

光响应和光交联型多糖基水凝胶的研究

摘 要

近年来,环境敏感性聚合物水凝胶的设计合成与应用研究十分活跃,尤其以光敏感性聚合物水凝胶的研究最受人们瞩目。由于光源安全、清洁、易于使用和控制,与其它环境敏感性聚合物水凝胶相比,光敏感性聚合物水凝胶在化学传感器、记忆元件开关、药物控释、固定化酶、组织工程等领域具有更广阔的应用前景。

多糖来源广泛,具有优良的生物相容性、生物可降解性和无毒性,被认为是一种非常理想的生物医药材料。本论文以天然多糖为基本原料,设计合成了光响应型聚合物水凝胶及光交联型聚合物水凝胶,对所得水凝胶的溶胀性能、力学性能、光响应行为以及在药物控释等方面的应用进行了探索研究。

本工作的主要创新包括以下几点: (1) 以葡聚糖为基本原料,合成了具有 pH 及光响应的水凝胶,并将其用作药物控释载体,同时利用紫外光照调控药物释放速率。(2) 合成了偶氮苯改性的两亲性支链淀粉接枝物,利用其在水溶液中的疏水缔合交联作用得到可对疏水药物进行包埋和光控释放的新型纳米水凝胶。(3) 首次将 4-硝基肉桂酸化学偶联到羧甲基壳聚糖大分子链上,在无外加光引发剂的条件下,利用肉桂酸基团在 365 nm 紫外光照下的光二聚反应,制备光交联型羧甲基壳聚糖水凝胶。(4) 首次合成了 4-硝基肉桂酸改性的支链淀粉衍生物,在无外加光引发剂条件下,采用光交联方法对蛋白类生物大分子(如溶菌酶)实现了原位包埋,经原位光包埋后的溶菌酶可有效地保持其二级构象及生物活性。

本论文主要研究内容和结论概括如下:

(1) 光及 pH 响应型葡聚糖水凝胶的研究

以二甲基亚砜为溶剂、偶氮二异丁腈为引发剂,将甲基丙烯酸缩水甘油酯改性的葡聚糖与偶氮单体 4-(4'-丙烯酰氧基苯基偶氮)苯甲酸自由基共聚交联,合成了具有光及 pH 响应性的葡聚糖水凝胶。红外光谱和核磁共振氢谱证实了合成单体及水凝胶的结构,并通过元素分析确定了凝胶中偶氮苯含量。通过溶胀实验,发现所得水凝胶的平衡溶胀度随介质 pH 值增大以及凝胶中偶氮含量降低而增大,扫描电镜分析证实偶氮含量高的凝胶具有更致密的网络结构。以维生素 B₁₂ 为模型药物,研究了载药水凝胶在不同 pH 及紫外光照下的药物释放行为。通过体外药物释放实验,发现随凝胶中偶氮含量增加,药物释放速率及累积释放量均

减小；不同偶氮含量的载药凝胶在 pH 7.4 缓冲溶液中的药物释放速率均高于在 pH 2.2 缓冲溶液中的药物释放速率，说明该类水凝胶材料具有 pH 响应的药物释放行为；且在 pH 7.4 的缓冲溶液中，当用波长为 365 nm 的紫外光照射时，水凝胶的释药速率以及最终药物释放量均高于未光照的水凝胶，因此可利用紫外光照调控药物的释放速率。

(2) 光响应型支链淀粉基纳米水凝胶的研究

合成了含偶氮苯疏水侧链的两亲性支链淀粉接枝物(Amy-Azo)，利用 Amy-Azo 在水溶液中的疏水缔合交联作用，得到光响应型支链淀粉基纳米水凝胶。通过激光粒度分析和透射电镜测定紫外光照前后 Amy-Azo 纳米水凝胶的粒径，发现经 365 nm 的紫外光照射后，Amy-Azo 纳米水凝胶的粒径增大，且其粒径随 Amy-Azo 中偶氮苯基团取代度增大而减小。用芘做荧光探针确定了 Amy-Azo 在水溶液中的临界胶束浓度，并利用紫外可见光谱研究了 Amy-Azo 在 H₂O/DMSO 溶液中的疏水聚集过程，发现偶氮生色团的反顺异构化程度和异构化速率均随混合溶液中水含量增加而减小。以吲哚美辛为模型药物，研究了所形成的纳米水凝胶对药物的负载能力，发现偶氮苯取代度大的 Amy-Azo 所形成的纳米水凝胶具有较高的药物负载率和负载效率。体外释放实验表明，随 Amy-Azo 中偶氮苯基团取代度增大，载药纳米水凝胶的药物释放速率及累积释放量减小；当用波长为 365 nm 的紫外光照射时，载药纳米水凝胶的释放速率以及最终药物释放量均高于未光照的纳米水凝胶，因此可通过紫外光照来调控纳米水凝胶的药物释放速率。

(3) 光交联型壳聚糖水凝胶的研究

首先合成了水溶性的羧甲基壳聚糖，再通过 4-硝基肉桂酸活化酯与羧甲基壳聚糖上的氨基反应得到可光交联的羧甲基壳聚糖衍生物(CMCS-NC)；利用 CMCS-NC 中肉桂酸酯基在 365 nm 紫外光照下的光二聚反应，制备光交联型羧甲基壳聚糖水凝胶。研究了紫外光照时间和 CMCS-NC 中肉桂酸酯基取代度对所得水凝胶溶胀性能、力学性能及生物降解性的影响，发现随光照时间延长和 CMCS-NC 中肉桂酸酯基取代度增大，所得水凝胶的平衡溶胀度和生物降解速率减小，而力学强度增加。以抗肿瘤药物盐酸阿霉素为模型药物，在无外加光引发剂的条件下，研究了该类水凝胶对盐酸阿霉素的原位包埋与体外药物释放行为，结果发现药物释放速率随肉桂酸酯基取代度增大而下降；当在释放介质中加入 4 mg/mL 溶菌酶时，由于溶菌酶对凝胶骨架的降解作用，水凝胶的释药速率以及最终累积释药量均明显增加。

(4) 光交联型支链淀粉基水凝胶的研究

基于侧链含 4-硝基肉桂酸支链淀粉衍生物(Amy-NC)的合成,在无外加光引发剂的条件下制备光交联型支链淀粉基水凝胶。通过紫外可见光谱研究了 Amy-NC 中硝基肉桂酸酯基的光二聚反应过程,发现紫外光照 1800 s 后其交联度为 38%。研究了紫外光照时间和 Amy-NC 溶液浓度对所得水凝胶溶胀性能、力学性能及生物降解性的影响,发现随光照时间延长和 Amy-NC 溶液浓度增大,所得水凝胶的平衡溶胀度和生物降解速率减小,而力学强度增加。通过流变数据和分形模型,发现该水凝胶体系具有分形特征,凝胶形成的驱动力是分子间和分子内两种作用力等同贡献,属于过渡型凝胶。以溶菌酶为蛋白类生物大分子模型药物,在无外加光引发剂的条件下,研究了该类光交联水凝胶对溶菌酶的原位包埋与控制释放。通过体外药物释放实验,发现该类水凝胶对溶菌酶均有一定的缓释效果,且随光照时间延长及 Amy-NC 溶液浓度增大,溶菌酶的释放速率与最终累积释放量均减小。通过 Peppas 方程对释放曲线进行线性拟合,其 n 值均在 0.45 左右,说明溶菌酶的释放机制属于 Fickian 扩散。通过圆二色谱法研究了释放液中溶菌酶的二级构象,发现经原位光包埋后的溶菌酶可有效地保持其二级构象。通过微球菌的溶菌实验测定溶菌酶的生物活性,发现药物释放 48 h 后溶液中溶菌酶的相对活性在 83%以上,说明经原位光包埋后的溶菌酶仍具有良好的生物活性。

关键词: 多糖, 光响应, 光交联, 水凝胶, 药物控释载体

Studies on photoresponsive and photocrosslinked hydrogels based on polysaccharides

Abstract

In recent years, environment-sensitive hydrogels have been widely investigated. Among them, light as an external stimulus to control structure and volume of the hydrogels has received increasing attention. Since the light is readily available, inexpensive, safe, clean and easily manipulated, light-sensitive hydrogels may possess special advantages over others and have been used in diverse applications, such as chemical valves, shape memory switches, drug delivery, immobilization of enzymes, and tissue engineering.

Polysaccharides are an important class of natural polymers with good biocompatibility, biodegradability and low toxicity. As a result, they are widely used as functional materials in medical and pharmaceutical applications. In this work, photoresponsive and photocrosslinked hydrogels based on polysaccharides have been designed and synthesized. Moreover, their properties such as swelling, mechanical strength, photoresponse and drug release were investigated.

The innovative points in this work are as follows. (1) Photo- and pH-responsive hydrogels based on azobenzene-containing dextran derivatives were prepared as a new carrier for controlled drug release. The release rate of drug could be modulated by 365 nm UV irradiation. (2) Azobenzene-modified amphiphilic amylopectin derivatives were synthesized and could self-aggregate into the nanogels by the hydrophobic association interactions of incorporated azobenzene groups for controlled drug release. (3) A novel water-soluble chitosan derivative having a nitrocinnamate moiety was synthesized and characterized. Different from the photocrosslinkable polysaccharide derivatives reported previously in the literature, this modified polysaccharide has a unique photogelation ability in the absence of potentially toxic photoinitiator or catalyst, which makes it to be suitable particularly for the preparation of photocrosslinked hydrogel biomaterials. (4) It has been firstly revealed that a novel amylopectin derivative with nitrocinnamate as pendant groups is suitable for the photoencapsulation and controlled release of lysozyme in the absence of photoinitiators. The secondary structures of the encapsulated lysozyme could be

maintained and its biological activities with more than 83 % could be kept.

The main contents and conclusions in this dissertation are as follows:

(1) Studies on photo- and pH-responsive hydrogels based on dextran

The photo- and pH-responsive hydrogels were obtained from radical copolymerization of methacrylated dextran with 4-[(4'-acryloyloxy)phenylazo]benzoic acid in dimethyl sulfoxide with 2,2'-azobisisobutyronitrile as an initiator. The FT-IR and ¹H-NMR analyses were used to characterize the chemical structure of modified dextran, azobenzene monomers and their hydrogels, and elemental analysis was used to determine the azobenzene amount in the hydrogels. The obtained hydrogels showed good pH- and photo-responsive properties due to the ionization of carboxyl groups and the *cis-trans* isomerization of azobenzene, respectively. By changing the azobenzene content, the properties of hydrogels could be modulated. The swelling degree of the hydrogels increased with the decrease of azobenzene content and the increase of pH of the medium. A relatively high azobenzene content could make the hydrogel have a denser network structure, as confirmed by the scanning electron microscopy observation. In addition, the drug release behavior of resultant hydrogels was investigated in pH 2.2 and 7.4 phosphate buffer solution (PBS) before and after 365 nm UV photoirradiation by using vitamin B₁₂ as a model drug. The result showed that the release rate of the encapsulated vitamin B₁₂ increased with the decrease of azobenzene content and the increase of pH of the medium. Moreover, the release rate of vitamin B₁₂ had an increase after 365 nm UV photoirradiation due to *trans* to *cis* photoisomerization of azobenzene groups in the hydrogel.

(2) Studies on photoresponsive polymeric nanogels base on amylopectin

Azobenzene-modified amphiphilic amylopectin derivatives (Amy-Azo) were synthesized and could self-aggregate into the nanogels by the hydrophobic association interactions of incorporated azobenzene groups, as confirmed by fluorescence measurements, particle size analyses and transmission electron microscopy observation. Meanwhile, the content of incorporated azobenzene groups and UV photoirradiation were found to have a great influence on the property of resultant nanogels. A higher azobenzene content resulted in the decreases of the critical aggregation concentration and mean size of the nanogels. Moreover, the mean size of

the nanogels had an increase after 365 nm UV photoirradiation due to *trans* to *cis* photoisomerization of incorporated azobenzene groups. Furthermore, the *trans*-to-*cis* photoisomerization rate and the isomerization degree of Amy-Azo in H₂O/DMSO media were investigated by UV-vis spectroscopy. It was found that the photoisomerization rate and the isomerization degree at the photostationary state decreased with the increase of the water content in H₂O/DMSO media. In addition, the drug release behavior of resultant nanogels was investigated in PBS solution before and after 365 nm UV photoirradiation by using indomethacin as a model drug. The result showed that a relatively high azobenzene content could make the nanogels have a slower drug release rate. The release behavior of encapsulated indomethacin from these nanogels could be regulated by (*trans-cis*) photoisomerization of the azobenzene moiety present in the crosslinker.

(3) Studies on photocrosslinked hydrogels based on chitosan

A novel water-soluble chitosan derivative having a nitrocinnamate moiety (CMCS-NC) was synthesized and characterized. The UV-vis spectra showed that the gelation phenomenon of aqueous CMCS-NC solution upon exposure to 365 nm irradiation in the absence of photoinitiator may be caused by the intermolecular cycloaddition formation of the incorporated nitrocinnamate groups under the photoirradiation. By changing the photoirradiation time and incorporated nitrocinnamate content, its photogelation property could be modulated. For the hydrogels incorporated with various nitrocinnamate contents, their properties such as swelling, viscoelasticity, in-vitro biodegradation and drug release were investigated. It was found that a relatively high nitrocinnamate content could make the photocrosslinked hydrogel have a greater mechanical strength, a slower swelling degree, biodegradation and drug release rate. Furthermore, when the drug-loading CMCS-NC hydrogel was placed in PBS solution containing 4 mg/mL lysozyme, both the released rate and amount of the drug were higher than the hydrogel placed in PBS solution without lysozyme.

(4) Studies on photocrosslinked hydrogels based on amylopectin

A water-soluble amylopectin derivative (Amy-NC) with photoreactivity was prepared by the conjugation of amylopectin with 4-nitrocinnamate. Upon 365 nm UV irradiation, Amy-NC PBS solution underwent an intermolecular crosslinking by

means of photodimerization of cinnamoyl groups, resulting in the hydrogel formation. The UV-vis spectra showed that the crosslinking degree of cinnamoyl groups was 38% after UV irradiation for 1800 s. By changing the photoirradiation time and Amy-NC concentration, its photogelation properties such as swelling, viscoelasticity, in-vitro biodegradation and drug release were investigated. In the cases of a longer irradiation time and a higher Amy-NC concentration, the photocrosslinked hydrogels have a denser network structure, a greater mechanical strength, a slower biodegradation and drug release rate. Based on rheological method and the scaling model, the fractal characteristics were confirmed for the hydrogel systems. Moreover, the in-vitro drug release behavior of the photocrosslinked hydrogels in the absence of photoinitiator was investigated in PBS solution by using lysozyme as a model protein drug. It was found that there was a sustained release behavior in all cases, and the release mechanism was confirmed to follow the Fickian diffusion. The circular dichroism spectroscopy showed that the secondary structure of encapsulated lysozyme could be maintained. The biological activity of released lysozyme could be kept to be more than 83% after 48 h.

Keywords: Polysaccharide; Photoresponsive; Photocrosslinked; Hydrogel; Drug carrier

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名： 扈蓉

日期：2010 年 6 月 6 日

学位论文使用授权声明

本人完全了解中山大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆、院系资料室被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，可以采用复印、缩印或其他方法保存学位论文。

学位论文作者签名： 扈蓉

日期：2010年 6 月 6 日

导师签名：马建荣

日期：2010年 6 月 6 日

知识产权保护声明

我所提交答辩的学位论文，是本人在导师指导下完成的成果，该成果属于中山大学化学与化学工程学院，受国家知识产权法保护。在学期间与毕业后以任何形式公开发表论文或申请专利，均需由导师作为通讯联系人，未经导师的书面许可，本人不得以任何方式，以任何其它单位作全部和局部署名公布学位论文成果。本人完全意识到本声明的法律 responsibility 由本人承担。

学位论文作者签名： 扈蓉

日期：2010年6月6日

第 1 章 绪论

1.1 聚合物水凝胶概述

聚合物水凝胶是一种能在水中溶胀并保持大量水分而不溶解的聚合物网络。自从 Wichterle 和 Lim^[1]在二十世纪五十年代制备了具有三维网络结构的聚合物水凝胶以来,水凝胶材料在日用品、工业用品、环境工程及食品工程等方面得到了广泛应用。例如:基于聚丙烯酸盐及丙烯酸盐与海藻酸钠接枝共聚物的水凝胶可用于婴儿尿布等卫生用品^[2]; Yi 和 Zhang^[3]采用腐植酸钠/聚丙烯酰胺水凝胶进行染料脱色;在缺水干旱地区,用水凝胶作为保水剂具有显著的节水效果^[4];此外,基于鸡蛋白蛋白、大豆蛋白和乳清蛋白^[5-7]等蛋白类水凝胶可稳定或提高食品的结构和性能,并能增加食品的营养价值^[8]。

聚合物水凝胶的物理性质与生物体软组织相似,具有吸水溶胀且保持大量水分、良好的生物相容性和可生物降解性等优点,其在生物医药领域的应用研究引起了人们极大的兴趣,可用作烧伤涂敷物、药物载体、生物分子和细胞载体、补齿材料、组织工程支架材料等。例如: Balakrishnan 等^[9,10]报道了一种原位形成的水凝胶敷料,由明胶与氧化海藻酸盐在加入微量的硼酸溶液的条件下交联而形成的,这种原位形成的水凝胶敷料能黏附在复杂形状的伤口上,具有良好的顺应性。Lee 等^[11]用铝碳酸镁/聚丙烯酸-b-聚 *N*-异丙基丙烯酰胺杂化水凝胶对带有不同电荷的药物分子(吡啶美辛、咖啡因、结晶紫和苯酚红)进行负载并研究其体外释放行为,结果显示与聚合物带电性质相同的药物释放速率较快,而与之相反的药物则释放速率较慢。Lei 等^[12]用可被金属蛋白酶降解的端巯基多肽对带有靶向配体(RGD)的聚乙二醇进行交联,制得可用于负载 DNA/聚乙烯亚胺复合物的水凝胶,经研究发现包埋后的 DNA 保有 65 %活性,复合物的包埋不影响凝胶的力学性能,并通过对间充质干细胞的转染实验证明了该载体的优越性。Kawakami 等^[13]通过将壳聚糖与磷酸三钙交联形成一种可用于口腔齿骨修复的支架材料,实验发现此支架材料可以促进齿骨的生成。

水凝胶种类繁多,基于不同的标准有不同的分类方法,最常用的分类方法有如下 3 种:根据水凝胶网络的交联方式,可分为物理凝胶和化学凝胶;根据其合成材料的不同,可分为合成高分子水凝胶、天然高分子水凝胶和杂化水凝胶;根据水凝胶对外界刺激的响应情况,可分为传统水凝胶和环境敏感水凝胶。

近二十多年来,环境敏感聚合物水凝胶的设计合成与应用研究十分活跃。这类凝胶对外界刺激能产生响应,其自身的物理性质或化学性质可以随外界环境改变而发生相应的变化。外界刺激因素包括温度、pH、溶剂、压力、离子、光、电场、磁场、声波、化学物质等,有些水凝胶可以对两种或两种以上的刺激做出响应,当这些刺激信号发生变化时,凝胶的自身性质如相态、体积、形状、分子极性、反应速率或识别性能等随之发生变化。因此,环境敏感聚合物水凝胶在化学传感器、转换器、记忆元件开关、人造肌肉、药物控释、固定化酶、组织工程等领域具有良好的应用前景。

近年来,人们对温度敏感性、pH值敏感性、生物分子敏感性等聚合物水凝胶进行了广泛的研究^[14,15],而光敏感性聚合物水凝胶的研究还处于起步阶段。由于光源安全、清洁、易于使用和控制,与其它环境敏感性聚合物水凝胶相比,光敏感性聚合物水凝胶无论是在工业领域还是生物医学领域都具有广阔的应用前景^[16]。下面我们重点介绍光响应型聚合物水凝胶以及光交联型聚合物水凝胶。

1.2 光响应型聚合物水凝胶

1.2.1 响应机理

光响应型聚合物水凝胶是一类在光(如紫外光、可见光、红外线等)作用下能迅速发生化学或物理变化而做出响应的刺激响应型材料,且响应过程具有可逆性,停止光的作用后,凝胶能够恢复到原来的状态。有关光响应型聚合物水凝胶的响应机理,目前主要有3种。

一种是在温敏性凝胶中引入特殊光敏分子,当光敏分子吸收一定能量的光子后,将光能转化为热能,使得凝胶内部局部温度升高,当温度升高到凝胶的相转变温度时,凝胶发生溶胀或收缩,引起体积相转变。Suzuki和Tanaka^[17]在聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)温敏凝胶中引入吸光产热分子叶绿酸,没有光照时,凝胶体积随温度升高而连续收缩;当温度控制在PNIPAM的相转变温度附近时,再用光照射,光能被吸收,导致凝胶局部的温度升高,凝胶体积出现不连续变化。

另一种是利用光敏分子见光分解产生的离子化作用来实现响应性,如螺吡喃、螺噁嗪、三苯甲基衍生物。此类凝胶经光照后,凝胶内部产生大量离子,使凝胶内外离子浓度差改变,引起凝胶内部渗透压的突变,溶剂由外向内扩散,促使凝胶发生体积相转变。Mamada等人^[18]将一种紫外光敏感分子bis(4-(dimethylamino)phenyl) (4-vinylphenyl)methyl leucocyanide与PNIPAM交联共聚得到光敏凝胶,在无紫外光照射时,随温度升高,凝胶体积连续减小;用紫

紫外线照射时, 凝胶中光敏分子发生离子化反应(如图1-1), 凝胶内形成大量离子, 对凝胶溶胀性能产生影响, 出现不连续的体积变化。Kurihara等^[19]以相同的光敏分子与NIPAM及聚乙烯醇接枝共聚交联制得凝胶膜, 他们通过膜的溶质传递情况来评价该凝胶的光响应性。在无紫外光照射时, 随温度升高, 凝胶体积减小, 凝胶膜的孔径变小, 溶质的透过速率降低; 用紫外光照时, 在凝胶相转变温度附近, 由于光照产生的离子引起溶液中离子浓度改变, 溶质的透过速率明显增加。

