

Ag/AgO/羧甲基壳聚糖抗菌水凝胶制备 及其释药性能研究

官淑敏 曹 渊* 徐彦芹 王 烨

(重庆大学化学化工学院,重庆 401331)

摘 要 通过银(Ag)/氧化银(AgO)原位沉淀法制备具有 pH 敏感性的 Ag/AgO/羧甲基壳聚糖(CMCS)抗菌水凝胶(Ag/AgO/CMCS)以及载药阿司匹林(ASA)的 Ag/AgO/CMCS/ASA 载药水凝胶,并对水凝胶的溶胀性能、降解性能、释药性能及抗菌性能的影响进行了研究。制得的 Ag/AgO/CMCS/ASA 载药凝胶的网络主要通过氢键和分子间作用力交联,交联点 Ag 主要以单质 Ag 和 Ag^{2+} 态存在。在缓冲溶液 $\text{pH}=7.4$ 条件下,制得的 Ag/AgO/CMCS/ASA 载药凝胶在 12h 内的累计释药量为 75.20%,对革兰氏阴性大肠杆菌(*E.coli*)的抑制率最大达到 92.32%,在医疗领域具有广阔的应用前景。

关键词 银,氧化银,羧甲基壳聚糖,pH 敏感性水凝胶,抗菌

Preparation and antibacterial property of Ag/AgO/CMCS hydrogel

Guan Shumin Cao Yuan Xu Yanqin Wang Ye

(Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 401331)

Abstract PH sensitive Ag/AgO/carboxymethyl chitosan (CMCS) bacteriostatic hydrogels (Ag/AgO/CMCS) and Ag/AgO/CMCS/ASA carrier potion gels were prepared by Ag/AgO in situ precipitation method, and the effects of swelling, degradation, drug release and antibacterial properties of hydrogels were studied. The network of Ag/AgO/CMCS/ASA drug-loaded gels produced was mainly cross-linking by hydrogen bonding and intermolecular forces, and the cross-linking silver was mainly present in the elemental Ag and Ag^{2+} states. Under the condition of buffer solution $\text{pH}=7.4$, the cumulative release amount of Ag/AgO/CMCS/ASA drug-loaded gel was 75.20% within 12h, and the inhibition rate of *Gram-negative Escherichia coli* (*E.coli*) reached the maximum of 92.32%, which had broad application prospects in the medical field.

Key words silver, silver oxide, carboxymethyl chitosan, pH sensitive hydrogel, antibacterial property

伴随药物治疗的快速发展,“用药最适化”这一概念逐渐成为人们关注的热点。如果给药过程能在适当的时间和(或)在适当的地点精确地匹配生理需求,能有效提高靶向部位的生物利用度,减少毒副作用^[1]。羧甲基壳聚糖水凝胶^[2]作为一种软生物材料,以其三维网络、高含水量、高柔韧性、良好的生物相容性和生物降解性等优点,在组织工程、药物传递和生物传感器等领域应用广泛^[3-4]。以往对水凝胶体系的研究主要侧重于交联剂种类^[5]、新型合成方法^[6]对水凝胶的成胶时间、力学性能、微观形貌或者药物释放等方面的影响。由于生物医用的优越性,开发抗菌水凝胶越来越具有实用意义。Wahid 等^[7]

通过原位合成氧化锌(ZnO)纳米棒成功制备出羧甲基壳聚糖(CMCS)/ZnO 纳米复合抗菌水凝胶。Zhou 等^[8]在室温条件下采用辐射诱导还原法合成纳米银/明胶/羧甲基壳聚糖抗菌水凝胶。但对应用银离子(Ag^{2+})抗菌性能来制备抗菌水凝胶却鲜有报道。 Ag^{2+} 能与生物体电子传递链中的代谢酶的微生物脱氧核糖核酸(DNA)和巯基结合形成稳定的配位复合物,有效杀灭病原体微生物的同时,还可以有效避免耐药性产生^[9]。本研究采用原位沉淀法制备银(Ag)/氧化银(AgO)/CMCS 抗菌水凝胶,研究了水凝胶的孔隙结构、溶胀行为和对阿司匹林(ASA)药物释放等物理性能。此外,还对水凝胶对

基金项目:中央高校基础研究基金(CDJXS10221136)

