

具有抗菌性能的载药复合微纳米纤维的制备及其结构和性能表征

陈乐乐^{1,2}, 丁 玲^{1,2}, 王铖博^{1,2}, 滕桂香^{1,2}, 农金旺², 邱 婷^{1,2}, 张 继^{1,2*}

(1. 西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070; 2. 甘肃特色植物有效成分制品
工程技术研究中心, 兰州 730070)

摘要:利用静电纺丝技术制备了一种具有抗菌性能的氧化锌(ZnO)/聚乳酸(PLA)/聚己内酯(PCL)载药微纳米纤维膜,并通过扫描电子显微镜(SEM)、X射线衍射(XRD)和傅里叶变换红外光谱(FTIR)分别对复合膜的表面形态、元素组成和化学结构进行表征。通过抗菌实验评价了复合膜的抗菌性能,用紫外分光光度计测试复合膜在体外的药物释放行为。结果显示,以物理共混的方式将 ZnO 和氢溴酸高乌甲素(LAH)成功载入复合微纳米纤维;与 PLA/PCL 复合微纳米纤维膜相比,ZnO/PLA/PCL 复合微纳米纤维膜表现出更好的抗菌效率。当 ZnO 含量为 10%(wt)时,复合微纳米纤维膜具有最佳的抗菌性能;药物释放性能结果表明,ZnO/PLA/PCL 复合微纳米纤维膜具有良好的药物缓释性能。

关键词:静电纺丝;微纳米纤维;氧化锌;聚乳酸;聚己内酯

引言

静电纺丝技术是通过静电力制备微纳米级纤维的一种有效途径,由于得到的微纳米纤维具有高比表面积、高孔隙率、易制备等优良性能,在生物医药等各个方面具有广泛的应用^[1~4]。氧化锌(ZnO)是一种安全无毒、具有较广抗菌谱且性能稳定的无机抗菌剂,因此具有高比表面积的纳米氧化锌能成为制备抗菌微纳米纤维的理想材料^[5~7]。聚乳酸(PLA)是一种安全的生物相容性材料,广泛地应用于静电纺丝技术^[8,9]。但 PLA 的细胞亲和性差、耐冲击性差,这些弊端在一定程度上影响了 PLA 的应用范围。聚己内酯(PCL)是一种人工合成的热塑性半结晶态聚合物,具有良好的生物降解、柔韧性和加工性能,现已广泛用于组织工程等领域^[10]。但是,PCL 结构中存在的 5 个重复的亚甲基单元,阻碍了材料的亲水性能,使得 PCL 的降解速率较慢。因此,选用 PLA/PCL/ZnO 共混体系,经静电纺丝技术制备得到的复合微纳米纤维膜具有优良的综合性能^[11,12]。

综上所述,本文采用 PLA/PCL/ZnO 共混的方式制备复合微纳米纤维膜,并以氢溴酸高乌甲素(LAH)为例,对载药微纳米纤维材料进行形貌表征、结构表征以及应用研究。

1 实验部分

1.1 主要原料

聚乳酸:相对分子量 2.0×10^4 ,济南岱罡生物科技有限公司;聚己内酯:数均相对分子量 8.0×10^4 ,广东绿宝生物材料有限公司;二氯甲烷(天津市富宇精细化工有限公司);纳米氧化锌(ZnO),15~30nm(上海麦克林生化科技有限公司);溴化钾(天津市光复精细化工研究所);磷酸氢二钠(上海沪峥生物科技有限公司);磷酸二氢钠(无锡市展望化工试剂有限公司)。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2020.04.005

收稿:2019-07-31;修回:2019-12-19;

基金项目:国家自然科学基金(51873175);

作者简介:陈乐乐(1994-),女,硕士研究生,研究方向为生物大分子结构与功能。E-mail: 1806041081@qq.com;

* 通讯联系人:张继(1963-),女,博士,研究员,研究方向为植物资源的开发与利用。E-mail: zhangj@nwnu.edu.cn.

