

一种氧化海藻酸钠基温敏凝胶的制备与性能*

吴年强 潘春跃** 张报进 饶燕平 于 典

(中南大学化学化工学院功能有机高分子研究所 长沙 410083)

摘 要 合成出一种具有温敏特性的多官能团的大分子聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-丙烯酸甲酯-丙烯酰胺)(PNMH),用它交联氧化的海藻酸钠(OSA),得到可生物降解的温敏凝胶 PNMH-OSA. 分别以凝胶的透光率随温度变化和凝胶在磷酸盐缓冲液(PBS)中的溶胀比随时间变化来考察凝胶的温敏性能和降解性能,并采用傅立叶变换红外光谱(FTIR)和激光共焦拉曼光谱(LCRS)对样品进行了表征. 结果表明,PNMH-OSA 凝胶是通过 PNMH 上的 $-NHNH_2$ 和 OSA 上的 $-CHO$ 反应生成 $C=N$ 键而形成的化学交联凝胶. 随着凝胶中 PNMH 量的增加,PNMH-OSA 凝胶的温敏性增强,降解时间延长. 温敏组分的含量对 PNMH-OSA 凝胶的溶胀和降解性能与温度的关系影响显著.

关键词 凝胶,海藻酸钠,温敏性,降解

温敏凝胶由于在最低临界溶解温度(LCST)下会发生体积相变,是具有良好的应用前景的药物控制释放载体材料. 近年来,一些学者尝试在可降解材料中引入温敏结构单元来制备可降解的温敏凝胶^[1~5],但所报道的凝胶只能部分降解或在特定的酶作用下降解. 海藻酸钠(SA)具有良好的生物相容性,在药物释放体系和组织工程领域应用广泛^[6,7]. 可用二价正离子(如 Ca^{2+})交联 SA 形成离子型凝胶^[8],但离子交联型 SA 凝胶的降解产物相对分子质量较高,且二价正离子容易流失,因而凝胶降解不易控制且降解产物难以完全排出体外^[9]. Mooney 等^[9,10]将 SA 部分氧化,然后用二官能团的小分子己二酰肼交联得到部分氧化的海藻酸钠(OSA)凝胶,发现部分氧化使其相对分子质量减小,降解产物易排出体外,且采用多官能团的大分子交联剂可以明显改善凝胶的机械性能^[11]. 为此,本文合成了一种具有温敏特性和交联作用的大分子聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-丙烯酸甲酯-丙烯酰胺)(PNMH),将其与 OSA 交联制备了不需酶的作用便可完全降解的温敏凝胶 PNMH-OSA.

1 实验部分

1.1 主要试剂

N-异丙基丙烯酰胺(NIPAm),东京化成工业株式会社,正己烷中重结晶提纯;海藻酸钠(SA),CP,中国医药集团上海化学试剂公司;丙烯酸甲酯(MA),AR,天津市化学试剂研究所;联胺溶液

(85 wt%),AR,扬中县化剂厂;高碘酸钠,AR,汕头市西陇化工厂;偶氮二异丁腈(AIBN),CP,上海试剂四厂,经重结晶后使用.

1.2 PNMH 的合成

按摩尔比 80:20:1 将单体 NIPA、MA 和引发剂 AIBN 溶于乙醇,70℃下反应 12 h 后将温度升高到 83℃,搅拌,并开始滴加联胺溶液(联胺的摩尔数为 MA 的 5 倍),8 h 后停止反应,除去溶剂. 所得产物在热水中浸泡一天,并每隔 2 h 换一次水. 产物干燥至恒重. 产率为 71.6%.

1.3 海藻酸钠的氧化与 PNMH-OSA 凝胶的制备

参考文献[12],将 3 g 海藻酸钠分散在 20 mL 乙醇中,加入 25 mL 0.4 mol/L 的 $NaIO_4$ 溶液,搅拌,室温下避光反应 12 h. 产物经抽滤后用水/乙醇(1:1, V/V)溶液洗涤 5 次,得氧化的海藻酸钠. 产率为 81%.