作者简介:官淑敏(1992-),女,硕士,主要从事高分子水凝胶研究。

联系人:曹渊(1963-),男,博士,教授,主要从事高分子水凝胶研究。

革兰氏阴性大肠杆菌(*E.coli*)的抗菌性能进行了定性和定量测试。Ag/AgO/CMCS 水凝胶结合了 CMCS 和 Ag/AgO 二者的优势,有望成为一种新型的抗菌水凝胶。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

CMCS(生物试剂),阿拉丁试剂(上海)有限公司;明胶(分析纯),成都市化学试剂厂;ASA(分析纯),重庆博艺化学试剂有限公司;硝酸银、氢氧化铵,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;*E.coli* (ATCC25922),上海鲁微科技有限公司;营养琼脂培养基,海博生物技术有限公司。

磁力加热搅拌器(791 型),上海南汇电讯器材厂;干燥机(Pilot3-6L 型),北京博医康实验仪器有限公司;恒温振荡器(CHA-S 型),常州澳华仪器有限公司;紫外-可见分光光度计(UV-Vis, DUV-3700 型)、X 射线衍射仪(XRD, XRD-6000 型)、热重差热同步热分析仪(DTG-60H 型),日本岛津公司;傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, Magnal R550 II 型),美国 Nicolet 公司;X 射线光电子能谱仪(XPS, ESCALAB250Xi),赛默飞世尔科技公司;扫描电子显微镜(SEM, JSM-64901LV 型),赛默飞世尔科技公司。

1.2 样品的制备

在 70℃ 条件下,将 CMCS(1.2g)和明胶(1.2g)溶于 20mL 去离子水中,采用磁力加热搅拌器(791 型,上海南汇电讯器材厂)搅拌 1h,待完全溶解。称取添加一定量硝酸银的氢氧化铵溶液(1mL, 0.1mol/L)滴加入混合溶液中,室温静置 24h 形成凝胶,冷冻,采用干燥机(Pilot3-6L 型,北京博医康实验仪器有限公司)进行干燥,即制得 Ag/AgO/CMCS-1。

称取 ASA(0.1mg)溶于明胶/CMCS 的混合溶液(20mL)中,采用上述相同的方法,即制得 Ag/AgO/CMCS/ASA 载药凝胶,根据 ASA 载药量的不同,分别记为 Ag/AgO/CMCS/ASA-1、Ag/AgO/CMCS/ASA-2、Ag/AgO/CMCS/ASA-3、Ag/AgO/CMCS/ASA-4、Ag/AgO/CMCS/ASA-5。

1.3 样品的测试

1.3.1 溶胀度测试

在 37℃ 条件下,将制得的 Ag/AgO/CMCS-1 (0.2g)分别放入不同 pH 缓冲溶液(50mL)中,一定间隔时间取出,拭干表面水分,称重。采用溶胀度(SR)公式计算样品的溶胀度,见式(1)。并画出样

品的溶胀度曲线。

$$SR = [(W_t - W_0)/W_0] \times 100\% \quad (1)$$

式中,SR 为溶胀度,%; W_0 为凝胶初始质量,g; W_t 是溶胀 t 时间后的质量,g。

1.3.2 降解率测试

在 37℃ 条件下,将制得的 Ag/AgO/CMCS-1 (0.2g)分别置于不同 pH 缓冲溶液(50mL)中,间隔一定时间取出 1 份凝胶,干燥并称重。采用降解率(DR)公式计算样品的降解率,见式(2)。

$$DR = [(W_d - W_i)/W_d] \times 100\% \quad (2)$$

式中,DR 为降解率,%; W_d 为凝胶初始质量,g; W_i 为降解 i 时间后的质量,g。

1.3.3 释药量测定

称取干燥恒重的 Ag/AgO/CMCS/ASA 载药凝胶(0.2g)分别放入 pH=7.4 和 pH=2.0 的缓冲溶液(100mL)中,采用恒温振荡器(CHA-S 型,常州澳华仪器有限公司)37℃,150r/min,一定间隔时间分别取 4mL 液体,同时补充新鲜缓冲液,在 37℃,采用紫外-可见分光光度计(UV-Vis, DUV-3700 型,日本岛津公司)测试样品在 222nm 处的吸光度,平行测定 3 次。根据标准曲线法计算凝胶累计释药量(CR)见式(3)、式(4)。

$$CR = m_n / (m_0 \times 0.1) \times 100\% \quad (3)$$

$$m_n = (C_1 + C_2 + \dots + C_{n-1}) \times 0.004 + C_n \times 0.1 \quad (4)$$

式中,CR 为释药量,%; C_n 为第 n 次取样中 ASA 的质量浓度,mg/L; m_n 为第 n 次取样 ASA 的累计释放质量,mg; m_0 为凝胶初始质量,mg。

