

载药纳米纤维素气凝胶的制备及其药物可控释放

唐爱民 李 静 李德贵

(华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室, 广州 510640)

摘 要 将 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧化物自由基(TEMPO)氧化纳米纤维素(NFC)与庆大霉素(GM)进行物理共混,采用冷冻干燥法制备出孔结构可调控的载药 NFC 气凝胶。探讨了 NFC 均质次数和羧基含量对 GM/NFC 气凝胶的孔结构、溶胀性、药物缓释性能以及抗菌效果的影响。结果表明:所制备的 GM/NFC 气凝胶的孔径范围为 150~450 μm ,孔隙率均在 96%以上。体外释放实验结果表明:药物累积释放率随气凝胶平均孔径的增加而升高,在 420min 内可控制在 74.15%~90.19%之间。药物体外释药行为符合 Peppas 方程,药物释放以扩散控释型为主。同时 GM/NFC 气凝胶显示出较好的抗菌特性,对标准金黄色葡萄球菌的抑菌圈宽度范围为 13.31~16.98mm。

关键词 纳米纤维素,庆大霉素,气凝胶,可控释放,抑菌效果

Preparation and controlled release of drug loaded nanocellulose aerogel

Tang Aimin Li Jing Li Degui

(State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract Gentamicin (GM)/NFC sustained-release aerogels with tunable pore structure were prepared by freeze-drying the mixture of TEMPO oxidized NFC with GM. The influences of carboxyl content of NFC and homogenization times on the pore structure, swelling property, drug release property and antibacterial effect of GM/NFC aerogels were investigated. The obtained GM/NFC aerogels had porous network structures, with porosity above 96% and pore sizes in the range of 150~450 μm . The drug release rate of GM/NFC aerogels were improved with increasing the average pore size, and controlled between 74.15% and 90.19% in 420min. The results of in vitro release tests revealed that drug release behaviors from GM/NFC aerogels fitted with Peppas model, indicating that drug release were mainly controlled by diffusion. Simultaneously, GM/NFC aerogels showed excellent antibacterial properties, with the inhibition zone's width of standard staphylococcus aureus in the range of 13.31~16.98mm.

Key words nanocellulose, gentamicin, aerogel, controlled release, antibacterial effect

纳米纤维素(NFC)以其良好的生物降解性、生物相容性及低毒性,以及高比表面积、高强度、易改性等特点,近几年在创伤修复以及药物缓释系统等领域成为研究热点^[1]。NFC 作为药物传递载体包括薄膜^[2]、微球^[3]和凝胶^[4]等。其中,气凝胶因具有高孔隙率、高比表面积及可调控的孔结构等特性使其成为药物的优良载体,在达到较高载药量的同时还具备良好的药物缓释效果^[5]。

气凝胶作为药物缓释载体,其重点研究方向在于提升载药量、调节药物释放及提高生物利用度。Smirnova 等^[6]通过 CO₂ 超临界干燥法制备了载药

SiO₂ 气凝胶,结果发现随着气凝胶比表面积的增加,药物负载能力提高,同时随着气凝胶孔径的减小,药物释放速度减缓。在药物可进入孔道的情况下,气凝胶载体的比表面积和孔隙率对药物的负载以及释放性能有着重要影响^[7]。因此,对 NFC 气凝胶的孔结构进行调控非常重要。常见的 NFC 气凝胶孔结构的调控方法有:调控原料的形态尺寸^[8]、溶剂置换^[9]、干燥^[10]和工艺控制等^[11]。其中 Tarrés 等^[8]研究发现 NFC 尺寸对气凝胶的孔径和孔隙率有影响,同时冷冻干燥也赋予气凝胶丰富的孔结构。

对载药气凝胶来说,药物的释放行为不仅依赖

基金项目:国家自然科学基金(51875214);华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室基金(2016PY01 和 2015C09);广州市科技计划项目(201804010452)

作者简介:唐爱民(1965-),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要研究方向为纳米纤维素制备与应用、纳米复合材料。