室温下将不同质量配比的 OSA 和 PNMH 共 0.4 g 分别用蒸馏水溶解,保持总用水量为 4 mL,混合,搅拌均匀后,静置 2 h,得到 PNMH-OSA 凝胶(含水量为 90.9%).

1.4 测试与表征

1.4.1 大分子 PNMH 取代度测定 PNMH 的取代度(DS)用参加取代反应的联胺摩尔数 n_1 与聚合反应所用单体 MA 的摩尔数 n_2 的比表示:

$$DS(\%) = \frac{n_1}{n_2} \times 100\%$$

收集 PNMH 的浸泡液,取 1 mL 稀释后的溶液与对

二甲氨基苯甲醛溶液反应显色,用 UV755B 型分光光度计在 460 nm 处测其吸光度,计算可得参加取代反应的联胺摩尔数 n_1 .

1.4.2 海藻酸钠氧化程度测定 取 1 mL 反应后未经水/乙醇溶液洗涤的 OSA 分散液,用 NaHCO_3 溶液调节 pH 值至 7.0,再加 KI 溶液避光反应 15 min,以淀粉为指示剂,用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液进行滴定^[10],计算得消耗的 NaIO_4 摩尔数 n . 按下式计算 SA 的氧化程度(DO)^[13]:

$$\text{DO}(\%) = \frac{198n}{m} \times 100\%$$

式中, m 为 SA 的质量(g),198 为 SA 重复单元的相对分子质量(g/mol).

1.4.3 样品透光率 T 的测定 用 721 型分光光度计在 450 nm 处测定不同温度下 PNMH 溶液的透光率. 将不同质量配比的 OSA 和 PNMH 分别用蒸馏水溶解,混合均匀后倒入到比色皿中形成凝胶,在 500 nm 处测定不同温度下 PNMH-OSA 凝胶样品的透光率.

1.4.4 凝胶的溶胀曲线 测定方法参照文献[14],将含水量为 90.9% 的 PNMH-OSA 凝胶制成柱状(Φ 6.5 mm $\times$ 6 mm),称重 m_0 ,将其置入 pH = 7.4 的 PBS 缓冲液(17.92 g Na_2HPO_4 、5.37 g

NaH_2PO_4 和 9 g NaCl 配成 1 L 0.1 mol/L 溶液)中,37°C 下隔一定时间 t (h) 取出称重 m_t ,得溶胀比 $\text{SR} = m_t/m_0$,以 SR 对 $\lg t$ 作图得溶胀曲线.

1.4.5 FTIR 和 LCRS 测定 将样品干燥后磨成粉末,经 KBr 压片后用 Avatar370 红外光谱仪测定样品的 FTIR 谱图,用 Labram-010 激光共焦拉曼光谱仪测定样品的 LCRS 谱图.

2 结果与讨论

2.1 PNMH-OSA 凝胶的合成和表征

PNMH-OSA 凝胶的合成路线见图 1. 首先, NIPA 和 MA 共聚形成直线型大分子,再用联胺取代共聚物链段上的甲氧基,得到带有许多 $-\text{NHNH}_2$ 官能团的大分子 PNMH. 海藻酸钠是由 β -1,4-D-甘露糖醛酸(M) 和 α -1,4-L-古罗糖醛酸(G)单元组成的线性聚合物,其中 G 单元上相邻的两个 $-\text{OH}$ 易被氧化成 $-\text{CHO}$ ^[9~11],用 NaIO_4 氧化 SA 得到部分氧化的 OSA(参见图 1b). 然后大分子 PNMH 与 OSA 反应, $-\text{NHNH}_2$ 与 $-\text{CHO}$ 脱水形成席夫碱(见图 1c),由于交联反应的发生而形成 PNMH-OSA 凝胶.