1.3.4 细菌抑菌圈测试

称取 *E.coli* 均匀涂布于营养琼脂平板培养基表面,将 Ag/AgO/CMCS-0、Ag/AgO/CMCS-1、Ag/AgO/CMCS-5($d=10\text{mm}$, $h=5\text{mm}$)凝胶薄片置于培养基上,37℃ 孵育 12h。观察薄片周围的细菌生长情况,并测量抑菌圈直径。

1.3.5 细菌抑制测试

称取 Ag/AgO/CMCS(0.5g)浸入 *E.coli* 营养琼脂培养液[40mL,光密度(OD)=1]中,空白琼脂培养液为对照组。采用恒温振荡器(CHA-S 型,常州澳华仪器有限公司)37℃,150r/min,孵育 24h。一定间隔时间取出,采用紫外-可见分光光度计(UV-Vis, DUV-3700 型,日本岛津公司)在 37℃ 条件下,测定培养液在 600nm 的 OD 值。

样品的抑制率计算见式(5)。

$$\text{抑制率} = [1 - (A_t - A_0)/(A_{\text{con}} - A_0)] \times 100\% \quad (5)$$

式中,抑制率,%; A_0 为 *E.coli* 孵育前的 OD

值,无量纲; A_t 和 A_{con} 分别为水凝胶和参照样品中*E.coli* 孵育 t 时间后的OD值,无量纲。

2 结果与讨论

2.1 FT-IR 分析

明胶、CMCS 和 Ag/AgO/CMCS 的 FT-IR 谱图见图 1。从图可以看出,Ag/AgO/CMCS 在 3438cm^{-1} 处氨基、羟基以及 1634cm^{-1} 处羧基的伸缩振动峰明显向低波数移动,说明 CMCS 与明胶分子间存在着较强的分子间氢键作用, 1386cm^{-1} 处羧基的对称伸缩振动向高波数移动,进一步证明两者分子间存在较强的分子间相互作用^[10]。

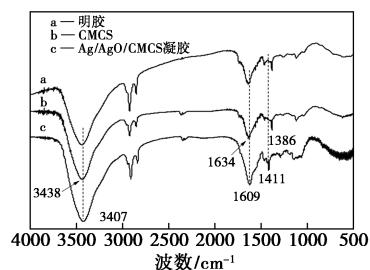


图1 明胶、CMCS 和 Ag/AgO/CMCS 的 FT-IR 谱图

2.2 XRD 分析

明胶、CMCS 和 Ag/AgO/CMCS 的 XRD 谱图见图 2。从图可以看出,在 $2\theta = 21.5^\circ$ 处,明胶、CMCS 和 Ag/AgO/CMCS 均出现 1 个宽峰,为芳香烃特征峰,Ag/AgO/CMCS 在 $2\theta = 38.1^\circ$ 、 43.9° 、 64.0° 和 78° 处的峰分别是金属 Ag 的(111)、(200)、(220)和(311)面反射引起的(PDF 标准卡片 04—0783),在 $2\theta = 31.9^\circ$ 处的峰对应于立方 AgO 的(111)面(PDF 标准卡片 43—1038)。结果表明 Ag/AgO/CMCS 中共存 Ag 和 AgO 相^[11]。

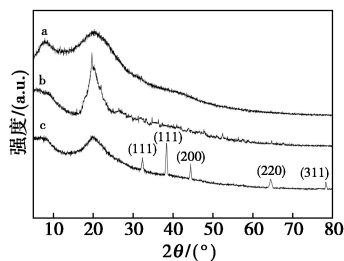


图2 明胶、CMCS 和 Ag/AgO/CMCS 的 XRD 谱图

2.3 XPS 分析

Ag/AgO/CMCS 的 XPS 谱图见图 3。从图可以看出,通过迭加拟合得到 2 个双峰,在 367.8eV 和 373.9eV 处观察到的峰为单质 Ag, 367.4eV 和 373.4eV 处到的峰为 Ag^{2+} 。