于气凝胶的孔结构,还受气凝胶表面电荷特性的影响。Valo 等^[12-13]研究发现药物的释放受药物和纤维素基质之间结构和相互作用的影响,且主要机理是 NFC 与药物间的静电作用力。然而目前对于 NFC 气凝胶电荷特性对药物缓释的影响缺乏系统研究,同时 NFC 气凝胶孔结构控制及其对药物控制释放的影响也鲜有报道,药物缓释和抗菌效果不尽理想。因此,本研究将 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧化物自由基(TEMPO)氧化法制备的 NFC 与阳离子药物庆大霉素(GM)共混,采用冷冻干燥法制备孔结构可调控和高孔隙率的 GM/NFC 气凝胶,以期 NFC 药物缓释气凝胶的制备提供理论依据,推动 NFC 在药物缓释和创伤修复敷料中的应用。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

漂白硫酸盐蝴蝶桉木浆(α -纤维素含量 86.8%,打浆度 15°SR,水分 64.65%),红塔仁恒纸业公司;2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧化物自由基(TEMPO),Alfa Aesar 公司;庆大霉素(GM,分析纯),阿拉丁试剂有限公司;盐酸莫西沙星(MXF,分析纯),Adamas 试剂厂;NaClO(10%)、NaBr、无水乙醇、磷酸氢二钠,均为分析纯。

高压微射流均质机(Nano DeBEE 型),美国 BEE 公司;冷冻干燥机(Modulyod-230 型),美国 Thermal 公司;傅里叶红外变化光谱仪(FT-IR, Vector 33 型),德国 Bruker 公司;透射电子显微镜(TEM, H7650 型),日本 HITACHI 公司;电子扫描电镜(SEM, EVO 18 型),德国 Zeiss 公司;紫外分光光度计(S3150 型),美国 Agilent 公司。

1.2 纳米纤维素(NFC)的制备

以漂白硫酸盐蝴蝶桉木浆为原料,按文献方法^[14]制备 TEMPO 氧化的 NFC 水悬浮液,其质量分数为 1%。其中氧化体系中 NaClO 用量分别为 4mmol/g、6mmol/g、8mmol/g 和 10mmol/g,得到羧基含量分别为 1.13mmol/g、1.30mmol/g、1.48mmol/g 和 1.70mmol/g 的氧化浆,然后经过高压均质机用 D4 喷嘴均质 8 次,获得 4 组 NFC,分别记作 NFC-1.13-8、NFC-1.30-8、NFC-1.48-8 和 NFC-1.70-8;另选羧基含量为 1.70mmol/g 的氧化浆,分别均质 4 次和 6 次得到 2 组 NFC,分别记作 NFC-1.70-4 和 NFC-1.70-6。

1.3 GM/NFC 气凝胶的制备

将以上 6 组 NFC 悬浮液分别与 GM 按照 25:1

的质量比(绝干质量)充分搅拌混合 12h,混合均匀后按一定量注入到 24 孔板内,之后将其置于-20℃的冰箱内冷冻 24h,待混合液完全冷冻后放入-50℃真空冷冻干燥机内干燥 24h 得到圆柱状的气凝胶,并放入干燥器中保存。制备好的 GM/NFC 气凝胶直径为 14mm,高度为 10mm。

1.4 MXF/NFC 气凝胶的制备

为了探究载体与药物之间的静电作用对药物释放的影响,按 1.3 节所述方法制备非离子药物 MXF/NFC 气凝胶,得到的 4 种样品分别记作 MXF/NFC-1.13-8、MXF/NFC-1.30-8、MXF/NFC-1.48-8 和 MXF/NFC-1.70-8。

