

眼用盐酸洛美沙星壳聚糖纳米粒的制备与体外评价

季可非, 汪 洋*

武汉市红十字会医院 药剂科, 湖北 武汉 430015

摘要: 目的 基于质量源于设计(QbD)理念制备盐酸洛美沙星壳聚糖纳米粒(LF-CNs), 并评价其体外抗菌活性。方法 采用离子凝胶化法制备LF-CNs, 根据失效模式效应分析(FMEA)工具初步评估影响LF-CNs制剂性质的潜在处方和工艺变量, 并通过2水平部分析因实验设计筛选出影响LF-CNs制剂性质的关键变量, 最终以壳聚糖浓度、三聚磷酸钠(STPP)浓度和搅拌速度3个独立变量作为考察因素, 以LF-CNs的粒径分布和包封率作为评价指标, 应用Box-Behnken实验设计优化并得到LF-CNs的处方和制备工艺参数。通过Zetasizer Nano ZS 90动态激光粒度仪测定LF-CNs的粒径分布、聚合物分散性指数(PDI)和 ζ 电位, 透射电子显微镜下观察LF-CNs的微观形态; 采用体外透析法考察LF-CNs和LF原料药体外药物释放特性; 通过抑菌实验比较LF原料药与LF-CNs的体外抑菌活性。**结果** 经实验优化得到LF-CNs的最优处方和工艺参数: 壳聚糖质量浓度为10 mg/mL, STPP质量浓度为6 mg/mL, 搅拌速度为750 r/min; 在透射电镜下可观察到LF-CNs呈圆球状, 无聚集, 粒径大小为 (479.6 ± 18.7) nm, PDI为 (0.194 ± 0.012) , ζ 电位为 (34.4 ± 1.9) mV, LF-CNs的体外释放机制符合Korsmeyer-Peppas方程拟合, 药物的释放为扩散和溶蚀双重机制; LF-CNs对金黄色葡萄球菌的体外抑菌效果优于LF原料药。**结论** 将盐酸洛美沙星制备成壳聚糖纳米粒, 处方设计科学合理, 制备工艺简单易行, 体外抑菌活性显著, 有望成为盐酸洛美沙星眼用给药的一种有效途径。

关键词: 盐酸洛美沙星; 壳聚糖纳米粒; 离子凝胶化法; Box-Behnken实验设计; 抑菌活性

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2021)12-2627-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.12.015

Preparation and *in vitro* evaluation of ophthalmic lomefloxacin hydrochloride chitosan nanoparticles

Ji Kefei, Wang Yang

Department of Pharmacy, the Red Cross Hospital of Wuhan, Wuhan 430015, China

Abstract: Objective To prepare lomefloxacin hydrochloride chitosan nanoparticles (LF-CNs) based on the concept of quality by design (QbD), and evaluate its *in vitro* antibacterial activity. **Methods** LF-CNs were prepared by ionic gelation method. Using the failure mode effect analysis (FMEA) tool to identify the potential formulation and process variables that affect the properties of LF-CNs. The key variables that affect the properties of LF-CNs were screened by 2-level factorial experiment design. Finally, the three independent variables of chitosan concentration, STPP concentration and stirring speed were used as the investigating factors, and the particle size distribution and encapsulation efficiency of LF-CNs were used as evaluation indicators. The formulation and process parameters of LF-CNs were optimized and obtained using Box-Behnken experimental design. The particle size distribution, ζ potential and *in vitro* drug release characteristics of LF-CNs were investigated. The antibacterial activities of LF raw materials and LF-CNs *in vitro* were compared through the inhibition zone experiment. **Results** The optimal formulation and process parameters of LF-CNs were optimized by experiment: The chitosan concentration was 10 mg/mL, the STPP concentration was 6 mg/mL, and the stirring speed was 750 r/min. Under the transmission electron microscope, it could be observed that LF-CNs were spherical, without aggregation, the particle size was (479.6 ± 18.7) nm, the PDI was (0.194 ± 0.012) , the ζ potential was (34.4 ± 1.9) mV, and the *in vitro* release rate of LF-CNs can be fitted by Korsmeyer-Peppas equation. The *in vitro* antibacterial effect of LF-CNs on *Staphylococcus aureus* was higher than that of LF raw materials. **Conclusion** In this study, lomefloxacin hydrochloride was prepared into chitosan nanoparticles. The formulation design was scientific and reasonable, the preparation process was simple and easy, and

收稿日期: 2021-03-09

第一作者: 季可非(1992—), 女, 硕士研究生, 初级药师, 研究方向为临床药学。E-mail: jikefei1992@126.com

*通信作者: 汪 洋(1982—), 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为临床药学。E-mail: wangyang2021@126.com

the antibacterial activity *in vitro* was significant. It is expected to become an effective way of ophthalmic administration of lomefloxacin hydrochloride.

