

可控降解抗感染材料的合成和表征^{*}

李春艳¹, 出端艳¹, 单 丽¹, 温志国², 黄剑华², 董声雄², 芴太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), 制备CF嵌入聚氨酯(PU)主链的聚氨酯前药CFPU。用UV、FTIR、¹H-NMR表征其结构; GPC法测定分子量; UV法测定载药率; 摸索影响其分子量和载药率的主要因素; 并用琼脂稀释法测定其胆固醇酯酶(CE)降解液对金黄色葡萄球菌的抗菌活性。结果表明, 确已成功制得目标产物; PCL浓度和HDI加料方式分别对其平均分子量和载药率有较大影响; 而其CE降解液对金黄色葡萄球菌具有抗菌活性。因此, 当其用作医用内植物的涂层材料时, 能被炎症组织所分泌的CE可控降解为这种具抗菌活性的降解液, 从而可发挥抗感染作用。

关键词: 环丙沙星; 聚氨酯; 高分子前药; 可控降解; 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(2010)04-0730-04

1 引言

医用内植物临床应用中常会并发难以治疗的感染^[1], 解决这一抗感染问题成为当务之急。近年来, 以具生物相容性的聚合物为载体的抗感染药物缓释体系成为研究热点^[2]。但这些体系大多为聚合物与药物物理混合而成^[3,4], 两者并未经化学键合, 因而其药物释放是不可控的, 即一旦开始释放就无法控制, 药物完全释放之前也无法停止, 不能满足安全、长效地抵抗内植物感染的需要。为此, 国外学者通过分子设计和聚合物组装, 令抗菌药物与聚合物键合, 合成高分子前体药物(简称前药, Predrug)^[5-7]。高分子前药本身没有药理活性, 不是药物, 但特定的条件(温度、pH、酶等)可控制其降解, 令其依据抗感染需要适时适量地释放出可发挥药理作用的药物。这是一类智能型的药物缓释体系, 既能避免药物过量, 又能维持抗感染的长效。

本文在国内首次报道以环丙沙星(CF)为抗菌药物、聚氨酯(PU)为载体, 成功地合成了聚氨酯前药CFPU。考察了合成过程影响CFPU应用的两个重要参数—前药分子量和载药率的主要因素。鉴于内植物感染主要是由金黄色葡萄球菌引起的, 在发生感染的炎症组织内, 巨噬细胞会分泌胆固醇酯酶(CE), 且炎

症越严重分泌的CE越多^[8]。CE可以降解PU^[9,10]。因此, 将所合成的CFPU分别置于CE和无炎症组织的正常体液PBS中降解, 考察其CE、PBS降解液对金黄色葡萄球菌的抗菌活性。

2 CFPU的合成和表征

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪器

Varian Cary50型紫外-可见分光光度计, 美国Varian公司; Nicolet 360型傅立叶红外光谱仪, 美国Nicolet公司; Bruker Advance III 400MHz核磁共振仪, 瑞士Bruker公司; SHP-250型生化培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 超级恒温槽, 上海精宏实验设备有限公司。

2.1.2 试剂

聚己内酯(PCL1250、2000)、六亚甲基二异氰酸酯(HDI)和胆固醇酯酶(CE), 美国Sigma公司; 盐酸环丙沙星(CF), 浙江京新药业; MH肉汤和MH琼脂, 广东环凯生物科技有限公司; N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、四氢呋喃(THF)、二甲基亚砷(DMSO)、甲醇、三乙胺(TEA)和二月桂酸二丁基锡(DBTDL), 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 金黄色葡萄球菌(ATCC25923), 福建省疾病预防控制中心; 透析袋(R-25-8K), 山东济南皓博生物技术有限公司。

2.2 CFPU的合成

通过缩聚反应, 按照以下3个步骤合成CFPU。

2.2.1 预聚

于干燥的三口烧瓶中加入一定量的PCL与DM-SO, 边搅拌边加热至60℃, 待全溶后, 通N₂10~15min; 继续加入一定量的HDI和2d催化剂DBTDL, 60℃下反应1~3h, 得到预聚物(Prepolymer)。

2.2.2 扩链

在搅拌条件下, 于预聚物中加入一定量的CF、TEA, 并再滴入2d催化剂DBTDL和一定量DMSO, 反应5min后反应液呈澄清状, 24h后呈半透明状。此时, CF替代传统的扩链剂, 与预聚物发生缩合反应生成CFPU。