1.5 GM/NFC 气凝胶的表征

采用 TEM 观察 NFC 形貌;采用 FT-IR 对 GM/NFC 气凝胶材料进行测试;采用 SEM 观察 GM/NFC 气凝胶表面形貌;采用液体置换法测定 GM/NFC 气凝胶的孔隙率,将样品浸渍到已知乙醇体积(V_1 , mL)的量筒中 5min,记录样品与乙醇的总体积(V_2 , mL),然后拿出样品,记录量筒中残留乙醇体积(V_3 , mL),按式(1)计算样品孔隙率(%)。

$$\text{孔隙率} = \frac{V_1 - V_3}{V_2} \times 100\% \quad (1)$$

1.6 GM/NFC 气凝胶的溶胀率测定

用称重法测定 GM/NFC 气凝胶的平衡溶胀率,将样品放入 PBS 缓冲溶液中达到溶胀平衡点,用滤纸将气凝胶表面水分擦干后称重,按式(2)计算气凝胶材料的平衡溶胀率(ESR, %)。

$$\text{ESR} = \frac{w_i - w_d}{w_d} \times 100\% \quad (2)$$

式中, W_i 为达到溶胀平衡点的 GM/NFC 气凝胶质量,g; W_d 为经冷冻干燥后 GM/NFC 气凝胶的绝干质量,g。

1.7 缓释气凝胶的体外药物释放测试

将冷冻干燥后的气凝胶样品放到盛有 15mL PBS 溶液的锥形瓶中,然后置于恒温水浴振荡器中振荡,条件为 $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, 50r/min。每隔一段时间取出 2mL 溶液,并补充同体积 PBS 缓冲溶液,整个取样时间持续 24h。利用紫外分光光度计测定样品在 289nm 处的吸光度值,按式(3)计算累积释放率(%)。

$$\text{累积释放率} = \frac{2 \sum C_{i-1} + 15C_i}{m} \times 100\% \quad (3)$$

式中, C_i 为第 i 次取样时 GM 的释放浓度, $\mu\text{g/mL}$; m 为总的载药量,g。

1.8 缓释气凝胶的抗菌性能

采用琼脂平皿扩散国家标准法研究气凝胶样品对标准金黄色葡萄球菌的抗菌性能,将样品置于涂有菌液的培养基上,在 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 24h 后,测量样品抑菌圈的宽度。

2 结果与讨论

2.1 TEM 分析

图 1 为 6 种 NFC 样品的 TEM 图,用 Nano Measurer 软件对 6 种样品的长度和直径进行测量。由图可知,NFC-1.13-8、NFC-1.30-8、NFC-1.48-8 和 NFC-1.70-8 的纤维直径变化不大,主要分布在 3~8nm 之间;但其长度却有明显下降,由 500nm 减至 100nm 左右。而 NFC-1.70-8 与 NFC-1.70-4 和 NFC-1.70-6 相比,随高压均质次数从 4 次增至 8 次,NFC 纤维直径由 14~20nm 减少至 3~8nm。以上结果表明,通过对 NFC 制备过程中氧化程度和均质次数的控制,可得到长度和直径在一定范围内可调控的 NFC。

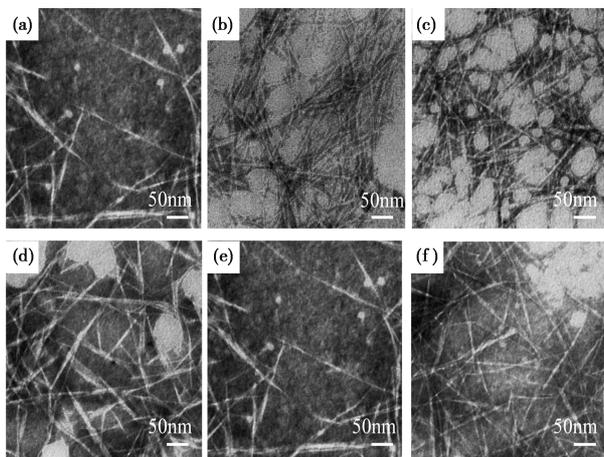


图 1 6 种 NFC 样品的 TEM 图

[(a)NFC-1.13-8;(b)NFC-1.30-8;(c)NFC-1.48-8;

(d)NFC-1.70-4;(e)NFC-1.70-6;(f)NFC-1.70-8]

