

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2024.03.008

明胶/羟丙基- β -环糊精/甘油-水复合凝胶的合成及其载药抗菌性能

姜海洋¹ 李响² 杨宇¹ 任晓文¹ 周徐瑞溪¹ 鲁睿彤³ 刘金晖¹ 代欣宏¹ 牟高敏³ 李兆楼⁴(¹ 济宁医学院第二临床医学院, 济宁 272067; ² 山东理工职业学院能源与材料工程学院, 济宁 272067;³ 济宁医学院中西医结合学院, ⁴ 济宁医学院基础医学院, 济宁 272067)

摘要 **目的** 合成明胶/羟丙基- β -环糊精/甘油-水复合凝胶, 探讨羟丙基- β -环糊精对该凝胶体系的影响及凝胶载药应用。**方法** 采用溶胶-凝胶法制备凝胶, 并使用多种物理方法如扫描电子显微镜 (SEM)、差示扫描量热法 (DSC)、傅里叶红外光谱 (IR)、X 射线衍射 (XRD)、流变学等方法对复合凝胶进行表征; 以牛津杯法验证该凝胶递送左氧氟沙星的抗菌效果。**结果** 羟丙基- β -环糊精以氢键结合明胶, 促进明胶分子螺旋微结构聚集, 增强了复合凝胶的稳定性, 流变测试可知该复合凝胶应力屈服值增大了 1000 Pa。复合凝胶装载抗菌药物左氧氟沙星后作用于金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏菌, 抑菌效能可分别达到对照标准的 90.27% 和 80.02%。**结论** 新型复合凝胶合成方法简便、易行, 体系中的羟丙基- β -环糊精和甘油都可改善复合凝胶的微结构、性质和性能, 该复合凝胶的左氧氟沙星制剂表现出极好的抑菌效果。

关键词 明胶; 羟丙基- β -环糊精; 甘油; 复合凝胶; 抗菌效果

中图分类号: O656.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2024)06-206-05

Synthesis of gelatin/hydroxypropyl β -cyclodextrin/glycerol water composite gel and its bacteriostatic performance as drug delivery system

JIANG Haiyang¹, LI Xiang², YANG Yu¹, REN Xiaowen¹, ZHOU Xuruixi¹,LU Ruitong³, LIU Jinhui¹, DAI Xinhong¹, MU Gaomin³, LI Zhaolou⁴

(¹The Second Clinical Medical College, Jining Medical University, Jining 272067, China; ²School of Energy and Materials Engineering, Shandong Polytechnic College, Jining 272067, China; ³College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, ⁴College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective A gelatin (GA) gel modified by hydroxypropyl β -cyclodextrin (HPCD) will be synthesized, and its micro-structure, physical properties, antibacterial effect of loaded-drug levofloxacin (LVFX) will also be investigated. **Methods** The composite gel was synthesized by sol-gel method, and its structure and properties were studied by OM, SEM, FTIR, XRD and rheology. The antibacterial effect of the composite gel loaded with levofloxacin was tested by Oxford cup method. **Results** The GA spiral molecules could be collected by H-bond force of HPCD, which enhanced the stability of the composite gel network and increased the stress yield value of 1000 pa. The antibacterial efficacy of the loaded-drug gel with LVFX could reach about 90.27% and 80.02% to the positive antibacterial control on Staphylococcus aureus and Escherichia coli, respectively. **Conclusion** The composite gel can be acquired in a direct and easy method. The microstructure and properties of GA/HPCD gel were optimized by H-bonding interactions between GA and HPCD or glycerol molecules. The composite gel deserves to be widely applied as drug delivery system.

Keywords: Gelatin; Hydroxypropyl β -cyclodextrin; Glycerol; Composite gel; Antibacterial effect