螺吡喃的光响应过程如图1-2所示。在紫外光照下, 螺吡喃通过C-O键的异裂, 由无色闭环的螺环结构变为有色开环的部花青结构; 在可见光或热的作用下, 部花青发生闭环反应生成螺环结构。螺噁嗪具有与螺吡喃相似的化学结构及相同的光响应原理。Sumaru等^[20]将乙烯基螺吡喃与NIPAM共聚交联制得光响应凝胶, 将该凝胶在酸性溶液中溶胀, 当用蓝光照射时, 可观察到凝胶体积迅速缩小, 如图1-3所示。作者进一步研究了该凝胶膜的质子传递性能, 实验发现光照时质子的传递速度提高了2倍。

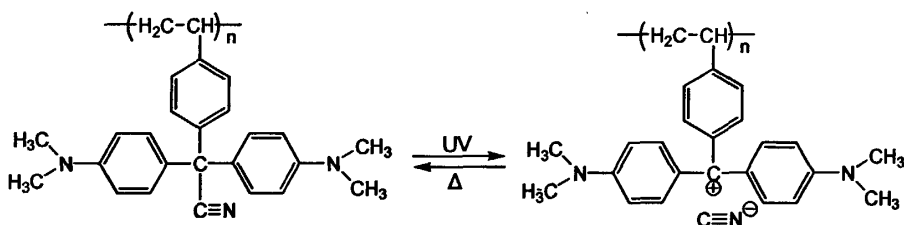


Figure 1-1 Reversible ionization of triphenylmethane derivatives

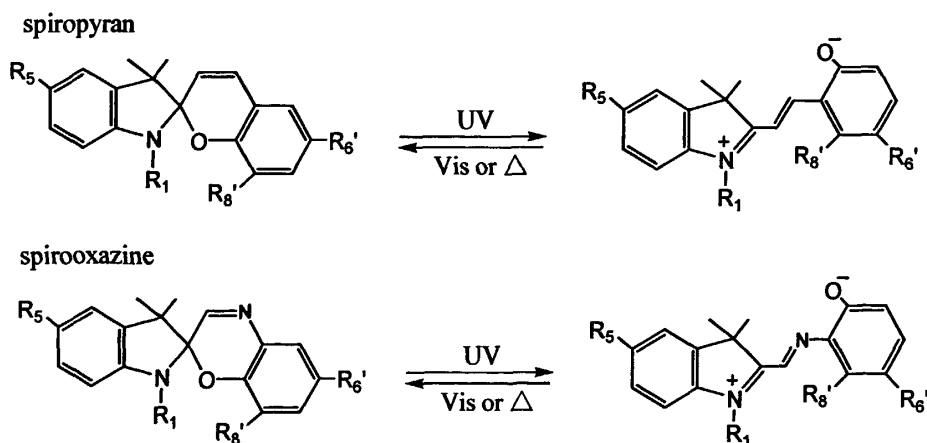


Figure 1-2 Photochromic process of spiropyran and spirooxazine

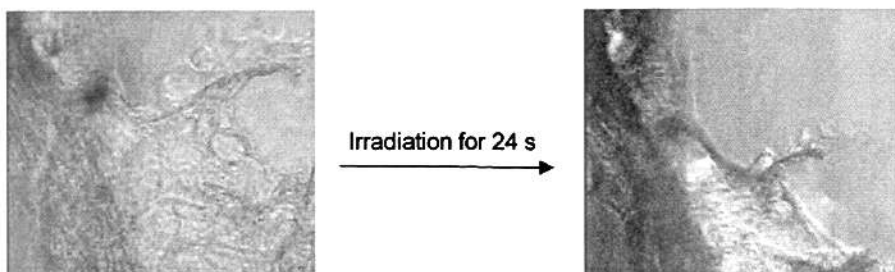


Figure 1-3 Photoresponsive deformation of a cross-linked spiropyran hydrogel^[20]

更为常见的是通过光敏分子的异构化作用，引起分子构型的变化，促使凝胶材料内部发生某些物理性质的改变，进而产生响应性。偶氮苯及其衍生物是一类典型的光致异构分子，存在顺式(*cis*)和反式(*trans*)两种异构体。在 365 nm 的紫外光照射下，偶氮苯分子由棒状的反式构型转变为“V”型的顺式构型；在可见光或热作用下，顺式构型可回复到反式构型。如图 1-4 所示，当偶氮苯从反式结构转变为顺式结构时，分子尺寸发生了很大变化^[21]，位于偶氮苯对位的两个碳原子间距离从 9.0 Å 减小为 5.5 Å，分子偶极距从 0 D 增大到 3.0 D。陈莉等^[22]将丙烯酸酰胺基偶氮苯与丙烯酸共聚制备了一种 pH 和光双重敏感的水凝胶。实验发现，在紫外光照下，凝胶体积减小，且随着凝胶中偶氮苯含量的增加，凝胶收缩的越快。这主要是由偶氮苯的光致异构化引起的，偶氮苯生色团由反式构型变为顺式，分子尺寸减小，宏观上表现为凝胶的体积减小。

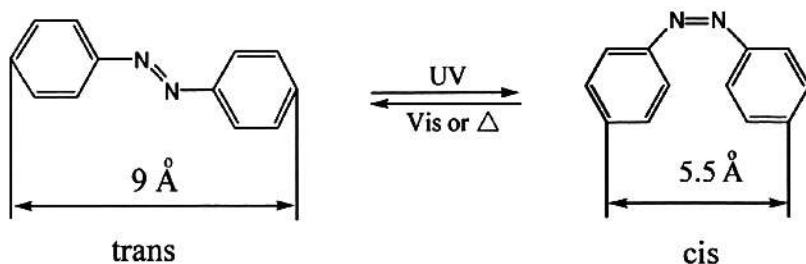


Figure 1-4 Dimension changes of isomerization of trans-cis azobenzene

1.2.2 制备方法

根据聚合物水凝胶制备方法不同可将其分为物理交联型水凝胶和化学交联型水凝胶。

1.2.2.1 物理交联型水凝胶

光响应性物理水凝胶主要是通过物理作用如两亲性聚合物疏水缔合、主客体

识别作用等方式形成三维网络。物理交联型水凝胶一般是可逆的，这些交联点随外界条件的改变而变化，出现溶胶-凝胶转变。

两亲性聚合物可在水溶液中通过疏水缔合交联作用形成三维网络结构。Patnaik 等^[23]将含长链烷烃的偶氮苯连接到葡聚糖主链上，该葡聚糖衍生物在水溶液中发生疏水聚集形成具有光响应性的纳米凝胶。Lee 等^[24]将疏水改性的聚丙烯酸与偶氮苯表面活性剂溶液混合，当表面活性剂的浓度在临界胶束浓度以上时，偶氮苯表面活性剂发生聚集形成胶束，同时诱导聚丙烯酸中的疏水链一起聚集，形成物理凝胶，如图 1-5 所示。当用紫外光照射凝胶时，偶氮苯分子由棒状的反式变为“V”型的顺式结构，其分子形状和偶极距均发生变化，更为亲水的顺式构型的偶氮苯分子与疏水烷基链间的相互作用变弱，导致胶束结构解离，体系由凝胶向溶胶转变。

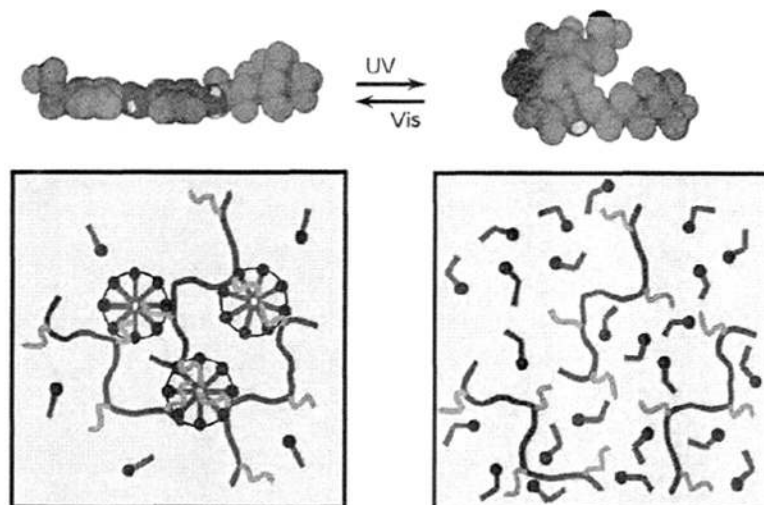


Figure 1-5 Illustration of the proposed mechanism of reversible gelation light^[24]

利用主客体识别作用也可实现聚合物体系的原位凝胶化。环糊精和偶氮苯是一对很好的光控主客体分子，反式构型的偶氮苯能与环糊精相互识别，而顺式的则不能^[25,26]，因而可通过光照来调节环糊精与偶氮苯间的相互作用，实现溶胶-凝胶转变。Tomatsu 等^[27]以 α -环糊精与偶氮苯主客体作用为基本思路构筑光控溶胶-凝胶物理凝胶体系。他们将疏水长烷基链修饰的聚丙烯酸，与 α -环糊精在水溶液中混合，环糊精与多个疏水烷基链的包结作用起到了物理交联点的作用使得材料凝胶化；若将偶氮苯化合物加入，由于环糊精对反式偶氮苯的包结作用大于其对疏水烷基链的作用，导致烷基链从环糊精空腔脱出，体系发生从凝胶到溶胶的转变。当用紫外光照射凝胶时，偶氮苯分子由反式变为顺式结构，从环糊精空

腔脱出, 疏水烷基链又与环糊精形成包结作用, 体系又呈现凝胶化; 而采用可见光照射上述凝胶, 偶氮苯异构化为反式结构, 重新与环糊精组装, 体系由凝胶向溶胶转变, 这样就构筑了光控凝胶-凝胶可逆转变的智能物理凝胶体系(见图 1-6)。Zhao 和 Stoddart^[28]利用同样的原理在聚丙烯酸聚合物链上引入偶氮苯基团, 在该溶液中加入脱氧胆酸改性的 β -环糊精, 构筑了光控凝胶-溶胶可逆转变的智能物理凝胶体系(见图 1-7)。Zheng 等^[29-31]在羟丙基甲基纤维素中引入偶氮苯基团, 在该材料体系中加入 α -环糊精, 也形成了光控凝胶-溶胶可逆转变的智能物理凝胶体系。

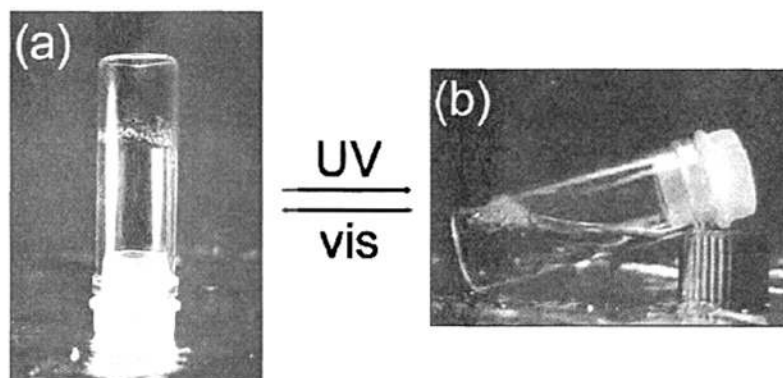


Figure 1-6 Photographs for a ternary mixture under photoirradiation with visible (a) and UV light (b)^[27]

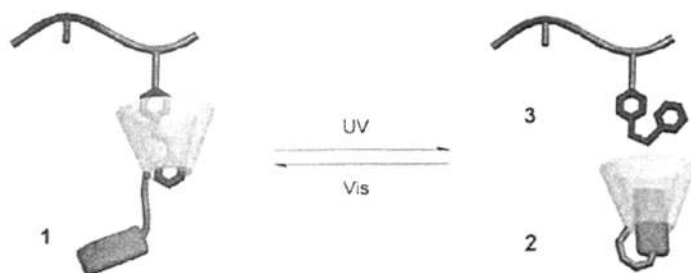


Figure 1-7 Supramolecular inclusion complex 1 form from deoxycholate- β -CD derivatives 2 and azobenzene-branched poly(acrylic acid) copolymer 3^[28]

1.2.2.2 化学交联型水凝胶

化学交联型水凝胶是分子链通过化学键交联形成的具有三维网络结构的聚合物。自由基共聚交联反应是制备光响应聚合物水凝胶的最常用方法, 通常将烯

类单体或带有双键的聚合物,在引发剂和交联剂存在下交联共聚形成高分子网络。

Moniruzzaman 等^[32]以偶氮二异丁腈为引发剂、*N,N*-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂,通过自由基聚合制备了甲基丙烯酸酯基偶氮苯与丙烯酰胺的共聚凝胶。Kang 和 Gupta^[33]以双甲基丙烯酰胺基偶氮苯为交联剂制备了 NIPAM 温敏凝胶,该凝胶具有双重响应性,通过紫外光照和温度能调控其溶胀-收缩行为。Gomy 等^[34]以抗肿瘤药物甲氨蝶呤为模板分子,以脲基乙基双甲基丙烯酸酯偶氮苯为功能单体及交联剂,通过自由基聚合反应制得具有光响应性的分子印迹凝胶。Takeuchi 等^[35]利用相同的原理,以偶氮苯为功能单体合成具有光响应性的分子印迹凝胶。Wang 等^[36]将甲基丙烯酸酯基螺噁嗪和 NIPAM 自由基共聚交联形成凝胶,该凝胶具有良好的光可逆性,可用作光电材料、光控化学阀等。

1.2.3 应用

由于光源安全、清洁、易于使用和控制,因此与其它环境响应性聚合物水凝胶相比,光响应型聚合物水凝胶在工业领域以及生物医药领域都具有广阔的应用前景。目前,光响应型聚合物水凝胶主要应用在药物控释系统、光控化学膜和化学阀等方面。

1.2.3.1 药物控释系统

光响应型聚合物水凝胶在光刺激下发生不连续的体积变化,其作用类似于开关,从而控制凝胶中药物的释放。Tomer和Florence^[37]合成了两种偶氮苯与NIPAM的共聚凝胶用于药物释放,一种是将4-丙烯酰胺基偶氮苯与NIPAM共聚交联形成含偶氮苯侧链的凝胶,另一种是以4,4'-双丙烯酰胺基偶氮苯为交联剂制得NIPAM凝胶。将两种载药凝胶在紫外光照下进行药物释放,与在避光条件下的药物释放行为相比,含偶氮苯侧链凝胶的药物释放量增大,而以偶氮苯为交联链的凝胶的药物释放量降低。Patnaik等^[23]将含长链烷烃的偶氮苯连接到葡聚糖主链上,该葡聚糖衍生物在水溶液中发生疏水聚集形成具有光响应性的纳米凝胶,他们以阿司匹林和罗丹明B为模型药物研究了葡聚糖纳米凝胶的光控释放行为。实验发现,在波长为365 nm的紫外光照下进行药物释放时,纳米凝胶的药物释放速率以及最终释药量均高于未光照时的纳米凝胶。

通过分子印迹技术制备分子印迹智能水凝胶,不仅可以提高水凝胶网络对特定药物分子的结合能力,而且能够根据外界环境的变化来控制其对特定药物分子的结合情况,实现自动识别并结合或释放特定药物分子。Gong 等^[38,39]以药物分

子如咖啡因或扑热息痛为模板分子、乙烯基偶氮苯化合物为功能单体，制备了药物分子印迹的光响应水凝胶。当用紫外光照射该印迹凝胶时，凝胶中偶氮苯分子异构化为顺式结构，与药物分子的结合位点相互远离，导致药物分子从凝胶中释放出来；当再用可见光照时，偶氮苯分子回复为反式结构，与药物分子的结合位点重新建立，如图 1-8 所示，因而可反复进行光控药物负载和释放。

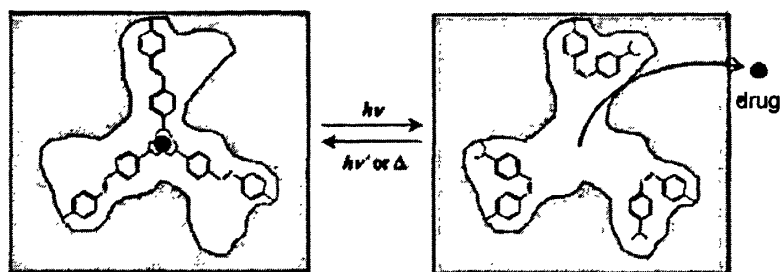


Figure 1-8 Reversible photoregulated drug release and uptake process with molecularly imprinted photoresponsive hydrogels^[38]

1.2.3.2 光控化学膜和化学阀

由于光响应型聚合物水凝胶具有体积相变特性，可应用于光控化学膜和化学阀方面。Kodzwa 等^[40]将含有三苯甲烷光敏基团的聚丙烯酰胺凝胶用作离子选择性膜，在紫外光照下，三苯甲烷光敏基团分解产生离子，导致阴离子的透过速率增大。Liu 等^[41]制备了含有偶氮苯基团的光响应性纳米多孔膜，在紫外光照下，凝胶膜中偶氮苯分子异构为顺式结构，分子尺寸变小，导致纳米凝胶膜的孔径增大，经 270 s 的紫外光照后膜孔径不再变化；再用可见光照射上述凝胶膜，凝胶膜的孔径随光照时间延长而逐渐减小，可见光照 200 s 后与光照前凝胶膜的孔径相同，且该过程具有良好的可重复性。Sugiura 等^[42]进一步将螺吡喃与 NIPAM 的共聚凝胶(PS-NIPAM)用作光控微阀。如图 1-9 所示，通过光聚合方法在微管道中原位生成 PS-NIPAM 凝胶，在凝胶上方管道中充满靛蓝染料溶液，当用蓝光照射凝胶 18 s，可观察到靛蓝染料进入到凝胶下面的管道中，说明此时微阀处于“开”的状态。PS-NIPAM 凝胶用作微阀能对光刺激作出快速响应，实现微阀“开”或“关”的快速转化。

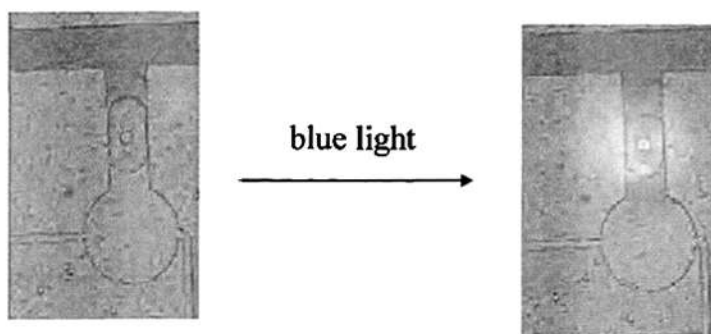


Figure 1-9 Simultaneous control of the PS-NIPAM gel microvalve by means of local light irradiation^[42]

1.3 光交联型聚合物水凝胶

光交联型聚合物水凝胶是指含有光敏感基团的化合物,在紫外或可见光的照射下发生分子内或分子间的交联形成三维网络结构。与其它交联方式相比,光交联方法制备水凝胶具有如下优点^[43]: (1) 可使聚合物前驱体水溶液原位交联,因而可用于制备可注射水凝胶; (2) 在室温或生理温度下快速聚合形成水凝胶; (3) 产物几何形状易于控制; (4) 原位聚合过程中产生较低的热量等。这些优点使光交联型聚合物水凝胶在药物控释以及组织工程等领域获得广泛的应用。

1.3.1 光交联机理

目前,常见的可光交联聚合物主要有两类:一类是含有乙烯基功能团的聚合物,在光引发剂的作用下引发聚合反应形成凝胶;另一类是不需外加光引发剂,含有可交联基团的聚合物在光的作用下能发生交联反应形成凝胶,如曙红、叠氮基团,以及肉桂酸、香豆素、蒽等能发生光二聚反应的基团。

1.3.1.1 含乙烯基功能团的聚合物

含有乙烯基功能团的聚合物,借助光引发剂,通过波长 $\lambda > 300$ nm 的紫外光引发聚合而形成凝胶。光引发剂是聚合体系的重要组成部分,是决定体系光聚合速率和交联程度的主要因素之一。光引发剂根据引发机理的不同,可分为裂解型和夺氢型两类,图 1-10 为两类光引发剂在光照条件下引发光聚合的示意图。在 $\lambda > 300$ nm 紫外光照下,裂解型光引发剂在 $O=C-C$ 、 $C-Cl$ 、 $C-O$ 或 $C-S$ 处发生裂解,主要是芳香族羰基化合物,如安息香衍生物、苯乙酮衍生物等。在光引发剂

引发的光聚合反应中,一部分未反应的光引发剂及光裂解碎片会残留在凝胶体系中,且容易迁移到凝胶表面,当这种光聚合凝胶应用到生物体内时,残留在凝胶体系中的引发剂会迁移并浸入到生物机体中而产生毒性。因此,当光交联聚合物凝胶应用于生物医药领域时,需考虑光引发剂的生物适应性、溶解性、稳定性以及细胞毒性等。其中, 2-羟基-1-[4-(羟基乙氧基)苯基]-2-甲基-1-丙酮 (2-hydroxy-1-[4-(hydroxyethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanone, Irgacure 2959) 和 2,2-二甲氧基-2-苯基苯乙酮 (2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone, Irgacure 651) 两种光引发剂的细胞毒性较小^[44], 其结构如图 1-11 所示。

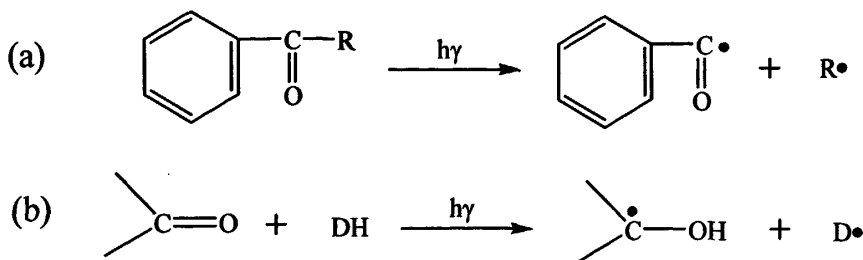


Figure 1-10 Radical Photopolymerization of photoinitiators by (a) photocleavage and (b) hydrogen abstraction