2.2 FT-IR 分析

图 2 为纯 NFC 气凝胶和 GM/NFC 气凝胶(NFC-1.70-8 所制)的 FT-IR 谱图。由图可知,1070 cm^{-1} 、1538 cm^{-1} 和 1631 cm^{-1} 分别为 GM 中醚、—NH、—NH₂ 的弯曲振动峰,3429 cm^{-1} 则为 N—H 的伸缩振动峰^[15]。GM/NFC 气凝胶(NFC-1.70-8 所制)在 1536 cm^{-1} 和 1070 cm^{-1} 处出现 GM 的—NH 和醚峰的弯曲振动峰,说明 GM 药物成功负载于 NFC 载体中。GM/NFC 气凝胶 FT-IR 谱图中并未出现新的特征峰,表明 NFC 与 GM 之间

没有产生新的化学键。但与纯 NFC 相比,GM/NFC 中属于 NFC 的—COO—非对称振动峰由 1610 cm^{-1} 蓝移至 1620 cm^{-1} ,且峰型变得尖锐。这可能是由于阳离子 GM 与 NFC 中羧基之间存在静电相互作用所致。

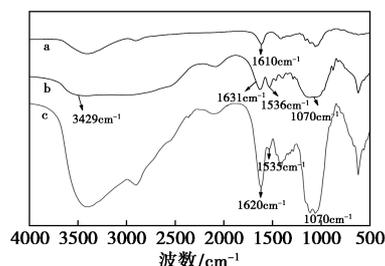


图 2 纯 NFC 气凝胶(a)、GM(b)和 GM/NFC 气凝胶(NFC-1.70-8 所制,c)的 FT-IR 谱图

2.3 孔结构表征

图 3 为 6 种 GM/NFC 气凝胶的 SEM 图。由图可知,六者均具有三维网络结构,孔隙分布较均匀,孔间贯通性良好。进一步采用 Nano Measure 软件和液体置换法,测定 GM/NFC 气凝胶的平均孔径大小和孔隙率,结果见表 1。由表可知,6 种气凝胶的孔隙率均在 96% 以上,孔径范围则为 150~450 μm ;此外,随着 NFC 中羧基含量的增加,NFC 纤维间的氢键作用增强^[16],使得相应 GM/NFC 气凝胶的平均孔径减小。NFC 的宽度随均质次数增加而变小,但其比表面积增大,因而形成的气凝胶的孔径减小,孔隙分布变密。可见,改变 NFC 的制备条件可得到不同形貌尺寸的 NFC,使得制备的 GM/NFC 气凝胶的孔径大小在一定范围可调控,这将对 GM 的负载和缓释起到非常重要的调节作用。

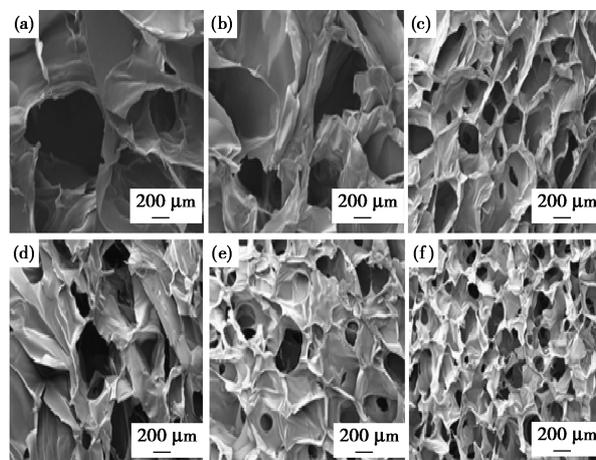


图 3 6 种 GM/NFC 气凝胶的 SEM 图

[(a)NFC-1.13-8;(b)NFC-1.30-8;(c)NFC-1.48-8;

(d)NFC-1.70-4;(e)NFC-1.70-6;(f)NFC-1.70-8]