* 基金项目: 福建省科技厅国际合作处重点资助项目(200610019); 福建省科技厅资助省属高校资助项目(2008F50502)

收到初稿日期: 2009-12-07

收到修改稿日期: 2010-02-22

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。

2.2.3 终止反应

在上述反应液中加入 5ml 甲醇, 继续搅拌 1h, 令游离的异氰酸酯基完全封闭以终止反应。用乙醚水

混合液沉淀, 过滤, 滤饼经蒸馏水洗涤提纯, 得到弹性的白色或淡黄色聚氨酯前药 CFPU 小颗粒。

上述合成过程, 化学反应式如图 1。

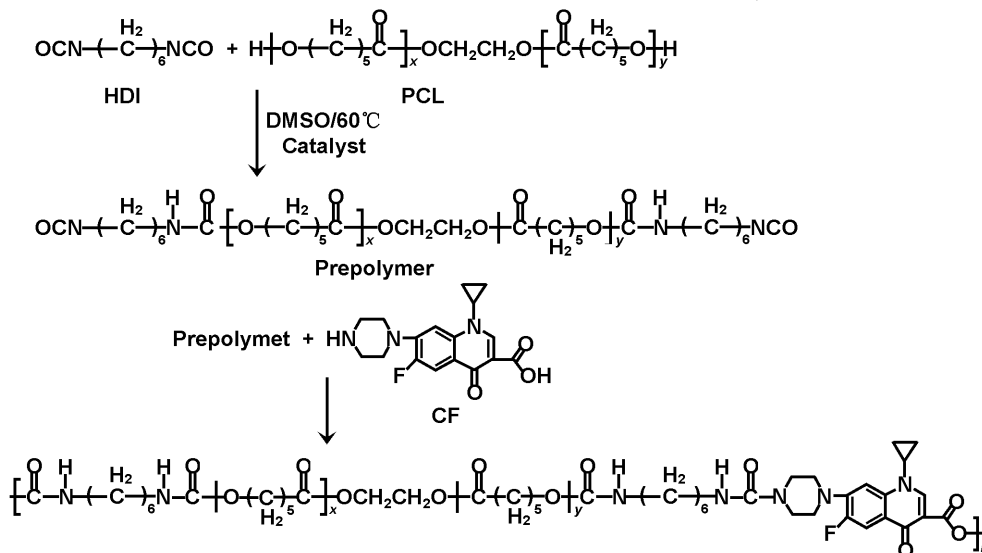


图 1 聚氨酯缩合合成 CFPU 的化学反应式

Fig 1 Chemical equation of CFPU via polyurethane condensation reaction

2.3 CFPU 的表征

2.3.1 结构表征

采用 UV、FTIR、H-NMR 联合表征。

2.3.2 平均分子量测定

精确称取一定量的 CFPU, 经 THF 溶解、定容、0.45μm 滤膜过滤后, 用 Waters Breeze 凝胶渗透色谱仪(Pheugel(300mm × 7.8mm × 5μm) 三柱串联色谱柱, 流动相为 THF, 流速为 1ml/min, 柱温为 30℃, RI 检测器, 检测温度 40℃, 进样量为 20μl) 测定其相对分子量及其分布。用窄分布的聚苯乙烯(PS) 标样校准系统, 用 GPC offline 软件计算 CFPU 的分子量, 所有分子量数据都是 PS 当量。

2.3.3 载药率测定

精确称取适量 CF, 用 DMF 溶解定容, 配制成一列标准溶液, 用紫外-可见分光光度计测定其在最大吸收波长处的吸收值, 绘制标准曲线。取适量 CFPU, 按上述同样操作后根据标准曲线确定其所含 CF 的浓度 C, 计算载药率。

$$\text{实际载药率} = \frac{50 \times C \times 10^{-3}}{W_0} \times 100\%$$

$$\eta = \frac{\text{实际载药率}}{\text{理论载药率}}$$

式中: W_0 为高分子前药的总量, g; C 为 CF 浓度, μg/ml; 理论载药率为反应化学计量比计算的药理论质量百分数, %。η 为药物结合率。

2.4 抗菌活性测定

2.4.1 CFPU 的降解

称取 2 份 CFPU(约 3mg), 分别置于透析袋中, 各加入 3ml pH 为 7.4 的 PBS、CE 溶液, 然后浸入装有 5ml PBS 溶液的试管中, 37℃ 水浴降解, 隔天在 CE 的