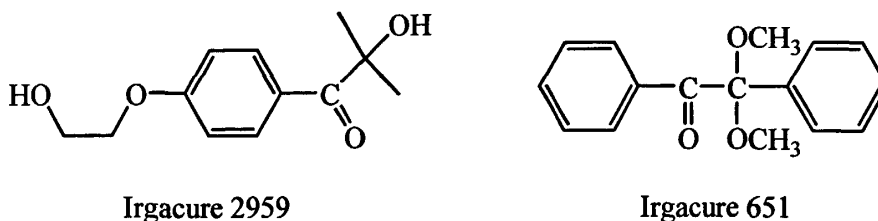


Figure 1-11 Structure of photoinitiators of Irgacure 2959 and Irgacure 651

1.3.1.2 其它可光交联聚合物

在无外加光引发剂的条件下,一些含有光敏感基团的聚合物能在光的作用下发生交联反应而形成凝胶,如肉桂酸、香豆素、蒽等基团,能在365 nm紫外光照下发生光二聚反应;曙红在可见光作用下产生自由基,引发聚合物交联形成凝胶;叠氮基团在紫外光照下脱去一个N₂分子形成活性中间体而引发交联反应。

(1) 肉桂酸、香豆素、蒽

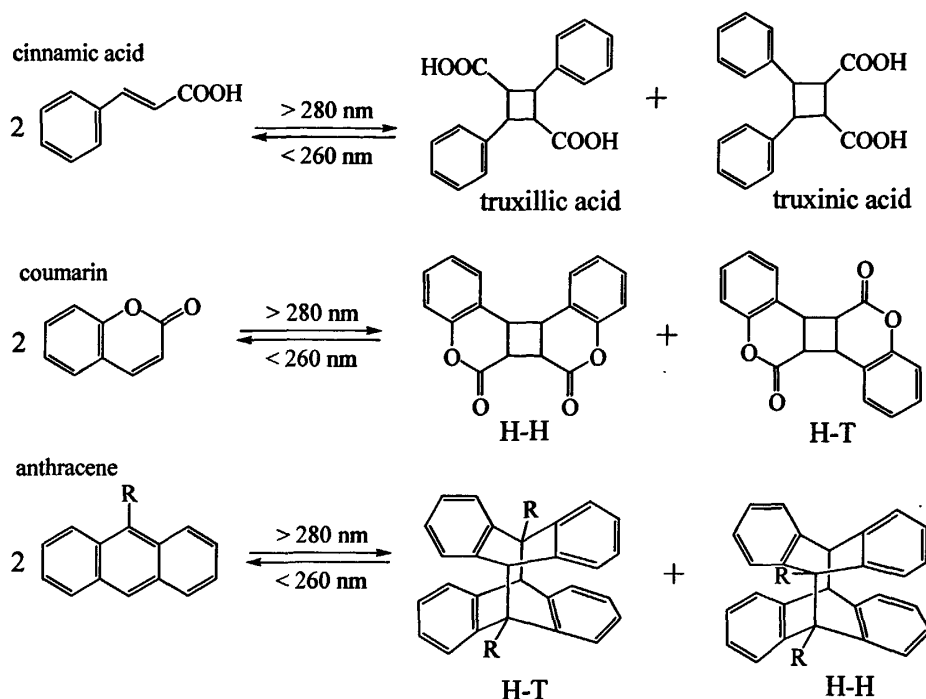


Figure 1-12 Reversible photodimerization of cinnamic acid, coumarin and 9-substituted anthracene derivative

肉桂酸(cinnamic acid), 化学名为3-苯基-2-丙烯酸, 类似于苯乙烯结构, 有顺式和反式2种异构体, 通常以反式形式存在。肉桂酸可发生光二聚反应, 在 $\lambda > 280 \text{ nm}$ 的紫外光照下, 发生[2+2]加成反应形成环丁烷结构; 而在 $\lambda < 260 \text{ nm}$ 的紫外光照下, 交联环状结构被打开, 重新形成双键, 如图1-12所示。肉桂酸的二聚产物为古柯间二酸(truxillic)和古柯邻二酸(truxinic)两种, 由于空间位阻及静电排斥作用, 以古柯间二酸为主^[45]。

Shi等^[46]合成主链含肉桂酸的共聚物P(3,4DHCA-co-4HCA), 该共聚物在选择性溶剂中自组装形成纳米粒子; 在 $\lambda > 280 \text{ nm}$ 的紫外光照下, 肉桂酸发生光二聚反应形成核交联的纳米粒子, 导致纳米粒子的粒径减小; 当用254 nm的紫外光照时, 肉桂酸发生光解聚反应, 纳米粒子的粒径又增大, 其变化示意图如图1-13所示。同时作者用紫外-可见光谱考察了P(3,4DHCA-co-4HCA)光二聚反应的可逆性, 如图1-14。当用 $\lambda > 280 \text{ nm}$ 的紫外光照射P(3,4DHCA-co-4HCA)溶液时, 肉桂酸基团发生光二聚反应, 其最大吸收峰处的吸光度值(A)从2减小至0.2左右; 当用254 nm的紫外光照时, 交联的肉桂酸基团发生光解聚反应, A值逐渐升高至0.4左右, 但远小于光照前肉桂酸基团的吸光度值, 表明光二聚反应具有部分可逆性。

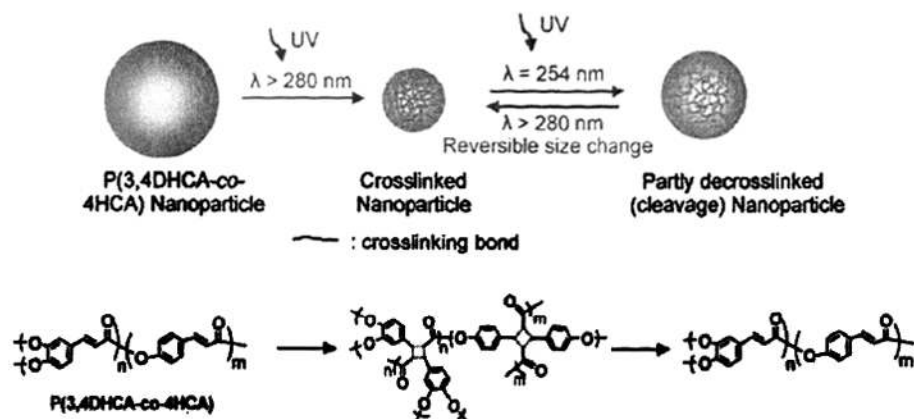


Figure 1-13 Schematic representation of size change behavior of P(3,4DHCA-co-4HCA) nanoparticles with UV irradiation: chemical structure of UV-induced [2 + 2] cycloaddition formation (cross-linking) and deformation (cleavage) [46]

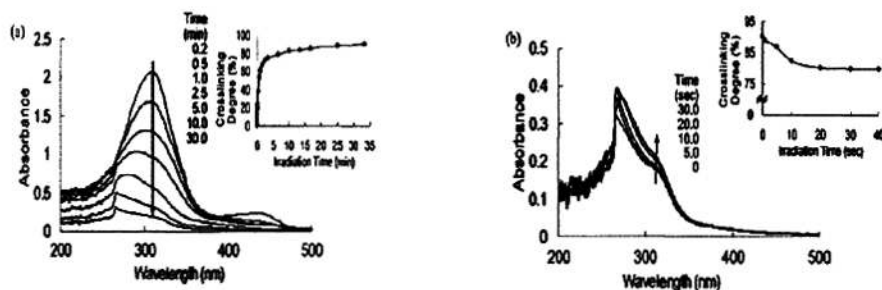


Figure 1-14 UV-vis absorbance of the nanoparticles in THF during UV irradiation at $\lambda > 280$ nm for 30 min (a) and subsequent irradiation at $\lambda = 254$ nm for 30 s (b) [46]

香豆素(coumarin), 又名邻羟基肉桂酸内酯, 与肉桂酸结构类似, 能发生可逆的光二聚反应, 其光二聚产物有头-头(H-H)和头-尾(H-T)两种连接方式, 但以H-H连接的产物为主[47]。

Yamamoto等[48-49]在聚赖氨酸或聚鸟氨酸侧链引入香豆素基团, 用365 nm紫外光照24 h制得凝胶。该凝胶具有良好的生物降解性, 可被胰岛素、曲霉毒素蛋白酶及微生物降解。Nagata等[50]合成了侧链含香豆素的PEG衍生物(ICME)。紫外光照ICME膜5 min, 凝胶转化率可达到80%以上, 光照时间和PEG的分子量对凝胶的溶胀性能有较大影响。通过紫外-可见光谱研究了ICME膜中香豆素光二聚的可逆性(如图1-15), 结果表明香豆素的光二聚反应具有良好的可逆性。

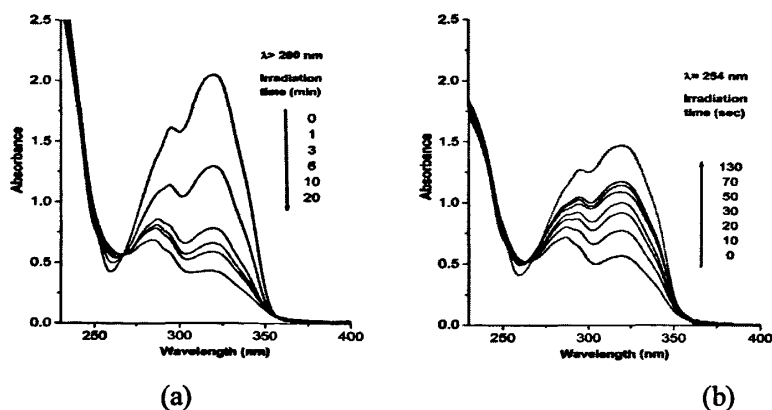


Figure 1-15 Changes of the UV spectra absorbance of ICME thin film during UV irradiation at $\lambda > 280$ nm for 20 min (a) and subsequent irradiation at $\lambda = 254$ nm for 130 s (b) ^[50]

蒽(anthracene)是由三个苯环稠合成的, 易在9, 10位发生加成和取代反应。通常认为, 蒽的光二聚反应是通过蒽单线态激基缔合物中间体, 以[4+4]环加成方式形成光二聚体。对于9-取代蒽来讲, 由于其光二聚发生在9, 10位的位置上, 其二聚体存在头-头(H-H)和头-尾(H-T)两种异构体, 如图1-12所示。在溶液中, 大多数蒽衍生物分子间的光二聚反应具有H-T结构, 因为H-T构型产物的空间位阻和静电排斥作用均较小^[51-53]。

Zheng等^[54]将9-蒽酰氯与八臂PEG反应, 得到可光交联的PEG大单体(见图1-16)。用紫外-可见光谱研究了该大单体光二聚的可逆性, 如图1-17, 结果表明蒽的光二聚反应具有部分可逆性和良好的光可逆重复性。

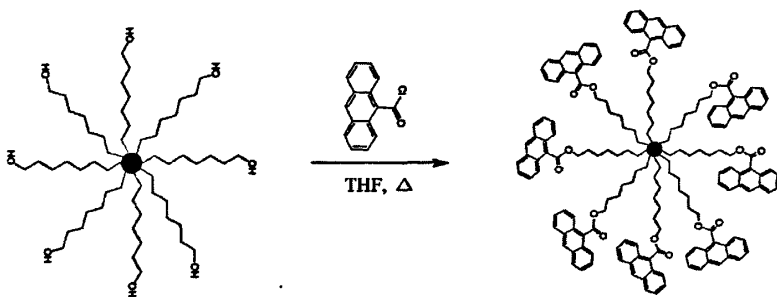


Figure 1-16 Synthesis of PEG-anthracene macromer (PEG-AN) ^[54]

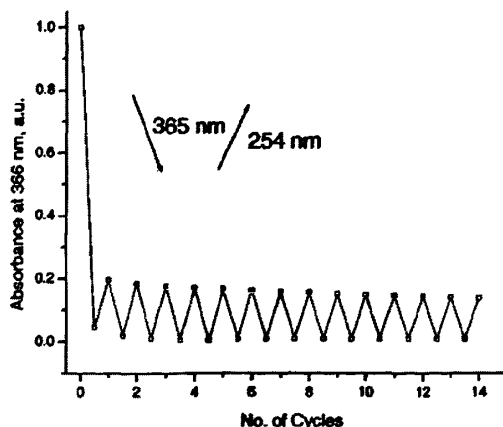


Figure 1-17 Number of reversible cycles of PEG-AN hydrogel monitored by UV-vis spectroscopy at 366 nm^[54]

(2) 曙红

曙红(eosin), 是一种酸性染料, 通常使用的是其二钠盐, 又称曙红Y(eosin Y)。在可见光照射下, 曙红分子中的电子处于激发态, 形成阴离子自由基(Eosin[•]), 能夺取助催化剂聚胺邻位C上的活泼氢形成曙红自由基(Eosin[•]), 被夺取氢质子的聚胺也形成自由基, 两种自由基发生双基终止形成交联聚合物^[55-57], 图1-18给出了其可能的交联机理。由其交联机理来看, 曙红相当于一种夺氢型光引发剂, 而聚胺相当于大分子交联剂, 文献^[56,57]报道将曙红和小分子胺作为光引发体系。

Fukaya^[58]等通过偶联反应将曙红连接到明胶上, 在聚胺作用下, 用可见光照该明胶衍生物几十秒即能得到凝胶。改变曙红的取代度和光照时间, 可调控凝胶的力学性质。体外细胞实验表明, 曙红取代度较低的明胶衍生物具有低的细胞毒性; 当曙红取代度较高时, 明胶衍生物具有细胞毒性。

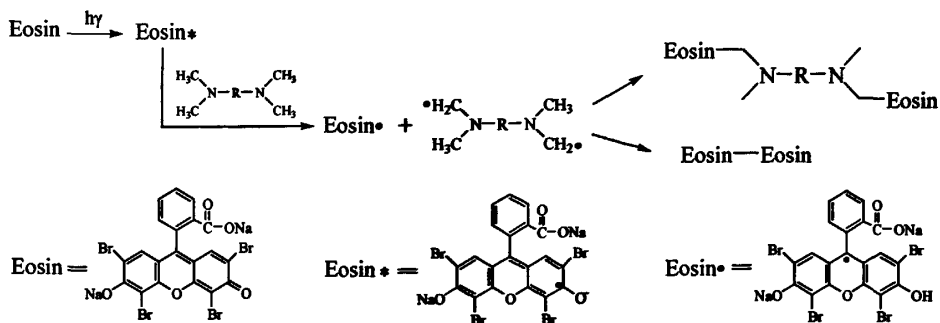


Figure 1-18 A possible photocrosslinking mechanism of eosin in the presence of amine

(3) 叠氮

叠氮化合物(azides)的通式为 RN_3 ，在紫外光的照射下，叠氮基释放出氮气，转变为化学反应性很高的氮烯基团 $[R-N]$ ，如图 1-19 所示。氮烯是一个极为活泼仅瞬间存在的活性中间体，比一般的活泼离子或自由基中间体更不稳定，可以发生许多特征性反应，如加成反应、重排反应，以及与临近物质分子中的 C-H、O-H 和 N-H 键发生夺氢插入反应等^[59,60]。

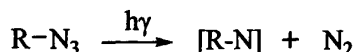


Figure 1-19 The formation of nitrene intermediates from organic azides upon UV irradiation

Ishihara 等^[61-63]将乳糖酸和叠氮苯甲酸与壳聚糖分子中的氨基进行缩合反应，得到一种可光交联的水溶性壳聚糖衍生物(Az-CH-LA)。用 365 nm 的紫外光照射 Az-CH-LA 的水溶液，60 s 内可得到不溶的、柔韧的水凝胶。细胞培养实验表明 Az-CH-LA 的水溶液及其水凝胶都不具有细胞毒性。该水凝胶对兔体外及体内的颈动脉和肺部的刺孔实验表明其具有很好的密封和止血效果，疗效甚至超过价格昂贵的纤维蛋白胶，显示出巨大的医学应用前景。另据文献中的报道，将 20 μ L 的 Az-CH-LA 水溶液(浓度为 30 mg/mL)涂敷在白鼠的创口上，用低功率(30 W)的紫外灯照射 30 s 就可达到止血效果。

1.3.2 聚合物水凝胶分类

许多单体在可见或紫外光照下可发生光交联反应，并得到广泛的应用，但大多数单体由于具有细胞毒性而不能用于生物医药领域。因此，用于生物医药领域的光交联水凝胶通常由大分子前驱体来得到^[64]，这些大分子前驱体能溶于水，含有两个或多个反应基团，同时应具有良好的生物相容性。常用于生物医药领域的光交联水凝胶，依据其主要原料来源可分为合成高分子类光交联水凝胶和天然高分子类光交联水凝胶。

1.3.2.1 合成高分子类光交联水凝胶

广泛使用的具有生物相容性的合成高分子类光交联水凝胶的原料主要有四类：聚甲基丙烯酸-2-羟基乙酯、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙二醇类、聚乙烯醇类。其中，聚甲基丙烯酸-2-羟基乙酯和聚乙烯基吡咯烷酮类光交联水凝胶，是通过一种或多种低分子量烯类单体在光引发剂存在下直接进行光交联共聚反应得到；而聚乙二醇和聚乙烯醇本身不具有光反应活性，通过化学反应引入可光交联的反

应基团，然后在光的作用下发生光交联反应形成聚合物凝胶，其主要特点是可根据需要将不同敏感或功能特性基团引入到聚合物水凝胶骨架中，同时可方便地调控官能团的密度及水凝胶的交联程度。

(1) 聚甲基丙烯酸-2-羟基乙酯

聚甲基丙烯酸-2-羟基乙酯(poly(2-hydroxyethyl methacrylate), PHEMA)是一类亲水性聚合物，具有良好的生物相容性，其均聚物或共聚物水凝胶具有类似活体组织的水含量，在生物体内表现为生物惰性，作为生物材料广泛应用于药物释放、烧伤涂覆、接触镜制造等生物医学领域^[65,66]。

Li等^[67]将单体HEMA、交联剂二乙二醇双丙烯酸酯和光引发剂Irgacure 651混合溶液置于365 nm的紫外光下，单体共聚交联形成凝胶，讨论了紫外光强度和单体浓度对光聚合速率的影响。采用类似的设计与合成策略，Lu等^[68]将HEMA单体溶液与药物的混合溶液置于模具中，采用分层光照法原位包埋药物，如图1-20所示，通过调节凝胶膜的厚度以及每层凝胶中包载的药物含量，使得到的多层载药凝胶可以零级动力学进行药物释放。

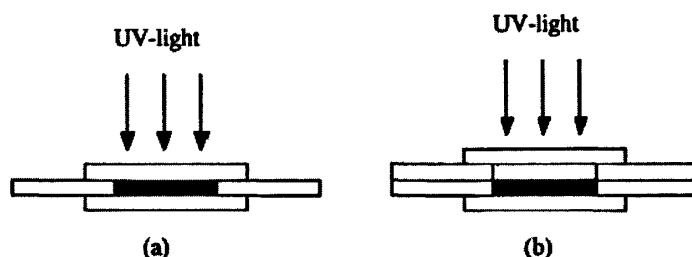


Figure 1-20 A schematic plot of the preparation of multilaminated samples. (a) Polymerization of the first layer; (b) polymerization of the second layer^[68]

(2) 聚乙烯基吡咯烷酮

聚乙烯基吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)是一种重要的水溶性聚合物，由乙烯基吡咯烷酮(N-vinylpyrrolidone, NVP)在一定条件下聚合而成。PVP分子结构具有强极性和能接受氢键的酰胺基团，使它能够结合一些极性分子如含羟基、羧基、氨基及其他含活性氢的化合物。且PVP具有良好的生物相容性，不参与人体的新陈代谢，对皮肤、粘膜和器官等没有任何明显的刺激，在生物医药等领域得到广泛的应用^[69]。

White等^[70]以双乙烯基吡咯烷酮为交联剂、Irgacure 651为光引发剂，将NVP单体溶液光照制备凝胶，实验发现该交联剂能增加NVP的聚合速率。Wu等^[71]研究了PVP光交联凝胶膜的渗透性，实验结果表明紫外光强度影响该凝胶的渗透

性,光照时紫外光的强度越高,得到的凝胶膜的渗透性越高。D'Errico等^[72]也通过紫外光交联得到具有生物相容性的PVP凝胶,通过流变表征了该凝胶的力学性能,结果表明该凝胶的力学强度与生物组织的强度相似,可应用于组织工程领域。

(3) 聚乙二醇

聚乙二醇(poly(ethylene glycol), PEG)为非离子亲水性聚合物,既可溶于水,又可溶于绝大多数有机溶剂,且具有良好的生物相容性、无毒、免疫原性低等特点,其生物相容性已通过美国食品与药物管理署(FDA)认证,广泛应用于生物医药领域。此外,PEG的聚醚主链具有一定化学惰性,但其分子链上两端的羟基具有反应活性,易于进一步化学改性。

在PEG上引入可光交联的基团,常用的方法是在聚乙二醇及其衍生物的端基引入(甲基)丙烯酸酯基,然后在光引发剂作用下进行光交联反应形成聚合物凝胶。Sawhney等^[73]合成了基于聚乙二醇-聚- α -羟基酸双丙烯酸酯的大分子单体,进一步通过光聚合制得水凝胶。通过改变共聚物中 α -羟基酸链段的长度和位置可控制其降解速率,并通过大分子单体的浓度和聚乙二醇链段的长度控制体系的渗透性和力学性能。Shah等^[74]报道了丙烯酰基封端的聚乳酸-聚乙二醇-聚乳酸三嵌段共聚物,在光引发剂Irgacure 2959作用下,紫外光照形成可生物降解的凝胶。实验发现,介质pH值影响凝胶的降解速率。Hou等^[75]合成了星形聚二甲基硅氧烷丙烯酸酯大单体,将其与聚乙二醇大单体及光引发剂Irgacure 651溶液混合,在紫外光照下形成有机-无机杂化凝胶,实验结果表明该杂化凝胶具有良好的生物相容性和低的生物毒性,可用于组织工程支架材料。

