论

3.1 环丙沙星浓度的测定

3.1.1 CF 的标准曲线

$A = -105450.93343 + 62758.18167C$ ($r = 0.9996, n = 7$) 见图 1,结果表明在 2~24 μg/mL 浓度范围内线性关系良好。

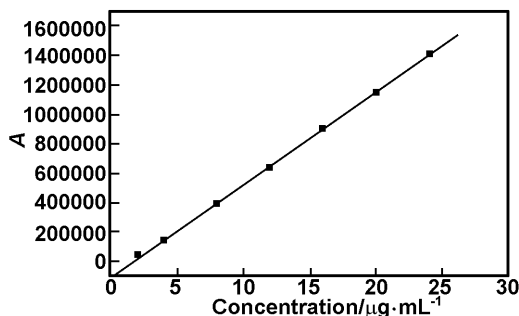


图 1 CF 的标准曲线

Fig 1 The standard curve of CF

3.1.2 HPLC 谱图

CFPU 降解液、CF 对照品溶液、PU 降解液以及流动相的 HPLC 谱图见图 2,结果表明流动相及 PU 降解液对色谱峰无干扰。

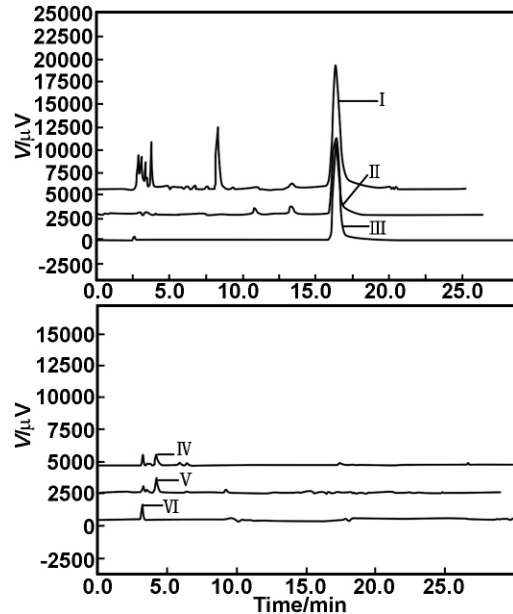


图 2 CFPU 降解液、CF 溶液、PU 降解液与空白对照的 HPLC 谱图

Fig 2 The HPLC chromatogram of CFPU, CF, PU and blank determination

3.1.3 方法优势

高、中、低 3 个浓度的平均加样回收率为 100.1%, RSD 为 2.08%; 日内精密度 RSD 为 1.90%, 日间精密度 RSD 为 1.67%, 表明该测定方法准确度及精密度高。本课题组曾用 UV 法来研究 CFPU 的体外降解^[6], 但据文献^[7]报道, CFPU 在 CE 中降解除了释放游离的 CF 外, 还有带有 CF 的碎片, 由于二者的 UV 吸收一致, 因此 UV 法研究 CFPU 的体外释药存在较大的误差。本文建立的 HPLC 法, 能更准确反映 CFPU 的释药情况。

3.2 CFPU 体外降解的累积药物释放曲线

3.2.1 降解介质对 CFPU 体外药物释放的影响

分别取 CFPU 在 PBS 缓冲液与 CE 溶液中的降解液测定 CF 浓度, 以累积释药率 Q 为纵坐标, 降解天数 d 为横坐标, 绘制累积释药曲线(图 3)。从图 3 看出 CF 在 PBS 中只是缓慢微量释放, 即在无炎症组织的正常体液中保持相对惰性; 而在 CE 溶液中释放速率明显提高, 说明在体内发生炎症时, 就会在炎症组织巨噬细胞分泌的 CE 作用下, 加快可控降解, 释放出 CF。

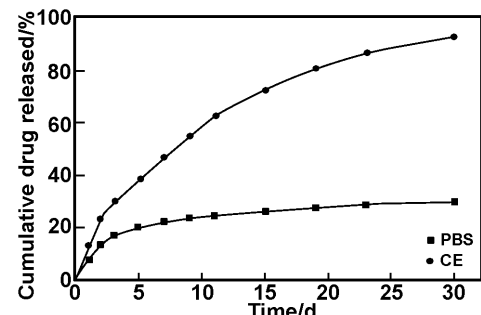


图 3 CFPU 在 PBS 和 CE 溶液中累积释药曲线

Fig 3 The curves of accumulated drug release of CFPU in PBS and CE solution

3.2.2 CFPU 在不同浓度 CE 溶液对药物释放的影响

分别测定 CFPU 在不同浓度 CE 溶液中降解液的 CF 浓度,以累积释药率 Q 为纵坐标,降解天数 d 为横坐标,绘制累积释药曲线(图 4)。从图 4 看出 CF 释放速率随 CE 溶液浓度的提高而提高。即 CF 的释放量与炎症的严重程度相匹配,即炎症越严重,巨噬细胞分泌的 CE 也就越多,CFPU 降解释放的 CF 也就越多,抗感染力也就越强。