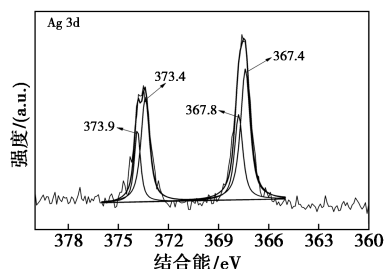


图3 Ag/AgO/CMCS 的 XPS 谱图

2.4 溶胀性能分析

Ag/AgO/CMCS 在不同 pH 缓冲液中的溶胀度曲线见图 4。从图可以看出,在 $\text{pH} < 7.4$ 条件下,所有 Ag/AgO/CMCS 的溶胀度与 pH 呈正比;在 $\text{pH} = 7.4$ 条件下,所有 Ag/AgO/CMCS 的溶胀度都达到最大值,随着 pH 继续增大,所有 Ag/AgO/CMCS 的溶胀度呈下降趋势。这是由于当介质中 pH 发生变化时,羧甲基壳聚糖和明胶分子链上的游离氨基、羧基的分子间作用力和亲水性能会发生显著变化,因而表现出不同的溶胀性能,在 $\text{pH} < 7.4$ 条件下,羧化壳聚糖和明胶链上的 $-\text{COOH}$ 部分发生电离,以 $-\text{COO}^-$ 形式存在, $-\text{COO}^-$ 之间的静电排斥和亲水性致使凝胶网络膨胀,从而增加水凝胶内的孔隙和自由空间,相应地吸收更多的水^[7];在 $\text{pH} = 7.4$ 条件下, $-\text{NH}_3^+$ 发生脱质子化, $-\text{COOH}$ 完全电离成 $-\text{COO}^-$ 形式, $-\text{COO}^-$ 间强的静电斥力和亲水性使凝胶的溶胀度达到最大;随着 pH 继续增大, $-\text{NH}_3^+$ 完全脱质子化,致使分子链的溶解性降低,并形成新的氢键,使得高分子链收缩,因此溶胀度反而降低^[12-13]。

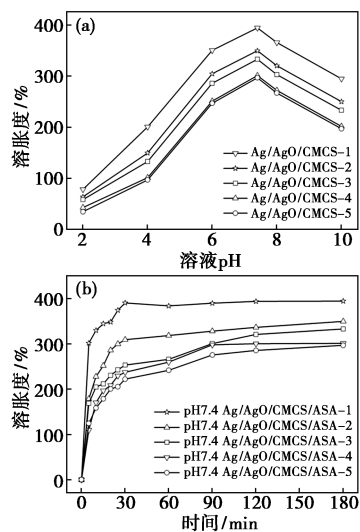


图4 Ag/AgO/CMCS 在不同 pH 缓冲液中的溶胀度曲线图

2.5 药物释放性能分析

Ag/AgO/CMCS/ASA 载药凝胶的药物释放动力学曲线见图 5。从图可以看出,不同交联剂浓度制得的 Ag/AgO/CMCS/ASA 载药凝胶,在 pH=7.4 缓冲溶液中,ASA 的释放都呈缓慢上升态势,并能释放 4~12h,在 pH=7.4 缓冲溶液中,释放 12h 条件下,Ag/AgO/CMCS/ASA-5 载药凝胶的累计释药量为 75.20%,具有较好的药物释放性能。这是因为在交联剂浓度较高条件下,制得的 Ag/AgO/CMCS/ASA 载药凝胶的网络交联密度增大,使得凝胶溶胀性能减弱,提供给药物溶出释放的空间和孔道变小所致。

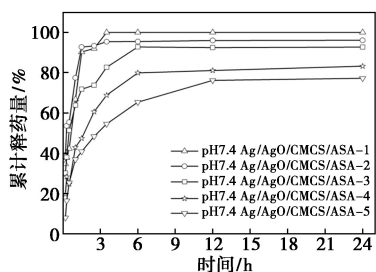


图 5 Ag/AgO/CMCS/ASA 在 pH=7.4 缓冲溶液中的释药曲线图

在 pH=7.4 和 pH=2.0 缓冲溶液条件下,Ag/AgO/CMCS/ASA-5 载药凝胶的释药量曲线见图 6。从图可以看出,Ag/AgO/CMCS/ASA-5 载药凝胶在 pH=7.4 缓冲液中可持续释放 12h,累计释药量达 75.20%;在 pH=2.0 缓冲液中释放时间短且释放量低,累计释药量为 20.14%。研究结果表明,制得的 Ag/AgO/CMCS/ASA-5 载药凝胶具有较好的 pH 敏感性。