Key words: lomefloxacin hydrochloride; chitosan nanoparticles; ion gelation method; Box-Behnken experimental design; antibacterial activity

盐酸洛美沙星(lomefloxacin hydrochloride, LF)属于第三代的喹诺酮类抗生素,其通过抑制细菌的DNA螺旋酶的合成和复制而起杀菌作用,临床已证实LF对革兰阴性菌、阳性菌以及部分厌氧菌均有抗菌活性^[1-2],目前已将LF制备成滴眼液用于治疗细菌性结膜炎、角膜炎、角膜溃疡、泪囊炎、术后感染等外眼感染^[3]。然而,患者在使用滴眼液后经常会出现频繁眨眼活动,导致大部分药物流失,治疗效果显著降低^[4-5]。研究表明,生物黏附性聚合物会增加药物在眼部区域的停留时间,可提高药物治疗效果^[6]。为此,本研究制备LF壳聚糖纳米粒(LF-CNs),为LF的眼部用药提供一种有效途径。

1 材料

1.1 主要仪器

安捷伦1200型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);MYP19-2型恒温磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司);JEM-1011型透射电子显微镜(日本电子株式会社);Optima L-100XP型超速冷冻离心机(贝克曼库尔特商贸有限公司);Zetasizer Nano ZS 90型激光粒度仪(英国马尔文公司);纤维素透析袋(截留相对分子质量12 000~14 000,上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 试剂及主要试剂

LF原料药(郑州瑞康制药有限公司,批号20200214,质量分数为99.8%);LF对照品(中国食品药品检定研究院,批号130452-201603,质量分数99.4%);壳聚糖(脱乙酰度为95%,相对分子质量范围为120 000~150 000,广州齐云生物技术有限公司);三聚磷酸钠(STPP, Sigma试剂公司);乙酸(AA, Sigma试剂公司);纯净水由默克密理博Milli-Q纯水超纯水机制备。

2 方法与结果

2.1 LF-CNs的制备

LF-CNs采用离子凝胶化法制备,其原理是通过壳聚糖所带的 NH_3^+ (阳离子)基团与STPP中的 PO_4^- (阴离子)基团通过静电作用并在外力作用下形成纳米级颗粒^[7]。根据实验设计,在不同质量浓度(10、15 mg/mL)的乙酸溶液中溶解不同质量浓度(5、10、15 mg/mL)的壳聚糖,备用;另将LF原料

药溶解到不同质量浓度(4、8、12 mg/mL)的STPP溶液中;在不同搅拌速度(500、750、1 000 r/min)下将药物溶液缓慢滴加到壳聚糖溶液中,持续搅拌不同时间(30、90 min)后,即得到LF-CNs溶液。

2.2 粒径分布测定

取LF-CNs溶液0.25 mL在 $(25.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 下加入蒸馏水稀释10倍,使用Zetasizer Nano ZS 90型动态激光粒度仪测定粒径分布,所有样品均测定3次,取平均值。

2.3 包封率测定

取LF-CNs溶液1 mL加入到25 mL容量瓶中,加入质量浓度为50 mg/mL的乙酸溶液使纳米粒完全溶解并定容,得到总待测样;另取LF-CNs溶液4 mL,15 000 r/min离心30 min,下层为纳米粒沉淀物,上层为澄清透明状溶液,吸取上清液1 mL加入到25 mL量瓶中并定容,得到游离待测样。取上述总待测样、游离待测样经HPLC法^[8]检测药物含量($C_{\text{总}}$ 、 $C_{\text{游离}}$),计算LF-CNs的包封率。

$$\text{包封率} = (C_{\text{总}} - C_{\text{游离}}) / C_{\text{总}}$$

2.4 基于QbD理念开发LF-CNs

2.4.1 风险识别 采用失效模式效应分析(FMEA)工具对可能影响LF-CNs制剂性质的潜在处方和工艺变量进行风险评估^[9],根据各个变量对LF-CNs制剂性质影响的严重性(S)、可能性(P)和可检测性(D)进行打分,将高风险定义为3分,中风险定义为2分,低风险定义为1分,风险优先数(RPN)= $S \times P \times D$,将RPN阈值设定为12分, $\text{RPN} \geq 12$ 分的变量被认定为是潜在的关键变量。

根据FMEA风险工具(图1)确定壳聚糖浓度、STPP浓度、乙酸浓度、搅拌速度和搅拌时间5个处方和工艺变量会对LF-CNs制剂性质具有潜在的影响,采用2水平部分析因实验设计筛选出关键变量。

2.4.2 2水平部分析因实验设计 使用Design-Expert 10.1软件中的2-水平部分析因实验设计筛选出关键变量^[10],评估壳聚糖质量浓度(X_1)、STPP质量浓度(X_2)、乙酸质量浓度(X_3)、搅拌速度(X_4)和搅拌时间(X_5)对LF-CNs的粒径分布(Y_1)以及包封率(Y_2)的影响,并基于半正态图(half-normal plot)和帕累托图(pareto chart)对实验结果进行分析。表1

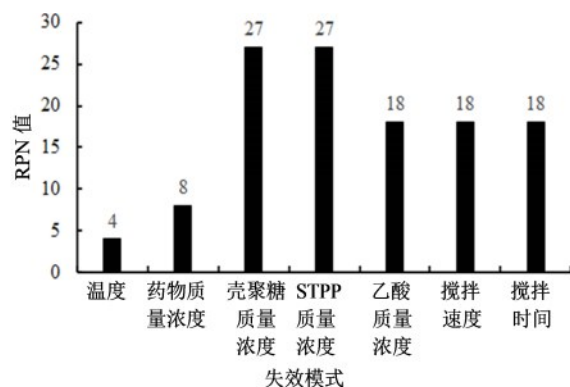


图1 FMEA评估LF-CNs制剂性质的潜在处方和工艺变量

Fig. 1 Potential formulation and process variables for FMEA to evaluate properties of LF-CNs