也可将肉桂酸等光二聚基团引入到PEG上,在没有光引发剂条件下,通过光二聚反应交联形成凝胶。Andreopoulos等^[76]通过酯化反应将亚肉桂基连接到四臂PEG上,该聚合物溶液用365 nm紫外光照时形成凝胶(如图1-21所示)。作者进一步在八臂PEG上引入对硝基肉桂酸^[77,78],并采用环境扫描电镜观察了该凝胶以及用254 nm光照后凝胶的表面形态。作者比较了这两种可光交联基团的稳定性,实验发现亚肉桂基的稳定性较差,室温放置2个月后完全失去活性,再用365 nm紫外光照不能形成凝胶;而对硝基肉桂酸基团相对稳定,在室温下放置6个月活性基本保持。

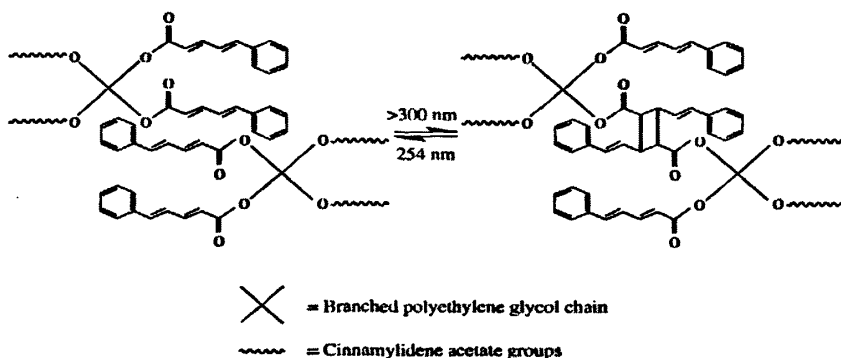


Figure 1-21 Photopolymerization-photocission of PEG-cinnamylidene in the presence of UV light^[76]

(4) 聚乙烯醇

聚乙烯醇(poly(vinyl alcohol), PVA)是一种价廉、无毒、无刺激性的亲水性聚合物,具有良好的生物相容性,在软性角膜接触镜、关节软骨、药物载体等生物医药领域^[79,80]获得广泛应用。

Mühlebach等^[81]用(甲基)丙烯酸酯改性PVA制得反应性大单体,在光引发剂Irgacure 2959存在下,通过紫外光照可得到无色透明的聚合物水凝胶,该水凝胶具有良好的机械稳定性和透光性,可用作隐形眼镜材料。Schmedlen等^[82]通过缩醛与PVA侧链羟基反应引入双键,可通过改变PVA聚合物溶液浓度和紫外光照时间来调控光聚合凝胶的溶胀度和机械强度,体外细胞实验证实该PVA凝胶无细胞毒性,可望用于组织工程领域。Bader等^[83]采用流变手段表征了光交联PVA凝胶的力学性质,发现该凝胶与人体软组织的性质相似,因此该凝胶材料在组织工程领域具有广阔的应用前景。

1.3.2.2 天然高分子类光交联水凝胶

天然多糖由于具有品种众多、来源广泛以及良好的生物相容性和生物降解性等优点,已得到了国内外研究人员的广泛关注。在天然多糖上引入具有光反应活性的基团,在光照作用下可制得天然高分子水凝胶。常用的天然高分子有透明质酸、壳聚糖、葡聚糖、海藻酸、胶原和明胶。

(1) 透明质酸

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是由N-乙酰氨基葡萄糖与葡萄糖醛酸两个糖单元交替组成线性聚合物,大量存在于细胞外基质,关节液等生物基质中。透明

质酸水凝胶可以通过体内的透明质酸酶及一些氧化途径进行降解产生低聚糖和葡萄糖醛酸。

Park等^[84]通过带氨基的甲基丙烯酰胺单体与HA反应得到HA大单体,在光引发剂Irgacure 2959存在下,进一步通过光聚合制得HA水凝胶,可通过改变HA的分子量及加入PEG大单体来调控凝胶的力学性能和溶胀度,但细胞不能在该凝胶上贴附生长;若在HA大单体上再引入RGD多肽,再光聚合得到含有RGD多肽的凝胶,此时细胞能在凝胶上贴附并增殖。Burdick等^[85]通过HA与甲基丙烯酸酐反应制得具有光聚合活性的HA衍生物,研究了HA分子量和HA大单体浓度对凝胶性能的影响,体外细胞实验表明低的HA大单体含量具有低的细胞毒性,但随HA大单体含量增大,细胞的存活率下降。Erickson等^[86]采用同样的原理合成了HA大单体,通过光交联原位包埋骨髓间充质干细胞,考察了HA大单体浓度对骨髓间充质干细胞定向分化为软骨细胞的影响,实验结果表明,增加HA大单体浓度,能促进骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞,但大单体浓度增加,导致凝胶网络结构变密,有限的结构空间会限制细胞的增殖分化。Weng等^[87]用紫外光交联制备了甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)改性的HA衍生物水凝胶,此凝胶质脆,力学强度较差;将此凝胶浸泡于*N,N*-二甲基丙烯酰胺及光引发剂溶液中,二次光交联得到具有双重网络结构的水凝胶,该凝胶的力学强度增大,且具有良好的柔软性、延展性以及机械稳定性,将该凝胶与纤维原细胞共培养2个月后仍保持良好的力学强度,体外细胞实验表明该凝胶无细胞毒性,可作为生物活性载体。Miyamoto等^[88]在HA上引入肉桂酸基团,通过光二聚反应形成凝胶,天竺鼠的皮内注射实验表明透明质酸-肉桂酸凝胶具有良好的生物相容性和生物降解性。

(2) 壳聚糖

壳聚糖(chitosan)又名 *N*-脱乙酰几丁质,其化学结构同天然的氨基葡萄糖相似,是迄今为止自然界中所发现的唯一一种碱性多糖,具有良好的生物相容性和低毒性,其降解可通过酶解过程如几丁质酶或溶菌酶来完成。由于壳聚糖含有胺基和比较高的结晶度,较难溶于一般的有机溶剂和中碱性的水介质中,可溶于稀酸性溶液。为了拓宽其应用范围,可利用壳聚糖分子链上活泼的氨基和羟基基团进行改性,以改善壳聚糖的水溶性。

Amsden等^[89]将水溶性的乙二醇壳聚糖与GMA反应得到壳聚糖大单体,壳聚糖大单体的浓度和模具的厚度对光交联壳聚糖凝胶的凝胶化产率及溶胀度有明显影响,体外细胞实验表明该凝胶具有良好的生物相容性和低的细胞毒性,在溶菌酶的作用下凝胶可缓慢降解。Nie等^[90]通过Michael加成反应在壳聚糖上引入乙二醇甲基丙烯酸酯,得到水溶性的壳聚糖衍生物,实验发现该壳聚糖大单体具有

很高的反应活性，在光引发剂Irgacure 2959作用下，大单体上的双键几乎全部参与反应，在形成的凝胶中未检测到残余的双键。进一步研究^[91]表明，该凝胶无细胞毒性，由于壳聚糖大单体良好的光反应活性，可用作可注射生物材料。

(3) 葡聚糖

葡聚糖(dextran)是一种细菌多糖，存在于特殊种类的细菌、酵母菌、蘑菇类等的细胞壁中，主链由 D-吡喃葡萄糖以 α -1,6 键连接，有少量以 α -1,2、 α -1,3、 α -1,4 键连接的支链。葡聚糖具有良好的生物相容性和低毒性，在体内可由葡聚糖酶降解。

Kim等^[92]合成了葡聚糖大单体，在光引发剂Irgacure 651存在下，进一步光聚合得到葡聚糖水凝胶，研究了葡聚糖上丙烯酸酯基取代度对凝胶溶胀性能的影响。Pitarresi等^[93]将葡聚糖大单体与天冬氨酸大单体紫外光聚合制得凝胶，研究了大单体浓度和光照时间对凝胶产率及溶胀性能的影响，实验发现，纯的葡聚糖凝胶在葡聚糖酶作用下能完全降解，且降解速率与交联度有关；而含有天冬氨酸组分的葡聚糖凝胶，在葡聚糖酶作用下部分降解。因此可通过调节凝胶的交联密度以及引入天冬氨酸组分来实现药物的可控释放。由于人体结肠处含有葡聚糖酶，因此这种葡聚糖凝胶可用于结肠靶向的药物释放体系^[94]。

(4) 海藻酸

海藻酸(alginic acid)是从褐藻类中分离出来的一种多聚糖醛酸，由古洛糖醛酸与其立体异构体甘露糖醛酸两种结构单元构成，类似于细胞外基质中的糖胺聚糖，具有良好的生物相容性和低的毒性。海藻酸易与一些二价阳离子如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 等结合形成凝胶，这种离子交联的海藻酸盐凝胶不太稳定，在离子介质环境中易溶解，失去凝胶的特性。

Jeon 等^[95]合成了海藻酸甲基丙烯酸酯大单体，进一步光聚合得到海藻酸水凝胶，可通过改变海藻酸上丙烯酸酯基取代度来调控凝胶的溶胀度、力学性能以及降解速率，体外细胞实验表明海藻酸大单体以及其光交联凝胶具有低的生物毒性。Chou 等^[96]进一步研究了紫外光交联海藻酸水凝胶在椎间盘退变治疗中的应用，采用 Ca^{2+} 交联的海藻酸凝胶与光交联的海藻酸凝胶原位包埋牛髓核(NP)细胞，比较了 NP 细胞在两种凝胶中的细胞增殖及表达情况。实验结果表明， Ca^{2+} 交联的海藻酸凝胶稳定性较差，在体内易降解，不能保持完整的凝胶网络结构，不利于细胞的增殖；将原位包埋 NP 细胞的光交联海藻酸凝胶植入到体内，实验发现该凝胶能促进 I 型和 II 型胶原的形成，8 周后凝胶仍保持完整的网络结构，且凝胶的模量比未植入体内时增加，这是因为凝胶中生成的髓核功能组织能

增加凝胶的强度。

(5) 胶原和明胶

胶原(collagen)是人体中含量最丰富的一种结构蛋白。胶原蛋白是生物机体结缔组织的主要成分、骨组织的细胞外基质的主要成分,可促进新骨的形成。胶原的种类较多,常用作组织工程材料的主要是I型、II型和III型胶原。胶原具有热可逆的溶胶-凝胶转变性能,但其物理凝胶的力学强度较差,可采用化学交联的方法来提高胶原凝胶的力学性能。明胶(gelatin)是动物胶原蛋白的部分水解产物,分为A、B两类。A类明胶是胶原经酸处理的水解产物,B类明胶是胶原经碱处理的水解产物。

Brinkman 等^[97]将甲基丙烯酰胺改性的 I 型胶原和平滑肌细胞可见光聚合,生成原位包埋细胞的胶原凝胶,且细胞的存活率为 70%。甲基丙烯酰胺改性后的胶原大单体以及光交联的胶原均能保持其三维螺旋结构,与天然胶原一样,容易被细胞受体识别,具有良好的生物相容性。Dong 等^[98]通过胶原上的羧基与肉桂酸酯衍生物上的氨基的偶联反应,将肉桂酸酯基连接到 I 型胶原上。肉桂酸酯改性的胶原用紫外光照 60 min,制得具有良好力学性能的胶原凝胶,该凝胶可用作药物载体及组织工程材料。Gatts-Asfura 等^[99]通过类似的偶联反应在明胶上引入对硝基肉桂酸酯基,体外细胞实验显示该光交联凝胶具有良好的生物相容性。

1.3.3 在生物医学领域的应用

光聚合提供了一种快速可控形成水凝胶的方法,含有可聚合基团的聚合物在光的作用下发生交联反应形成聚合物水凝胶。由于光聚合的优点^[43],光交联型聚合物水凝胶广泛用作药物载体、细胞和生长因子载体、基因载体、可注射型载体等。

1.3.3.1 药物载体

通常,水凝胶负载药物的方法主要有两种,即物理型负载和化学型负载。物理型负载是常用的药物负载方法,其操作较为简单,可利用药物由外向凝胶内部的扩散作用达到负载药物的目的,这种负载方式也成为后负载方法;或是采用原位包埋的方式负载药物。后负载方式中药物的负载效率较低,负载量有限^[100,101];原位包埋方式中药物负载效率较高,负载量较大^[102,103]。化学型负载是将药物分子接在聚合物分子链上后再形成凝胶,这种方法可有效控制药物的负载量并具有一定的靶向释放功能。

由于光聚合的特点,光交联水凝胶通过物理负载方法包埋药物时,通常采用原位包埋法。Obara 等^[104]将乳糖酸与叠氮引入到壳聚糖上,在紫外光照下光照原位包埋抗癌药物紫杉醇,该载药凝胶在缓冲溶液中缓慢持续释放,包埋于凝胶内的紫杉醇能长时间的保持活性;动物实验表明,载药凝胶能够抑制肿瘤细胞的生长,且抑制效果比未包埋的紫杉醇好。Han 等^[105]将壳聚糖甲基丙烯酸酯大单体与 *N*-异丙基丙烯酸酰胺共聚光交联,制得具有 pH 和温度双重敏感性的凝胶,以酸性橙 8 和 5-氟脲嘧啶为模型药物,讨论了凝胶中温敏单体含量及介质 pH 对药物释放速率的影响。Kim 等^[106]也通过共聚光交联得到原位包埋人体生长激素的温敏性透明质酸凝胶,包埋的人体生长激素在 12 天内持续缓慢释放,且释放速率与温度有关,温度越高,释放速率越快。Leach 等^[107]在加与不加四臂 PEG 大单体的条件下,用光聚合方法制备了透明质酸凝胶并将其用作牛血清蛋白(BSA)的载体,结果发现通过改变透明质酸的浓度及 PEG 的用量可有效地调控 BSA 的释放速率。Liu 等^[108]以 PEG 双丙烯酸酯为大单体,在光引发剂的存在下,通过光交联原位包埋溶菌酶,讨论了光引发剂浓度、光照时间等对溶菌酶二级结构及其活性的影响,结果发现光引发剂含量较高或光照时间较长时,部分溶菌酶也参与了链增长反应连接到 PEG 链上,导致溶菌酶失活。

将药物分子连接到聚合物分子链上,可以改善药物的一些不良因素如水溶性低、组织或黏膜刺激性等,或者改善药物代谢动力学上一些影响药效发挥的因素如易降解、半衰期太短或太长、药物透膜能力低以及缺乏理想的靶向性等^[109]。Andreopoulos 等^[110]在四臂 PEG 上连接亚肉桂基和有机磷酸水解酶(OPH),通过亚肉桂基的光二聚反应形成凝胶,实现发现化学连接 OPH 的光稳定性远远高于天然 OPH,化学连接 OPH 紫外光照 60 min 能保有 80%的活性,而天然 OPH 紫外光照 10 min,其活性完全丧失;比较化学固定化酶凝胶与物理包埋酶凝胶的酶释放活性,发现前者释放出的 OPH 的活性高于后者。Cho 等^[111]将抗肿瘤药物阿霉素连接到低分子量壳聚糖甲基丙烯酸酯大单体上,与丙烯酸酯化的聚乙二醇-聚丙二醇-聚乙二醇(Pluronic)共聚光交联形成凝胶,同时原位物理包埋阿霉素,如图 1-22 所示,发现物理包埋的阿霉素首先通过分子扩散释放出来,然后化学连接的阿霉素通过化学降解而释放出来,达到可持续释放目的,且释放出的阿霉素具有明显的抗肿瘤效果。

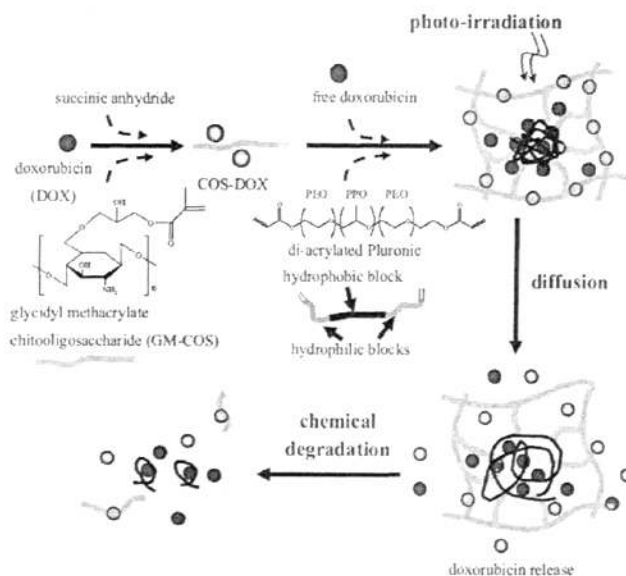


Figure 1-22 Schematic diagram of GM-COS/Pluronic hydrogel for anti-cancer therapy^[111]

1.3.3.2 细胞及生长因子载体

水凝胶交联网络结构具有多孔结构,其孔径和孔密度可通过聚合交联反应条件来调控,这种多孔结构有利于细胞活性物质的传递和迁移。通过光聚合技术生成水凝胶可对细胞进行快速原位包封,不仅可以降低包埋过程中细胞失活率,而且可以根据所需制备不同形状的材料。

Fedorovich等^[112]用透明质酸水凝胶原位光包埋干细胞,研究了包埋过程中紫外光照对干细胞活性的影响,实验结果表明,干细胞均匀分散在透明质酸溶液中,不易与活性自由基接触,因而聚合过程中的紫外光照不影响干细胞的活性。Bryant等^[113]将软骨细胞包埋在硫酸软骨素凝胶中并进行体外培养,8周后没有观察到软骨细胞外基质的生成;但用硫酸软骨素与PEG的共聚凝胶原位包埋软骨细胞,2周后观察到有软骨细胞外基质生成,表明PEG能够促进软骨组织的形成。Dadsetan等^[114]研究了PEG光交联凝胶的交联密度对所包埋软骨细胞的贴附、生长情况的影响,实验发现,随凝胶交联密度增大,细胞越容易粘附于凝胶;将载有细胞的凝胶体外培养3周后,观察到有软骨细胞外基质生成。Reza等^[115]用羧甲基纤维素凝胶对牛髓核细胞进行原位光包埋,实验发现细胞能在凝胶中分化增殖,将载有细胞的凝胶体外培养7天后,发现凝胶的模量增大,这是因为生成的细胞外基质能增强凝胶的力学强度。

生长因子是细胞分泌的、具有诱导和刺激细胞增殖、维持细胞存活等生物效应的水溶性蛋白质,对细胞的增殖分化、组织或器官的修复和再生都具有重要的促进作用。一般来讲,生长因子在室温环境下极易失去活性,因此,采用适宜的

介质或载体负载生长因子,在指定部位可控持续释放,从而促进细胞的生长和分化,诱导和加速组织再生。

由于光聚合反应条件温和,在室温下可快速形成凝胶,将光交联水凝胶作为载体原位包埋生长因子可有效地保持生长因子的活性。Obara等^[63]将乳糖基和叠氮基引入到壳聚糖分子链上,得到一种可光交联的水溶性壳聚糖衍生物(Az-CH-LA)。将Az-CH-LA水溶液涂敷在白鼠背部完全皮肤切口处,用紫外光照射90 s,结果显示形成的水凝胶能促进伤口愈合;若在Az-CH-LA水溶液中加入成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2),在紫外光照下原位包埋FGF-2,从凝胶释放出的FGF-2能促进毛细血管和上皮组织的生成。动物皮肤创口实验表明,给药30天后,部分水凝胶被降解,部分水凝胶被巨噬细胞吞噬,在水凝胶周围可见肉芽组织,最终伤口完全愈合。Andreopoulos等^[116]用肉桂酸改性的PEG凝胶原位包载碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),当紫外光交联时间不超过10 min时, bFGF的活性能得到有效的保持,且在光包埋过程中加入肝素能提高生长因子的活性,同时可改变光照时间和PEG大单体浓度来调控凝胶的交联密度,以控制bFGF的释放速率。Yoon等^[117]进一步将肝素大单体与Pluronic大单体共聚交联制得凝胶,并对bFGF进行原位包埋,由于肝素与bFGF之间存在特定的相互作用(如图1-23),使包埋的生长因子以近乎零级的释放方式持续释放一个月,且释放出的bFGF具有足够的活性促进人脐静脉内皮细胞的增殖;当将载有bFGF的肝素凝胶移植到体内,可观察到新生血管的形成。

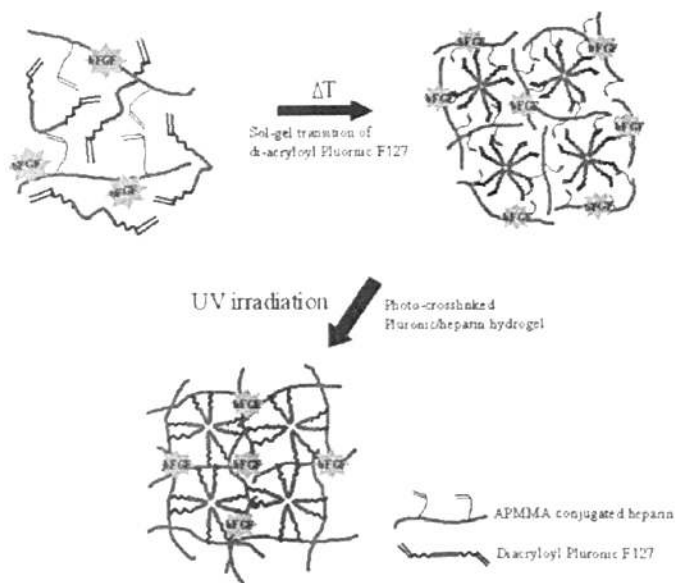


Figure 1-23 Schematic illustration of photo-crosslinked Pluronic/heparin composite hydrogel formation^[117]

1.3.3.3 基因载体

目前用于基因治疗的载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体虽然具有较好的转染效率,但因其高风险性、机体免疫反应、不能大规模生产等自身缺陷,难以广泛应用于临床。因此,近年来用非病毒载体(聚合物)进行基因传输受到了越来越多的关注^[118-121]。

与其它聚合方式形成化学交联水凝胶相比,光聚合方法可最大程度的保持 DNA 的活性^[122]。Chun 等^[123]以双键修饰的 Pluronic 和透明质酸为原料,通过紫外光聚合将 DNA 原位包埋于水凝胶基质中,通过改变光照时间及透明质酸的用量可有效地控制 DNA 的释放速率;虽然紫外光照会影响 DNA 的活性,但释放出的 DNA 仍保持了一定的基因表达活性。Wieland^[124]等通过光聚合反应,将 DNA/聚乙烯基亚胺复合物包埋于 PEG 与透明质酸凝胶基质中,通过调节 PEG 与透明质酸的比例,可调节 DNA 的释放速率;但是由于 DNA 复合物与凝胶基质存在相互作用,只有约 14% 的 DNA 复合物从凝胶中释放出来, DNA 的利用率较低。Quick^[125]也报道了相似的光交联 PEG 体系,在光包埋过程中加入保护剂维生素 C 有助于保持质粒 DNA 的超螺旋构象,释放出的 DNA 活性很高,可通过凝胶的降解速率来调控 DNA 的释放速率。