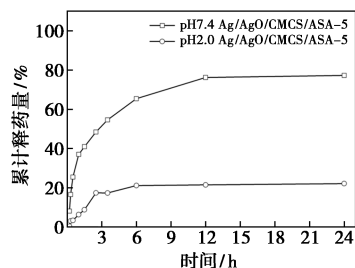


图 6 不同 pH 条件下 Ag/AgO/CMCS/ASA-5 载药凝胶的释药量曲线图

2.6 抗菌性能分析

水凝胶的抑菌圈图见图 7。从图可以看出,Ag/AgO/CMCS-1 和 Ag/AgO/CMCS-5 的抑菌圈直径分别为 11.8mm 和 13.6mm,作为对照,在 Ag/AgO/CMCS-0 凝胶中未发现明显的抑菌圈。可推断抗菌能力主要归因于凝胶中 Ag/AgO 颗粒的存

在,抗菌能力随着 Ag/AgO 颗粒含量的增加而增强。

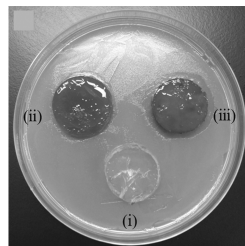


图 7 水凝胶的抑菌圈图

[(i) Ag/AgO/CMCS-0; (ii) Ag/AgO/CMCS-1; (iii) Ag/AgO/CMCS-5]

Ag/AgO/CMCS 的抑菌率曲线见图 8。从图可以看出,Ag/AgO/CMCS-5 对 *E.coli* 的抑制率起初呈快速上升态势,在孵育 6h 条件下,抑制率最大达到 92.32%,在孵育 6h 以上至 12h 内,抑制率持续保持在 90%以上,随后抑制率逐渐减小为 0;Ag/AgO/CMCS-1 对 *E.coli* 的抑制率在孵育 4h 条件下,抑制率最大达到 37%,无抗菌保持平台。这是由于在凝胶浸入悬浮液中,大量的 Ag/AgO 颗粒被释放并促成细菌生长的初始抑制。同时,这些颗粒与被破坏的细胞内物质相互作用并形成凝结物,导致 Ag/AgO 含量的降低,随着 Ag/AgO 释放量的逐渐降低,Ag/AgO 的消耗占主导地位。因此,在 Ag/AgO 含量降至最低抑制浓度以下时,细菌就会恢复生长^[8]。虽然从图可以看出 Ag/AgO/CMCS-0 仍存在微弱的抗菌力,这是由于羧化壳聚糖本身具有一定程度的抗菌能力。

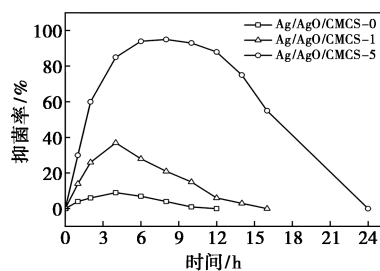


图 8 Ag/AgO/CMCS 的抑菌率曲线图

[(i) Ag/AgO/CMCS-0; (ii) Ag/AgO/CMCS-1; (iii) Ag/AgO/CMCS-5]

3 结论

采用 Ag/AgO 原位沉淀法合成了具有抗菌性能的 pH 响应性的 Ag/AgO/CMCS/ASA 载药凝胶。制得的 Ag/AgO/CMCS/ASA 载药凝胶的网络主要通过氢键和分子间作用力交联,交联点银主要以单质 Ag 和 Ag^{2+} 态存在。在缓冲溶液 pH=