表1 2-水平部分析因实验设计中独立变量水平

Table 1 Level of independent variables in 2-level factorial experiment design

变量	水平	
	低(-1)	高(+1)
X_1 : 壳聚糖质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	5	15
X_2 : STPP 质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	4	12
X_3 : 乙酸质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	10	15
X_4 : 搅拌速度/(r·min ⁻¹)	500	1 000
X_5 : 搅拌时间/min	30	90

列出了各个变量的低(-1)和高(+1)2个水平,表2列出了16次实验设计及结果。

通过半正态图和帕累托图可以清晰地观察到影响LF-CNs的粒径与包封率的关键变量,如图2所示,壳聚糖质量浓度(X_1)、STPP 质量浓度(X_2)和搅拌速度(X_4)是影响LF-CNs的粒径大小的关键变量;同样如图3所示,壳聚糖质量浓度(X_1)和STPP 质量

表2 实验设计及结果

Table 2 Results of two-level factorial experiment design

编号	处方变量/(mg·mL ⁻¹)			工艺变量		响应值	
	X_1	X_2	X_3	X_4 /(r·min ⁻¹)	X_5 /min	Y_1 /nm	Y_2 /%
1	15	12	10	500	90	705.4	68.2
2	15	4	15	1 000	30	541.3	38.4
3	5	12	15	500	90	416.8	45.1
4	15	12	15	500	30	631.5	65.2
5	5	4	10	500	90	418.6	30.9
6	5	4	15	500	30	400.2	35.1
7	5	12	10	500	30	431.2	47.5
8	5	4	15	1 000	90	390.2	29.5
9	15	4	10	500	30	520.1	45.6
10	15	12	10	1 000	30	775.4	59.1
11	5	12	15	1 000	30	425.1	49.3
12	15	4	10	1 000	90	551.6	40.1
13	5	12	10	1 000	90	406.8	50.2
14	15	12	15	1 000	90	791.7	28.6
15	5	4	10	1 000	30	308.1	34.8
16	15	4	15	500	90	531.2	43.6

浓度(X_2)是影响LF-CNs的包封率的关键变量。接下来通过Box-Behnken实验设计对关键性变量进一步优化。

2.4.3 Box-Behnken实验设计 固定乙酸质量浓度为10 mg/mL,搅拌时间为30 min,应用Box-Behnken实验设计进一步优化壳聚糖质量浓度(X_1)、STPP 质量浓度(X_2)和搅拌速度(X_3)3个关键变量对LF-CNs的粒径分布(Y_1)和包封率(Y_2)的影响。在此设计中变量设置为低(-1)、中(0)和高(+1)3个水平(表3),共进行了17次实验并得到相应的实验结果(表4)。

对LF-CNs的粒径分布和包封率的方差分析结果分别见表5、6, Y_1 和 Y_2 模型的 P 值分别为<0.000 1

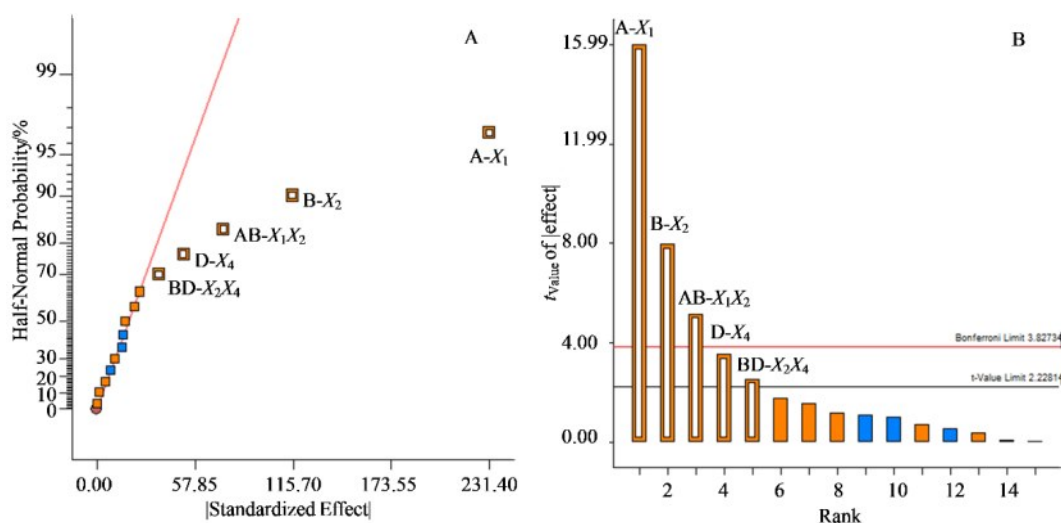


图2 各变量对LF-CNs粒径影响的半正态图(A)和帕累托图(B)

Fig. 2 Half-normal plot (A) and pareto chart (B) of influence of various variables on particle size distribution of LF-CNs