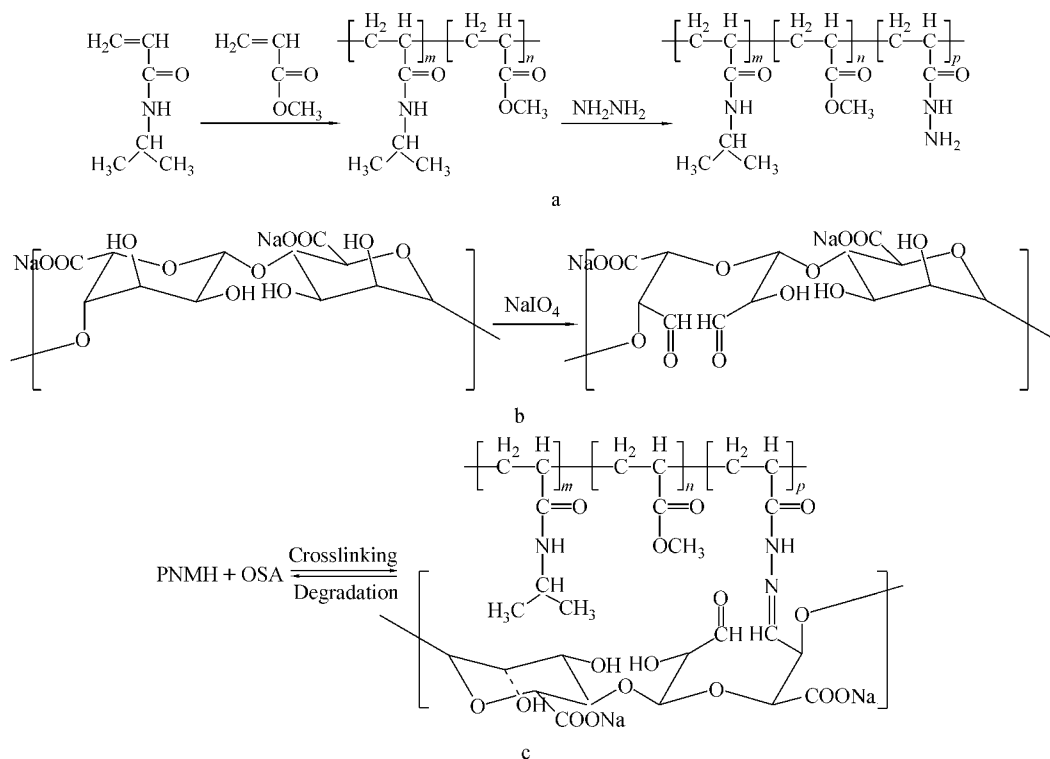


Fig. 1 Synthesis of macromolecule PNMH (a), oxidation of sodium alginate (b) and preparation of hydrogel (c)

按实验部分所述条件制备的大分子 PNMH 的取代度为 75.8%，OSA 的氧化程度为 64.3%。大分子 PNMH 和 PNMH-OSA 凝胶的红外光谱图见图 2。图 2(a) 中 3506.13 cm^{-1} 和 3429.00 cm^{-1} 处为 —NH_2 上 N—H 的伸缩振动峰， 3303.57 cm^{-1} 处为 N—H 上 N—H 的伸缩振动峰， 3077.27 cm^{-1} 处为次强酰胺带的倍频伸缩振动峰， 2974.47 、 2927.56 、 2876.64 cm^{-1} 处为甲基、亚甲基及次甲基上 C—H 伸缩振动峰， 1743.00 、 1652.63 cm^{-1} 处分别为酯基和酰胺基上羰基的伸缩振动峰，可知 PNMH 的侧链主要由 $\text{—CONHCH(CH}_3)_2$ 、 —CONHNH_2 和 —COOCH_3 基团构成。PNMH 与 OSA 反应所形成凝胶的红外谱图见图 2(b)，与图 2(a) 比较可知，其中 3506.13 cm^{-1} 和 3429.00 cm^{-1} 处的峰消失，表明 —NHNH_2 基团参与了反应。

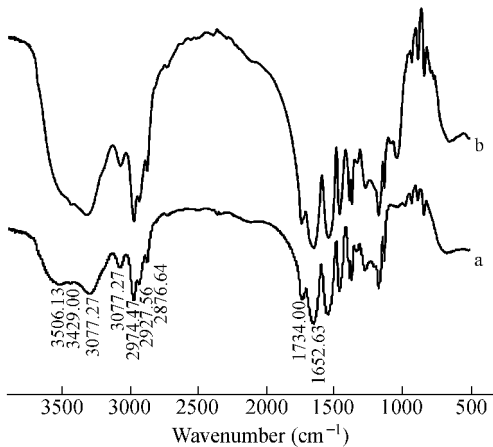


Fig. 2 FTIR spectra of the macromolecule PNMH (a) and hydrogel (b)