明胶 (gelatin, GA) 是由胶原蛋白水解所得的一种单链左手螺旋结构的天然多肽分子,其分子链富含甘氨酸 (Gly, 33%)、脯氨酸 (Pro, 12%)、丙氨酸 (Ala, 11%) 和羟基脯氨酸 (HyPro, 11%) 等,分子链上存在某些独特的氨基酸序列: Gly-Pro-HyPro^[1]。因此,GA 分子拥有大量的氨基、羰基、羟基和羧基使得分子链的内部或分子链之间容易发生氢键作用,分子链也容易与水分子形成氢键,GA 吸水可达到自身质量的 10 倍^[2]。GA 具有优良的生物相容性、无毒性 and 生物可降解性等特点,因此,GA 的凝胶体系可以作为药物运送载体,用来装载药物分子进行药物的传递和控制释放^[3-4]。但是,结晶性 GA 原料本身韧性差,易于断裂^[5]。为改善 GA 在凝胶体系中的结构、力学性能、稳定性等性能,大多通过物理、酶或化学交联的方法来开发新型的 GA 复合凝胶体系^[6-8]。本文利用甘油-水混合溶剂,并且在 GA 凝胶体系中引进羟丙基-β-环糊精 (hydroxypropyl β-cyclodextrin, HPCD) 分子^[9]利用物理交联开发新的复合凝胶体系,利用 HPCD 大环分子空腔的主客体作用包含抗菌药物左氧氟沙星 (levofloxacin, LVFX) 分子,更好地实现药物的控制释放,并通过抑菌试验验证其载药抗菌效能。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

羟丙基-β-环糊精 (上海源叶生物科技有限公司); 明胶 (天津市天大化工实验厂); Mueller-Hinton 琼脂 (杭州微生物试剂有限公司), 大肠杆菌 (ATCC25922) 和金黄色葡萄球菌 (ATCC25923) 由济宁医学院病原生物学实验室提供。乳酸左氧氟沙星 (北京亚赛尔科技有限公司), 其它试剂均为分析纯。

Zeiss ultra plus FESEM (德国) 扫描电子显微镜; PE/Frontier 铂金埃尔默 (英国) 傅里叶红外光谱仪; Mettler-Toledo TGA/DSC1 同步热分析仪; RheoStress 6000 rheometer 流变仪; German Bruker/D8ADVANCE X 射线衍射仪。

1.2 复合凝胶的制备

首先,量取甘油和去离子水各 4.0ml 放入试管中,混匀并加热至 60℃ 后,冷却至室温。然后称取明胶粉 1.50g,加入上述甘油-水混合溶剂的试管中,浸泡 1h;再称取羟丙基-β-环糊精 0.6222g 加入

上述试管中,边搅拌边加热,保持 70℃ 持续加热 1h,冷却后得到明胶/羟丙基-β-环糊精/甘油-水凝胶。按上述程序操作,不加羟丙基-β-环糊精,可得明胶/甘油-水凝胶样品,用作对比试验。将上述所得凝胶,置于真空干燥箱内保持 40℃ 温度,减压干燥 7d,得干凝胶样品。

1.3 复合凝胶的表征

使用电子扫描显微镜观察干凝胶样品的结构与形貌,先将干凝胶进行喷金,对典型结构形貌拍照得到 SEM 图。采用流变仪进行动态应变扫描,25℃ 时在线性黏弹性范围内对凝胶样品扫频分析,平行测定 3 次结果求平均值。使用红外光谱仪测定,采用 KBr 压片法得干凝胶样品红外光谱图。使用 X 射线衍射仪,将干凝胶置于样品池扫描并记录 XRD 谱图。

1.4 载药凝胶的制备

首先配制一定浓度左氧氟沙星的水溶液 (1:1, v/v), 稀释成 32μg/ml 溶液。然后取上述溶液 4.0ml,加入 0.6222g 羟丙基-β-环糊精,溶解后放置暗处 24h,形成包合液。而后,将甘油 4.0ml 加入包合液中形成混合溶剂,再称取明胶粉 1.50g,在搅拌下加入上述混合溶剂中,浸泡 1h 后,于 70℃ 下恒温搅拌 1h,冷却到室温,得到载药凝胶 (含抗菌药 16μg/mL)。