7.4条件下,制得的Ag/AgO/CMCS/ASA载药凝胶在12h内的累计释药量为75.20%,对*E.coli*的抑制率最大达到92.32%。Ag/AgO/CMCS/ASA载药凝胶具有促进阿司匹林在肠位点的累积释放和提高药物抗菌性能的优势,是一种有效的给药方法,在病痛治疗领域具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64(3): 49-60.
- [2] Hu L, Zhang P, Wang X, et al. pH-sensitive carboxymethyl chitosan hydrogels via acid-labile ortho ester linkage for potential biomedical applications[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 178: 166-179.
- [3] Liu Z, Wang C, Liu Y, et al. Cefepime loaded O-carboxymethyl chitosan microspheres with sustained bactericidal activity and enhanced biocompatibility[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2017, 28(1): 79-92.
- [4] Yu S, Zhang X, Tan G, et al. A novel pH-induced thermosensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan and poloxamer cross-linked by glutaraldehyde for ophthalmic drug delivery[J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 155: 208-217.
- [5] Treenate P, Monvisade P. In vitro drug release profiles of pH-sensitive hydroxyethylacryl chitosan/sodium alginate hydrogels using paracetamol as a soluble model drug[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 99: 71-78.
- [6] Shi Y, Xiong Z, Lu X, et al. Novel carboxymethyl chitosan-graphene oxide hybrid particles for drug delivery[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2016, 27(11): 169-175.
- [7] Wahid F, Yin J J, Xue D D, et al. Synthesis and characterization of antibacterial carboxymethyl chitosan/ZnO nanocomposite hydrogels[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 88: 273-279.
- [8] Zhou Y, Zhao Y, Wang L, et al. Radiation synthesis and characterization of nanosilver/gelatin/carboxymethyl chitosan hydrogel[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2012, 81(5): 553-560.
- [9] 尚柯, 郑宪友, 陈婷, 等. 多价银氧化物 Ag_4O_4 的软化学制备、表征及抑菌性能评价[J]. *材料导报*, 2012(1): 32-35.
- [10] 崔莉, 贾军芳, 熊子豪, 等. 羧甲基壳聚糖/海藻酸钠半互穿网络水凝胶的制备及性能研究[J]. *高分子学报*, 2014(3): 361-368.
- [11] Vidyasagar D, Ghugal S G, Kulkarni A, et al. Silver/silver(II) oxide (Ag/AgO) loaded graphitic carbon nitride microspheres: an effective visible light active photocatalyst for degradation of acidic dyes and bacterial inactivation[J]. *Applied Catalysis B(Environmental)*, 2018, 221: 339-348.
- [12] Shen Y, Li X, Huang Y, et al. pH and redox dual stimuli-responsive injectable hydrogels based on carboxymethyl cellulose derivatives[J]. *Macromolecular Research*, 2016, 24(7): 602-608.
- [13] Gils P S, Ray D, Sahoo P K. Designing of silver nanoparticles in gum arabic based semi-IPN hydrogel[J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 46(2): 237-244.

收稿日期: 2018-01-12

修稿日期: 2019-02-15

(上接第166页)

(2)对样品进行酸处理有助于提高样品的电化学性能。

(3)将硝酸铜和乙酸锰不同摩尔比的样品分别在300℃和350℃下焙烧,发现前者电极材料的比容量均高于后者。

参考文献

- [1] Largeot C, Portet C, Chmiola J, et al. Relation between the ion size and pore size for an electric double-layer capacitor[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(9): 2730.
- [2] Kandalkar S G, Dhawale D S, Kim C K, et al. Chemical synthesis of cobalt oxide thin film electrode for supercapacitor application[J]. *Synthetic Metals*, 2010, 160(11-12): 1299.
- [3] 李庆同. 现代二氧化锰电解工业发展动向[J]. *电池*, 2001, 31(2): 52.
- [4] 黄坤, 刘煦. 纳米级电池活性材料的研究进展[J]. *电池工业*, 2001, 6(3): 133.
- [5] Wroblow H S, Gupta N. Rechargeable manganese oxide electrodes: part II, physically modified materials[J]. *J Electroanal Chem*, 1987, 238: 93.
- [6] 夏熙, 张春霞, 掺Bi改性MnO₂的制备及电化学性能研究[J]. *电源技术*, 2002, 26(3): 147.
- [7] 李国栋, 白立军, 李宁先, 等. 薄片式大功率Zn/MnO₂电池研究[J]. *电源技术*, 1980, 13(4): 1.
- [8] 门传玲, 夏熙. 纳米级电极材料制备与电化学性质研究(I)——溶胶-凝胶法制备纳米级MnO₂的性能[J]. *电池*, 1997, 27(5): 205.
- [9] 夏熙, 门传玲. 纳米级MnO₂的制备与电化学性质研究(II)——溶胶-凝胶法制备掺铋改性纳米MnO₂的性能[J]. *应用化学*, 1998, 15(1): 13.
- [10] 刘玲, 夏熙. 纳米电极材料的制备及其电化学性质研究(III)——微乳液中通氧气制备MnO₂及其性能[J]. *电化学*, 1998, 4(3): 328.
- [11] 夏熙, 刘玲. 纳米电极材料制备及其电化学性能研究(III): 微乳法制备纳米MnO₂及其性能[J]. *电池*, 1998, 28(4): 147.
- [12] 李娟, 李清文, 夏熙. 纳米MnO₂的固相合成及其电化学性能的研究(I)——纳米 γ -MnO₂的合成及表征[J]. *高等学校化学学报*, 1999, 20(9): 1434.

收稿日期: 2018-01-05