1.2 复合微纳米纤维膜的制备

静电纺丝液的配制:以二氯甲烷作为溶剂,将 PLA/PCL 按照 9:1 的质量比配制成质量分数为 8% 的纺丝溶液。此外,PLA/PCL/ZnO 共混体系中 ZnO 的质量分数分别为 2%、4%、6%、8%、10%、20%; PLA/PCL/ZnO/LAH 共混体系中 LAH 的质量分数为 0.8%;在室温下,将 ZnO 粉末加入至 PLA/PCL 共混体系中,磁力搅拌 3h,超声除气泡,重复 3 次后备用。

复合微纳米纤维膜的制备:将配制好的不同纺丝液在静电纺丝机中进行纺丝,其中纺丝电压为 8kV、温度 25℃、相对湿度为 2.5%,纺丝速率为 2mL/h,每个比例复合微纳米纤维膜纺丝时间为 5h。利用滚筒接收器接收静电纺丝得到的复合微纳米纤维膜,纺丝结束后将其置于真空干燥箱中 37℃ 干燥 12h。

1.3 测试与表征

1.3.1 SEM 表征 对复合微纳米纤维膜进行喷金处理后,采用热场发射扫描电子显微镜(SEM, Ultra Plus 型,德国 Zeiss 公司)对复合微纳米纤维膜进行微观形貌表征。随机选取 50 根微纳米纤维,通过 ImageJ 软件统计纤维直径,根据所得数据统计微纳米纤维的直径分布及平均直径。

1.3.2 EDS 表征 采用能量散射光谱仪(EDS, Ultra Plus 型,德国 Zeiss 公司)对 PLA/PCL/ZnO 复合微纳米纤维膜进行化学元素分析。

1.3.3 FT-IR 表征 以傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, Nicoletis10, 美国 Thermo 公司)表征膜的化学结构。将载药复合纤维膜剪成圆片,上下两边平铺上溴化钾粉末,压片,在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 的波数范围内测定复合微纳米纤维的红外谱图,扫描频率 16 次,分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.3.4 XRD 表征 采用 X 射线衍射仪(XRD, D8 ADVANCE, Bruker, 德国制)对不同的复合微纳米纤维膜进行结晶性能分析,扫描角度范围为 $5 \sim 80^\circ$ 。

1.3.5 抗菌性能测试 将 50mg 不同复合微纳米纤维膜浸入含有 5mL 细菌悬浮液的无菌小瓶中来评估抗菌活性,其中细菌悬浮液浓度为实验所需浓度(10^5 CFU/mL),将小瓶置于 37℃ 的恒温培养箱中,培养 24h 后取出,进行细菌计数。其中每种复合膜重复三次。复合微纳米纤维膜的抑制百分比(GI)用等式(1)来计算:

$$GI = \left[1 - \left(\frac{S_{t=24h}}{B_{t=24h}} \right) \right] \times 100 \quad (1)$$

其中, B_t 是空白(不添加 PLA/PCL/ZnO 载药复合微纳米纤维膜)存在下培养 24h 后的存活细菌数, S_t 是 PLA/PCL/ZnO 载药复合微纳米纤维膜存在下培养 24h 后的存活细菌数。

1.3.6 体外药物释放性能测试 根据 LAH 的紫外全波长分析,以 252nm 为测定波长^[13],采用紫外-可见分光光度计测定 LAH 在磷酸盐缓冲液(PBS)中的吸光值(OD 值),得到线性回归方程。称取 100mg PLA/PCL/ZnO 载药复合微纳米纤维膜,放入透析袋中,加入 100mL PBS,置于 37℃ 恒温摇床上震荡培养。间隔一定时间取出 5mL 溶液,并补加同等温度的 PBS 溶液 5mL,测定 OD 值。根据线性回归方程计算不同时刻 PLA/PCL/ZnO 载药复合微纳米纤维膜的累积释放百分比^[14]。