图 3 为 PNMH-OSA 凝胶的拉曼光谱图。 2981.0 、 2932.3 、 2883.9 cm^{-1} 处为甲基、亚甲基及次甲基上 C—H 的伸缩振动峰， 1459.6 cm^{-1} 处为 —COO— 的扭转振动峰， 1167.9 cm^{-1} 处为 C—N 的伸缩振动峰， 955.5 cm^{-1} 和 848.5 cm^{-1} 处分别为 C—O—C 的反对称和对称伸缩振动峰， 1643.3 cm^{-1} 处为 C=N 的伸缩振动峰。LCRS 分析表明，PNMH 与 OSA 反应所得凝胶中形成了 C=N 键。

由 IR 和 LCRS 分析结果表明，PNMH 与 OSA 发生了化学交联反应，PNMH 上的 —NHNH_2 和 OSA 上的 —CHO 反应生成 C=N 键。实验中还发现，PNMH-OSA 凝胶在升温或降温过程中仍保持凝胶状态，并且将与 OSA 溶液相同浓度的 SA 溶液和 PNMH 溶液混合后不能形成凝胶，这说明 PNMH-OSA 凝胶主要是化学交联凝胶。

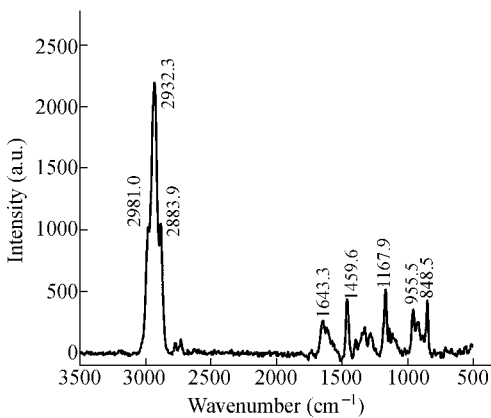


Fig. 3 LCRS spectra of the hydrogel

2.2 大分子 PNMH 和 PNMH-OSA 凝胶的温敏性能

温敏凝胶发生体积相变时其透光性能会发生明显变化，因此可以通过考察透光率随温度的变化来分析凝胶的温敏性能^[15]。0.5% 的 PNMH 溶液的透光率随温度的变化见图 4，升温至 33°C 时 PNMH 溶液的透光率出现急剧下降，此时溶液由澄清变浑浊。可以由此确定 PNMH 溶液的 LCST 为 33°C 。当温度低于 LCST 时，PNMH 上的联胺基、亚胺基及羰基能与水分子形成氢键，PNMH 大分子可溶解于水中得到澄清溶液；当温度超过 LCST 以后，氢键遭到破坏，由于 PNMH 上碳碳主链、异丙基和酯基的疏水作用而使大分子链构象向球团型转变^[16]，大分子收缩与水发生相分离而使溶液变浑浊和透光率下降。

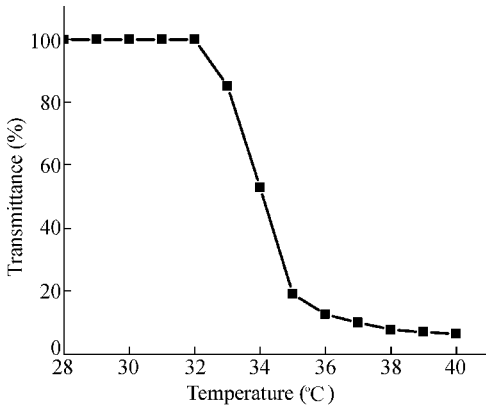


Fig. 4 The change of transmittance of PNMH solution at different temperature

不同配比的 PNMH-OSA 凝胶的透光率比 T/T_0 与温度的关系见图 5 (T_0 为 25°C 下的透光率)。在 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 温度区间内 PNMH-OSA 凝胶的透光率发生突变，可知将具有温敏特性的大分子