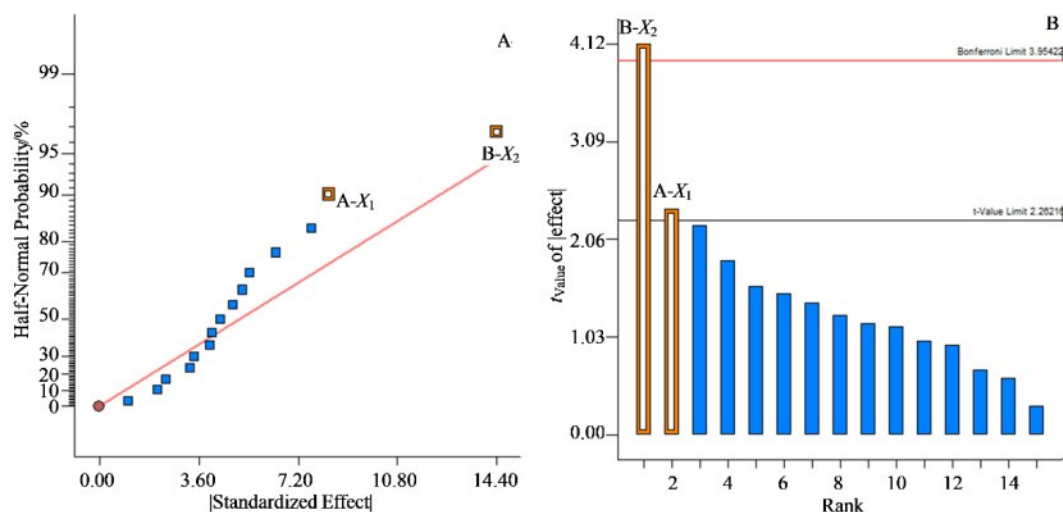


图3 各变量对LF-CNPs封装率影响的半正态图(A)和帕累托图(B)

Fig. 3 Half-normal plot (A) and pareto chart (B) of influence of various variables on encapsulation efficiency of LF-CNPs

表3 Box-Behnken实验设计中独立变量水平

Table 3 Level of independent variables in Box-Behnken experiment design

变量	水平		
	低(-1)	中(0)	高(+1)
X_1 :壳聚糖浓度/(mg·mL ⁻¹)	5	10	15
X_2 :STPP浓度/(mg·mL ⁻¹)	4	8	12
X_3 :搅拌速度/(r·min ⁻¹)	500	750	1 000

表4 实验设计及结果

Table 4 Results of Box-Behnken experiment design

编号	变量/(mg·mL ⁻¹)			响应值	
	X_1	X_2	X_3	Y_1 /nm	Y_2 /%
1	10	8	750	502.2	58.9
2	15	8	500	789.4	65.7
3	5	8	500	367.2	32.4
4	15	4	750	701.6	61.8
5	10	8	750	491.7	56.1
6	5	4	750	376.8	29.4
7	10	8	750	460.3	51.2
8	10	4	500	435.9	58.6
9	5	12	750	379.1	35.8
10	10	4	1 000	478.6	48.1
11	10	12	1 000	548.1	55.9
12	10	8	750	473.2	49.6
13	15	8	1 000	778.6	58.4
14	10	12	500	560.5	56.9
15	5	8	1 000	359.2	30.5
16	15	12	750	812.5	67.7
17	10	8	750	476.9	52.1

表5 X_1 、 X_2 和 X_3 对粒径分布(Y_1)影响的方差分析结果Table 5 ANOVA results of influence of X_1 , X_2 and X_3 on particle size distribution (Y_1) of LF-CNPs

来源	平方和	自由度	平均值	F值	P值	显著性
模型	363 100	9	40 342.29	92.32	<0.000 1	显著
X_1	319 900	1	319 900	732.11	<0.000 1	显著
X_2	11 804.16	1	11 804.16	27.01	0.001 3	显著
X_3	16.53	1	16.53	0.038	0.851 3	不显著
X_1X_2	2 948.49	1	2 948.49	6.75	0.035 6	显著
X_1X_3	1.96	1	1.96	0.045	0.948 5	不显著
X_2X_3	759.00	1	759.00	1.74	0.229 0	不显著
X_1^2	25 115.20	1	25 115.20	57.47	0.000 1	显著
X_2^2	372.64	1	372.64	0.85	0.386 5	不显著
X_3^2	1 012.56	1	1 012.56	2.32	0.171 8	不显著
残差	3 058.87	7	436.98	—	—	—
失拟项	1 988.90	3	662.97	2.48	0.200 6	不显著
纯误差	1 069.97	4	267.49	—	—	—
总和	366 100	16	—	—	—	—

和0.000 1,说明模型采用二次方程拟合较为适合;失拟项 P 值分别为0.200 6和0.922 9,均大于0.05,说明模型实测值与预测值之间不存在显著性差异,模型拟合可信度较高。通过软件生成的三维效应面图可以更为直观地分析变量因素与响应值之间的关系(图4、5)。

表5方差分析结果显示,壳聚糖质量浓度(X_1)和STPP质量浓度(X_2)对LF-CNPs的粒径分布具有显著影响($P<0.05$)。通过三维效应面图可知,壳聚糖质量浓度越高,制备的LF-CNPs的粒径越大,可能是由于壳聚糖质量溶液浓度增加,黏度增大,不利于

表6 X_1 、 X_2 和 X_3 对包封率(Y_2)影响的方差分析结果
Table 6 ANOVA results of influence of X_1 , X_2 and X_3 on encapsulation efficiency (Y_2) of LF-CN_s