2 结果与讨论

2.1 复合微纳米纤维膜的形貌分析

图 1 是不同 ZnO 含量的 PLA/PCL/ZnO 复合微纳米纤维膜的 SEM 显微照片及平均直径,从图 1(a)可以看出,不加 ZnO 的 PLA/PCL 复合微纳米纤维粗细均匀,纤维平均直径为 $5.27 \mu\text{m}$,存在少量粘连现象且纤维表面有孔洞结构。粘连现象的出现可能是因为纤维喷射到接收装置时,二氯甲烷并未完全挥发。静电纺丝结束后,将得到的纤维膜置于真空干燥箱内干燥处理,使二氯甲烷完全挥发,纤维表面产生孔洞结构,这与文献报道的基本一致^[15,16],这种孔洞结构能够极大地增加纤维的比表面积;如图 1(b)所示,当纺丝液中加入 10%(wt) ZnO 后,复合微纳米纤维平均直径由 $5.27 \mu\text{m}$ 减小到 $0.8 \mu\text{m}$,这可能是因为 Zn^{2+} 的加入导致纺丝液的表面电荷密度增加,纺丝过程中受到的静电场牵引力增大,从而导致复合

微纳米纤维直径减小^[17],同时,ZnO 的加入导致复合微纳米纤维表面不平整;如图 1(c)所示,当 ZnO 浓度达到 20%(wt)时,ZnO 纳米颗粒聚集,堵塞纺丝针头,导致微纳米纤维直径分布不均匀,平均直径降低至 0.38 μm 。

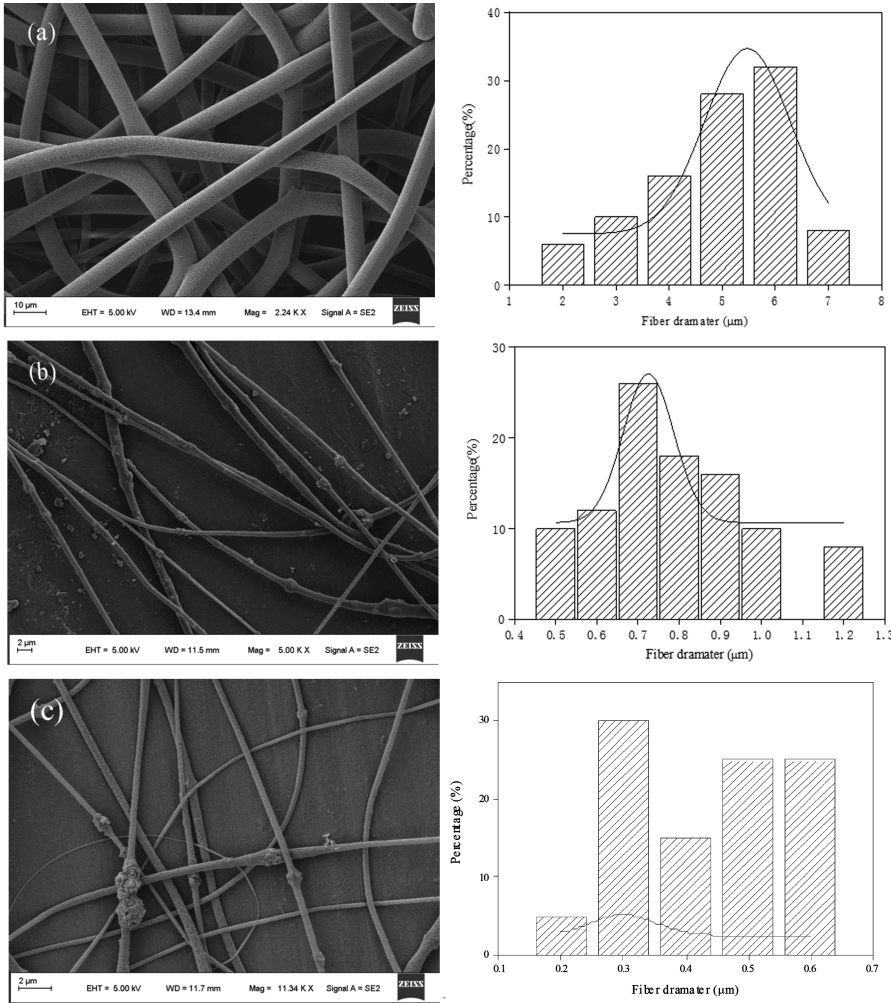


图 1 不同 ZnO 含量的 PLA/PCL/ZnO 复合微纳米纤维膜的表面形貌及纤维直径分布

a. 0%(wt);b. 10%(wt);c. 20%(wt)