透析袋中加入 1ml CE 溶液以维持酶活性, 并在 PBS 的透析袋中加入相应的 1ml PBS 溶液。取降解液做抗菌活性试验。

2.4.2 抗菌活性的测定

以 CF 为阳性对照、空白肉汤为阴性对照, 采用琼脂稀释法测定 CFPU 的 PBS 与 CE 降解液对金黄色葡萄球菌的抗菌活性。

3 结果与讨论

3.1 CFPU 的 UV 分析

分别取适量的空白聚氨酯(PU, 以 PCL 构筑软段、HDI 构筑硬段)、CF 及所合成的 CFPU, 经 DMF 溶解后用 Cary50 型紫外-可见分光光度计在 200~800nm 波长范围扫描, 结果见图 2。

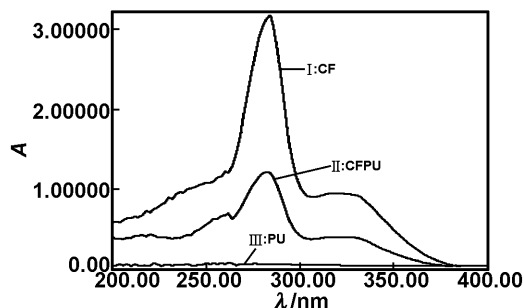


图 2 PU、CF 及 CFPU 的 UV 谱图

Fig 2 The UV spectra of PU, CF and CFPU

从图 2 可以看出, 同在 286nm 处, PU 并无吸收; 而 CF 和 CFPU 一样, 都有最大吸收。表明在 CFPU 中, CF 确已嵌入到 PU 主链中。

3.2 CFPU 的 FTIR 分析

CFPU 的红外光谱见图 3。图 3 中, 3333cm^{-1} 是 PU 主链硬段 N—H 的伸缩振动峰, 1725cm^{-1} 是氨基

甲酸酯键中的 $C=O$ 伸缩振动峰, $1520\sim 1550\text{cm}^{-1}$ 是酰胺 II (即 $NHCO$) 的伸缩振动峰, 表明 CFPU 中有氨基酯键的存在; $1192\sim 1245\text{cm}^{-1}$ 是 $C-O-C$ 吸收峰; $1453.5\sim 1619.3\text{cm}^{-1}$ 是苯环上 $C=C$ 伸缩振动峰, $767.6\sim 929.0\text{cm}^{-1}$ 是多取代苯环上 $C-H$ 振动峰, 表明 CFPU 中已有只可能来自 CF 的苯环结构存在, 据此可以推断, CF 确已嵌入到 PU 主链中。

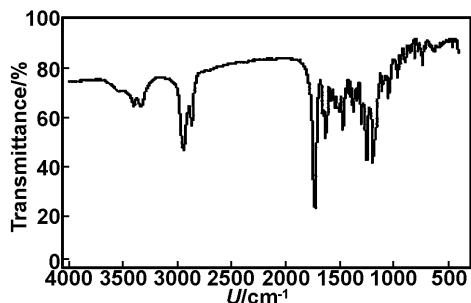


图3 CFPU 的 FTIR 谱图

Fig 3 The FTIR spectrum of CFPU

3.3 CFPU 的 ^1H-NMR 分析

CFPU 在 $DMSO-d_6$ 中的 ^1H-NMR 谱见图 4。

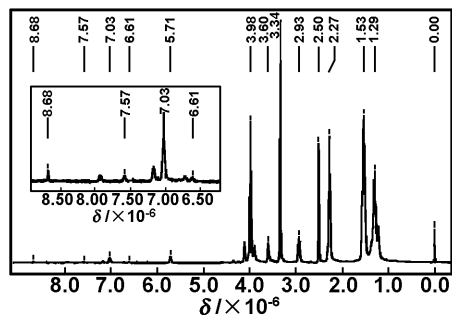
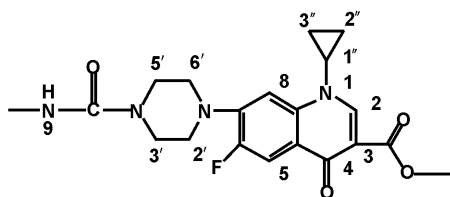