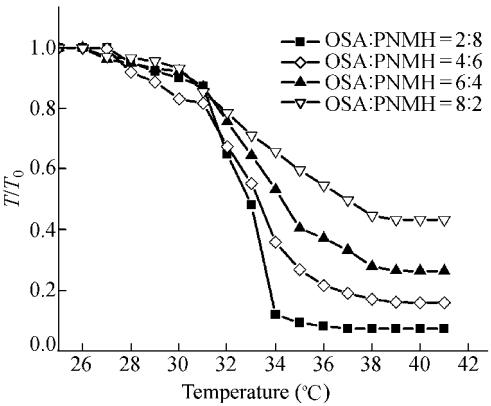


Fig. 5 The thermo-sensitive curve of gels with different weight ratios

PNMH 与 OSA 交联形成的 PNMH-OSA 凝胶同样具有温敏特性.随着 OSA 与 PNMH 质量比的增大,PNMH-OSA 凝胶的透光率突变的温度区间变宽,透光率的变化减小,即 PNMH-OSA 凝胶的温敏性减弱.表明增大凝胶中 PNMH 的比例,有利于提高 PNMH-OSA 凝胶的温敏性能.

2.3 PNMH-OSA 凝胶的降解性能

将 PNMH-OSA 凝胶置于 PBS 缓冲液中,在凝胶溶胀的同时(溶胀比 SR 增大),由于水解作用

使交联键 $C=N$ 断裂^[9],PNMH-OSA 凝胶变为 PNMH 和 OSA 而使凝胶结构破坏,即凝胶发生降解(溶胀比减小).因而可以通过测定 PBS 缓冲液中凝胶溶胀曲线来分析凝胶的降解性能^[14],将 PNMH-OSA 凝胶的溶胀比 SR 降为 0 的时间记为凝胶的完全降解时间.

2.3.1 组分配比对 PNMH-OSA 凝胶降解性能的影响 PNMH-OSA 凝胶的降解速率主要决定于凝胶的交联程度,另外也与降解产物的亲水性和扩散性能有关.由图 6 可知,随着 PNMH-OSA 凝胶