1.3.3.4 可注射型载体

聚合物水凝胶由于具有良好的生物相容性、生物降解性及适当的机械强度,作为支架材料广泛应用于组织工程领域。可注射型支架由于手术简单(注射),具有微创性和费用低等优点而受到广泛关注^[126,127]。

光聚合方法的可控性满足了水凝胶支架的可注射要求,便于手术操作。Lee 等^[128]通过紫外光聚合,将软骨细胞包埋于透明质酸与 Pluronic 的接枝物凝胶中,体外培养发现有软骨细胞基质生成,因此该凝胶可用作可注射细胞载体。Elisseeff 等^[129]进一步利用可注射水凝胶的透皮光聚合技术,实现了软骨的异位形成(如图 1-24 所示),他们将牛关节软骨细胞悬浮于 PEG 与 PEG 双丙烯酸酯的水溶液中,然后将其皮下注射于鼠背上,在体外光源照射下聚合,经 4-7 周后取出,发现有新生类软骨结构形成。与紫外光聚合相比,可见光引发的可注射凝胶更具优势,因为可见光对生物组织的损伤更小。Fukaya 等^[130]将明胶与曙红的接枝物和聚胺溶液混合,用可见光照射几十秒即能形成微孔交联状凝胶,他们通过改变明胶的分子量及接枝物浓度来调控凝胶的力学强度,可得到与牙周组织力学强度相当的凝胶,如图 1-25 所示,该可注射水凝胶可用作齿骨修复的支架材料。

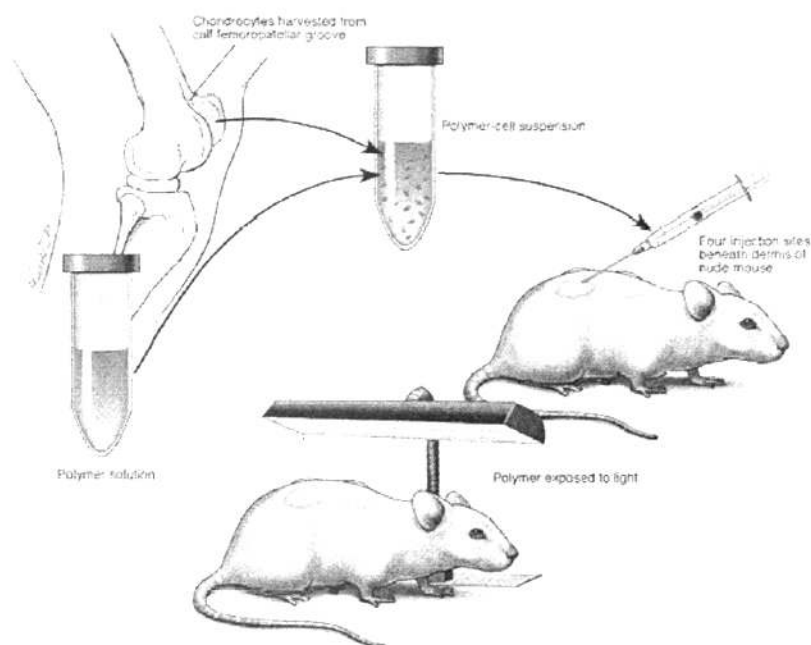


Figure 1-24 Schematic of procedure for cartilage tissue engineering by using transdermal photopolymerization^[129]

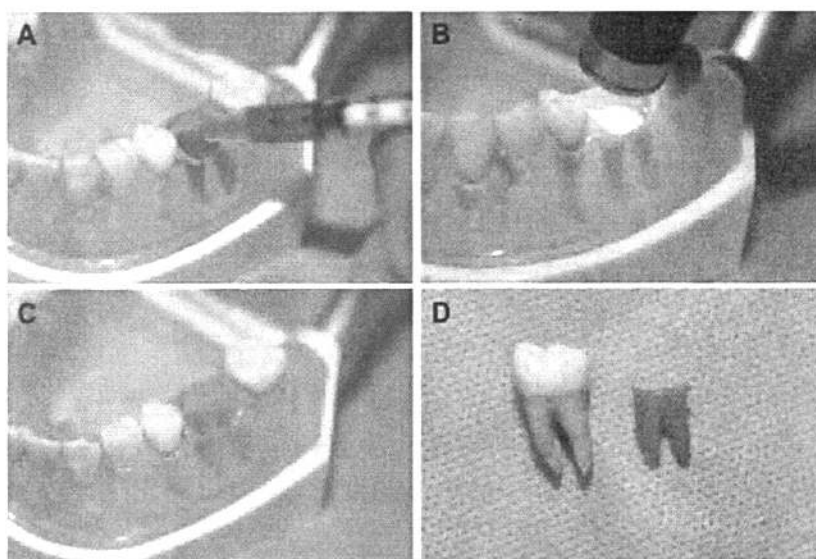


Figure 1-25 Demonstration of photocuring of the photo-crosslinkable material by using the root cavity of a dental study model. (A) Filling the root cavity with the precursor solution, (B) photoirradiation for 40 s, 4 times, (C) photocured material, and (D) extraction of the material^[130]

1.4 本课题的提出

近年来,环境敏感性聚合物水凝胶的设计合成与应用研究十分活跃,尤其以光敏感性聚合物水凝胶的研究最受人们瞩目。由于光源安全、清洁、易于使用和控制,与其它环境敏感性聚合物水凝胶相比,光敏感性聚合物水凝胶在化学传感器、记忆元件开关、药物控释、固定化酶、组织工程等领域具有更广阔的应用前景。

多糖来源广泛,具有优良的生物相容性、生物可降解性和无毒性,被认为是一种非常理想的生物医药材料。本论文以天然多糖为基本原料,设计合成了光响应型聚合物水凝胶及光交联型聚合物水凝胶,对所得水凝胶的溶胀性能、力学性能、光响应行为以及在药物控释等方面的应用进行了探索研究。

主要研究内容如下:

(1) 利用甲基丙烯酸缩水甘油酯改性的葡聚糖与偶氮单体 4-(4'-丙烯酰氧基苯基偶氮)苯甲酸自由基共聚交联,合成了具有光及 pH 响应性的葡聚糖水凝胶。研究了水凝胶中偶氮含量及介质 pH 对水凝胶溶胀性能的影响;以维生素 B₁₂ 为模型药物,考察了该类凝胶材料对药物的负载及在紫外光照下的体外释放规律。

(2) 合成了含偶氮苯疏水侧链的两亲性支链淀粉接枝物(Amy-Azo),利用 Amy-Azo 在水溶液中的疏水缔合交联作用,得到光响应型支链淀粉基纳米水凝胶。用苾做荧光探针测定了 Amy-Azo 在水溶液中的临界胶束浓度;通过激光粒度分析和透射电镜研究了紫外光照前后 Amy-Azo 纳米水凝胶的粒径大小及分布;并利用紫外可见光谱研究了 Amy-Azo 在 H₂O/DMSO 溶液中的疏水聚集过程;以疏水药物吲哚美辛为模型药物,研究了载药纳米水凝胶在紫外光照下的体外药物释放行为。

(3) 通过三步反应合成了以 4-硝基肉桂酸为侧基的水溶性壳聚糖衍生物(CMCS-NC),在无外加光引发剂的条件下,利用 CMCS-NC 中肉桂酸酯基在 365 nm 紫外光照下的光二聚反应,制备了光交联型羧甲基壳聚糖水凝胶。研究了紫外光照时间和肉桂酸酯基的取代度对所得水凝胶溶胀性能、力学性能以及体外生物降解性的影响;以抗肿瘤药物盐酸阿霉素为模型药物,在无外加光引发剂的条件下,研究了该类水凝胶对盐酸阿霉素的原位包埋与体外药物释放行为。

(4) 基于侧基含 4-硝基肉桂酸支链淀粉衍生物(Amy-NC)的合成,在无外加光引发剂的条件下制备了光交联型支链淀粉基水凝胶。通过紫外可见光谱研究了 Amy-NC 中硝基肉桂酸酯基的光二聚反应过程;研究了紫外光照时间和 Amy-NC 溶液浓度对所得水凝胶溶胀性能、力学性能以及体外生物降解性的影

响；以溶菌酶为蛋白类生物大分子模型药物，在无外加光引发剂的条件下，研究了该类光交联水凝胶对溶菌酶的原位包埋与控制释放，并探讨了释放液中溶菌酶的二级构象及生物活性。

参考文献

- [1] Wichterle O, Lim D. Hydrophilic gels in biologic use. *Nature*, 1960, 185: 117-123
- [2] 柳明珠, 曹丽歆. 丙烯酸与海藻酸钠共聚制备耐盐性高吸水树脂. *应用化学*, 2002, 19(5): 455-458
- [3] Yi JZ, Zhang LM. Removal of methylene blue dye from aqueous solution by adsorption onto sodium humate/polyacrylamide/clay hybrid hydrogels. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 2182-2186
- [4] Matheis G. Phosphorylation of food proteins with phosphorous oxychloride – Improvement of functional and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 1991, 39: 13-36
- [5] Bryant CM, McClement DJ. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science and Technology*, 1998, 9: 143-151
- [6] Clark AH, Kavanagh GM, Ross-Murphy SB. Globular protein gelation-theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, 2001, 15: 383-400
- [7] Ziegler GR, Foegeding EA. The gelation of proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1990, 34: 203-298
- [8] Chen LY, Remondetto GE, Subirade M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 2006, 17: 272-283
- [9] Balakrishnan B, Mohanty M, Umashankar PR, Jayakrishnan A. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials*, 2005, 26: 6335-6342
- [10] Balakrishnan B, Mohanty M, Fernandez AC, Mohanan FP, Jayakrishnan A. Evaluation of the effect of incorporation of dibutyl cyclic adenosine monophosphate in an in situ-forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials*, 2006, 27: 1355-1361
- [11] Lee WF, Chen YC. Effects of intercalated hydrotalcite on drug release behavior for poly(acrylic acid-co-N-isopropyl acrylamide)/intercalated hydrotalcite hydrogels. *European Polymer Journal*, 2006, 42: 1634-1642

- [12] Lei YG, Segura T. DNA delivery from matrix metalloproteinase degradable poly(ethylene glycol) hydrogels to mouse cloned mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2009, 30: 254-265
- [13] Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H. Experimental study on osteoconductive properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste. *Biomaterials*, 1992, 13: 759-763
- [14] Chaterji S, Kwon IK, Park K. Smart polymeric gels: Redefining the limits of biomedical devices. *Progress in Polymer Science*. 2007, 32: 1083-1122
- [15] Yamato M, Akiyama Y, Kobayashi J, Yang J, Kikuchi A, Okano T. Temperature-responsive cell culture surfaces for regenerative medicine with cell sheet engineering. *Progress in Polymer Science*. 2007, 32: 1123-1133
- [16] Roy D, Cambre JN, Sumerlin BS. Future perspectives and recent advances in stimuli responsive materials. *Progress in Polymer Science*. 2010, 35: 278-301
- [17] Suzuki A, Tanaka T. Phase transition in polymer gels induced by visible light. *Nature*, 1990, 346: 345-347
- [18] Mamada A, Tanana T, Kungwachakun D, Irie M. Photoinduced phase transition of gels. *Macromolecules*, 1990, 23: 1517-1519
- [19] Kurihara S, Ueno Y, Nonaka T. Preparation of poly(vinyl alcohol)-graft-*N*-isopropylacrylamide copolymer membranes with triphenylmethane leucocyanide and permeation of solutes through the membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 1998, 67: 1931-1937
- [20] Sumaru K, Ohi K, Takagi T, Kanamori T, Shinbo T. Photoresponsive properties of poly(*N*-isopropylacrylamide) hydrogel partly modified with spiropyrans. *Langmuir*, 2006, 22: 4353-4356
- [21] Kumar GS, Neckers DC. Photochemistry of azobenzene-containing polymer. *Chemical Reviews*, 1989, 89: 1915-1925
- [22] Chen L, Li SG, Zhao YP, Wang YC, Wang QW. Photoresponses and pH responses of hydrogels composed of acrylamido azobenzene and acrylic acid. *Journal of Applied Polymer Science*, 2005, 96: 2163-2167
- [23] Patnaik S, Sharma AK, Garg BS, Gandhi RP, Gupta KC. Photoregulation of drug release in azo-dextran nanogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 342: 184-193
- [24] Lee CT, Smith KA, Hatton TA. Photoreversible viscosity changes and gelation in mixtures of hydrophobically modified polyelectrolytes and photosensitive surfactants. *Macromolecules*, 2004, 37: 5397-5405
- [25] Bortolus P, Monti S. Cis $\leftrightarrow$ trans photoisomerization of azobenzene-cyclodextrin inclusion complexes. *The Journal of Physical Chemistry*, 1987, 91: 5046-5050

- [26] Sanchez AM, Rossi RH. Effect of β -Cyclodextrin on the thermal cis-trans isomerization of azobenzenes. *The Journal of Organic Chemistry*, 1996, 61: 3446-3451
- [27] Tomatsu I, Hashidzume A, Harada A. Photoresponsive hydrogel system using molecular recognition of α -Cyclodextrin. *Macromolecules*, 2005, 38: 5223-52271
- [28] Zhao YL, Stoddart JF. Azobenzene-based light-responsive hydrogel system. *Langmuir*, 2009, 25: 8442-8446
- [29] Zheng PJ, Hu X, Zhao XY, Li L, Tam KC, Gan LH. Photoregulated sol-gel transition of novel azobenzene-functionalized hydroxypropyl methylcellulose and its α -cyclodextrin complexes. *Macromolecular Rapid Communications*, 2004, 25: 678-682
- [30] Zheng PJ, Wang C, Hu X, Tam KC, Li L. Supramolecular complexes of azocellulose and α -cyclodextrin: isothermal titration calorimetric and spectroscopic studies. *Macromolecules*, 2005, 38: 2859-2864
- [31] Hu X, Zheng PJ, Zhao XY, Li L, Tam KC, Gan LH. Preparation, characterization and novel photoregulated rheological properties of azobenzene functionalized cellulose derivatives and their α -CD complexes. *Polymer*, 2004, 45: 6219-6225
- [32] Moniruzzaman M, Fernando GF, Talbot JDR. Synthesis and characterization of an azobenzene- and acrylamide-based photoresponsive copolymer and gel. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2004, 42: 2886-2896
- [33] Kang MS, Gupta VK. Photochromic cross-links in thermoresponsive hydrogel of poly(*N*-isopropylacrylamide): enthalpic and entropic consequences on swelling behavior. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106: 4127-4132
- [34] Gomy C, Schmitzer AR. Synthesis and photoresponsive properties of a molecularly imprinted polymer. *Organic Letters*, 2007, 9: 3865-3868
- [35] Takeuchi T, Akeda K, Murakami S, Shinmori H, Inoue S, Lee WS, Hishiya T. Photoresponsive porphyrin-imprinted polymers prepared using a novel functional monomer having diaminopyridine and azobenzene moieties. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007, 5: 2368-2374
- [36] Wang S, Choi MS, Kim SH. Multiple switching photochromic poly(*N*-isopropylacrylamide) with spironaphthoxazine hydrogel. *Dyes and Pigments*, 2008, 78: 8-14
- [37] Tomer R, Florence AT. Photo-responsive hydrogels for potential responsive release applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 1993, 99: R5-R8
- [38] Gong CB, Lam MHW, Yu HX. The fabrication of a photoresponsive molecularly imprinted polymer for the photoregulated uptake and release of caffeine. *Advanced Functional Materials*, 2006, 16: 1759-1767

- [39] Gong CB, Wong KL, Lam MHW. Photoresponsive molecularly imprinted hydrogels for the photoregulated release and uptake of pharmaceuticals in the aqueous media. *Chemistry of Materials*, 2008, 20: 1353-1358
- [40] Kodzwa M G, Staben M E, Rethwisch D G. Photoresponsive control of ion-exchange in leucohydroxide containing hydrogel membranes. *Journal of Membrane Science*, 1999, 158: 85-92
- [41] Liu NG, Dunphy DR, Atanassov P, Bunge SD, Chen Z, López GP, Boyle TJ, Brinker CJ. Photoregulation of mass transport through a photoresponsive azobenzene-modified nanoporous membrane. *Nano Letters*, 2004, 4:551-554
- [42] Sugiura S, Sumaru K, Ohi K, Hiroki K, Takagi T, Kanamori T. Photoresponsive polymer gel microvalves controlled by local light irradiation. *Sensors and Actuators A*, 2007, 140: 176-184
- [43] Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2002, 23: 4307-4314
- [44] Williams CG, Malik AN, Kim TK, Manson PN, Elisseff JH. Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials*, 2005, 26: 1211-1218
- [45] Lewis FD, Quillen SL, Hale PD, Oxman JD. Lewis acid catalysis of photochemical reactions. 7. Photodimerization and cross-cycloaddition of cinnamic esters. *Journal of the American Chemical Society*, 1988, 110: 1261-1267
- [46] Shi DJ, Matsusaki M, Kaneko T, Akashi M. Photo-cross-linking and cleavage induced reversible size change of bio-based nanoparticles. *Macromolecules*, 2008, 41: 8167-8172
- [47] Trenor SR, Shultz AR, Love BJ, Long TE. Coumarins in polymers: from light harvesting to photo-cross-Linkable tissue scaffolds. *Chemical reviews*, 2004, 104: 3059-3077
- [48] Yamamoto H, Kitsuki T, Nishida A, Asada K, Ohkawa K. Photoresponsive peptide and polypeptide systems. 13. Photoinduced cross-linked gel and biodegradation properties of copoly(L-lysine) containing 7-coumaryloxyacetyl-L-lysine residues. *Macromolecules*, 1999, 32: 1055-1061
- [49] Ohkawa K, Shoumura K, Yamada M, Nishida A, Shirai H, Yamamoto H. Photoresponsive peptide and polypeptide systems. 14 Biodegradation of photocrosslinkable copolypeptide hydrogels containing L-ornithine and 7-coumaryloxyacetyl-L- ornithine residues. *Macromolecular Bioscience*, 2001, 1: 149-156
- [50] Nagata M, Yamamoto Y. Photoreversible poly(ethylene glycol)s with pendent coumarin group and their hydrogels. *Reactive & Functional Polymers*, 2008, 68: 915-921

- [51] Becker HD, Langer V, Becker HC. Photochemistry of 9-benzoylanthracene. *The Journal of Organic Chemistry*, 1993, 58: 6394-6396
- [52] Ito Y, Fujita H. Formation of an unstable photodimer from 9-anthracenecarboxylic acid in the solid state. *The Journal of Organic Chemistry*, 1996, 61: 5677-5680
- [53] Bouas-Laurent H, Desvergne JP, Castellan A, Lapouyade R. Photodimerization of anthracenes in fluid solution: structural aspects. *Chemical Society Reviews*, 2000, 29: 43-55
- [54] Zheng YJ, Micic M, Mello SV, Mabrouki M, Andreopoulos FM, Konka V, Pham SM, Leblanc RM. PEG-Based Hydrogel Synthesis via the Photodimerization of Anthracene Groups. *Macromolecules*, 2002, 35: 5228-5234
- [55] Nakayama Y, Kameo T, Ohtaka A, Hirano Y. Enhancement of visible light-induced gelation of photocurable gelatin by addition of polymeric amine. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2006, 177: 205-211
- [56] Grotzinger C, Burget D, Jacques P, Fouassier JP. Visible light induced photopolymerization: speeding up the rate of polymerization by using co-initiators in dye/amine photoinitiating systems. *Polymer*, 2003, 44: 3671-3677
- [57] Kızılel S, Pérez-Luna VH, Teymour F. Photopolymerization of poly(ethylene glycol) diacrylate on eosin-functionalized surfaces. *Langmuir*, 2004, 20: 8652-8658
- [58] Fukaya C, Ishikawa A, Nakayama Y, Murayama Y, Omata S, Hosaka Y, Nakagawa T. Development of a photocurable gelatin-based gelation material for application to periodontal regeneration. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2008, 199: 255-260
- [59] Abramovitch RA, Davis BA. Preparation and properties of imido intermediates (imidogens). *Chemical Reviews*, 1964, 64: 149-185
- [60] Labbe G. Decomposition and addition reactions of organic azides. *Chemical Reviews*, 1969, 69: 345-363
- [61] Ono K, Saito Y, Yura H, Ishikawa K, Kurita A, Akaike T, Ishihara M. Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2000, 49: 289-295
- [62] Ishihara M, Nakanishi K, Ono K, Sato M, Kikuchi M, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Uenoyama M, Kurita A. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials*, 2002, 23: 833-840
- [63] Obara K, Ishihara M, Ishizuka T, Fujita M, Ozeki Y, Maehara T, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Kikuchi M, Kurita A. Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired *db/db* mice. *Biomaterials*, 2003, 24: 3437-3444