图4 CFPU 的 ^1H-NMR 谱图

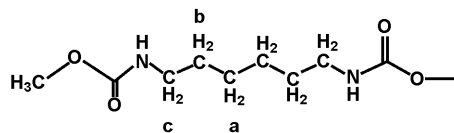
Fig 4 The ^1H-NMR spectrum of CFPU

CFPU 中含有以下 3 个结构单元:

结构单元 1:



结构单元 2:



结构单元 3:

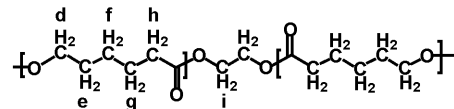


图 4 中 $\delta 1.29 \times 10^{-6}$ 、 1.53×10^{-6} 、 2.27×10^{-6} 、 3.99×10^{-6} 为 PCL 中 $-CH_2-$ 的特征峰, 其中的 $\delta 1.29 \times 10^{-6}$ 、 1.53×10^{-6} 同时也是 HDI 中 $-CH_2-$ 的特征峰, HDI 中的 $-CH_2-$ 特征峰还有 $\delta 3.34 \times 10^{-6}$ 。样品含有两类 NH ($1H$: $\delta 5.71 \times 10^{-6}$ 、 6.61×10^{-6}), 且含有酯 H ($1H$: $\delta 3.99 \times 10^{-6}$), 表明其系含有由 PCL 构筑软段、由 HDI 构筑硬段的 PU 化合物。 $\delta 7.57 \times 10^{-6}$ 、 7.91×10^{-6} 处是 CF 结构中苯环上的两个 $1H$ 峰 (H_5 , H_8), $\delta 2.94 \times 10^{-6}$ 处哌嗪环上 $1H$ 峰及 $\delta 8.67 \times 10^{-6}$ 的 $1H$ 峰为 CF 的特征峰, 进一步表明 CF 已成功嵌入到 PU 主链中。

3.4 CFPU 的平均分子量和分散性

当投料比为 $m(\text{HDI}) : m(\text{PCL}) : m(\text{CF}) = 2 : 1 : 1$ 时, 用 GPC 法测得 CFPU 平均分子量为 $14\sim 17\text{K}$ 。增加 PCL 的含量, 即当 $m(\text{HDI}) : m(\text{PCL}) : m(\text{CF}) = 2.6 : 1.8 : 0.6$ 时, CFPU 平均分子量可达 30K 。表明 CFPU 平均分子量随 PCL 含量的增加而增加, 可以通过改变 PCL 的含量设计 CFPU 的分子量。所有分子量的分散性指数 (PD) 均为 $1.2\sim 1.4$, 表明合成的 CFPU 具有较窄的分子量分布。

3.5 CFPU 的载药率

从图 2 看出, CFPU 和 CF 一样, 最大吸收也在 286nm ; 而同样以 PCL 构筑软段、HDI 构筑硬段的 PU 在 286nm 处并无吸收。因此, 可以断定, CFPU 的紫外吸收就是其所含 CF 的吸收。CF 的标准曲线方程为 $y = 0.00834x - 0.00012$ ($R^2 = 0.9999$), 由此方程, 可以求得投料比为 $m(\text{HDI}) : m(\text{PCL}) : m(\text{CF}) = 2 : 1 : 1$ 时 CFPU 的载药率 (表 1)。

表 1 CFPU 的载药率测定结果

Table 1 The drug loading rate of CFPU

样品编号	HDI 加入方式	预聚时间(h)	实际载药率 (%)	理论载药率 (%)	药物结合率 (%)
1	第 1 步全加入	1	9.4	17.3	0.54
2	分 2 步加入	1	16.7	17.3	0.97
3	第 1 步全加入	3	9.7	17.3	0.56
4	分 2 步加入	3	16.5	17.3	0.95

从表 1 可以看出, 缩聚反应中 HDI 的加入方式对于 CFPU 的载药率有着重要影响; 而预聚时间却几无影响。当预聚投料比为 $m(\text{HDI}) : m(\text{PCL}) : m(\text{CF}) = 2 : 1 : 1$ 时, 无论预聚时间是 1h 还是 3h , 实际载药

率基本一样, 均大约为理论载药率的一半; 而同样的 $m(\text{HDI}) : m(\text{PCL}) : m(\text{CF}) = 2 : 1 : 1$, 将 HDI 等量分成两份, 分别加入到预聚、扩链两步反应, 令预聚反应 $m(\text{HDI}) : m(\text{PCL}) = 1 : 1$, 扩链反应 $m(\text{HDI}) : m$

