

# 载小檗碱硫酸钙缓释材料的制备与体外抑菌研究

李建亮<sup>1</sup> (通讯作者) 王佳<sup>1</sup> 姚兴彰<sup>1</sup> 张杰<sup>2</sup>

1 甘肃省中医院, 甘肃兰州, 730000;

2 甘肃中医药大学, 甘肃兰州, 730000;

**摘要:** 骨髓炎是一种治疗周期长、复发率高的骨感染性疾病, 术后局部持续抗感染仍是临床难点。硫酸钙作为可降解骨修复材料, 具有良好的药物负载与缓释潜力。本研究拟制备小檗碱-硫酸钙基缓释系统, 并对其体外释放行为及抑菌活性进行评价, 为骨感染局部治疗提供实验参考。方法: 采用混合法将小檗碱负载于硫酸钙载体中制备缓释材料。建立 HPLC 外标法测定胆小檗碱含量并对释放液进行长期监测 (2 - 60d)。同时采用琼脂扩散法观察其对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的体外抑菌效果。结果: 小檗碱在 240nm 检测波长下具有良好色谱响应, 标准曲线线性关系可靠 ( $R=0.99931$ )。体外释放结果显示该缓释体系呈现“早期释放逐渐增加—中期进入平台—后期维持稳定”的规律, 60d 时释放液中仍可检测到约 92 - 94 $\mu\text{g/mL}$  的小檗碱浓度。抑菌实验表明载药材料可形成稳定抑菌圈, 对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径为  $0.75\pm 0.07\text{cm}$ , 对大肠杆菌抑菌圈直径为  $1.18\pm 0.12\text{cm}$ , 具有一定体外抑菌活性。结论: 小檗碱-硫酸钙基缓释系统制备方法可行, 具有稳定缓释与抑菌作用, 为骨髓炎术后局部抗感染材料开发提供实验依据。

**关键词:** 小檗碱; 硫酸钙; 缓释材料; 骨髓炎; 体外释放; 抑菌活性

**DOI:** 10.69979/3029-2808.26.03.067

## 引言

骨髓炎是一类由细菌侵入骨组织及骨髓腔所引起的持续性感染性疾病, 其临床特点包括病程迁延、局部组织破坏严重以及复发率较高。常见致病菌以金黄色葡萄球菌为主, 同时大肠杆菌等革兰阴性菌亦可参与感染过程。由于骨组织血供相对有限, 感染灶局部药物浓度往往难以通过静脉或口服给药长期维持, 即使经过规范抗生素治疗, 仍可能出现感染控制不彻底、慢性复发甚至耐药菌产生等问题<sup>[1,3]</sup>。

目前, 骨髓炎的临床治疗通常采用“清创+抗生素”综合方案, 即通过手术清除坏死骨组织并辅以系统性抗菌药物。但在清创术后常遗留骨缺损或感染死腔, 而局部细菌生物膜的存在也显著增加了感染持续与复发风险<sup>[2,4]</sup>。因此, 开发可用于死腔填充并持续释放抗菌药物的局部缓释材料, 已成为骨感染治疗研究的重要方向<sup>[4]</sup>。

硫酸钙是一种应用较为成熟的生物可降解骨替代材料, 具有良好的生物相容性与成型性, 可在体内逐渐吸收并促进骨缺损修复。近年来, 抗生素负载硫酸钙被用于骨髓炎术后局部抗感染治疗, 并取得一定临床效果<sup>[5]</sup>。然而, 长期使用传统抗生素易引发耐药性问题及潜在毒副作用, 因此寻找安全性较高且具有抗菌活性的天然药物替代物具有重要意义。

小檗碱是一种从黄连、黄柏等中药中提取的天然异

喹啉类生物碱, 研究表明其具有广谱抗菌、抗炎及免疫调节作用, 对革兰阳性菌及阴性菌均表现出一定抑制活性<sup>[2]</sup>。此外, 小檗碱可能通过干扰细菌黏附、生物膜形成等途径发挥抗感染作用, 因此在骨感染局部治疗材料中具有潜在应用价值。

基于此, 本研究以硫酸钙为载体, 构建小檗碱-硫酸钙基缓释系统, 采用 HPLC 方法对其体外释放行为进行长期监测, 并通过抑菌圈实验评价其体外抗菌效果, 以期骨髓炎术后局部抗感染缓释材料的开发提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

实验用小檗碱标准品购自正规试剂公司, 硫酸钙粉末为医用级材料。PBS 缓冲液、LB 培养基及琼脂粉均为分析纯试剂。实验菌株选用金黄色葡萄球菌及大肠杆菌标准菌株, 用于体外抑菌活性评价。

### 1.2 小檗碱-硫酸钙缓释材料制备

采用混合法制备载药硫酸钙缓释系统。具体步骤如下: 称取一定量硫酸钙粉末与小檗碱药物粉末, 置于无菌培养皿中充分混合均匀; 随后加入适量无菌蒸馏水调制成均匀糊状物。将混合物迅速灌注于预先制备的模具中, 室温条件下固化成型, 待材料完全硬化后脱模。所