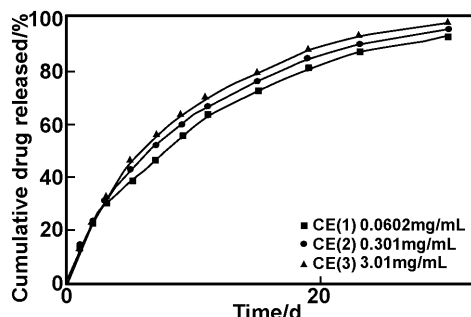


图 4 CFPU 在不同浓度溶液中的累积释药曲线

Fig 4 The curves of accumulated drug release of CFPU in different solutions of CE

3.2.3 CFPU 的体外药物释放机制

用描述高分子药物释放常用的几个动力学模型,

表 1 累积释药曲线的拟合

Table 1 Fit line of the curve of cumulated drug releasere

| 降解介质 | 模型 | 动力学方程 | R^2 |
|-------|---------------------|-------------------------------|--------|
| PBS | 零级方程 | $Q=0.0079T+0.1188$ | 0.6853 |
| | 一级动力学 | $\ln(1-Q)=-0.0097t-0.1284$ | 0.7296 |
| | Higuchi 平方根定律 | $Q=0.0526t^{1/2}+0.0524$ | 0.9018 |
| | Hixson-Crowell 溶蚀方程 | $(1-Q)^{1/3}=-0.003t+0.9583$ | 0.7150 |
| | Ritger-Pappas 方程 | $\ln Q=0.3562 \ln t-2.2957$ | 0.9166 |
| CE(1) | 零级方程 | $Q=0.0299t+0.1948$ | 0.8910 |
| | 一级动力学 | $\ln(1-Q)=-0.0875t-0.0454$ | 0.9982 |
| | Higuchi 平方根定律 | $Q=0.1837t^{1/2}-0.0122$ | 0.9914 |
| | Hixson-Crowell 溶蚀方程 | $(1-Q)^{1/3}=-0.0195t+0.9544$ | 0.9864 |
| | Ritger-Pappas 方程 | $\ln Q=0.5679 \ln t-1.8807$ | 0.9877 |
| CE(2) | 零级方程 | $Q=0.0308t+0.2097$ | 0.8682 |
| | 一级动力学 | $\ln(1-Q)=-0.1009t-0.0242$ | 0.9973 |
| | Higuchi 平方根定律 | $Q=0.191t^{1/2}-0.0086$ | 0.9844 |
| | Hixson-Crowell 溶蚀方程 | $(1-Q)^{1/3}=-0.0213t+0.952$ | 0.9851 |
| | Ritger-Pappas 方程 | $\ln Q=0.5704 \ln t-1.8873$ | 0.9754 |
| CE(3) | 零级方程 | $Q=0.0314t+0.2244$ | 0.8543 |
| | 一级动力学 | $\ln(1-Q)=-0.1182t+0.0216$ | 0.9928 |
| | Higuchi 平方根定律 | $Q=0.196t^{1/2}-0.0014$ | 0.9794 |
| | Hixson-Crowell 溶蚀方程 | $(1-Q)^{1/3}=-0.0234t+0.9516$ | 0.9871 |
| | Ritger-Pappas 方程 | $\ln Q=0.5806 \ln t-1.8241$ | 0.9738 |

根据具体需要还可以合成不同性质的 CFPU 来进行研究。实际应用时,必须将 CFPU 作成医用内植物的涂层材料,才能发挥其抗感染作用;而一旦制成涂层后,CFPU 的形态将由疏松变得紧密,与介质的接触面积减少,释药速率将明显降低,但释药趋势不会改变。本研究的 CFPU 在 CE 中的日释药浓度都 $>2\mu\text{g}/\text{mL}$;制成涂层之后,释药速率虽会有所下降,但仍在最低抑

如零级方程、一级动力学、Higuchi 平方根定律、Ritger-Pappas 方程、Hixson-Crowell 溶蚀方程等,对图 3、4 的累积释药曲线进行拟合,结果见表 1。