Figure 1 Surface morphology and fiber diameter distributions of PLA/PCL/ZnO micro/nano-fiber composite membranes with different contents of ZnO

a. 0%(wt); b;10%(wt); c. 20%(wt)

2.2 PLA/PCL/ZnO 复合微纳米纤维的能量散射光谱图

图 2 是 PLA/PCL/ZnO 复合微纳米纤维的能量散射光谱图,从图中可以明显看出,C、O、Zn、Al、Au 元素的峰,其中 Al 元素的存在是因为复合微纳米纤维膜是置于铝箔纸上进行观察的。EDS 分析结果表明 ZnO 纳米颗粒成功混入复合微纳米纤维中^[18]。

2.3 不同复合微纳米纤维膜的红外图谱

聚酯类高分子 PLA 与 PCL 具有相似的官能团,其主要区别在于 PCL 带有一(CH₂)₅—基团,而 PLA 带有一CH(CH₃)—基团。图 3 是不同复合微纳米纤维膜及其初始成分的红外图谱,从图 3(b)可以看出,2948.55cm⁻¹、2865.91cm⁻¹ 处的峰对应亚甲基的 C—H 伸缩振动峰,2995.73cm⁻¹、2945.37cm⁻¹ 处为甲基的 C—H 伸缩振动峰^[19],430.67cm⁻¹ 是 Zn—O 伸缩振动峰;3536cm⁻¹ 处为 LAH 的—CO—

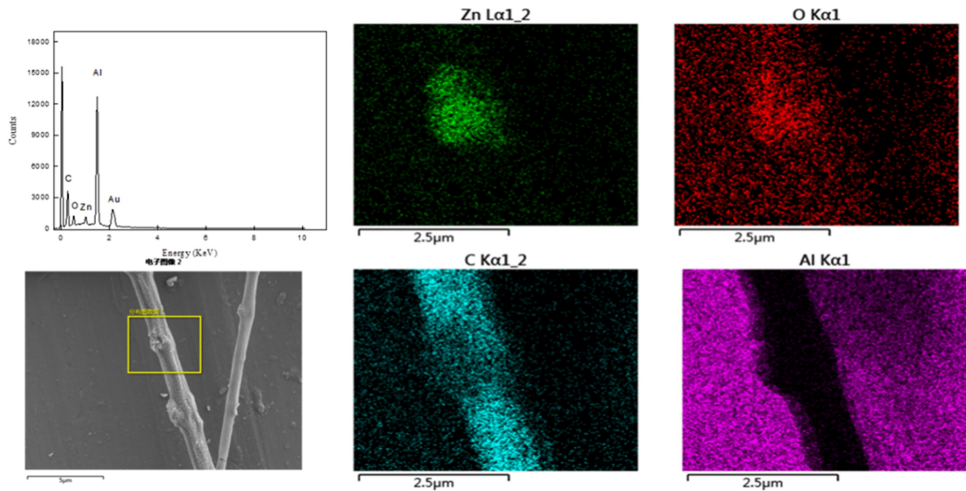


图 2 ZnO 复合微纳米纤维的 EDX 数据及相应元素映射

Figure 2 EDX data and the corresponding elemental mapping of ZnO micro/nano-fiber composite membranes

NH—特征峰,1691 cm^{-1} 处为羰基的特征吸收峰,1588 cm^{-1} 、762 cm^{-1} 处为二取代苯的特征吸收峰^[20]。从图 3(a)可以看出,PLA/PCL/ZnO 复合微纳米纤维中包含 ZnO 的特征吸收峰;PLA/PCL/ZnO/LAH 复合微纳米纤维中包含 ZnO、LAH 的特征吸收峰。复合微纳米纤维膜并没有产生新的吸收峰,并且特征峰的偏差不大,这表明其混合方式是物理学上的共混,没有生成新的化学键,这与文献报道的基本一致^[21]。