表 1 6 种 GM/NFC 气凝胶的孔结构参数

样品	NFC 羧基含量/ (mmol·g ⁻¹)	NFC 均质 次数/次	平均孔径 /μm	孔隙率/ %
NFC-1.13-8	1.13	8	450	97.96
NFC-1.30-8	1.30	8	350	97.74
NFC-1.48-8	1.48	8	300	97.70
NFC-1.70-4	1.70	4	420	98.39
NFC-1.70-6	1.70	6	270	97.85
NFC-1.70-8	1.70	8	150	96.87

2.4 平衡溶胀率分析

GM/NFC 气凝胶在 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中的平衡溶胀曲线见图 4。由图可知,随 NFC 羧基含量和均质次数的增加,NFC 气凝胶和 GM/NFC 气凝胶的平衡溶胀率均呈上升趋势。这是由于 NFC 氧化程度的增加会产生更多的亲水基团羧基,而均质次数的增加会使得纤维表面暴露出较多的极性羟基,因此气凝胶保水值提高。但与纯 NFC 气凝胶相比,由于 GM 药物粒子的加入会破坏 NFC 纤维间的氢键和网络结构,在相同条件下制备的 GM/NFC 气凝胶的平衡溶胀率都有所下降。

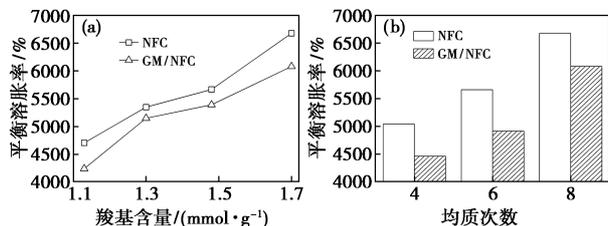


图 4 羧基含量(a)和均质次数(b)对 NFC 气凝胶和 GM/NFC 气凝胶平衡溶胀率的影响

2.5 药物释放性能分析

羧基含量、均质次数和 pH 对 GM/NFC 气凝胶药物释放性能的影响见图 5(a)–(c)。由图可知,所有样品在释放初期都有一定的药物突释现象,随着时间的延长,药物释放曲线变缓直至平衡。GM/NFC 气凝胶的药物累积释放率随 NFC 羧基含量和均质次数的增加而降低,这一差异主要是由于气凝胶内部孔隙结构不同所致(见图 1),GM/NFC 气凝胶平均孔径的减小使得药物溶出相对困难,而当平均孔径增大时药物累积释放率则增大,在本实验范围内,药物累积释放率在 420min 内可控制在 74.15%~90.19%之间。GM/NFC 气凝胶的药物释放速率随着 PBS 缓冲溶液 pH 的下降而发生加速。这是因为在低 pH 环境下,GM/NFC 气凝胶中

NFC 内部作用力减弱,导致药物溶出速率加快。采用不同动力学模型对 GM/NFC 气凝胶在 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中 GM 的释放曲线进行拟合,结果见表 2。由表可知,药物的释放行为符合 Peppas 模型,其指数 $n < 0.45$ 对应于菲克扩散释放^[17]。可见,GM/NFC 气凝胶释放机理为菲克扩散,属于扩散控释型,表明药物主要依靠气凝胶的微孔向外进行扩散,因此对气凝胶孔结构的调控十分关键。