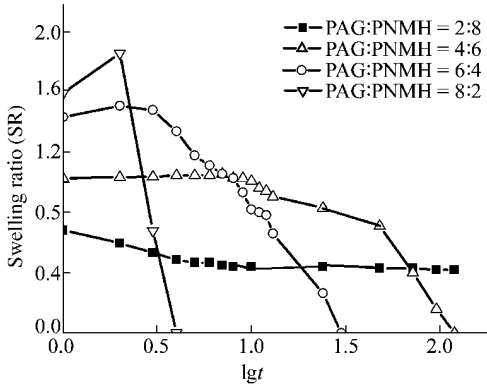


Fig. 6 The swelling curve of gels with different weight ratios at 37°C

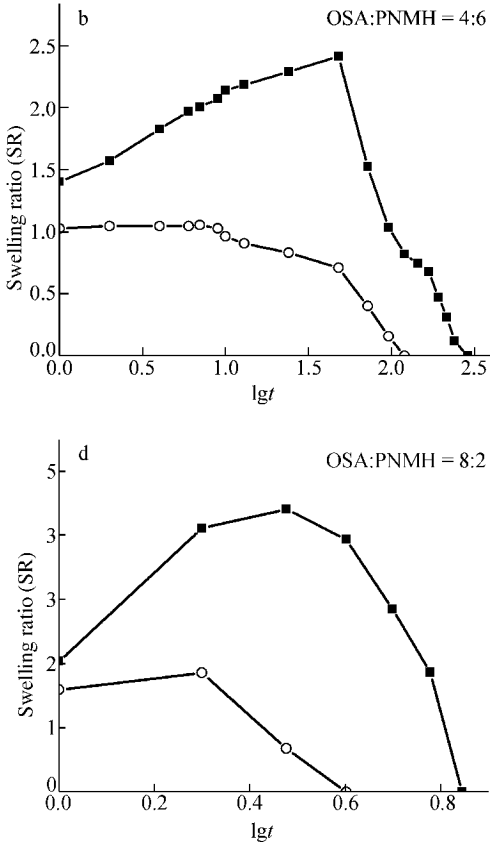
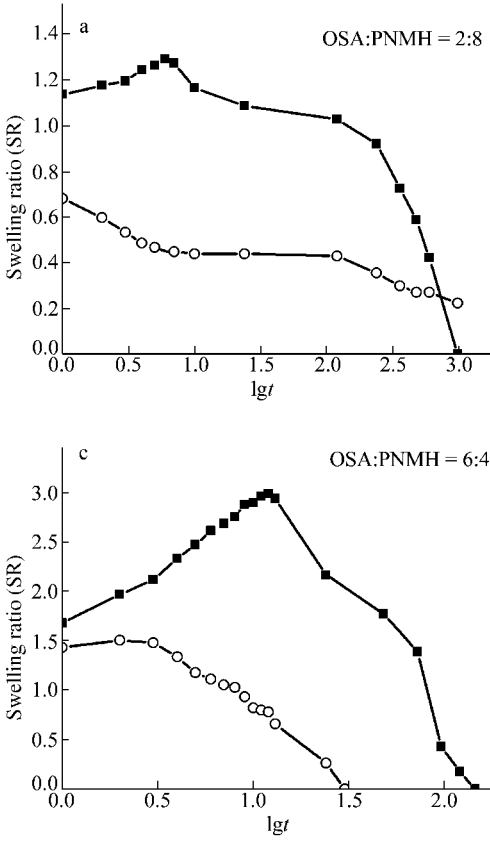


Fig. 7 The swelling curve of gels with different weight ratios at 25°C (■) and 37°C (○)

中 PNMH 量的增加,凝胶降解时间变长.这是因为随 PNMH 量的增加,起交联作用的官能团—NHNH₂数目增加,凝胶的交联程度增大,因而凝胶降解速率降低.另外,PNMH-OSA 凝胶的降解产物为 OSA 和 PNMH,随着凝胶中 PNMH 量的增加,亲水性强且易于扩散的降解产物 OSA 减少,这样也使 PNMH-OSA 凝胶的降解速率降低.

2.3.2 温度对降解性能的影响 图 7 为 4 种不同质量配比的 PNMH-OSA 凝胶样品在 25℃ 和 37℃ 下的溶胀曲线.由图 7 可知,PNMH-OSA 凝胶的溶胀比先增大后减少,最后完全降解(SR 变为 0)且 37℃ 下完全降解所需时间明显低于 25℃ 下完全降解所需时间,即凝胶在 37℃ 下更易降解.但 $m_{\text{OSA}}:m_{\text{PNMH}} = 2:8$ 的 PNMH-OSA 凝胶样品其溶胀和降解情况比较特殊,在 37℃ 下其溶胀曲线未观察到溶胀比增大现象,且 41 天后凝胶在 25℃ 下可完全降解,而在 37℃ 下还没有完全降解.

因为凝胶溶胀与降解是同时进行的,初始阶段以溶胀为主,因而 PNMH-OSA 凝胶样品在 PBS 缓冲液中的溶胀比增大.随着时间的增长,凝胶的

降解逐渐成为主要过程,因而其溶胀比减小. PNMH-OSA 凝胶在 37℃ 下比 25℃ 下更易降解,推测其原因可能与 PNMH 链段收缩所引起的应力作用和凝胶降解产物的扩散速率有关.因为 PNMH 在 37℃ 下疏水作用较强,链段收缩(PNMH 具有热缩温敏特性),收缩应力使 PNMH-OSA 凝胶中交联点处的 C=N 键容易断裂;另外,37℃ 下降解产物 OSA 的扩散速率较快,因而 PNMH-OSA 凝胶在 37℃ 下更易降解.对于 $m_{\text{OSA}}:m_{\text{PNMH}} = 2:8$ 的 PNMH-OSA 凝胶,凝胶中温敏成分 PNMH 的量很大,由于 PNMH 的热缩温敏特性使该 PNMH-OSA 凝胶样品在 37℃ 下处于退胀状态(其余 3 种凝胶样品在 37℃ 下仍处于热胀状态),初始阶段凝胶的溶胀比减小;由于凝胶退胀(凝胶收缩使水排出),水进攻凝胶内部的交联键 C=N 变得困难,水解作用减弱,且凝胶收缩使其网络的孔径变小,降解产物难以从凝胶内扩散进入溶液,这样就使该凝胶在 37℃ 下降解困难,降解速率明显降低.这说明温敏组分的含量对可降解温敏凝胶的溶胀和降解性能影响显著.