表 1 中的相关系数 R^2 表明 CFPU 在 CE 中的降解更接近于一级释放。从反映扩散机制 Higuchi 方程的拟合效果优于反映溶蚀机制的 Hixson-Crowell 溶蚀方程来看,说明本释药机制为扩散与骨架溶蚀相结合,前者为主、后者为辅的机制。与表 1 中 Ritger-Pappas 方程拟合结果一致:在 PBS 中, $n < 0.45$, 释药以扩散为主;在 CE 中, $0.45 < n < 0.89$, CE 浓度越大 n 越大,说明释药为扩散与骨架溶蚀相结合,但骨架溶蚀转为优势。Ritger-Pappas^[8] 曾经指出:当(1) $n \leq 0.45$ 时,药物释放机制为 Fickian 扩散;(2) $0.45 < n < 0.89$ 时,药物释放机制为 non-Fickian 扩散,即扩散与骨架溶蚀机制相结合;(3) $n \geq 0.89$ 时,药物释放机制为骨架溶蚀。

本文只考察降解介质对 CFPU 的释药的影响,探讨其在有无炎症发生以及炎症不同严重程度下的释药情况。其实 CFPU 的释药还受其本身的结构和形态、环境的温度、pH 值等多种因素的影响。研究对象是课题组合成并表征的具有载药率高、分子量大的 CFPU^[5]。

菌浓度(MIC)之上。本文模拟体内炎症环境进行,因此将温度和 pH 值固定在人体正常生理值,即 37°C 和 7.4。

4 结 论

(1) 建立 CF 含量测定的 HPLC 法,灵敏度高、重现性好。

(2) CFPU 能在炎症组织分泌的 CE 作用下可控降解释放出 CF。

(3) CFPU 降解符合一级动力学, 药物释放机制是扩散与骨架溶蚀相结合。

参考文献:

- [1] Gristina A G. [J]. Science, 1987, 237: 1588-1595.
 [2] 李春艳, 单丽, 出端艳, 等. [J]. 高分子通报, 2009, (11): 57-61.
 [3] 陈德敏, 杨莽, 张彩霞. [J]. 功能材料, 2008, 39(11): 1883-1886.

- [4] 赵宏霞, 黄才欢, 金花, 等. [J]. 功能材料, 2009, 40(3): 429-432.
 [5] 李春艳, 出端艳, 温志国, 等. [J]. 功能材料, 2010, 41(4): 730-733.
 [6] Wen Z G, Li C Y, Hu C C, et al. [J]. Adv Mater Res, 2011, 239-242: 963-967.
 [7] Woo G L, Yang M L, Yin H Q, et al. [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 59: 35-45.
 [8] Ritger P L, Peppas N A. [J]. J Controlled Release, 1987, 5: 37-42.

Study on the drug release mechanism in vitro of antimicrobial material controlled degradation

LI Chun-yan^{1,2}, HU Cong-cong¹, WEN Zhi-guo², DONG Sheng-xiong², DING Ma-tai³

(1. Faculty of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China;

2. Faculty of Chemical & Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China;

3. Faculty of Material, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Based on the preparation and characterization of controlled release antibacterial material-ciprofloxacin-polyurethanes (CFPU), the method of HPLC was established to determine the content of antibacterial agent-ciprofloxacin (CF) in the degradation solution of CFPU and investigate the drug-release mechanism in vitro by plotting and fitting the cumulative release curves to inspect the effects of different medium and different concentrations on drug release. The results showed that the HPLC method is accurate, reliable and simple. The drug-release of CFPU was bioresponsive and could be accorded with first order kinetics. It was observed that CF was released from CFPU by a combination of diffusion and erosion mechanism by modeling in the Ritger-Pappas equation ($0.45 < n < 0.89$), mainly in the manner of diffusion in the absence of infection while erosion mechanism in the presence of infection. And the worse the inflammation was, the more erosion mechanism dominated.

Key words: ciprofloxacin; polyurethane; drug release; controlled degradation; antimicrobial

(上接第 1839 页)

Fabrication of a microscale ordered-reinforced composite and its mechanical characterization

ZHANG Zhen-jie, WANG Hong, YANG Zhuo-qing, DING Gui-fu, ZHAO Xiao-lin

(Institute of Micro and Nano Science and Technology, National Key Laboratory of Nano/Micro Fabrication Technology, Key Laboratory for Thin Film and Microfabrication of the Ministry of Education, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Polyurethane modified epoxy resin was selected as matrix, an PMC reinforced by micro-ordered electroplated nickel wire was fabricated through microfabrication. Results of ANSYS simulation show that matrix can relieve stress concentration if the matrix wraps up entirely on the reinforcement. The lowest stress concentration is generated in the deformation of composite when the angle of reinforcement is 45° and the volume content of reinforcement is 62.5%. Results of tension testing on DMA show that the tensile strength and elastic modulus of composite are 4 times and 3 times higher than the pure polymer, reasonable fracture processing has been analyzed by SEM.

Key words: MEMS; composite; ANSYS; ordered reinforcement; microscale