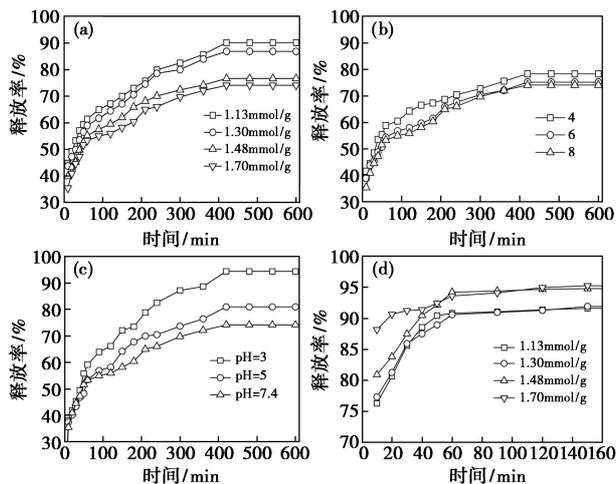


图 5 羧基含量(a)、均质次数(b)和 pH(c)对 GM/NFC 气凝胶药物释放性能的影响及羧基含量(d)对 MXF/NFC 气凝胶药物释放性能的影响

羧基含量对 MXF/NFC 气凝胶药物释放性能的影响见图 5(d)。由图可知,与 GM/NFC 气凝胶相比,MXF/NFC 气凝胶中药物突释量高且释放速度较快,表明药物和载体之间的相互作用力较大程度影响着药物的释放行为。MXF 与 NFC 之间仅依靠微弱的氢键和范德华力进行吸附,使得药物易向溶液中扩散,而 GM 与 NFC 之间由于静电作用力,能减缓药物释放速率,以达到长效给药的作用。

表 2 GM/NFC 气凝胶药物释放曲线拟合公式

模型	方程	相关系数
零级动力学方程	$M=0.0006t+0.4676$	$R^2=0.8291$
一级动力学方程	$\ln(1-M)=-0.0015t-0.6170$	$R^2=0.8995$
Higuchi 方程	$M=0.0177t^{1/2}+0.3624$	$R^2=0.9432$
Peppas 方程	$M=0.2406t^{0.1825}$	$R^2=0.9846$

2.6 抗菌性能研究

将 GM/NFC 气凝胶和 MXF/NFC 气凝胶对标准金黄色葡萄球菌的抑菌效果进行比较,结果见图 6。由图 6(a)–(f)可知,纯 NFC 气凝胶周围未形成抑菌圈,而 GM/NFC 气凝胶周围出现了明显的抑

菌圈,抑菌圈宽度在 13.31~16.98mm 之间,说明载药 NFC 气凝胶中是药物粒子起到抑菌作用。还可以发现,GM/NFC 气凝胶形成的抑菌圈宽度随 NFC 羧基含量和均质次数的增加而增大,最大值为 16.98mm。结合图 5(a)~(b)分析,推测其可能是由于气凝胶中 GM 释放速度减缓,延长了 GM 与细菌的作用时间所致。GM 对细菌产生抗菌性可能有两种原因,一是由于 GM 与细菌短暂接触,引起细菌非致死性损伤所致;二是 GM 与细菌靶位结合持续性作用导致细菌再生长时间延长^[18],由此推测 GM/NFC 气凝胶的抗菌机理属于后者。