1.5 载药凝胶的抑菌测试

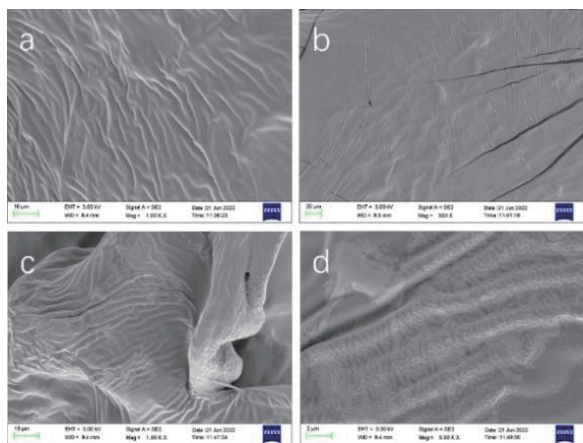
测试菌株分别为金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏菌,采用牛津杯法测试 1.4 中所得载药凝胶的抑菌效果。分别将 100μL 药物凝胶、100μL 空白对照凝胶和 100μL 浓度 16μg/mL 的左氧氟沙星甘油-水溶液 (阳性对照) 注入含有 10⁵CFU/ml 测试菌株的有盖培养皿,在 37℃ 下培育 48h。测量培养皿中各 (凝胶) 样品斑点区的抑菌圈直径,3 次平行测定求平均值,利用 SPSS 19.0 统计软件,方差分析采用 Duncan 法, $P < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 凝胶的微观形貌

电子扫描显微镜 (SEM) 观察到,GA/甘油-水凝胶的干样品表面具有一些条带状皱褶 (图 1a 和 b),我们推测这可能是其内部纤维状 GA 分子的螺旋结构造成^[1,7],由于裂的缝隙 (图 1b) 更容易令人想象到许多螺旋结构的纤维状纹理。当加入 HPCD 后,所得 GA/HPCD/甘油-水凝胶干样品表

面的条带状皱褶变长、变粗(图 1c 和 d),可能是 HPCD 分子代替了部分水分子,而且 HPCD 的羟基基团(-OH)也可能参与了 GA 分子的螺旋结构之间的结合,使 GA 分子的螺旋结构聚集得更加紧凑、更加稳定。同样,在该凝胶体系中使用了甘油-水(1:1, v/v)的混合溶剂,目的也是利用甘油取代部分水而甘油分子以氢键作用促进 GA 分子螺旋结构之间的结合。通过试验表明,合成 GA 的纯水凝胶,GA 的最低临界浓度为 4.0wt%,而加入甘油后甘油-水混合溶剂下 GA 的最低临界浓度可降低至 1.0wt%,这说明甘油分子也大大促进了 GA 分子螺旋结构之间的结合,使凝胶更易于形成,更加稳定。



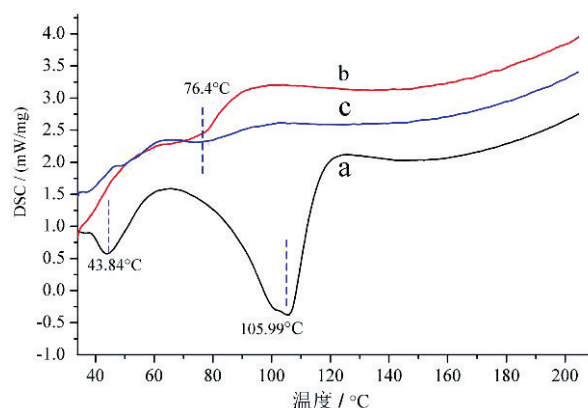
注:a 和 b 为 GA/甘油-水凝胶;c 和 d 为 GA/HPCD/甘油-水凝胶。

图 1 复合凝胶的电子扫描电镜 SEM 图

2.2 凝胶的热行为

使用差示扫描量热法(DSC)可以评估物质形态或结构的转化。图 2 给出了 GA 的纯水溶剂凝胶(图 2a)、GA/甘油-水凝胶(图 2b)和 GA/HPCD/甘油-水凝胶(图 2c)的 DSC 曲线。首先观察 GA 的纯水溶剂凝胶的 DSC 曲线(图 2a),43.84℃吸热峰是 GA 分子螺旋结构转变为线团结构的吸热峰^[7]。因大量水分子可与 GA 分子链上的亲水基团充分形成氢键,使得相邻 GA 分子链之间的氢键作用较弱。如果将甘油加入替代部分水分子,如图 2b 和 c,甘油则以强的氢键作用^[10]从 GA 分子链间吸附并夺出水分,使 GA 分子间纠缠和氢键作用增强,因而甘油-水混合溶剂下 GA 分子螺旋结构变化造成吸收峰升到了 76.4℃处的温度。若无任何溶剂影响,结晶性 GA 分子螺旋结构变化吸收峰