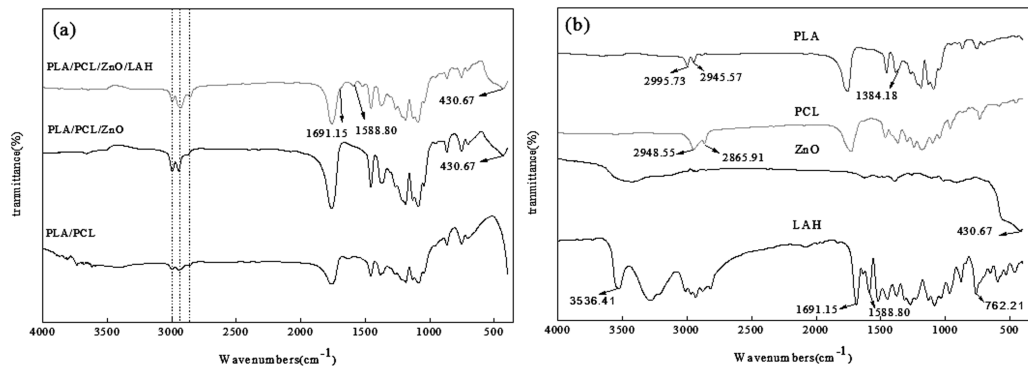


图 3 (a)复合微纳米纤维膜(PLA/PCL/LAH/ZnO、PLA/PCL/ZnO 和 PLA/PCL)的 FT-IR 曲线和 (b)其初始成分(PLA、PCL、LAH 和 ZnO)的 FT-IR 曲线

Figure 3 FT-IR spectra of the (a) micro/nano-fiber composite membranes (PLA/PCL/LAH/ZnO, PLA/PCL/ZnO and PLA/PCL) and (b) their initial components(PLA, PCL, LAH and ZnO)

2.4 不同复合微纳米纤维膜的 X 射线衍射图谱

图 4 是不同微纳米纤维膜的 XRD 图谱,由图可以看出,PLA 的图谱为低强度宽峰,显示为非晶体结构,而 LAH、ZnO、PCL 都存在尖锐衍射峰,其中 ZnO 为晶体结构,PCL 是一种半结晶高分子聚合物,其晶体结构与非晶体结构相互交织在一起。ZnO 在 2θ 为 31.65°(100)、34.27°(002)、36.31°(101)、47.63°(102)、56.65°(110)、62.88°(103)、67.82°(112)和 68.99°(201)处显示出低强度峰,由 JCP2.2CA:00-036-1451 卡可知,这些峰是 ZnO 的标准峰。PLA 低强度宽峰的最大值出现在 $2\theta=16.48^\circ$ 附近^[22,23]。半结晶高分子聚合物 PCL 在 2θ 为 21.33°、23.86°处显示出两个强衍射峰^[24]。LAH 是一种结晶材料,其 XRD 图谱出现尖峰,当将其放入纺丝溶液后,LAH 以分子形式进入聚合物材料,尖峰消失。从图 4(a)微纳米

纤维膜的 XRD 图谱可以看出,ZnO、PLA、PCL 的共混过程中没有生成新的基团,也没有形成新的物质,只有峰的强度因共混浓度的不同发生变化。根据 XRD 分析,这个结果与 FT-IR 的结果相一致。