来源	平方和	自由度	平均值	F值	P值	显著性
模型	2 281.54	9	253.50	27.29	0.000 1	显著
X_1	1 968.78	1	1 968.78	211.97	<0.000 1	显著
X_2	42.32	1	42.32	4.56	0.070 2	不显著
X_3	53.56	1	53.56	5.77	0.047 4	显著
X_1X_2	0.063	1	0.063	0.067	0.936 9	不显著
X_1X_3	7.29	1	7.29	0.78	0.405 1	不显著
X_2X_3	22.56	1	22.56	2.43	0.163 1	不显著
X_1^2	178.72	1	178.72	19.24	0.003 2	显著
X_2^2	10.91	1	10.91	1.18	0.314 3	不显著
X_3^2	0.42	1	0.42	0.045	0.838 1	不显著
残差	65.02	7	9.29	—	—	—
失拟项	6.67	3	2.22	0.15	0.922 9	不显著
纯误差	58.35	4	14.59	—	—	—
总和	2 346.55	16	—	—	—	—

纳米粒的粒径减小^[11];随着STPP质量浓度的增加,制备的LF-CN_s的粒径增大,这归因于STPP的质量

浓度增加,可更多地与壳聚糖链上 NH_3^+ 基团发生交联化反应,形成纳米粒的粒径较大^[12];搅拌速度(X_3)对LF-CN_s的粒径影响可以忽略不计。3个变量与粒径分布(Y_1)之间的二次多项式拟合方程为: $Y_1 = 507.65 - 322.31 X_1 - 30.48 X_2 - 0.25 X_3 + 135.75 X_1X_2 - 0.005 6 X_1X_3 - 0.14 X_2X_3 + 308.93 X_1^2 + 58.80 X_2^2 + 0.000 2 X_3^2$ ($R^2 = 0.991 6$)。

表6方差分析结果显示,壳聚糖质量浓度(X_1)与搅拌速度(X_3)对LF-CN_s的包封率有显著影响($P < 0.05$)。通过三维效应面图可知,随着壳聚糖质量浓度的增加,药物包封率增加,可能是由于壳聚糖质量浓度增高时,整个体系的黏度升高,药物更易于包裹在纳米粒中;搅拌速度提高会导致包封效率降低^[13]。3个变量与包封率(Y_2)之间的二次多项式拟合方程为: $Y_2 = 8.56 + 92.10 X_1 - 27.54 X_2 - 0.01 X_3 - 0.63 X_1X_2 - 0.01 X_1X_3 + 0.02 X_2X_3 - 26.06 X_1^2 + 10.06 X_2^2 - 0.000 005 X_3^2$ ($R^2 = 0.972 3$)。

2.4.4 优化和验证 以制备的粒径最小和包封率最大作为LF-CN_s制备目标,通过Design-Expert 10.1软件预测获得LF-CN_s的处方工艺设计空间,在设计空间内任选一点(壳聚糖质量浓度为10 mg/mL,

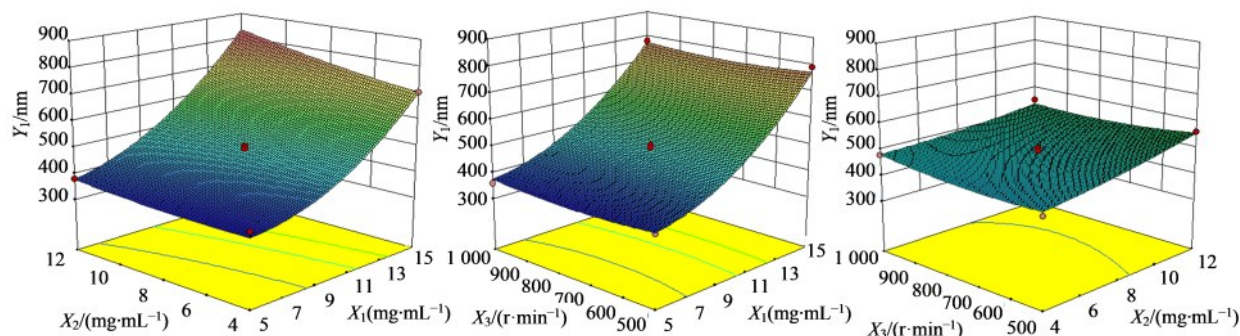


图4 壳聚糖质量浓度(X_1),STPP质量浓度(X_2)和搅拌速度(X_3)对LF-CN_s的粒径分布(Y_1)影响的三维效应面图
Fig. 4 Effect surface diagram of influence of chitosan concentration (X_1), STPP concentration (X_2) and stirring speed (X_3) on particle size distribution (Y_1) of LF-CN_s