会出现在 81.9℃^[4]处温度。我们还观察到,纯水溶剂下 GA 凝胶的水分蒸发吸热峰出现在 105.99℃(图 2a),可是加入甘油后该吸热峰则变得几乎消失了(图 2b 和 c)。这是因为部分水已被甘油分子替代,同时甘油强吸水作用又紧紧结合着剩余的水的缘故,剩余的水分不易蒸发。最后值得关注,如图 2c,在 GA 凝胶中添加 HPCD 之后,GA 分子螺旋结构转变吸热峰 76.4℃还变得更加宽泛了(与图 2b 对比)。这说明加入的 HPCD 分子在复合凝胶体系中分布是均匀的,且能够较好地稳固住 GA 分子的螺旋结构,构建了广泛的 GA/HPCD/甘油-水体系的凝胶网络。



注:a 为 GA 水凝胶;b 为 GA/甘油-水凝胶;c 为 GA/HPCD/甘油-水凝胶。

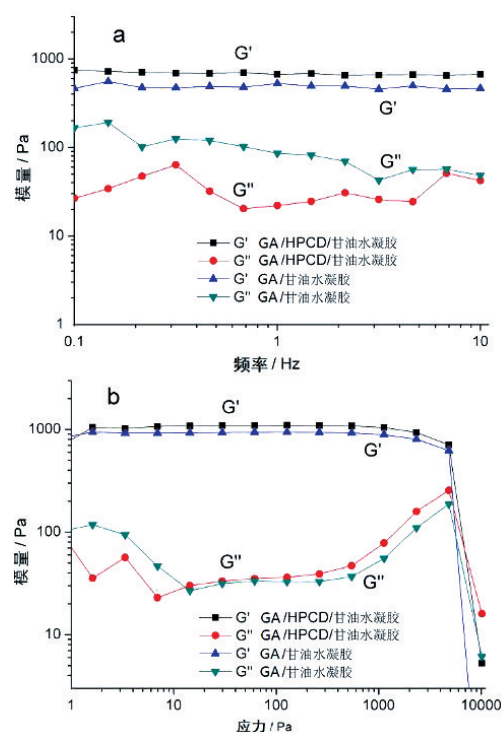
图 2 复合凝胶的差示扫描量热曲线

2.3 凝胶的流变学性质

对凝胶样品的流变测试进行了频率扫描和振幅扫描。如图 3a 所示,在 1Pa 外加应力下频率扫描测试,发现 GA/甘油-水凝胶和 GA/HPCD/甘油-水凝胶的弹性模量 G' 和黏性模量 G'' 值随频率增大而基本上不变,而且都保持 $G' > G''$ (图 3a)。这说明,加入 HPCD 前后体系都具有正常的凝胶特性^[8,11]。在频率 1Hz 下以指数形式施加应力,对上述两个凝胶体系进行振幅扫描测试(图 3b),对比发现,加入 HPCD 后的复合凝胶结构的应力屈服值增大了约 1000Pa。这说明加入 HPCD 促进了 GA 分子之间的结合,使得 GA/HPCD/甘油-水凝胶的黏弹性网络变得更加稳定、强劲,这与电子扫描显微镜(SEM)观察结果一致(图 1c 和 d)。