得载药硫酸钙药棒置于干燥环境保存备用。该方法操作简便、重复性较好，适用于硫酸钙类载药缓释材料的制备。

### 1.3 HPLC 检测条件与标准曲线建立

采用高效液相色谱法测定胆小檗碱含量。检测波长为 240nm，小檗碱在色谱条件下保留时间稳定于约 5.86 min，峰形对称，杂峰干扰较少。

采用外标法进行定量分析。配置不同浓度小檗碱标准溶液，进样测定峰面积并绘制标准曲线。回归方程线性关系良好，相关系数 R=0.99931，提示方法具有较高可靠性，可用于释放液样品中小檗碱含量测定。

### 1.4 体外释放实验

将制备完成的载药硫酸钙材料置于一定体积 PBS 溶液中，于 37℃ 恒温振荡培养模拟体液环境。分别在 2、4、6、8、10、20、30、45 及 60 天取样，收集释放液并采用 HPLC 测定胆小檗碱浓度。每个时间点设置 6 个平行样品，结果以均值±标准差表示。

### 1.5 体外抑菌实验

采用琼脂扩散法评价缓释材料的抑菌活性。将菌液均匀涂布于 LB 琼脂平板，菌液浓度约为  $5 \times 10^3$  PFU。随

后将载药材料置于平板中心，37℃ 倒置培养 24h。培养结束后测量材料周围抑菌圈直径，并计算均值±标准差。

## 2 结果

### 2.1 方法学评价

HPLC 检测结果显示，小檗碱标准品色谱峰峰形良好，保留时间稳定在 5.86min 左右，空白对照在相应保留时间处无明显杂峰干扰，表明该方法具有较好的专属性。

外标法标准曲线相关系数 R=0.99931，线性范围覆盖本研究释放样品浓度区间，说明该检测方法适用于缓释体系释放液中小檗碱含量的准确测定。

### 2.2 体外释放结果分析

不同时间点释放液检测结果表明，小檗碱-硫酸钙缓释系统具有明显的持续释放特征。释放浓度在早期阶段逐渐升高，d2 时浓度约 39.63μg/mL，提示材料存在一定初期释放效应；随后在 d4 - d6 阶段释放量明显增加，并于 d8 - d20 进入相对稳定的平台期，浓度维持在 90 - 98μg/mL 范围内（表 1）。

值得注意的是，释放实验持续观察至 60d 后，释放液中仍可检测到 92μg/mL 以上的小檗碱浓度，表明该体系具有较好的超长期缓释性能，可满足骨感染局部持续给药需求（图 1）。

表 1 不同时间点释放液中小檗碱浓度

名称	检测浓度[ug/mL]								
	d2	d4	d6	d8	d10	d20	d30	d45	d60
1	41.78	63.78	92.38	96.70	94.67	98.69	96.31	102.17	94.05
2	37.55	58.33	91.45	94.68	92.58	98.52	93.68	98.00	92.27
3	39.41	59.69	90.65	93.88	91.64	96.64	94.56	94.87	92.20
4	39.28	60.22	90.07	93.83	90.73	97.43	96.58	92.80	93.28
5	40.75	62.82	91.84	95.43	88.25	96.80	92.56	95.77	90.85
6	39.03	58.87	93.26	95.26	91.60	98.42	95.49	99.23	92.90
Mean	39.63	60.62	91.61	94.96	91.58	97.75	94.86	97.14	92.59
SD	1.47	2.20	1.16	1.08	2.12	0.91	1.56	3.35	1.10