- [64] 蒋琰, 陈满, 陈明, 姚芳莲, 姚康德. 光聚合水凝胶及其在组织工程中的应用. 高分子通报, 2007, 10: 26-33
- [65] Onuki Y, Hoshi M, Okabe H, Fujikawa M, Morishita M, Takayama K. Formulation optimization of photocrosslinked polyacrylic acid modified with 2-hydroxyethyl methacrylate hydrogel as an adhesive for a dermatological patch. Journal of Controlled Release, 2005, 108: 331-340
- [66] Baker M, Brown DH, Casadio YS, Chirila TV. The preparation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly{(2-hydroxyethyl methacrylate)-co-[poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate]} by photoinitiated polymerisation-induced phase separation in water. Polymer, 2009, 50: 5918-5929
- [67] Li L, Lee J. Photopolymerization of HEMA/DEGDMA hydrogels in solution. Polymer, 2005, 46: 11540-11547
- [68] Lu S, Anseth KS. Photopolymerization of multilaminated poly(HEMA) hydrogels for controlled release. Journal of Controlled Release, 1999, 57: 291-300
- [69] Jansen J, Melchels FPW, Grijpma Dw, Feijen j. Fumaric acid monoethyl ester-functionalized poly(D,L-lactide)/N-vinyl-2-pyrrolidone resins for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. Biomacromolecules, 2009, 10: 214-220
- [70] White LA, Jönson S, Hoyle CE, Mathias. Synthesis of 3-alkylated-1-vinyl-2-pyrrolidones and preliminary kinetic studies of their photopolymerizations. Polymer, 1999, 40: 6597-6605
- [71] Wu YH, Liu YL, Chang Y, Higuchi A, Freeman BD. Effect of UV intensity on structure, water sorption, and transport properties of crosslinked N-vinyl-2-pyrrolidone/N,N'-methylenebisacrylamide films. Journal of Membrane Science, 2010, 348: 47-55
- [72] D'Errico G, Lellis MD, Mangiapia G, TedeschiA, Ortona O, Fusco S, Borzacchiello A, Ambrosio L. Structural and mechanical properties of UV-photo-cross-linked poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels. Biomacromolecules, 2008, 9: 231-240
- [73] Sawhney AS, Pathak CP, Hubbell JA. Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly(α -hydroxy acid) diacrylate macromers. Macromolecules, 1993, 26: 581-587
- [74] Shah NM, Pool MD, Metters AT. Influence of network structure on the degradation of photo-cross-linked PLA- b-PEG- b-PLA hydrogels. Biomacromolecules, 2006, 7: 3171-3177
- [75] Hou YP, Schoener CA, Regan KR, Munoz-Pinto D, Mariah SH, Grunlan MA. Photo-cross-linked PDMS_{star}-PEG hydrogels: synthesis, characterization, and potential application for tissue engineering scaffolds. Biomacromolecules, 2010, 11: 648-656

- [76] Andreopoulos FM, Deible CR, Stauffer MT, Weber SG, Wagner WR, Beckman EJ, Russell AJ. Photocissable hydrogel synthesis via rapid photopolymerization of novel PEG-based polymers in the absence of photoinitiators. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118: 6235-6240
- [77] Zheng YJ, Andreopoulos FM, Micic M, Huo Q, Pham SM, Leblanc RM. A novel photocissile poly(ethylene glycol)-based hydrogel. *Advanced Functional Materials*, 2001, 11: 37-40
- [78] Micic M, Zheng YJ, Moy V, Zhang XH, Andreopoulos FM, Leblanc RM. Comparative studies of surface topography and mechanical properties of a new, photo-switchable PEG-based hydrogel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 27: 147-158
- [79] Young TH, Yao NK, Chang R. Evaluation of asymmetric poly(vinyl alcohol) membranes for use in artificial islets. *Biomaterials*, 1996, 17: 2139-2145
- [80] Uhrich KE. Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews*, 1999, 99: 3181-3198
- [81] Mühlebach A, Müller B, Pharisa C, Hofmann M, Seiferling B, Guerry D. New water-soluble photo crosslinkable polymers based on modified poly(vinyl alcohol). *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 1997, 35: 3603-3611
- [82] Schmedlen RH, Masters KS, West JL. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 2002, 23: 4325-4332
- [83] Bader RA. Synthesis and viscoelastic characterization of novel hydrogels generated via photopolymerization of 1,2-epoxy-5-hexene modified poly(vinyl alcohol) for use in tissue replacement. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4: 967-975
- [84] Park YD, Tirelli N, Hubbell JA. Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks. *Biomaterials*, 2003, 24: 893-900
- [85] Burdick JA, Chung C, Jia XQ, Randolph MA, Langer R. Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 386-391
- [86] Erickson IE, Huang AH, Sengupta S, Kestle S, Burdick JA, Mauck RL. Macromer density influences mesenchymal stem cell chondrogenesis and maturation in photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2009, 17: 1639-1648
- [87] Weng LH, Gouldstone A, Wu YH, Chen WL. Mechanically strong double network photocrosslinked hydrogels from *N,N*-dimethylacrylamide and glycidyl methacrylated hyaluronan. *Biomaterials*, 2008, 29: 2153-2163

- [88] Miyamoto K, Sasaki M, Minamisawa Y, Kurahashi Y, Kano H, Ishikawa S. Evaluation of *in vivo* biocompatibility and biodegradation of photocrosslinked hyaluronate hydrogels (HADgels). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004, 70: 550-559
- [89] Amsden BG, Sukarto A, Knight DK, Shapka Sn. Methacrylated glycol chitosan as a photopolymerizable biomaterial. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 3758-3766
- [90] Ma GP, Zhang XD, Han J, Song GQ, Nie J. Photo-polymerizable chitosan derivative prepared by Michael reaction of chitosan and polyethylene glycol diacrylate (PEGDA). *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, 45: 499-503
- [91] Gao XY, Zhou YS, Ma GP, Shi SQ, Yang DZ, Lu FM, Nie J. A water-soluble photocrosslinkable chitosan derivative prepared by Michael-addition reaction as a precursor for injectable hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79: 507-512
- [92] Kim SH, Won CY, Chu CC. Synthesis and characterization of dextran-based hydrogel prepared by photocrosslinking. *Carbohydrate Polymers*, 1999, 40: 183-190
- [93] Pitarresi G, Palumbo FS, Giammona G, Casadei MA, Moracci FM. Biodegradable hydrogels obtained by photocrosslinking of dextran and polyaspartamide derivatives. *Biomaterials*, 2003, 24: 4301-4313
- [94] Pitarresi G, Casadei MA, Mandracchia D, Paolicelli P, Palumbo FS, Giammona G. Photocrosslinking of dextran and polyaspartamide derivatives: A combination suitable for colon-specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2007, 119: 328-338
- [95] Jeon O, Bouhadir HK, Mansour JM, Alsberg E. Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials*, 2009, 30: 2724-2734
- [96] Chou AI, Akintoye SO, Nicoll SB. Photo-crosslinked alginate hydrogels support enhanced matrix accumulation by nucleus pulposus cells *in vivo*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2009, 17: 1377-1384
- [97] Brinkman WT, Nagapudi K, Thomas BS, Chaikof EL. Photo-cross-linking of type I collagen gels in the presence of smooth muscle cells: mechanical properties, cell viability, and function. *Biomacromolecules*, 2003, 4: 890-895
- [98] Dong CM, Wu XY, Caves J, Rele SS, Thomas BS, Chaikof EL. Photomediated crosslinking of C6-cinnamate derivatized type I collagen. *Biomaterials*, 2005, 26: 4041-4049
- [99] Gatts-Asfura KM, Weisman E, Andreopoulos FM, Micic M, Muller B, Sirpal S, Pham SM, Leblanc RM. Nitrocinnamate-functionalized gelatin: synthesis and "smart" hydrogel formation via photo-cross-linking. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 1503-1509
- [100] Am Ende MT, Peppas NA. Transport of ionizable drugs and proteins in crosslinked poly(acrylic acid) and poly(acrylic acid-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. II.

- Diffusion and release studies. *Journal of Controlled Release*, 1997, 48: 47-56
- [101] Yu H, Grainger DW. Modified release of hydrophilic, hydrophobic and peptide agents from ionized amphiphilic gel networks. *Journal of Controlled Release*, 1995, 34: 117-127
- [102] Bhattarai N, Ramay HR, Gunn J, Matsen FA, Zhang MQ. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. *Journal of Controlled Release*, 2005, 103: 609-624
- [103] Prestwich GD, Marecak DM, Marecek JF, Vercruysse KP, Ziebell MR. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release*, 1998, 53: 93-103
- [104] Obara K, Ishihara M, Ozeki Y, Ishizuka T, Hayashi T, Nakamura S, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Takase B, Ishihara M, Kikuchi M, Maehara T. Controlled release of paclitaxel from photocrosslinked chitosan hydrogels and its subsequent effect on subcutaneous tumor growth in mice. *Journal of Controlled Release*, 2005, 110: 79-89
- [105] Han J, Wang KM, Yang DZ, Nie J. Photopolymerization of methacrylated chitosan/PNIPAAm hybrid dual-sensitive hydrogels as carrier for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, 44: 229-235
- [106] Kim MR, Park TG. Temperature-responsive and degradable hyaluronic acid /Pluronic composite hydrogels for controlled release of human growth hormone. *Journal of Controlled Release*, 2002, 80: 69-77
- [107] Leach JB, Schmidt CE. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 2005, 26: 125-135
- [108] Liu CC, Sawicki SM, Metters AT. Free-radical-mediated protein inactivation and recovery during protein photoencapsulation. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 75-83
- [109] Valentino JS, Kwame WN. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59: 677-694
- [110] Andreopoulos FM, Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM, Beckman EJ, Russell AJ. Photoimmobilization of organophosphorus hydrolase within a PEG-based hydrogel. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 65: 579-588
- [111] Cho YI, Park S, Jeong SY, Yoo HS. In vivo and in vitro anti-cancer activity of thermo-sensitive and photo-crosslinkable doxorubicin hydrogels composed of chitosan-doxorubicin conjugates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 73: 59-65
- [112] Fedorovich NE, Oudshoorn MH, van Geemen D, Hennink WE, Alblas J, Dhert WJA. The

- effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels. *Biomaterials*, 2009, 30: 344-353
- [113] Bryant SJ, Arthur JA, Anseth KS. Incorporation of tissue-specific molecules alters chondrocyte metabolism and gene expression in photocrosslinked hydrogels. *Acta Biomaterialia*, 2005, 1: 243-252
- [114] Dadsetan M, Szatkowski JP, Yaszemski MJ, Lu LC. Characterization of photo-cross-linked oligo[poly(ethylene glycol) fumarate] hydrogels for cartilage tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 1702-1709
- [115] Reza AT, Nicoll SB. Characterization of novel photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels for encapsulation of nucleus pulposus cells. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6: 179-186
- [116] Andreopoulos FM, Persauda I. Delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) from photoresponsive hydrogel scaffolds. *Biomaterials*, 2006, 27: 2468-2476
- [117] Yoon JJ, Chung HJ, Park TG. Photo-crosslinkable and biodegradable Pluronic/heparin hydrogels for local and sustained delivery of angiogenic growth factor. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, 83: 597-605
- [118] Iwai M, Harada Y, Tanaka S, Muramatsu A, Mori T, Kashima K, Imanishi J, Mazda O. Polyethylenimine-mediated suicide gene transfer induces a therapeutic effect for hepatocellular carcinoma in vivo by using an Epstein-Barr virus-based plasmid vector. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 291: 48-54
- [119] Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R. Exploring polyethyleniminemediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *The Journal of Gene Medicine*, 2005, 7: 657-663
- [120] Kushibiki T, Tomoshige R, Fukunaka Y, Kakemi M, Yasuhiko T. In vivo release and gene expression of plasmid DNA by hydrogels of gelatin with different cationization extents. *Journal of Controlled Release*, 2003, 90: 207-216
- [121] Kushibiki T, Tomoshige R, Iwanaga K, Kakemi M, Tabata Y. Controlled release of plasmid DNA from hydrogels prepared from gelatin cationized by different amine compounds. *Journal of Controlled Release*, 2006, 112: 249-256
- [122] Quick DJ, Macdonald KK, Anseth KS. Delivering DNA from photocrosslinked, surface eroding polyanhydrides. *Journal of Controlled Release*, 2004, 97: 333-343
- [123] Chun KW, Lee JB, Kim SH, Park TG. Controlled release of plasmid DNA from photo-cross-linked pluronic hydrogels. *Biomaterials*, 2005, 26: 3319-3326
- [124] Wieland JA, Houchin-Ray TL, Shea LD. Non-viral vector delivery from PEG-hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Controlled Release*, 2007, 120: 233-241

- [125] Quick DJ, Anseth KS. DNA delivery from photocrosslinked PEG hydrogels: encapsulation efficiency, release profiles, and DNA quality. *Journal of Controlled Release*, 2004, 96: 341-351
- [126] Hou QP, De Bank PA, Shakesheff KM. Injectable scaffolds for tissue regeneration. *Journal of Materials Chemistry*, 2004, 14:1915-1923
- [127] Kretlow JD, Klouda L, Mikos AG. Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59: 263-273
- [128] Lee H, Park TG. Photo-crosslinkable, biomimetic, and thermo-sensitive pluronic grafted hyaluronic acid copolymers for injectable delivery of chondrocytes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, 88: 797-806
- [129] Elisseeff J, Anseth K, Derek S, McIntosh W, Randolph M, Yaremchuk M, Langer R. Transdermal photopolymerization of poly (ethylene oxide)-based injectable hydrogels for tissue-engineered cartilage. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1999, 104: 1014-1022
- [130] Fukaya C, Nakayama Y, Murayama Y, Omata S, Ishikawa A, Hosaka Y, Nakagawa T. Improvement of hydrogelation abilities and handling of photocurable gelatin-based crosslinking materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2009, 91B: 329-336

第2章 光及 pH 响应型葡聚糖基水凝胶的研究

2.1 前言

近二十多年来,环境响应性聚合物水凝胶的设计合成与应用研究十分活跃。这类水凝胶对外界刺激能产生响应,其自身的物理性质或化学性质可随外界环境改变而发生相应的变化。外界刺激因素包括温度、pH、溶剂、压力、离子、光、电场、磁场、声波、化学物质等^[1-7],有些水凝胶可以对两种或两种以上的刺激做出响应,当这些刺激信号发生变化时,凝胶的自身性质如体积、形状、分子极性 or 识别性能等随之发生变化。在这些环境响应性聚合物水凝胶中,温度和pH响应性水凝胶获得了广泛和深入的研究,但温度响应性水凝胶的响应速度受温度扩散的影响,pH响应性水凝胶的响应速度受离子扩散控制,而光响应性水凝胶能对光产生瞬时响应,在光学开关、光控制传感器以及光控制药物释放等方面具有潜在的应用^[8]。

偶氮苯及其衍生物是一类典型的光致异构分子,在光照下发生可逆顺反异构化反应。将偶氮苯基团引入到聚合物凝胶中,在紫外光照下,偶氮苯由反式构型转变为顺式构型,导致大分子链间距离发生改变,宏观上凝胶表现出膨胀-收缩行为^[9]。Chen 等^[10]将丙烯酰胺基偶氮苯与丙烯酸共聚制备了一种光和 pH 双重响应的凝胶。该共聚凝胶在紫外光照下体积减小,且随着共聚凝胶中偶氮苯含量的增加,凝胶收缩的越快。这种光响应型水凝胶在光刺激下发生溶胀-收缩行为,其作用类似于开关,可控凝胶中药物释放速率。Tomer 和 Florence^[11]合成了两种偶氮苯与 *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)的共聚凝胶用于药物释放,一种是将 4-丙烯酰胺基偶氮苯与 NIPAM 共聚交联形成含偶氮苯侧链的凝胶,另一种是以 4,4'-双丙烯酰胺基偶氮苯为交联剂制得 NIPAM 凝胶;将这两种载药凝胶在紫外光照下进行药物释放,与在避光条件下的药物释放行为相比,含偶氮苯侧链凝胶的药物释放量增大,而以偶氮苯为交联链的凝胶的药物释放量减小。

以葡聚糖为骨架的凝胶由于具有良好的生物相容性和生物降解性,常用作药物控制释放的载体^[2,12]。本文将甲基丙烯酸缩水甘油酯改性的葡聚糖和偶氮单体 4-(4'-丙烯酰氧基苯基偶氮)苯甲酸共聚交联,合成了具有光及 pH 响应性的葡聚糖基水凝胶。研究了水凝胶中偶氮含量及介质 pH 对凝胶溶胀性能的影响,并讨论了在不同介质 pH 及在紫外光照下的药物释放行为。

2.2 实验部分

2.2.1 原料与试剂

葡聚糖(粘均分子量为 20000)和对氨基苯甲酸, 国药集团化学试剂有限公司; 甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)和丙烯酰氯, 上海晶纯试剂有限公司; 4-二甲氨基吡啶(DMAP), Alfa Aesar; 偶氮二异丁腈(AIBN), 化学纯, 天津大茂化学试剂厂, 用甲醇重结晶且在 4°C 保存; 三乙胺, 天津大茂化学试剂厂, 用钠回流 6h 后蒸馏使用; 四氢呋喃, 分析纯, 广州化学试剂厂, 用钠回流 6 h 后蒸馏使用; 二甲亚砜(DMSO), 分析纯, 广州化学试剂厂, 用 4 Å 分子筛浸泡一周后使用; 其它试剂均为市售分析纯, 直接使用。

pH 2.2 和 pH 4.0 的缓冲溶液由邻苯二甲酸氢钾和稀盐酸配制, pH 6.0 和 pH 7.4 的缓冲溶液由磷酸二氢钠和磷酸氢二钠配制, pH 9.0 的缓冲溶液由三羟甲基氨基甲烷 (Tris)和稀盐酸配制, pH 10.8 的缓冲溶液由硼砂和碳酸钠配制, 缓冲溶液的离子强度均由氯化钠调为 0.05 mol/L, pH 值由 pH 计测定。

2.2.2 单体的合成与表征

2.2.2.1 葡聚糖甲基丙烯酸酯大单体的合成

参照文献方法合成^[13]。在 N₂ 氛下, 将 10 g 葡聚糖和 2 g 的 4-二甲氨基吡啶溶于 90 mL 二甲亚砜(DMSO)中, 然后加入一定量的甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA), 使 GMA 的量与葡聚糖中吡喃葡萄糖单元的摩尔比分别为 1:3 和 1:10, 室温搅拌反应 48 h。反应完毕后, 将反应混合液逐滴滴加到 400 mL 乙醇中沉淀, 过滤, 将固体溶于 20 mL 二次去离子水中, 用盐酸调节溶液 pH 值为 8, 在 10 °C 下透析 72 h (透析袋的截止分子量约为 8000), 然后冷冻干燥, 所得白色产物即为葡聚糖甲基丙烯酸酯大单体(Dex-GMA), 产率均在 80%以上。FT-IR (KBr, cm⁻¹): 2935 (s), 1710 (s, C=O), 1011 (m), 810 (w, C=C); ¹H-NMR (300 MHz, D₂O, ppm): δ 1.80 (s, 3H), 3.38-3.84 (m, 6H), 4.81 (d, 1H), 5.05 (m, 1H), 5.15 (m, 1H, in α -1,3 linkage), 6.05 and 6.56 (m, 2H)。

2.2.2.2 偶氮单体的合成

其合成路线如图 2-1 所示。

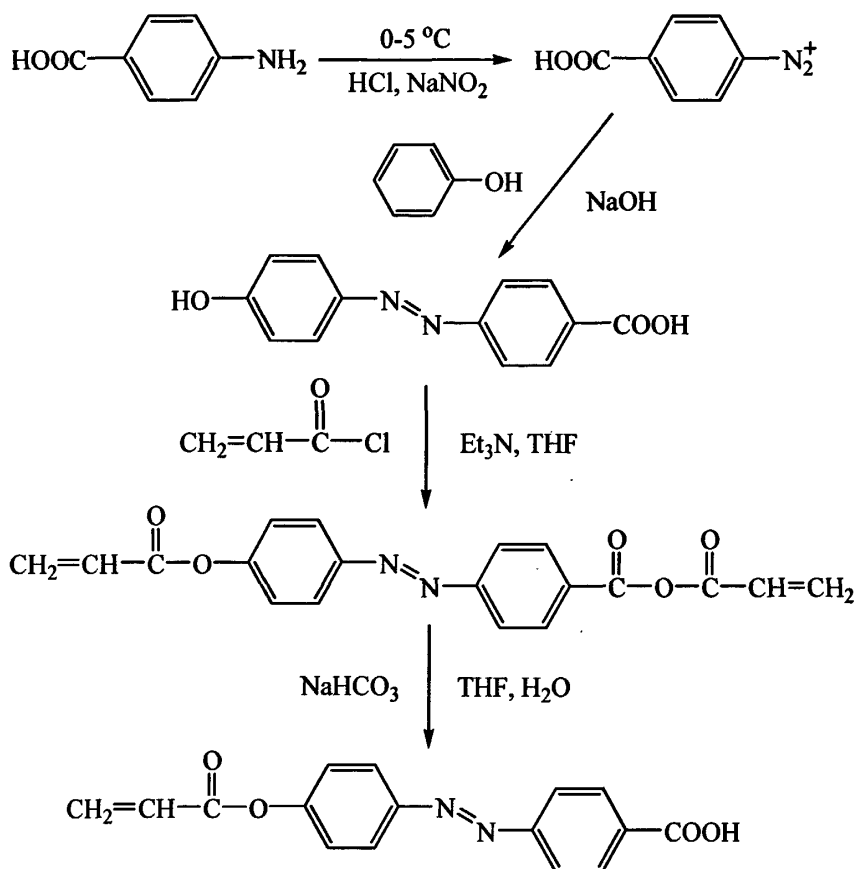


Figure 2-1 Synthetic route of the azobenzene monomers

(1) 4,4'-羟基苯基偶氮)苯甲酸(HAPB)

参照文献方法合成^[14]。将 6.85 g (0.05mol)对氨基苯甲酸、15 mL 浓盐酸和 30 mL 去离子水混合，用冰盐浴冷至 0 °C，然后滴加 30 mL NaNO₂ 的冷水溶液 (3.80 g, 0.055 mol)，控制滴加速度，使温度始终保持在 5 °C 以下，搅拌反应至溶液使淀粉 KI 试纸变蓝，时间约 30 min，再加少量的尿素使淀粉 KI 试纸不变色，继续反应 30 min，得淡黄色透明重氮盐溶液。

将 4.5 g (0.048mol)苯酚和 5.0 g (0.125mol) NaOH 溶于 60 mL 去离子水中，用冰盐浴冷至 0 °C，将上述重氮盐溶液滴加到苯酚的碱液中，滴加完毕后(约 30 min)，继续反应 1.5 h，得到亮黄色沉淀。用浓盐酸调 pH 值为 2~3 后减压抽滤，反复水洗至滤液呈中性，所得固体于 50 °C 真空干燥 12 h。在 50 °C 下，将干燥固体溶于环己烷-乙酸乙酯(3:1, v/v)混合溶剂中(若不完全溶解可补加少量乙醇)，过滤除去任何不溶物；滤液用 NaOH 水溶液萃取，碱水相呈深红色，油相呈淡黄色，分出水相用浓盐酸调 pH 值为 2~3，立刻出现黄色沉淀，抽滤，水洗至滤液呈中性，得到的固体 50 °C 真空干燥 24 h。产率 81.8%。IR (KBr, cm⁻¹): 3120 (m),

2844, 2680, 2538 (m, OH from H-bonds between carboxylic groups), 1680 (s, C=O), 1592, 1502, 1465 (m, Benz ring), 1285, 1245 (s, C-O); $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 6.94 (d, 2H), 7.85(t, 4H), 8.08(d, 2H).