2.4 红外光谱分析

图 4 为 GA/HPCD/甘油-水凝胶干样品及其原料 GA 和 HPCD 的红外光谱图。如图 4a 所示,

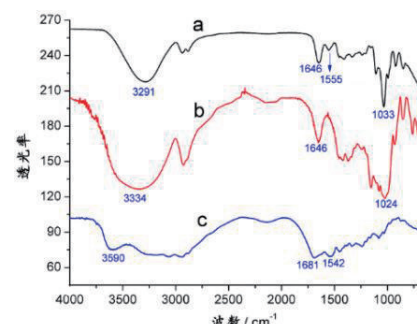


注:a 为频率扫描图; b 为振幅扫描图。

图 3 复合凝胶的动态流变图

GA/HPCD/甘油-水凝胶在 3291cm^{-1} 处的吸收带归属为 GA 分子 N-H 键振动吸收峰,与原料中 GA 分子 N-H 键振动 3590cm^{-1} 处吸收带(图 4c)对比,其 N-H 键振动频率降低了,原因可能是形成复合凝胶后受 HPCD 分子 3334cm^{-1} 处吸收带 O-H 键(图 4b)氢键作用^[11]。同时,凝胶样品中 GA 分子 N-H 键 3291cm^{-1} 处吸收带也不如 GA 原料 N-H 键吸收带那么宽,说明形成凝胶后 GA 分子链内 N-H 键振动彼此干扰减弱了, N-H 键有更多机会与 HPCD 分子 O-H 键形成了氢键。再者,如图 4a,凝胶样品的 1646cm^{-1} 吸收峰为酰胺 I 带的 C=O 键伸缩振动^[8],对比原料 GA 分子酰胺 I 带 C=O 键 1681cm^{-1} 吸收峰(图 4c)其波数也降低了,这说明 GA 分子中 C=O 键也参与了与 HPCD 分子间的氢键作用,或 GA 分子链之间的氢键作用;但是,凝胶样品中 GA 分子 1555cm^{-1} 为酰胺 II 带的 N-H 键面内弯曲振动吸收^[8](图 4a),其波数比 GA 原料酰胺 II 带的 1542cm^{-1} 增强了,这说明从原料形成凝胶时肽链中一部分 N-H 键从原料的分子内氢键中解放了出来。最后,如图 4a 所示,凝胶样品给出的吸收峰 1033cm^{-1} 归属为 HPCD 分子 C-OH 键振动吸收,而原料 HPCD 分子 C-OH 键振动吸收为

1024cm^{-1} (图 4b),这进一步说明了原料 HPCD 分子也打开了其分子内氢键,而参与了与 GA 分子共同构筑复合凝胶的过程。

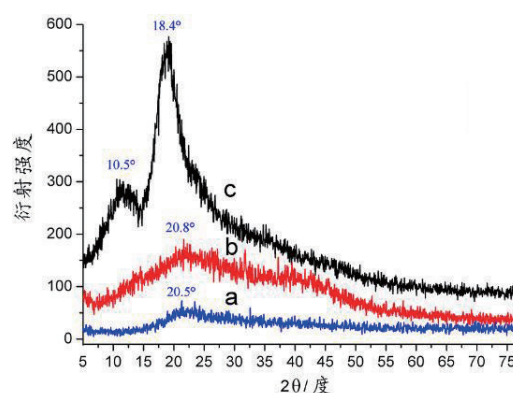


注:a 为 GA/HPCD/甘油-水凝胶的干凝胶;b 为 HPCD 原料;c 为 GA 原料。

图 4 复合凝胶及其原料的红外光谱

2.5 X 射线粉末衍射(XRD)谱图分析

图 5 为 GA/HPCD/甘油-水凝胶干样品及其原料 GA 和 HPCD 的 XRD 图谱。GA/HPCD/甘油-水凝胶干样品在 2θ 值为 20.5° 处呈现一个较宽泛的峰(图 5a),这说明凝胶样品的 GA 分子只存在单螺旋结构^[8],且呈无定形结构。对比其原料 GA 图谱(图 5b),也只有 20.8° 处一个较宽泛的峰,表明原料也只存在单螺旋结构的无定形结构,而并不存在三螺旋结构的胶原蛋白,因为并未发现在 2θ 值 7.2° 峰^[1,8],制备复合凝胶的过程中也没有三螺旋结构的恢复。而原料 HPCD 在 10.5° 和 18.4° 处出现稍强的衍射峰(图 5c),表明 HPCD 原料具有一定的晶体或半晶体性质。但形成凝胶后,HPCD 失去了晶体性质,以分散的分子状态与 GA 分子相互作用纠缠在一起,生成无定形结构的凝胶(图 5a)。



注:a 为 GA/HPCD/甘油-水凝胶的干凝胶;b 为 GA 原料;c 为 HPCD 原料。

图 5 复合凝胶及其原料的 XRD 图谱

2.6 载药凝胶的抗菌测试效果

采用抑菌圈法可判定凝胶载药 LVFX 的抑菌效果^[2]。对于金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏菌,其载药凝胶周围均出现清晰的抑菌圈,而空白凝胶周围均具有密集的细菌菌落。将抑菌圈相对大小(%)进行定量计算,对金黄色葡萄球菌的抑菌测试,GA/HPCD/甘油-水体系的载药凝胶斑点周围呈现的抑菌圈直径,相对于阳性对照达到了 90.27%;对大肠埃希氏菌的抑菌测试,GA/HPCD/甘油-水体系的载药凝胶斑点周围的抑菌圈直径,相对达到了 80.02%。这表明凝胶本身无抑菌作用,而装载 LVFX 的凝胶对细菌给予了显著的生长抑制作用。因此,新型 GA/HPCD/甘油-水体系的复合凝胶,值得在抗菌药物制剂的工业生产中推广应用。