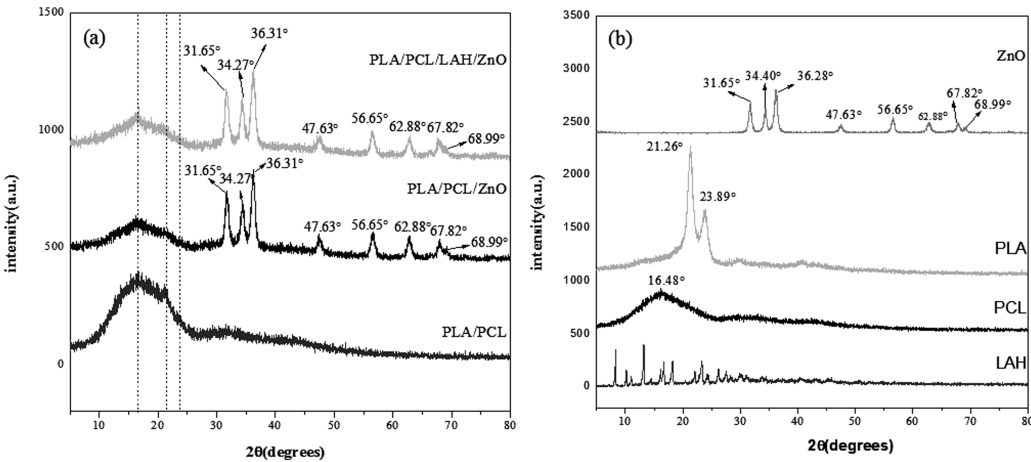


图 4 (a)复合纳米纤维膜(PLA/PCL/LAH/ZnO、PLA/PCL/ZnO 和 PLA/PCL)和
(b)初始成分(PLA、PCL、LAH 和 ZnO)的 X 射线衍射图

Figure 4 X-ray diffraction patterns of the (a) micro/nano-fiber composite membranes (PLA/PCL/LAH/ZnO, PLA/PCL/ZnO and PLA/PCL) and (b) their initial components(PLA, PCL, LAH and ZnO)

2.5 复合微纳米纤维膜的抗菌性能分析

根据氧化锌的不同浓度,设计了 PLA/PCL/ZnO 载药复合微纳米纤维膜的抗菌性能实验。表 1 是复合微纳米纤维膜的抗菌性能,由表 1 可知,相比于 *S. aureus*,PLA/PCL/ZnO 载药复合微纳米纤维膜的抗菌性能对 *E. coli* 显示出较低的灵敏度,这样的结果与 Shalumon 等^[25]报道的结果一致;当 ZnO 浓度达到 10%(wt)时,复合微纳米纤维膜对 *S. aureus* 的抑制百分比可达到 99.1%,而对 *E. coli* 的抑制百分比为 95.16%;当 ZnO 浓度达到 20%(wt)时,复合微纳米纤维膜对 *S. aureus* 的抑制百分比可达到 99.25%,而对 *E. coli* 的抑制百分比为 98.58%。扫描电镜分析得到,当 ZnO 浓度达到 20%(wt)时,复合微纳米纤维中 ZnO 纳米颗粒聚集,接触面积减少,抗菌性能增加不明显,这与 Rodríguez-Tobías 的研究结果是一致的^[26];当 ZnO 浓度为 0%(wt)时,PLA/PCL 复合微纳米纤维膜对于 *S. aureus* 的抑制百分比达到 35.83%,对于 *E. coli* 抑制百分比达到 2.53%,抗菌性能结果表明 PLA/PCL 复合微纳米纤维膜也具有一定的抗菌性能,这可能是因为 PLA 中含有极微量的乳酸或低聚物,这些物质在菌液中浸出一部分,形成酸性表面环境,防止了微生物的附着和繁殖,产生一定的抗菌性能,这与 Fei 的研究结果基本一致^[27]。综上所述,当 ZnO 浓度达到 10%(wt)时,对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抗菌性能最佳,且纤维直径均匀,易制备。

表 1 载有 ZnO/PLA/PCL 的复合微纳米纤维膜的抗菌性能

Table 1 Antibacterial properties of ZnO/PLA/PCL drug-loaded micro/nano-fiber composite membranes		
ZnO 质量分数 %(wt)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
	GI	GI
0	2.53%	35.83%
2	5.18%	62.66%
4	11.43%	83.47%
6	37.31%	91.38%
8	52.9%	96.25%
10	95.16%	99.1%
20	98.58%	99.25%