REFERENCES

- Zhang X Z, Wu D Q, Sun G M, Chu C C. *Macromol Biosci*, 2003, 3: 87 ~ 91
- Yoshida T, Aoyagi T, Kokufuta E, Okano T. *J Polym Sci Part A*, 2003, 41: 779 ~ 787
- Huang X, Lowe T L. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 2131 ~ 2139
- Lee J B, Yoon J J, Lee D S, Park T G. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004, 15: 1571 ~ 1583
- Zhang Ying(张颖), Ding Jiandong(丁建东). *Acta Polymeric Sinica(高分子学报)*, 2005, (6): 919 ~ 923
- Glicklis R, Shapiro L, Aghara R, Merchuk J C, Cohen S. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 67: 344 ~ 353
- Lee K Y, Peters M C, Mooney D J. *J Control Release*, 2003, 87: 49 ~ 56
- Zhang Hanwei(张汉威), Cai Qing(蔡晴), Bei Jianzhong(贝建中), Wang Shenguo(王身国). *Acta Polymeric Sinica(高分子学报)*, 2004, (6): 454 ~ 457
- Lee K Y, Bouhadir K H, Mooney D J. *Macromolecules*, 2000, 33: 97 ~ 101
- Bouhadir K H, Hausman B S, Mooney D J. *Polymer*, 1999, 40: 3575 ~ 3584
- Lee K Y, Bouhadir K H, Mooney D J. *Biomaterials*, 2004, 25: 2461 ~ 2466
- Balakrishnan B, Jayakrishnan A. *Biomaterials*, 2005, 26: 3941 ~ 3951
- He Shulan(何淑兰), Zhang Min(张敏), Di Zhanjie(耿占杰), Yin Yuji(尹玉姬), Yao Kangde(姚康德). *Chinese Journal of Applied Chemistry(应用化学)*, 2005, (9): 1007 ~ 1011
- Cadee J A, Groot C J, Jiskoot W, Otter W, Hennink W E. *J Contr Rel*, 2002, 78: 1 ~ 13
- Cai Hong(蔡红), Zhang Zhengpu(张政朴), Sun Pingchuan(孙平川), ZhangYangeng(张砚耕), He Binglin(何炳林). *Acta Polymeric Sinica(高分子学报)*, 2005, (5): 709 ~ 713
- Wang X, Qiu X, Wu C. *Macromolecules*, 1998, 31: 2972 ~ 2976

PREPARATION AND PROPERTIES OF A THERMO-SENSITIVE HYDROGEL BASED ON OXIDIZED SODIUM ALGINATE

WU Nianqiang, PAN Chunyue, ZHANG Baojin, RAO Yanping, YU Dian

(Institute of Functional Polymer and Organic Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083)

Abstract A multifunctional macromolecule poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-methacrylate-*co*-hydrazide) (PNMH) was prepared and used to cross-link oxidized sodium alginate (OSA) to form biodegradable and thermosensitive gels. Thermo-sensitivity and degradable properties of the gels were evaluated by measuring the transmittance at different temperatures and the time dependence of the swelling ratio in phosphate buffered saline, respectively. FTIR and LCRS were applied to characterize the samples. It is showed that gels are cross-linked by the forming of C=N bonds. The macromolecule PNMH shows thermo-sensitivity. With increasing PNMH content, the thermo-sensitivity of gels is improved, and degradation time of gels becomes longer. In addition, the PNMH content has great effect on the temperation dependence of swelling and degradation of hydroels.

Key words Hydrogel, Sodium alginate, Thermo-sensitivity, Degradation