(2) 4-(4'-丙烯酰氧基苯基偶氮)苯甲酸(AOPAB)

参照文献方法合成^[15]。将 1.21 g (5 mmol) 4-(4'-羟基苯基偶氮)苯甲酸溶于 50 mL 四氢呋喃(THF)中, 再加入 2.8 mL (20 mmol) 的三乙胺(Et_3N), 通 N_2 除氧 15 min 后密封, 置于冰水浴中冷却, 使反应温度降至 0 °C, 再缓慢滴加 1.6 mL (20 mmol) 丙烯酰氯, 体系温度控制在 5 °C 以下, 滴加完毕后室温反应 24 h。将反应液倾入水中, 有沉淀生成, 过滤, 并用去离子水洗至滤液呈中性, 室温真空干燥得黄色粉末状固体。再将固体溶于 THF (40 mL) 中, 用碳酸氢钠的饱和溶液调节体系的 pH 值为 7~8, 室温搅拌 24 h。反应液用 THF 稀释, 并调节体系的 pH 值为 8, 过滤除去不溶物, 滤液再用稀盐酸水溶液沉淀, 过滤, 水洗至滤液呈中性, 再冷冻干燥得黄色产物。产率 65.2%。元素分析: 实测值(理论值): C: 64.75% (64.86%); H: 4.14% (4.05%); N: 9.32% (9.46%)。IR (KBr, cm^{-1}): 2990 (m), 2844 (m), 2655 and 2549 (w, from H-bonds between carboxylic groups), 1744 (s, 酯 C=O), 1680 (s, 羧酸 C=O), 1601 (w, C=C), 1557, 1502, 1420 (m, Benz ring), 1407 (m), 1293 (s), 1251 (s), 1201 (s), 1150 (s); $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 6.21 and 6.58 (m, 2H), 6.45(d, 1H), 7.46(d, 2H), 7.98(dd, 4H), 8.15(d, 2H), 13.21(s, 1H)。

2.2.3 水凝胶的制备

在 N_2 氛下, 将 1 g 的 Dex-GMA 溶于 8 mL DMSO 中, 然后加入一定量的 AOPAB 及 0.02 g 的引发剂偶氮二异丁腈, 待其完全溶解后, 将反应液转移至玻璃试管中, 继续通 N_2 约 15 min 后密封, 60 °C 反应 24 h。将得到的凝胶切成厚度约为 2 mm 的圆片, 放入乙醇中浸泡 3 天, 然后在水中浸泡 1 周, 真空干燥后避光保存备用。

2.2.4 结构表征

采用美国 Nicolet 公司产 Nexus 670 型傅立叶变换红外光谱仪测定试样的红外光谱图 (KBr 压片); 采用美国 Varian 公司产 Mercury-Plus 300 MHz 核磁共振仪测定试样的 $^1\text{H-NMR}$; 采用德国 Elementar 公司产元素分析仪测定试样中 N 元素含量; 采用 Varian Cary 300 紫外光谱仪测定试样的紫外-可见光谱, 用于紫外

光照的紫外灯为 250 W 的飞利浦汞灯，主波长为 365 nm，光强为 2.8 mW/cm²，购自上海亚源照明电器有限公司。采用日本 Hitachi 公司 S-520 扫描电子显微镜观察凝胶表面形态，用于观察的凝胶样品冷冻干燥后用液氮脆断，真空镀金，观察其断面形态。

2.2.5 水凝胶溶胀性能的测定

在 25 °C，将干燥的水凝胶圆片称重后浸入去离子水或不同 pH 值的缓冲溶液中，在预定的时间取出，用湿滤纸吸取水凝胶表面的水分后称重，直至水凝胶达到溶胀平衡为止。水凝胶的溶胀度(Swelling degree)为：

$$S = (W_s - W_d) / W_d \quad (2-1)$$

其中， S 为水凝胶的溶胀度， W_s 为溶胀后水凝胶的重量， W_d 为干态水凝胶的重量。

2.2.6 药物负载与控制释放研究

(1) 药物负载

以维生素 B₁₂ (VB₁₂)为模型药物，将其溶于去离子水中，配成浓度为 0.5 mg/mL 的溶液。在 4 °C 下，将圆片状干凝胶置于 15 mL VB₁₂ 的水溶液中浸泡，48 h 后取出凝胶，然后用去离子水快速冲洗凝胶表面，载药凝胶冷冻干燥后避光保存备用。

(2) 药物负载量测定

首先绘制 VB₁₂ 的标准曲线。用定量体积的去离子水溶解确定质量的药物配成一系列浓度的标准溶液，用紫外光谱仪测定 VB₁₂ 在 375 nm 处的吸光度，绘制标准曲线。然后将载药凝胶研磨成粉状，在一定量的去离子水中充分溶胀使药物释放出来，用 0.22 μm 的针头式过滤器过滤，测试滤液在 375 nm 处的吸光度，根据标准曲线计算凝胶的载药量。

(3) 体外药物释放

在避光或紫外光照下，向载有 VB₁₂ 的干态凝胶加入 20 mL pH 2.2 或 7.4 的缓冲溶液，维持释放温度为 37 °C，每隔一定时间后取出 2 mL 释放液，同时补充相同体积的新鲜缓冲溶液，以维持释放体系的体积不变。取出的释放液在 375 nm 处测定其吸光度，根据标准曲线计算释放液中 VB₁₂ 的含量，测定结果以累积

释放率表示。

2.3 结果与讨论

2.3.1 合成与结构表征

(1) 葡聚糖甲基丙烯酸酯大单体的结构表征

通过葡聚糖与 GMA 的酯化反应将甲基丙烯酸酯基引入到葡聚糖上, 得到葡聚糖甲基丙烯酸酯大单体(Dex-GMA), 如图 2-2 所示。图 2-3 给出了葡聚糖和 Dex-GMA 的 IR 光谱。与葡聚糖的 IR 光谱相比, Dex-GMA 的光谱在 1710 和 810 cm^{-1} 处的吸收峰清晰可见, 它们分别代表甲基丙烯酸酯官能中的羰基($-\text{C}=\text{O}$)和碳碳双键($-\text{C}=\text{C}-$)的特征吸收峰。 $^1\text{H-NMR}$ 分析也证实了 Dex-GMA 的化学结构(图 2-4), δ 1.80 为甲基丙烯酸酯基中甲基的质子峰, δ 3.3~3.9 为葡聚糖吡喃糖环上的质子峰, δ 4.81 和 5.05 为葡聚糖异头碳的特征质子峰, δ 6.05 和 6.56 为甲基丙烯酸酯基中双键的质子峰。进一步通过 $^1\text{H-NMR}$ 计算 Dex-GMA 中甲基丙烯酸酯基的取代度(DS, 100 个糖环单元上所含的甲基丙烯酸酯基数), DS 由 δ 6.05 和 6.56 处的双键质子峰面积与 δ 4.81 和 5.05 处的葡聚糖异头碳质子峰面积的比值来计算, 投料中 GMA 与葡聚糖糖环单元的摩尔比为 1:3 和 1:10 的 DS 分别为 18.7 和 1.5。

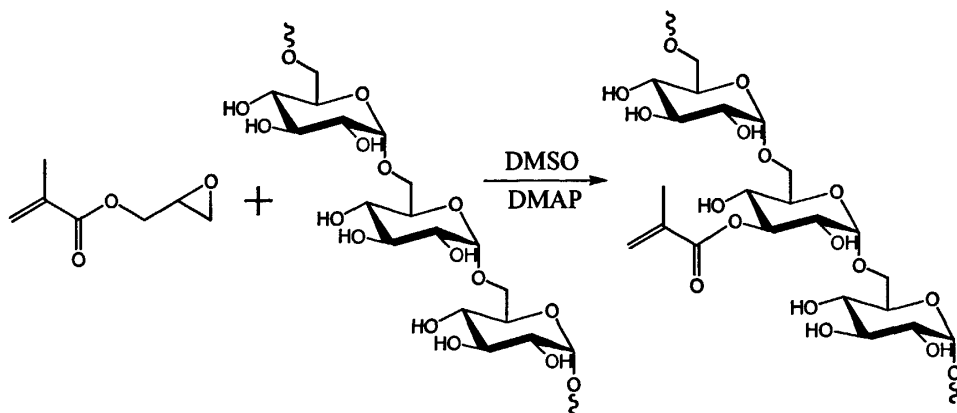


Figure 2-2 Reaction of dextran with glycidyl methacrylate (GMA)

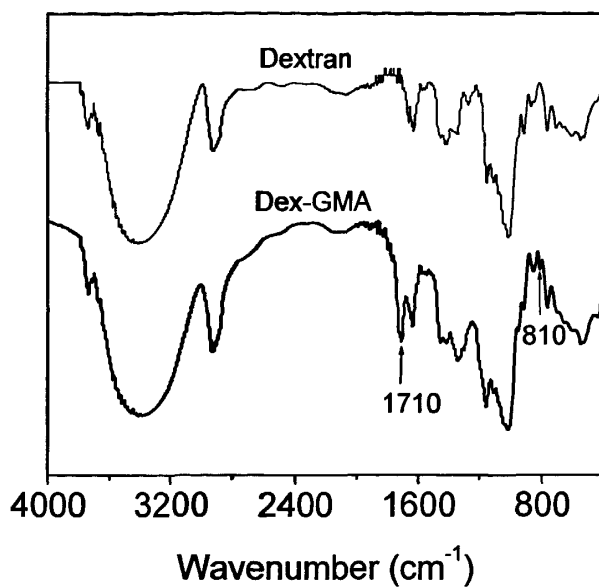


Figure 2-3 FT-IR spectra of dextran and Dex-GMA ($DS=18.7$)

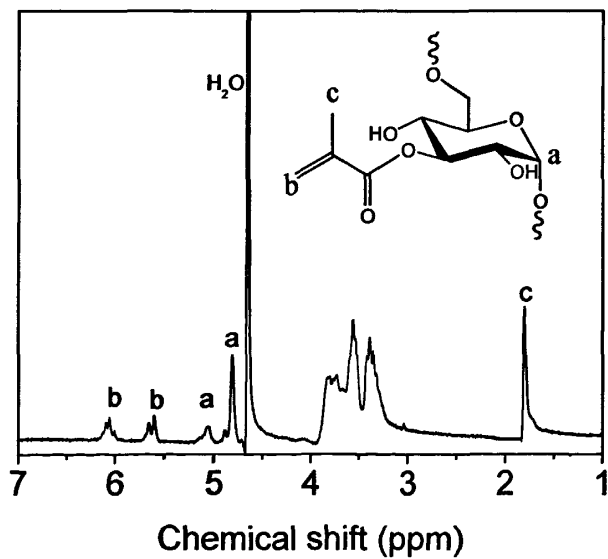


Figure 2-4 ^1H -NMR spectrum of Dex-GMA ($DS=18.7$) in D_2O

(2) 偶氮单体的结构表征

在偶氮单体合成中, 4-(4'-羟基苯基偶氮)苯甲酸(HPAB)与丙烯酰氯反应时, 羟基与酰氯基团反应生成酯, 同时羧基也会与酰氯基团反应生成酸酐, 为了得到最终产物 4-(4'-丙烯酰氧基苯基偶氮)苯甲酸(AOPAB), 需在弱碱性条件下对酸酐键进行水解。

图 2-5 为 HPAB 和 AOPAB 的 IR 谱图。在 HPAB 的 IR 图中, 1601, 1502, 1420 cm^{-1} 处为苯环的特征吸收峰, 1680 cm^{-1} 是羧基或酸酐中 C=O 键的伸缩振动峰。与 HPAB 谱图相比, 1744 cm^{-1} 处出现的吸收峰是酯基中 C=O 键的伸缩振动峰, 表明丙烯酰氯与 HPAB 中的羟基反应生成了酯键。图 2-6 和 2-7 的 $^1\text{H-NMR}$ 图分别清晰的反映了 HPAB 和 AOPAB 单体中各个氢在谱图上的位置, 且吸收峰面积与相应的氢原子数一一对应。

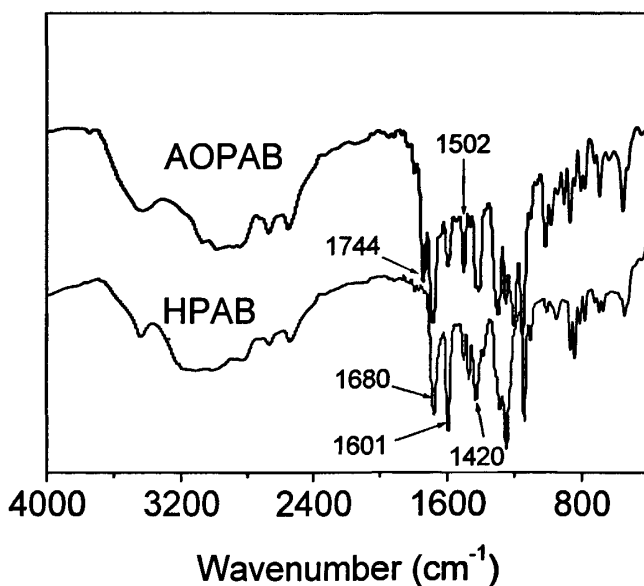


Figure 2-5 FT-IR spectra of 4-(4'-hydroxyphenylazo)benzoic acid (HPAB) and 4-(4'-acryloyloxyphenylazo)benzoic acid (AOPAB)

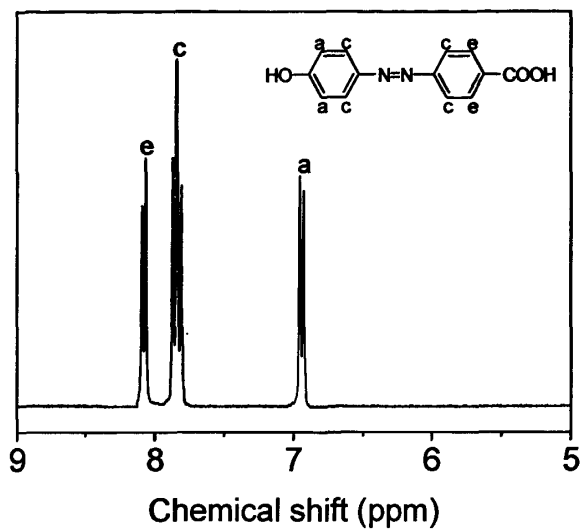


Figure 2-6 ^1H -NMR spectrum of HPAB in $\text{DMSO}-d_6$

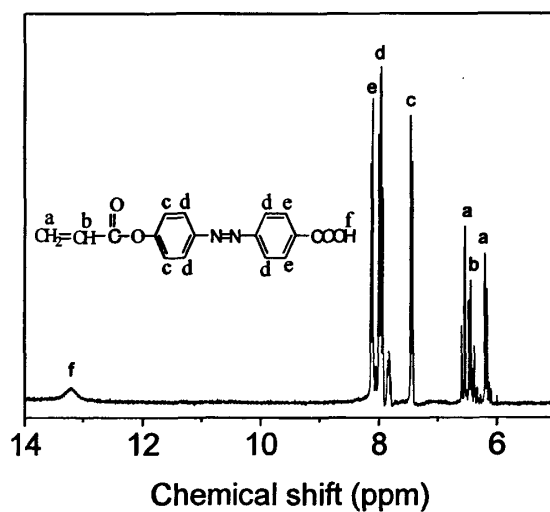


Figure 2-7 ^1H -NMR spectrum of AOPAB in $\text{DMSO}-d_6$

(3) 水凝胶的合成与表征

以葡聚糖甲基丙烯酸酯为凝胶骨架，偶氮单体 AOPAB 为交联桥(如图 2-8)，通过自由基聚合交联合成了具有 pH 响应和光响应的水凝胶，通过元素分析来计

算凝胶中偶氮单体的含量,如表 2-1 所示。对于 DGA 4,由于 Dex-GMA 中甲基丙烯酸酯基的取代度较低,只部分形成凝胶,加入 4 wt% 的交联剂 *N,N*-亚甲基双丙烯酰胺后可得到凝胶。

图 2-9 为 DGA3 凝胶的 IR 谱图,图中出现了酯基中 C=O 键的伸缩振动峰(1725 cm⁻¹),羧基中 C=O 键的伸缩振动(1640 cm⁻¹),也出现了偶氮中苯环的特征吸收峰(1560, 1502, 1420 cm⁻¹)。图 2-10 为 DGA1 凝胶随光照时间变化的紫外-可见吸收光谱,在本实验中我们参考 Mohan 等^[16]将凝胶样品用于紫外-可见光谱分析的方法,将凝胶样品研磨成细粉状,在去离子水中充分溶胀,用 0.22 μm 的滤膜过滤,得到的固体再分散于去离子水中,过滤以除去可能溶于水中的葡聚糖衍生物或偶氮单体,然后将固体超声分散于水中后测其紫外-可见吸收光谱。如图 2-10 所示, DGA1 凝胶的水分散液具有偶氮苯类化合物典型的紫外-可见吸收光谱特征,其最大吸收峰出现在 335 nm,代表偶氮生色团的 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁。在波长为 365nm 紫外灯的光照下,偶氮生色团发生反式至顺式异构化反应,其最大吸收峰位置蓝移且吸收强度下降。当紫外光照 120 min 后, DGA1 凝胶的水分散液的最大吸收峰蓝移至 327 nm,且在 335 nm 处的吸收强度不再降低,说明 DGA1 水分散液中偶氮生色团已达到顺反异构化平衡。偶氮生色团的异构化程度可用下式表示:

$$D(\%) = (A_0 - A_e) \times 100 / A_0 \quad (2-2)$$

式中, A_0 表示紫外光照前 335 nm 处吸收峰强度, A_e 表示紫外光照至顺反异构平衡后 335 nm 处吸收峰强度。与其溶液的顺反异构化程度($D=70\%$)^[17]相比, DGA1 凝胶光照顺反异构化程度仅为 25%, Kang 等人也得到类似的实验结果^[1]。

Table 2-1 Conditions and characterization for hydrogel preparation with different AOPAB contents

Samples	DS	AOPAB content (wt%)	
		in feed	in the hydrogel ^a
DGA1	18.7	3.57	3.09
DGA2	18.7	8.37	6.58
DGA3	18.7	15.47	11.7
DGA4 ^b	1.5	8.37	—

^a determined by Elemental Analysis.

^b partial gel.

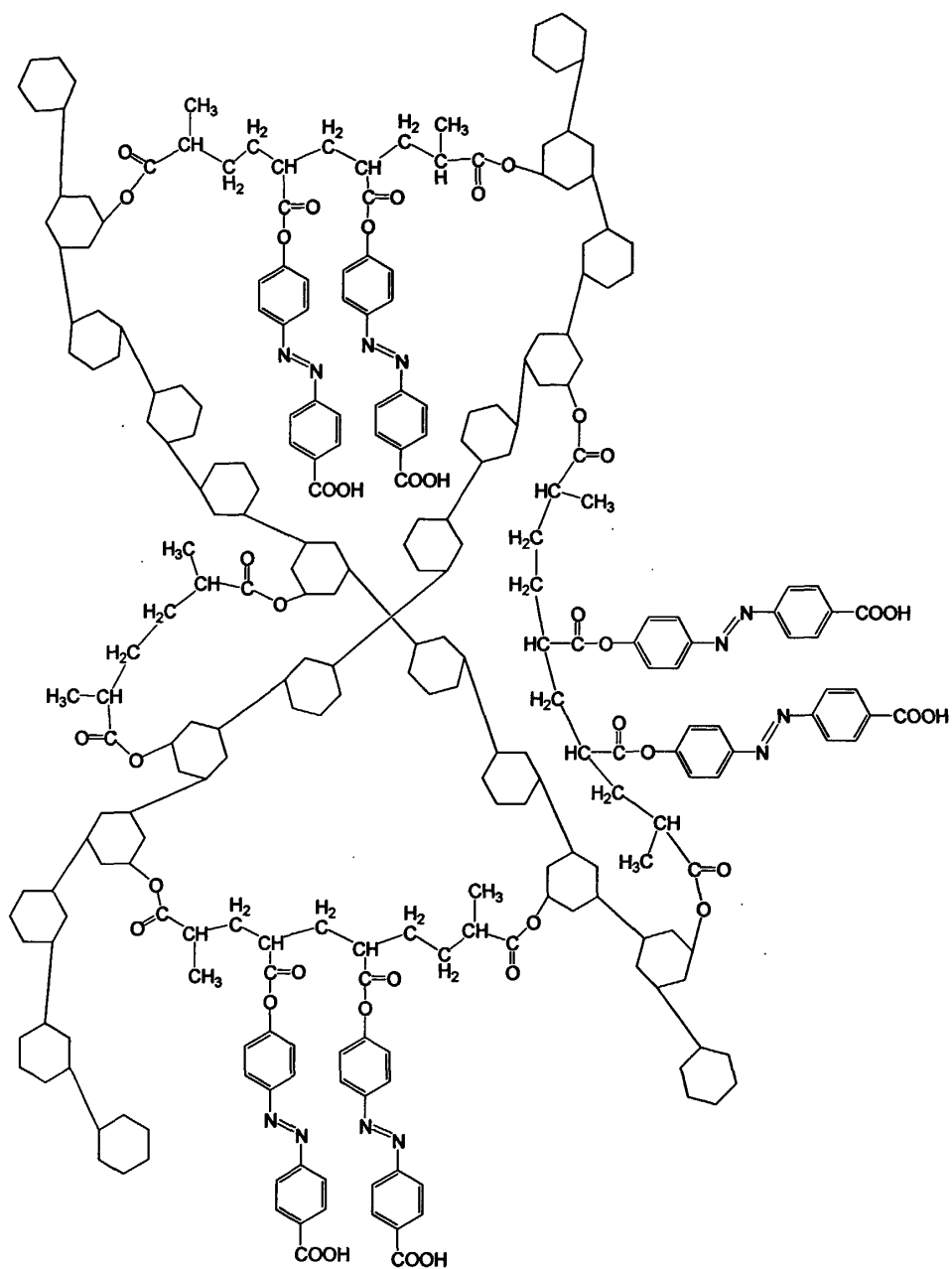


Figure 2-8 Illustration for connection of MA moieties of Dex-GMA with AOPAB bridging