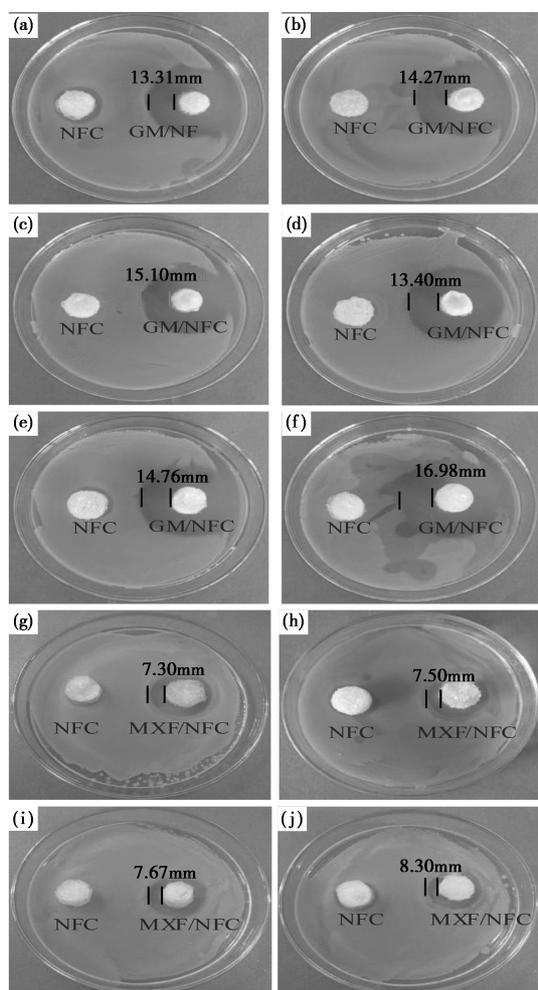


图 6 纯 NFC 气凝胶、GM/NFC 气凝胶(a—f)及 MXF/NFC 气凝胶(g—j)的抗菌效果示意图
 [(a)NFC-1. 13-8;(b)NFC-1. 30-8;(c)NFC-1. 48-8;
 (d)NFC-1. 70-4;(e)NFC-1. 70-6;(f)NFC-1. 70-8;
 (g)MXF/NFC-1. 13-8;(h)MXF/NFC-1. 30-8;
 (i)MXF/NFC-1. 48-8;(j)MXF/NFC-1. 70-8]

由图 6(g)~(j)可知, MXF/NFC 气凝胶的抑菌圈宽度在 6.32~8.30mm 之间,抑菌效果明显弱于 GM/NFC 气凝胶。原因在于 MXF/NFC 气凝胶

仅能释放 1h,而 GM/NFC 气凝胶由于其静电引力作用能够实现较长时间的持续释放,在培养 24h 之后显示出较强的抗菌效果。

3 结论

(1)将阳离子药物 GM 和 NFC 共混,采用冷冻干燥法制备了高孔隙结构的 GM/NFC 气凝胶。FT-IR 分析证实 NFC 与 GM 存在静电相互作用。SEM 图显示 GM/NFC 气凝胶具有三维孔状结构,孔隙率均在 96% 以上,且通过改变 NFC 的制备条件可使 GM/NFC 气凝胶的孔径大小在一定范围可调控。

(2)体外释放实验结果表明,药物释放率受气凝胶的内部结构和环境 pH 的影响,随着气凝胶平均孔径的增大以及环境 pH 的降低,药物释放率升高。GM/NFC 气凝胶的释放行为符合 Peppas 模型,其释放机理主要为菲克扩散。

(3)与 MXF/NFC 气凝胶相比,GM/NFC 气凝胶由于阳离子药物 GM 与 NFC 的静电作用,显示出更好的药物缓释和抗菌性能。

参考文献

- [1] Jorfi M, Foster E J. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2015, 132(14): 1-19.
- [2] 唐爱民, 闫长媛, 李德贵, 莫西沙星/纳米纤维素缓释膜的制备及其释药性能研究[J]. *生物质化学工程*, 2018, 52(1): 1-9.
- [3] Zhang F, Wu W, Zhang X, et al. Temperature-sensitive poly-NIPAm modified cellulose nanofibril cryogel microspheres for controlled drug release[J]. *Cellulose*, 2016, 23(1): 415-425.
- [4] Liu Y, Sui Y, Liu C, et al. A physically crosslinked polydopamine/nanocellulose hydrogel as potential versatile vehicles for drug delivery and wound healing[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 188: 27-36.
- [5] Bhandari J, Mishra H, Mishra P K, et al. Cellulose nanofiber aerogel as a promising biomaterial for customized oral drug delivery[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12: 2021-2031.
- [6] Smirnova I, Suttiruengwong S, Arlt W. Aerogels: tailor-made carriers for immediate and prolonged drug release[J]. *Powder and particle (KONA)*, 2005(23): 86-97.
- [7] Valletregi M, Balas F, Arcos D. Mesoporous materials for drug delivery[J]. *Angewandte Chemie*, 2007, 46(40): 7548-58.
- [8] Tarrés Q, Oliver-Ortega H, Llop M, et al. Effective and simple methodology to produce nanocellulose-based aerogels for selective oil removal[J]. *Cellulose*, 2016, 23(5): 1-12.

(下转第 202 页)