2.6 复合微纳米纤维膜的体外药物释放性能分析

图 5 为复合微纳米纤维膜的体外药物释放曲线,随着 LAH 释放时间的增加,其累积释放百分比逐渐升高,释放初期(前 3h),LAH 累积释放百分比可以达到 15%,药物释放速度较快。可能是因为部分 LAH 存在于微纳米纤维表面,经 PBS 冲刷,从微纳米纤维表面脱落释放,使得开始阶段 LAH 释放速率较快,同时表面 LAH 的溶解促进了 LAH 的进一步释放。释放中期(3~72h),药物释放速度较为缓慢。这可能是因为微纳米纤维表面的 LAH 几乎释放完毕,微纳米纤维内部的 LAH 需通过扩散作用到达表层后释放,同时,外层的 PLA/PCL 共混结构发生降解现象,释放出复合微纳米纤维内部包埋的 LAH,使得复合微纳米纤维膜达到良好的药物缓释效果,在 72h 时药物释放率达到 62%以上。释放后期(72h~110h),这段时间药物释放速度最为缓慢,因为 PLA/PCL 共混结构的降解速度很慢,特别是在没有酶存在的情况下,因此,最后阶段 LAH 释放缓慢。当累积释放时间达到 110h 以后,LAH 累积释放百分比可以达到 65%。

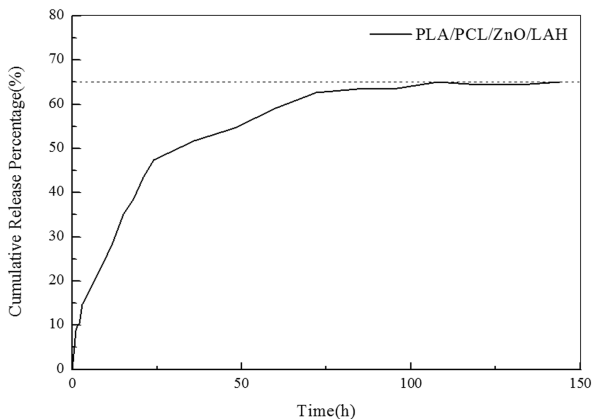


图 5 PLA/PCL/ZnO 载药复合微纳米纤维膜的体外药物释放性能

Figure 5 Drug release properties of drug-loaded PLA/PCL/ZnO micro/nano-fiber composite membrane *in vitro*

3 结论

本文通过静电纺丝技术制备出不同 ZnO 浓度的复合微纳米纤维膜。通过形貌和性能表征分析得到,当 ZnO 浓度达到 10% (wt)时,可以制备出直径均匀、抗菌效果最优的微纳米纤维膜。PLA、PCL、ZnO 以物理共混的方式混合。综上所述,本文制备的复合微纳米纤维膜可以有效的抑制 *E. coli* 和 *S. aureus* 的滋生,同时具有药物缓释性能和生物相容性等优点,在生物医用载药敷料方面具有优良的应用前景。

参考文献:

[1] Amariei G, Kokol V, Boltes K, Leton P, Rosal R. RSC Adv, 2018, 8(49): 28013~28023.

[2] Miguel S P, Figueira D R, Simões D, Ribeiro M P, Coutinho P, Ferreira P, Correia I. Colloid Surface B, 2018, 169: 60~71.

[3] Norouzi M, Shabani I, Ahvaz H H, Soleimani M. J Biomed Mater Res A, 2015, 103(7): 2225~2235.

[4] Kim P, Cho J. J Biochem Mol Biol, 2016, 49(1): 26~36.

[5] Eskandari M, Haghighi N, Ahmadi V, Haghighi F, Mohammadi S R. Physica B, 2011, 406(1): 112~114.

[6] Vitchuli N, Shi Q, Nowak J, Kay K, Caldwell J M, Breidt F, Zhang X. Sci Technol Adv Mat, 2011, 12(5):055004.

[7] Prasad G K, Mahato T H, Singh B, Ganesan K, Pandey P, Sekhar K. J Hazard Mater, 2007, 149(2): 460~464.

[8] 李顺江,王振永,张申伟,郝海涛,王婉莹,蔡艳华. 应用化工, 2014, 5: 916~918.

[9] 王淑瑶,梁雪,王勇章,刘耀文,吴贺君,陈姝娟,化工新型材料, 2017, 3: 102~104.

[10] 陈焱,曾迪,丁璐,李晓莉,谢江徽,郑强荪. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(1): 72~79.