(CF) = 1: 1, 则无论预聚时间是 1h 还是 3h, CFPU 的载药率都高且与理论载药率相近, 药物结合率 η 几近于 1。这是因为 CF 是通过其 H—N= 和 HO—基团与 HDI 的 OCN—基团发生化学反应而嵌入 PU 主链的, 所以投料比相同时, 载药率与预聚时间长短无关; 过量的 HDI 都在预聚反应中 1 次性加入, 容易使其 OCN—基团消耗到与 PCL 形成三聚体(或多聚体)上, 而使得扩链反应才加入的 CF 得不到足够的 OCN—基团与之反应, 导致 CF 扩链反应得不完全, 因而嵌入到 PU 分子链中的数量就较少, 即降低了 CFPU 的载药

率。HDI 分两步加入, 扩链反应才加入的 CF 就能够得到足够的 OCN—基团与之反应, 使其作为扩链剂的作用得以充分发挥。换句话说, 绝大部分的 CF 就都可以嵌入到 PU 高分子链中去, CFPU 的载药率也就高, 而且可以高达 16.5%, 接近于理论载药率(17.3%), 而国外文献报道的载药率仅为 10% 左右^[3-5]。

3.6 CFPU 降解液的抗菌活性

CFPU 的 PBS 与 CE 降解液对金黄色葡萄球菌的抗菌活性结果见表 2。

表 2 CFPU 降解液的抗菌活性结果

Table 2 The antibacterial activity of CFPU degradation solution

菌种	样品	试管编号									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
金黄色葡萄球菌	PBS 降解液	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CE 降解液	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

注:“-”表示无细菌生长,“+”表示有细菌生长。

从表 2 可以看出, 只有 CFPU 的 CE 降解液对金黄色葡萄球菌有抗菌活性, 而 CFPU 的 PBS 降解液对金黄色葡萄球菌并没有抗菌活性。表明 CFPU 在无炎症组织的正常体液 PBS 中是惰性的、稳定的, 不会发生降解, 自然也就不会释放出对金黄色葡萄球菌有抗菌活性的 CF; 但在体内发生炎症时, 它就会在炎症组织巨噬细胞分泌的 CE 作用下可控降解, 释放出对金黄色葡萄球菌具抗菌活性的 CF; 且 CF 释放的数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, 由它降解 CFPU 而释放的 CF 也就越多, 抗感染力也就越强。可见, CFPU 有望成为医用内植物的表面涂层材料。因为这种材料在内植物导致体内炎症时, 其所含的 CFPU 就会在炎症组织巨噬细胞所分泌的 CE 作用下可控降解, 释放出对金黄色葡萄球菌具有抗菌活性的 CF, 有效地抵抗内植物引起的感染。炎症越严重, 分泌的 CE 就越多, 由它降解 CFPU 所释放的 CF 也就越多。而在正常体液 PBS 中并不发生这种降解与释放。这样, 以 CFPU 作为表面涂层材料的医用内植物就具有安全、长效的抗感染功能。

有关 CFPU 的降解释药规律以及降解机制正在研究中。

4 结 论

(1) 以 CF 为抗菌药物、PU 为载体成功合成了 CF 嵌入于 PU 主链的 CFPU。

(2) 将构筑 PU 主链硬段的 HDI 等分, 分别于预聚、扩链两步加入, 可以获得载药率接近于理论值的 CFPU。

(3) 提高构筑 PU 主链软段的 PCL 在投料中的浓度, 可以获得大分子量的 CFPU。

(4) CFPU 能被炎症组织分泌的 CE 可控降解而释放出对金黄色葡萄球菌有抗菌活性的 CF, 可以既安全、又长效地抵抗内植物的感染。

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] Woo G L, Mittelman M W, Santerre J P. [J]. Biomaterials, 2000, 21: 1235-1246.
- [6] Yang M L, Santerre J P. [J]. Biomacromolecules, 2001, 2: 134-141.
- [7] Woo G L, Yang M L, Yin H Q, et al. [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 59: 35-45.
- [8] Labow R S, Meek E, Santerre J P. [J]. Biomed Mater Res, 1998, 36: 469-477.
- [9] Elizabeth M C, Sachin P, James M, et al. [J]. Biomaterials, 2006, 27: 3920-3926.
- [10] Labow R S, Erfle D J, Santerre J P. [J]. Biomaterials, 1995, 16: 51-59.