3 结论

GA 原料本身韧性差,易于断裂。GA 水凝胶经过甘油-水混合溶剂的改良,其凝胶结构、稳定性、力学性能都明显改善。特别探讨了利用 HPCD 对 GA 的甘油-水混合体系的凝胶的修饰作用。试验表明,加入 HPCD 很好地促进了 GA 分子螺旋结构间的结合,使得 GA/HPCD/甘油-水凝胶的黏弹性网络变得更加稳定、强劲,所得新型 GA/HPCD/甘油-水混合体系凝胶的微结构和性能得以改善,尤其成功利用了 HPCD 包合作用对抗菌的 LVFX 药物分子进一步控制,实现了药物活性成分的装载和控释,其抑菌效果较为明显,这些结果对制药工业开发新型药物凝胶制剂,具有应用推广价值。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review [J]. Food Hydrocolloid, 2011, 25: 1813-1827. DOI: 10. 1016/j. foodhyd. 2011. 02. 007.
- [2] Gheysoori P, Paydayesh A, Jafari M, et al. Thermoresponsive nanocomposite hydrogels based on Gelatin/poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) for controlled drug delivery [J]. Eur Poly J, 2023, 186: 111846. DOI: 10. 1016/j. eurpolymj. 2023. 111846.
- [3] Nazeri MT, Javanbakht S, Shaabani A, et al. 5-aminopyrazole-conjugated gelatin hydrogel: a controlled 5-fluorouracil delivery system for rectal administration [J]. J Drug Deliv Sci Tec, 2020, 57: 101669. DOI: 10. 1016/j. jddst. 2020. 101669.
- [4] Cassano R, Curcio F, Mandracchia D, et al. Gelatin and glycerine-based bioadhesive vaginal hydrogel [J]. Curr Drug Deliv, 2020, 17, 303-311. DOI: 10. 2174/1567201817666200129130031.
- [5] Mohanto S, Narayana S, Merai KP, et al. Advancements in gelatin-based hydrogel systems for biomedical applications: a state-of-the-art review [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 253 (Pt 5): 127143. DOI: 10. 1016/j. ijbiomac. 2023. 127143.
- [6] Zeinali Kalkhoran AH, Naghib SM, Vahidi O, et al. Synthesis and characterization of graphene-grafted gelatin nanocomposite hydrogels as emerging drug delivery systems [J]. Biomed Phys Eng Express, 2018, 4: 055017. DOI: 10. 1088/2057-1976/aad745.
- [7] Bigi A, Panzavolta S, Rubini K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films [J]. Biomaterials, 2004, 25 (25): 5675-5680. DOI: 10. 1016/j. biomaterials. 2004. 01. 033.
- [8] Piao Y, Chen B. One-pot synthesis and characterization of reduced graphene oxide-gelatin nanocomposite hydrogels [J]. RSC Adv, 2016, 6: 6171-6181. DOI: 10. 1039/C5RA20674J.
- [9] Zhang J, Ma PX. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65 (9): 1215-1233. DOI: 10. 1016/j. addr. 2013. 05. 001.
- [10] Dashnau JL, Nucci NV, Sharp KA, et al. Hydrogen bonding and the cryoprotective properties of glycerol/water mixtures [J]. J Phys Chem B, 2006, 110 (27): 13670-13677. DOI: 10. 1021/jp0618680.
- [11] Wang Y, Yuan C, Liu Y, et al. The influence of a hydroxypropyl-beta-cyclodextrin composite on the gelation of kappa-carrageenan [J]. Food Hydrocolloid, 2019, 90: 276-284. DOI: 10. 1016/j. foodhyd. 2018. 12. 037.

(收稿日期 2023-12-11)

(本文编辑:石俊强)