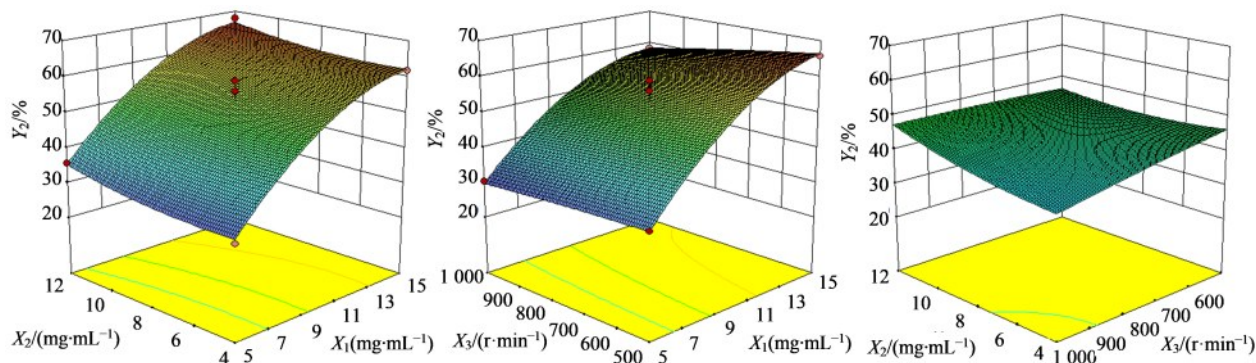


图5 壳聚糖质量浓度(X_1),STPP质量浓度(X_2)和搅拌速度(X_3)对LF-CN_s的包封率(Y_2)影响的三维效应面图
Fig. 5 Effect surface diagram of influence of chitosan concentration (X_1), STPP concentration (X_2) and stirring speed (X_3) on encapsulation efficiency (Y_2) of LF-CN_s

STPP质量浓度为6 mg/mL,搅拌速度为750 r/min,经软件预测得到的壳聚糖纳米粒的粒径470.3 nm,包封效率56.3%。按照该处方工艺连续制备3批LF-CNs,测定粒径与包封率的实验值分别为 (482.3 ± 21.5) nm和 $(55.9 \pm 1.1)\%$,粒径与预测值之间的误差为2.49%,包封率与预测值之间的误差为-0.7%,均较小。

2.5 粒度分布、 ζ 电位和微观形态

根据“2.4.4”项下优化得到的处方工艺制备LF-CNs,并取LF-CNs溶液0.25 mL用蒸馏水稀释10倍,通过Zetasizer Nano ZS 90动态激光粒度仪测定其粒径分布、聚合物分散性指数(PDI)和 ζ 电位,所有样品均测定3次,取平均值。另取LF-CNs溶液0.25 mL用蒸馏水稀释100倍,取1滴放在覆铜的格栅上,用20 mg/mL磷钨酸染色,滤纸吸取过量的水分,自然风干,在透射电子显微镜下观察LF-CNs的微观形态。

3批LF-CNs的粒径分布为 (479.6 ± 18.7) nm, PDI为 (0.194 ± 0.012) ,粒径小于1 μ m,可避免眼部给药引起不适感^[14]; ζ 电位为 (34.4 ± 1.9) mV,说明表面带有正电荷,这是因为壳聚糖纳米粒的表面氨基基团发生了质子化,其 ζ 电位值越大,越能够防止粒子之间聚集,物理稳定性越好^[15];另外,壳聚糖纳米粒表面所带的正电荷能够吸附到带负电荷的细菌表面,有利于增强抗菌活性^[16-17]。透射电镜显示LF-CNs呈圆球状,无聚集,分散性良好(图6)。

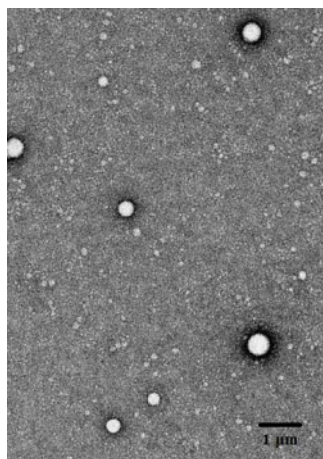


图6 LF-CNs的透射电镜照片

Fig. 6 Transmission electron micrograph of LF-CNs

2.6 体外释放研究

采用体外透析法考察LF-CNs和LF原料药的体外释放特性。将LF-CNs和LF水溶液分别装入处理好的透析袋中,绑紧两端。将透析袋浸入到人工泪

液^[18]的释放介质中,并以50 r/min的速度搅拌,在1、2、3、4、6、8、12 h取出2 mL释放介质(补加空白介质)经适当稀释后,HPLC法^[8]检测药物浓度,计算药物累计释放率。

LF-CNs和LF溶液的体外释放结果见图7,LF在2 h内药物已释放完全,达到 $(99.4 \pm 3.2)\%$ 。而LF-CNs显示出双相释放模式,初始阶段显示为突释,药物在2 h内释放量达到 $(43.9 \pm 2.6)\%$,此后表现为持续缓慢释放,最终在12 h内释放量达到 $(83.4 \pm 3.5)\%$ 。初始阶段显示为突释,这是由于游离的和吸附在壳聚糖纳米粒表面的LF释放,而后期出现缓释,这是由于壳聚糖纳米粒内部药物缓慢释放。

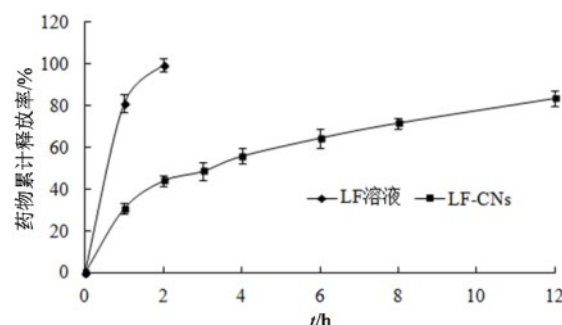


图7 LF-CNs和LF溶液在人工泪液中的药物释放曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Drug release profile of LF-CNs and LF solution in simulated artificial tears ($\bar{x} \pm s, n=6$)