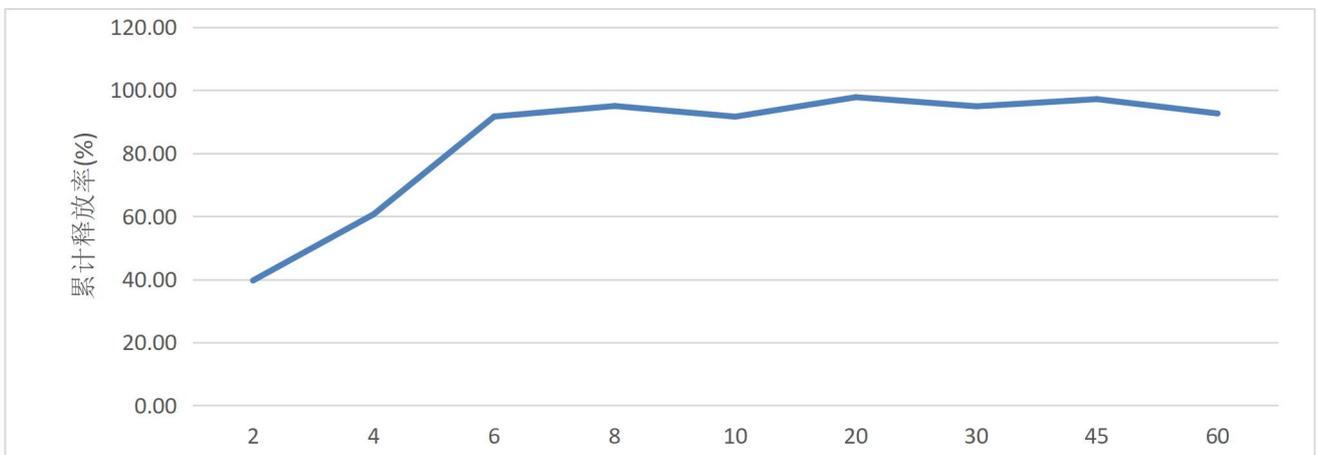


图 1 载小檗碱硫酸钙累计浓度释放曲线图

## 2.3 体外抑菌活性结果

琼脂扩散实验显示,载药硫酸钙材料周围可形成较为清晰的抑菌圈,表明小檗碱在材料中释放后仍保持一定抗菌作用。其中对大肠杆菌的抑菌圈略大于金黄色葡萄球菌,提示其对革兰阴性菌亦有一定抑制效果(表2)。

表2 两种菌株抑菌圈直径 (Mean±SD)

菌株	抑菌圈直径(cm)
金黄色葡萄球菌	0.75±0.07
大肠杆菌	1.18±0.12

## 3 讨论

本研究以硫酸钙为载体构建小檗碱缓释系统,并对其体外释放行为及抑菌活性进行了评价。结果表明,该体系具有较好的长期释放性能,并在体外实验中表现出一定抗菌活性。首先,从释放结果来看,小檗碱在硫酸钙载体中呈现典型的缓释规律,60d后仍可检测到较高浓度,说明该体系具有持续供药能力。骨髓炎治疗往往需要数周甚至数月的抗感染药物暴露才能有效抑制病灶内细菌残留<sup>[1,2]</sup>,因此长期释放特征具有重要临床意义。

其次,硫酸钙作为载体材料具有可降解性和局部填充优势,可用于骨髓炎清创术后的死腔管理,并在降解过程中释放负载药物<sup>[3-5]</sup>。与传统全身给药相比,局部缓释体系能够提高感染灶药物浓度并降低全身毒副作用风险<sup>[2,4]</sup>。

抑菌实验表明小檗碱在硫酸钙材料中仍保持一定抗菌活性,对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌均形成抑菌圈。小檗碱的作用机制可能不仅限于直接抑菌,还可能通过影响细菌黏附及生物膜形成发挥作用<sup>[2,5]</sup>。因此,该体系未来可考虑作为抗生素治疗的辅助方案,以降低耐药风险。

本研究仍存在一定局限性,例如仅进行了体外实验评价,尚未建立动物骨髓炎模型验证体内疗效;同时释放动力学模型尚未进一步拟合分析。后续研究可进一步优化药物负载比例,并结合体内实验开展深入验证。

综上所述,本研究构建的小檗碱-硫酸钙缓释系统在骨感染局部治疗方面具有一定研究价值和应用潜力。

## 4 结论

本研究成功制备了小檗碱负载硫酸钙基缓释系统,HPLC方法学可靠,材料能够实现持续释放60d以上,并在体外表现出一定抑菌活性。该体系兼具良好的局部长期给药能力与天然抗菌成分优势,为骨髓炎术后局部缓释抗感染治疗提供了实验基础。未来可通过动物实验及动力学研究进一步推动其临床转化。

## 参考文献

- [1] Zimmerli W. Clinical practice. Vertebral osteomyelitis[J]. New England Journal of Medicine, 2010, 362(11): 1022 - 1029.
- [2] Lew D P, Waldvogel F A. Osteomyelitis[J]. The Lancet, 2004, 364(9431): 369 - 379.
- [3] Ferguson J Y, Dudareva M, Riley N D, et al. The use of a biodegradable antibiotic-loaded calcium sulphate carrier containing tobramycin for the treatment of chronic osteomyelitis[J]. Bone & Joint Journal, 2014, 96-B(6): 829 - 836.
- [4] McNally M A, Ferguson J Y, Lau A C K, et al. Single-stage treatment of chronic osteomyelitis with an absorbable gentamicin-loaded calcium sulphate/hydroxyapatite biocomposite[J]. Bone & Joint Journal, 2016, 98-B(9): 1289 - 1296.
- [5] Wahl P, Guidi M, Benninger E, et al. The local use of antibiotics in the treatment of bone infections: current concepts[J]. European Journal of Trauma and Emergency Surgery, 2011, 37(1): 1 - 10.

作者简介:李建亮(1983.04-),男,汉族,山西太原人,硕士,主治医师,研究方向:中医药对骨关节疾病的防治。

基金项目:2021年的甘肃省中医药项目“骨髓炎治疗载小檗碱硫酸钙基缓释系统的制备及体外抑制菌活性的实验研究”;编号:GZKP-2020-21;