(下转第 736 页)

长条件。结果表明,采用较高的衬底温度(500℃)、适当的V/III束流比有助于提高外延层的晶体质量和电学性能。在GaSb外延层和GaAs衬底之间插入一层高质量的GaSb/AlSb超晶格可以减少穿通位错密度,提高GaSb层的光学性能。这种高质量的GaAs基GaSb外延膜为制造下一代高效热光伏电池,第3代大面阵红外探测器奠定了基础。

参考文献:

- [1] Johnson J L, Samoska L A, Gossard A C, et al. [J]. J Appl Phys, 1996, 80: 1116.
[2] Mohseni H, Wojkowski J, Razeghi M, et al. [J]. J Quantum Elec, 1999, 35: 1041.

- [3] Fuchs F, Weimer U, Pletschen W, et al. [J]. Appl Phys Lett, 1997, 71: 3251.
[4] Aifer E H, Tischler J G, Warner J H, et al. [J]. Proceedings of SPIE, 2005, 5732: 259.
[5] Wang C A, Huang R K, Shiau D A, et al. [J]. Appl Phys Lett, 2003, 83: 1286.
[6] Huang S H, Balakrishnan G, Khoshakhlagh A, et al. [J]. Appl Phys Lett, 2006, 88: 131911.
[7] Zhang Y, Baruch N, Wang W L. [J]. Appl Phys Lett, 1993, 63: 1068.
[8] Johnson G R, Cavenett B C, Kerr T M, et al. [J]. Semicond Sci Technol, 1988, 3: 1157.

GaSb films grown by MBE on GaAs(001) substrates

HAO Rui ting^{1,2}, SHEN Lan-xian¹, DENG Shu-kang¹,

YANG Pei-zhi¹, TU Jie-lei¹, LIAO Hua¹, XU Ying-qiang², NIU Zhi-chuan²

(1. Education Ministry Key Laboratory of Renewable Energy Advanced Materials and Manufacturing Technology, Institute of Solar Energy, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China;

2. State Key Laboratory for Superlattices and Microstructures, Institute of Semiconductors, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100083, China)

Abstract: GaSb thin films were grown on GaAs(001) substrates by molecular beam epitaxy (MBE). The crystalline quality, electrical properties and optical properties were studied by high resolution transition electron microscopy (HRTM), atomic force microscopy (AFM), Hall measurement and low temperature photoluminescence spectra (LTPL), respectively. It was found that the GaSb films directly grown on GaAs substrates have smooth surface and high hole mobility. It was also found that the AlSb/GaSb superlattices (SLs) can restrict the dislocations into GaSb layers. The intensity of PL spectra of GaSb layer became bigger homologous, which indicated that the optical qualities of GaSb films was improved.

Key words: GaSb; GaAs; molecular beam epitaxy

(上接第733页)

Synthesis and characterization of antimicrobial material controlled degradation

LI Chun-yan¹, CHU Duan-yan¹, SHAN Li¹, WEN Zhi-guo²,

HUANG Jian-hua², 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: Polyurethane prodrug (CFPU), was synthesized via polyurethane condensation reaction, with polycaprolactone (PCL) as soft-segment, 1,6-hexane diisocyanate (HDI) as hard-segment and an antibiotics drug, ciprofloxacin (CF). The structure of CFPU was characterized by UV, FTIR, H-NMR, the molecular weight was determined through the method of GPC, the drug-loading rate was determined by UV. The influence factors of molecular weight and drug-loading rate were studied. The antibacterial activity of prodrug degradation solution to staphylococcus aureus, degraded by cholesterol esterase (CE), was determined by agar dilution. The result suggested that polymer prodrug had been successfully synthesized by incorporating ciprofloxacin into polyurethane. The concentration of PCL has great effect on the average molecular weight of CFPU, while the feeding way of HDI has great effect on the drug-loading rate. CFPU degradation solution has shown an ability to kill Staphylococcus aureus. CFPU coated within the medical material implants, it can be controlled degraded by CE, which produced by inflammation, can reach the effect of anti-infection.

Key words: ciprofloxacin; polyurethane; polymer prodrug; controlled degradation; antimicrobial