释放数据分别采用零级、一级、Higuchi、Korsmeyer-Peppas方程拟合,探讨LF-CNs的释药机制,拟合方程中相关系数 R^2 越接近1表明拟合效果越好,拟合方程见表7。模型拟合结果显示,LF-CNs释药符合Korsmeyer-Peppas方程,说明LF-CNs中的药物的释放为扩散和溶蚀双重机制。

表7 不同释药模型拟合结果

Table 7 Fitting results of different release models

模型	拟合方程	R^2
零级方程	$y = 5.85 t + 23.44$	0.809 2
一级方程	$\ln(100 - y) = 0.14 t + 4.41$	0.971 0
Higuchi方程	$y = 0.26 t^{1/2} + 0.70$	0.900 6
Korsmeyer-Peppas方程	$\ln y = 0.39 \ln t + 3.46$	0.993 3

2.7 体外抑菌实验

采用抑菌实验评价LF-CNs对金黄色葡萄球菌的体外抗菌活性。取金黄色葡萄球菌(浓度均为 1×10^5 CFU/mL)混悬液100 μ L均匀接种到铺有培

培养基的表面皿中,放入到培养箱中培养24 h。在每份培养基上均取3个直径10 mm的小孔,分别加入空白壳聚糖纳米粒、LF原料药、LF-CN_s(LF原料药和LF-CN_s中LF含量相同,均为6 mg),做好标识,放到培养箱中培养24 h,用游标卡尺测定抑菌圈直径,取平均值。实验重复3次。

抑菌实验结果显示,空白壳聚糖纳米粒对金黄色葡萄球菌具有一定的抑菌效果,抑菌圈直径为 (11.9 ± 0.8) mm,而LF原料药和LF-CN_s抑菌效果均更明显,LF原料药的抑菌圈直径为 (15.3 ± 1.1) mm,LF-CN_s的抑菌圈直径为 (17.2 ± 0.6) mm,LF-CN_s对金黄色葡萄球菌产生的抑菌圈大于LF原料药,且差异显著($P < 0.05$)。结果见图8。结果表明,LF-CN_s可提高药物的抑菌活性,一方面可能由于LF-CN_s的粒径为纳米级,具有极大的比表面积,容易被细菌表面吸附,提高了药物与细菌的接触面积,增加了药物的抑菌活性;另一方面可能由于壳聚糖本身具有抑菌活性,将LF制备成壳聚糖纳米粒后达到了双重抑菌作用。

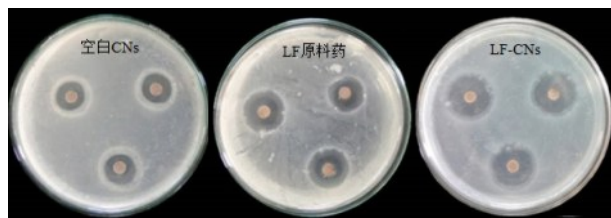


图8 空白壳聚糖纳米粒、LF原料药和LF-CN_s对金黄色葡萄球菌的抑菌圈

Fig. 8 Inhibition zone of blank chitosan nanoparticles, LF bulk drug and LF-CN_s against *Staphylococcus aureus*

3 讨论

壳聚糖(chitosan)是将天然多糖甲壳素脱乙酰化而得的阳离子多聚糖,具有良好的生物相容性^[19]和较强的生物黏附性^[20],可增强跨黏膜屏障的渗透性,并且延长药物与角膜的接触时间,提高药物的生物利用度^[21],更重要的是壳聚糖分子链中含有大量的NH₃⁺基团,能够与细菌表面带负电荷的基团产生静电作用,吸附在细菌的细胞壁上,破坏细胞壁的完整性,增加通透性,有助于增强抗菌活性。已有研究表明,将壳聚糖作为抗菌药物载体制备成壳聚糖载药纳米粒,可以提高抗菌药物的抑菌活性^[22]。因此,本研究选择壳聚糖作为载体材料将LF制备成壳聚糖纳米粒,并通过体外抑菌实验证实其抑菌效果优于其原料药。本研究制备的LF壳聚糖纳米粒,在眼部用药方面具有较大的应用价值,其能够有效地延长药物在感染处的作用持续时间,提