[11] 黄嵩涛, 王红, 张忠芮, 王家奎, 高鹏, 殷丽华, 王琳, 余占海. 高分子通报, 2014, 6: 101~106.

[12] 王利君, 熊杰, 骆菁菁, 赵兴燕, 赵新飞. 纺织学报, 2017, 38(5): 8~13.

[13] 管玉珠, 沈翠英, 马蓉, 陆东旭. 兰州大学学报(医学版), 2003, 29(1): 38~39.

[14] 高燕, 张华, 张雯, 李祥鹏, 岳盼, 李伟. 高等学校化学学报, 2018, 3(39): 575~582.

[15] Dasari A, Jennifer Quirós, Herrero B, Boltes K, Garcíacalvo E, Rosal R. J Membrane Sci, 2012, 405: 134~140.

[16] Kong Y X, Yuan J, Wang Z M, Qiu J. Polym Composite, 2012, 33(9): 1613~1619.

[17] 王淑瑶, 梁雪, 王勇章, 刘耀文, 吴贺君, 陈姝娟. 化工新型材料, 2017, 3: 102~104.

[18] Kim C H, Kim B H. J Power Sources, 2015, 274: 512~520.

[19] Wang D K, Varanasi S, Fredericks P M, Hill D J, Symons A L, Whittaker A K, Rasoul F. J Polym Sci Pol Chem, 2013, 51(24): 5163~5176.

[20] 张继, 孙文秀, 温慧慧, 刘汉士, 李红坤, 郁开北, 王云普. 有机化学, 2007, 27(11): 1409~1413.

[21] Hamza A M, Alhtheal E D, Shakir A K. Energy Procedia, 2017, 119: 615~621.

[22] 肖雅, 曲明, 史新妍. 高分子学报, 2018, 3: 402~409.

[23] Pantani R, Gorrasi G, Vigliotta G, Murariu M, Dubois P. Eur Polym J, 2013, 49(11): 3471~3482.

[24] Kiran A S K, Sampath Kumar T S, Perumal G, Sanghavi R, Doble M, Ramakrishna S. Prog Org Coat, 2018, 121: 112~119.

[25] Shalumon K T, Anulekha K H, Nair S V, Chennazhi K P, Jayakumar R. Int J Biol Macromol, 2011, 49(3): 247~254.

[26] Heriberto Rodríguez-Tobias, Morales G, Grande D. Mater Chem Phys, 2016, 182: 324~331.

[27] Fei Y, Chen Y, Wang H, Gao W, Yang R, Wan Y. Fiber Polym, 2011, 12(3): 340~344.

Preparation, Structure and Characterization of Drug-loaded Composite Micro/Nano Fibers with Antibacterial Properties

CHEN Le-le^{1,2}, DING Ling^{1,2}, WANG Cheng-bo^{1,2}, TENG Gui-xiang^{1,2}, NONG Jin-wang²,
QIU Ting^{1,2}, ZHANG Ji^{1,2*}

(1. College of life sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China;
2. Bioactive Products Engineering Research Center for Gansu Distinctive Plants, Lanzhou 730070, China)

Abstract:The antibacterial micro-nano fiber membrane loaded with zinc oxide (ZnO)/polylactic acid (PLA)/polycaprolactone (PCL) was prepared by electrostatic spinning technology. And the surface morphology, elementary composition and chemical structure of the composite membrane were characterized by scanning electronic microscope (SEM), X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), respectively. The antibacterial performance of the composite membrane was evaluated by the antibacterial experiment. The drug release behavior of the composite membrane *in vitro* was measured by ultraviolet spectrophotometer. The results showed that ZnO and LAH were successfully mixed into the composite micro-nano fibers by physical blending; Concerning to the antibacterial properties, ZnO/PLA/PCL micro-nano fiber composite membranes exhibited better antibacterial efficiency compared to the PLA/PCL micro-nano fiber composite membranes. When the ZnO content was 10% (wt), the composite fiber membrane had the best antibacterial performance. The drug release performance results showed that the ZnO/PLA/PCL micro-nano fiber composite membrane had good drug release performance.

Key words:Electrospinning; Micro-nano fiber; Zinc oxide; PLA; PCL