高抗菌活性。本研究可为LF的眼部用药提供一种新的用药途径,也对同类型药物的二次开发起到一定的借鉴作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 钱东生,朱卫忠,姚姝姮,等. 国产盐酸洛美沙星体内外抗菌作用实验研究[J]. 中国药理学通报, 1996, 12(1): 80-84.
Qian D S, Zhu W Z, Yao S H, et al. Studies of the antibacterial activities of domestic lomefloxacin chloride *in vitro* and *in vivo* [J]. Chin Pharmacol Bull, 1996, 12 (1): 80-84.
- [2] 朱人敏,何小平,邵海枫,等. 盐酸洛美沙星治疗呼吸道感染性细菌感染的临床研究[J]. 药学进展, 2001, 25(1): 47-50.
Zhu R M, He X P, Shao H F, et al. Lomefloxacin versus ciprofloxacin in acute respiratory bacterial infection [J]. Prog Pharm Sci, 2001, 25(1): 47-50.
- [3] 韦涛. 盐酸洛美沙星滴眼液治疗细菌感染性外眼疾病的临床疗效观察[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23 (12): 2994-2996.
Wei T. Clinical effect of lomefloxacin hydrochloride eye drops on treatment of bacterial infections of external eye diseases [J]. Chin J Nosocomiol, 2013, 23(12): 2994-2996.
- [4] 吴宏霞,林媚,石冬梅,等. 盐酸左氧氟沙星眼用纳米粒温敏凝胶的制备及体外释放考察[J]. 福建医科大学学报, 2018, 52(3): 158-163.
Wu H X, Lin M, Shi D M, et al. Preparation and *in vitro* release of levofloxacin hydrochloride ocular nanoparticles thermo-sensitive *in situ* gels [J]. J Fujian Med Univ, 2018, 52(3): 158-163.
- [5] Bin-Jumah M, Gilani S J, Jahangir M A, et al. Clarithromycin-loaded ocular chitosan nanoparticle: Formulation, optimization, characterization, ocular irritation, and antimicrobial activity [J]. Int J Nanomed, 2020, 15: 7861-7875.
- [6] Khalil I A, Saleh B, Ibrahim D M, et al. Ciprofloxacin-loaded bioadhesive hydrogels for ocular applications [J]. Biomater Sci, 2020, 8(18): 5196-5209.
- [7] Alruwaili N K, Zafar A, Imam S S, et al. Stimulus responsive ocular gentamycin-ferrying chitosan nanoparticles hydrogel: Formulation optimization, ocular safety and antibacterial assessment [J]. Int J Nanomed, 2020, 15: 4717-4737.
- [8] 孙春艳,赵亚萍,郭江红. HPLC法测定盐酸洛美沙星分散片含量及有关物质[J]. 中国药师, 2012, 15(9): 1262-

- 1264.
- Sun C Y, Zhao Y P, Guo J H. Determination of lomefloxacin and its related substances in lomefloxacin hydrochloride dispersible tablets by HPLC [J]. China Pharm, 2012, 15(9): 1262-1264.
- [9] 胡玉飘, 崔秀明, 张泽君, 等. 失效模式分析和星点设计-效应面法优化三七皂苷类成分纯化工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3009-3016.
- Hu Y P, Cui X M, Zhang Z J, et al. Optimization of purification process of saponins in steamed *Panax notoginseng* by failure mode and effects analysis and central composite design-response surface methodology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(13): 3009-3016.
- [10] Kiss E L, Berkó S, Gácsi A, et al. Development and characterization of potential ocular mucoadhesive nano lipid carriers using full factorial design [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(7): E682.
- [11] Shirsat A E, Chitlange S S. Application of quality by design approach to optimize process and formulation parameters of rizatriptan loaded chitosan nanoparticles [J]. J Adv Pharm Technol Res, 2015, 6(3): 88-96.
- [12] Gan Q, Wang T, Cochrane C, et al. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2005, 44(2/3): 65-73.
- [13] Saini D, Fazil M, Ali M M, et al. Formulation, development and optimization of raloxifene-loaded chitosan nanoparticles for treatment of osteoporosis [J]. Drug Deliv, 2015, 22(6): 823-836.
- [14] Tsai C H, Wang P Y, Lin I C, et al. Ocular drug delivery: Role of degradable polymeric nanocarriers for ophthalmic application [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): E2830.
- [15] 高菲, 刘莉. 酒石酸长春瑞滨壳聚糖纳米粒的制备及质量评价 [J]. 西北药学杂志, 2019, 34(2): 217-222.
- Gao F, Liu L. Preparation and quality evaluation of vinorelbine bitartrate-loaded chitosan nanoparticles [J]. Northwest Pharm J, 2019, 34(2): 217-222.
- [16] 薛金玲, 李健军, 白艳红, 等. 壳聚糖及其衍生物抗菌活性的研究进展 [J]. 高分子通报, 2017(11): 26-36.
- Xue J L, Li J J, Bai Y H, et al. Research development of chitosan and its derivatives in antibacterial activity [J]. Polym Bull, 2017(11): 26-36.
- [17] Marei N, Elwahy A H M, Salah T A, et al. Enhanced antibacterial activity of Egyptian local insects' chitosan-based nanoparticles loaded with ciprofloxacin-HCl [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 126: 262-272.
- [18] 徐颖, 张焱. 盐酸莫西沙星离子-温度双敏感眼用原位凝胶的研制 [J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(12): 1143-1146.
- Xu Y, Zhang Y. Preparation of moxifloxacin hydrochloride ion-temperature sensitive *in situ* ophthalmic gel [J]. Chin J Pharm, 2014, 45(12): 1143-1146.
- [19] Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(1): 3-11.
- [20] Luo Q H, Zhao J M, Zhang X R, et al. Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with Chitosan Oligosaccharides and its potential use in ocular drug delivery system [J]. Int J Pharm, 2011, 403(1/2): 185-191.
- [21] Ameenuzzafar, Alruwaili N K, Imam S S, et al. Formulation of chitosan polymeric vesicles of ciprofloxacin for ocular delivery: Box-behnken optimization, *in vitro* characterization, HET-CAM irritation, and antimicrobial assessment [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2020, 21(5): 167.
- [22] Yousry C, Elkheshen S A, El-Laithy H M, et al. Studying the influence of formulation and process variables on Vancomycin-loaded polymeric nanoparticles as potential carrier for enhanced ophthalmic delivery [J]. Eur J Pharm Sci, 2017, 100: 142-154.

[责任编辑 兰新新]