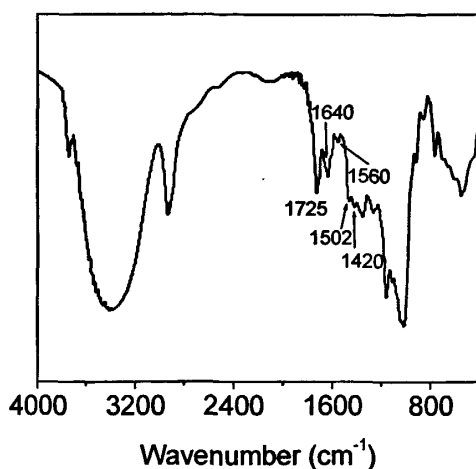


Figure 2-9 FT-IR spectrum of DGA3

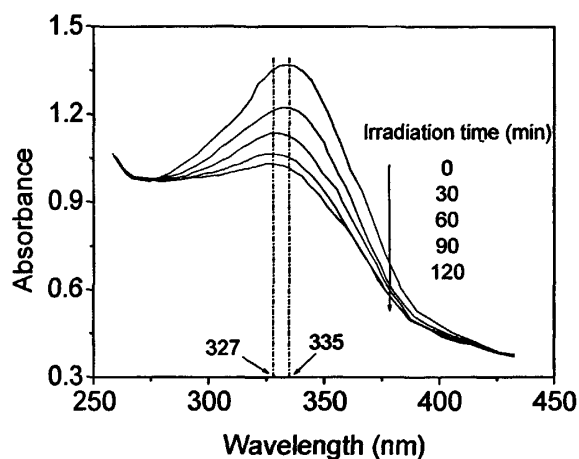


Figure 2-10 UV-vis spectra of DGA1 dispersed in water upon UV irradiation at $\lambda = 365$ nm

2.3.2 水凝胶的溶胀动力学

图 2-11 给出了不同偶氮含量水凝胶的溶胀动力学曲线。由图可见，在溶胀初期，溶胀度快速增加；随着溶胀时间延长，溶胀度增加趋势变缓，当溶胀时间超过 200 min 后，溶胀度基本不变，即达到溶胀平衡，且水凝胶的平衡溶胀度随凝胶中偶氮含量增加而下降，这可能是由凝胶的交联密度增加引起的。图 2-12 为凝胶的扫描电镜图，从图中可以看出，随着凝胶中偶氮含量增加，凝胶的孔径

明显减小, 凝胶具有更致密的网络结构。

水凝胶的溶胀动力学可用下面二次速率方程来描述^[18]:

$$t/S = 1/(kS_{\infty}^2) + t/S_{\infty} \quad (2-3)$$

式中, S_{∞} 为平衡溶胀度, t 为溶胀时间, k 为溶胀速率常数。将图 2-11 的数据以 $t/S \sim t$ 作图, 结果如图 2-13 所示。由图可见, 水凝胶的溶胀数据用二次速率方程来处理, 具有良好的线性关系, 由直线的斜率和截距得到的特征常数 k 和 S_{∞} 值列于表 2-2 中。由表 2-2 可知, 实测平衡溶胀度(S_{eq})与理论平衡溶胀度(S_{∞})相近, 且随凝胶中偶氮含量增加, S_{∞} 下降, 而溶胀速率常数 k 增大, 表明凝胶到达平衡溶胀的时间减小, Guilherme 等也得到类似的实验结果^[19]。

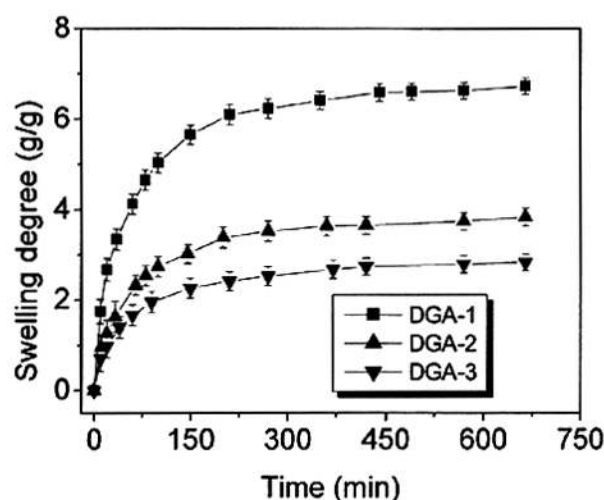


Figure 2-11 Swelling kinetics as a function of time for the hydrogels with different azobenzene contents in water at 25 °C

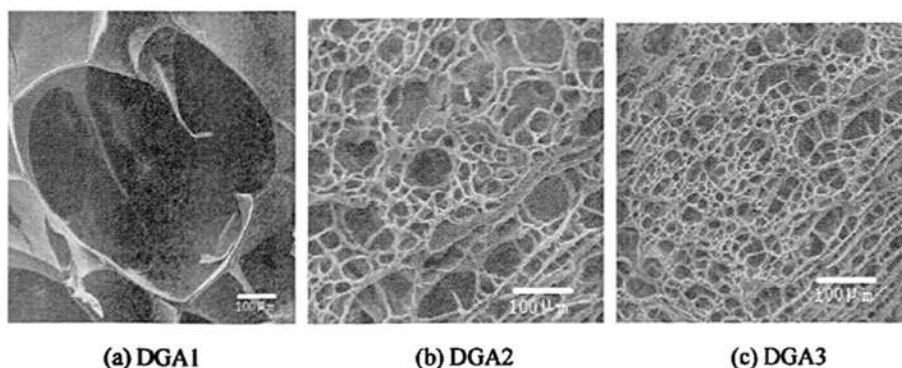


Figure 2-12 SEM images of the hydrogels with various azobenzene contents for DGA1 (a), DGA2 (b), and DGA3 (c)

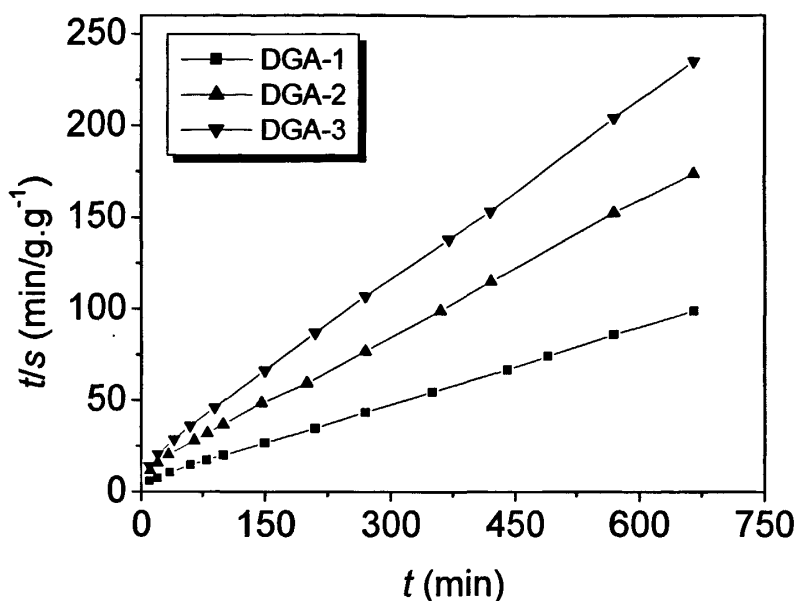


Figure 2-13 Experimental data of time-dependent swelling for the hydrogels plotted according to eq. 2-2 (second-order swelling kinetic)

Table 2-2 Swelling rate parameters for the hydrogels with different azobenzene contents

Samples	$k \times 10^3 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$S_{\infty} \text{ (g/g)}$	$S_{eq} \text{ (g/g)}$	R
DGA1	3.72	7.11	6.73	0.9999
DGA2	5.39	4.07	3.83	0.9998
DGA3	7.37	3.01	2.83	0.9997

为了研究所得水凝胶的 pH 敏感性,测定了不同偶氮含量的水凝胶在不同 pH 缓冲溶液中的平衡溶胀度。如图 2-14 所示,在 pH 2.2 和 7.4 缓冲溶液中, DGA1 的平衡溶胀度分别为 6.06 和 6.92,当 pH 增加至 10.8 时,其平衡溶胀度增加至 8.22,其在不同 pH 缓冲溶液中的平衡溶胀度变化不大;而当凝胶中偶氮含量逐渐增加时,随 pH 增高, DGA2 和 DGA3 平衡溶胀度明显增加,当介质 pH 超过 7.4,其平衡溶度急剧增大,并大于 DGA1 的平衡溶胀度。在含离子基团的凝胶中,由于离子基团的离解,产生的反离子增加了凝胶内部的渗透压,宏观表现为凝胶溶胀;而抑制凝胶吸水溶胀的因素是凝胶电解质网络的橡胶弹性,即交联密度;这两种因素决定凝胶的吸水情况^[2]。在本实验中,随介质 pH 增加,凝胶中侧链偶氮苯的端羧基逐渐离解,凝胶的平衡溶胀度逐渐增大。在介质 $\text{pH} \leq 7.4$

时,凝胶网络的橡胶弹性因素起主要作用,故随着凝胶偶氮含量的增加,由于其交联密度增加,凝胶的平衡溶胀度减小;而当 pH 为 9 和 10.8 时,此时羧基完全离解,凝胶内外的离子渗透压增大,离子渗透压成为凝胶溶胀的控制因素,导致偶氮含量较高的凝胶 DGA2 和 DGA3,其平衡溶胀度大于 DGA1。

图 2-15 给出了 DGA3 在 pH 2.2 和 7.4 缓冲溶液中反复溶胀的情况。水凝胶在 pH 2.2 和 7.4 缓冲溶液中反复溶胀三次,其平衡溶胀度变化较小,说明水凝胶具有良好的 pH 响应性和反复溶胀性能。

图 2-16 显示了凝胶 DGA1 在水-乙醇中的反复溶胀-收缩行为。由图可见,凝胶在水中溶胀,乙醇中收缩,发生溶剂可逆溶胀-收缩行为,反复三次后,在水和乙醇中的溶胀度均略微降低。

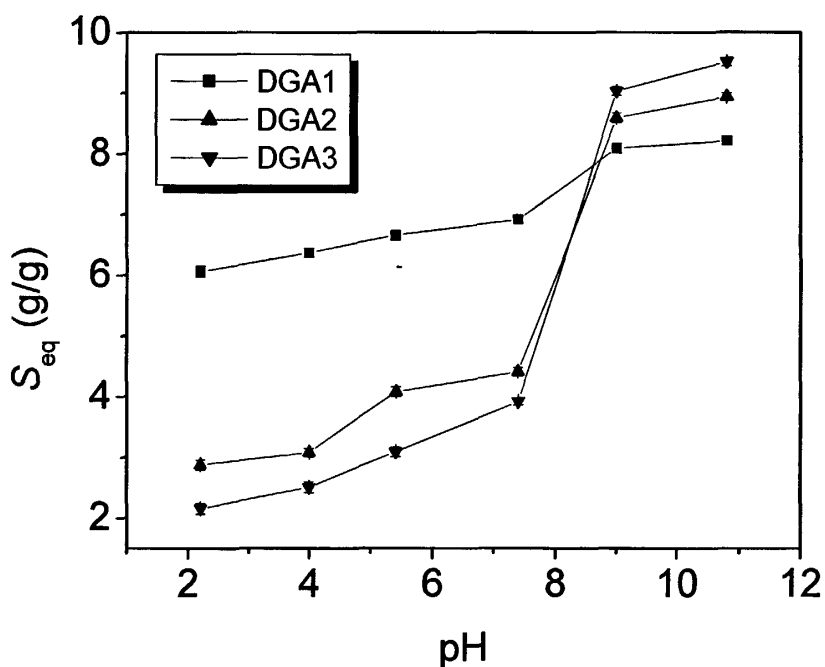


Figure 2-14 Equilibrium behavior of the hydrogels in different pH buffer solutions at 25 °C

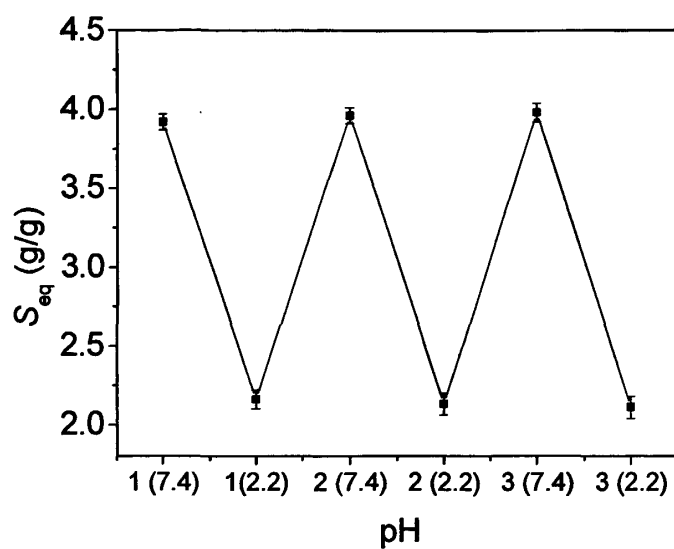


Figure 2-15 Equilibrium reswelling behavior of DGA3 transferred from pH 2.2 to pH 7.4 for several cycles at 25°C

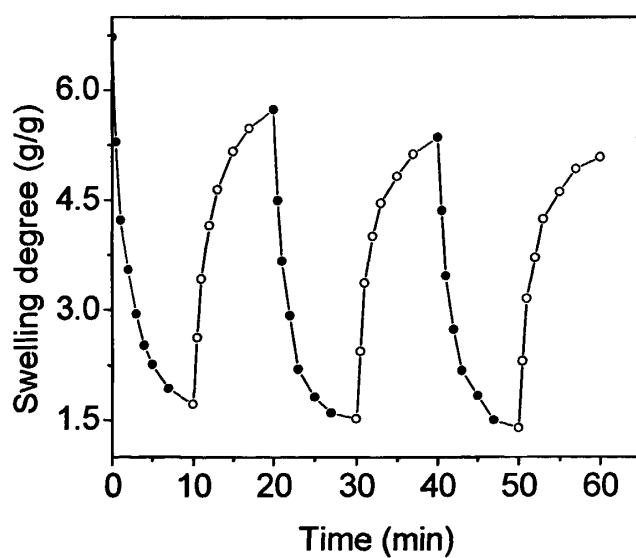


Figure 2-16 Solvent-induced expansion and contraction pattern of DGA1 at 25°C. open circle, in water; closed circle, in ethanol

2.3.3 水凝胶的药物释放研究

偶氮苯及其衍生物在光照下发生可逆顺-反异构,如图 2-17 所示。在 365 nm 的紫外光照射下,偶氮苯分子由棒状的反式构型转变为“V”型的顺式构型,分子尺寸发生了很大变化,位于偶氮苯对位的两个碳原子间距离从 9.0 Å 减小为 5.5 Å^[9]。含偶氮苯生色团的凝胶,在紫外光照下,由于大分子链间的距离发生改变,导致凝胶表现出膨胀-收缩行为,从而可控制凝胶中药物的释放速率。

本文研究具有 pH 响应和光响应的水凝胶在不同 pH 以及紫外光照下的体外药物释放行为,以累积释药百分数对时间作图得到药物释放曲线,如图 2-18 所示。由图可以看出,随着凝胶中偶氮含量的增加,药物释放速率减小,这是由于凝胶的交联密度增加引起的,与溶胀规律一致。此外,不同偶氮含量的凝胶在 pH 7.4 缓冲溶液中的药物释放速率均高于在 pH 2.2 缓冲溶液中的药物释放速率,说明该类水凝胶材料具有 pH 敏感的药物释放行为。且在 pH 7.4 的缓冲溶液中,当用波长为 365 nm 的紫外光照射时,水凝胶的释药速率以及最终药物释放量均高于未光照的水凝胶,Tomer 等也得到类似的实验结果^[11]。

为了研究水凝胶药物释放机理,通过 Peppas 方程^[20]对释放曲线进行线性拟合:

$$M_t / M_\infty = k t^n \quad (2-4)$$

式中, M_t/M_∞ 为药物在某一时刻的累积释放分数, t 为释放时间; k 为常数, n 为扩散指数,与释放机理有关。对于膜或片状制剂而言,当 $n=0.5$ 时,药物释放机制为 Fickian 扩散控制,药物分子主要通过分子扩散释放;当 $0.5 < n < 1.0$ 时,药物释放机制为 non-Fickian 扩散,药物分子的释放受 Fickian 扩散和骨架松弛(包括溶胀或降解)的共同作用;当 $n=1$ 时,药物分子的释放主要受骨架松弛机制控制。

通过 Peppas 方程对药物释放曲线进行线性拟合,计算得到的扩散指数 n 值见表 2-3。随着凝胶中偶氮含量的增加, n 值减小。在 pH 2.2 缓冲溶液中,不同偶氮含量凝胶的 n 值均较接近 0.5,说明此时药物释放主要是扩散控制过程,符合 Fickian 扩散定律。在 pH 7.4 缓冲溶液中,扩散指数 n 值高于在 pH 2.2 缓冲溶液中的 n 值,均大于 0.6,表明此时的药物释放过程受 Fickian 扩散和骨架松弛的共同作用。

当在紫外光照下进行药物释放时,扩散指数 n 值略低于未光照时的 n 值,这表明在紫外光照下,偶氮苯分子由棒状的反式构型转变为“V”型的顺式构型,分子尺寸减小,引起凝胶体积发生收缩,从而促进药物分子从凝胶中扩散出来。

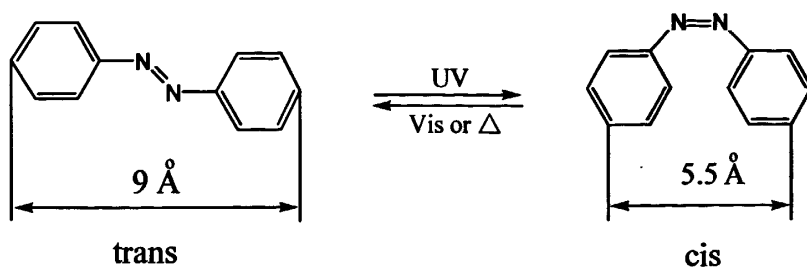
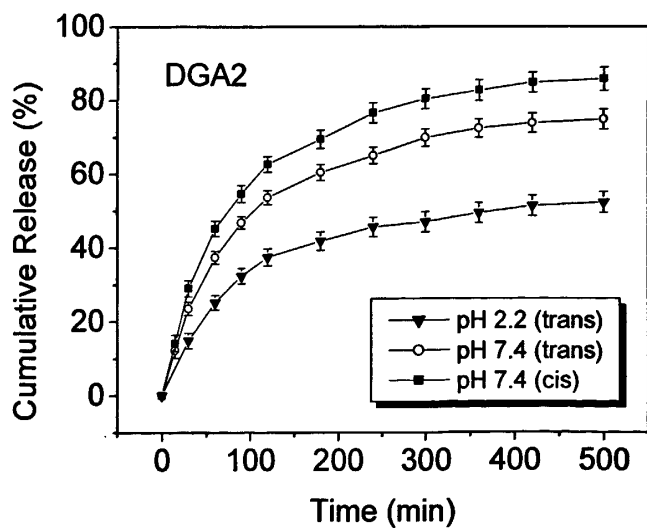
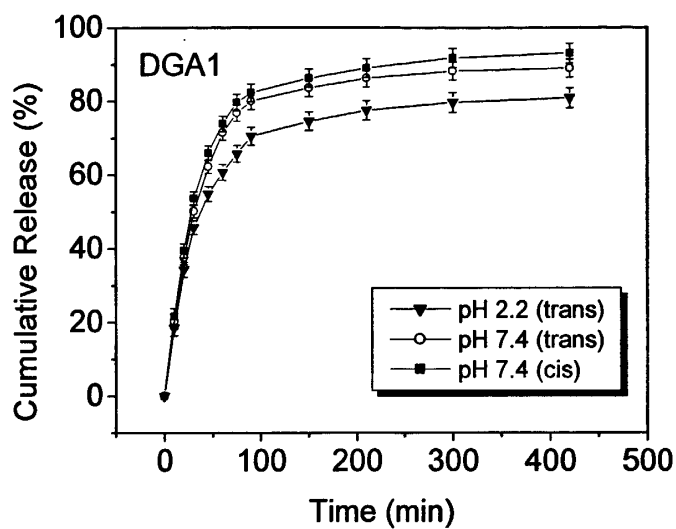


Figure 2-17 Dimension changes of isomerization of trans-cis azobenzene



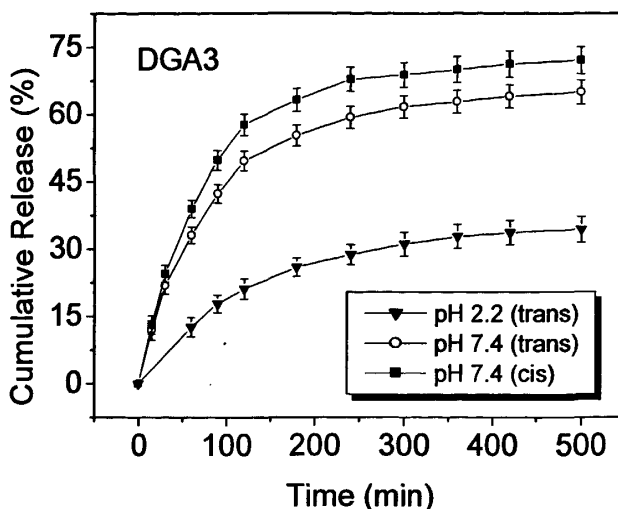


Figure 2-18 Effects of pH and UV irradiation on drug release for the hydrogels at 37 °C
(*cis*, under 365 nm UV irradiation; *trans*, in dark condition)

Table 2-3 Diffusion exponent (n) for release of VB₁₂ from the hydrogels

Samples	pH 2.2 (<i>trans</i>)		pH 7.4 (<i>trans</i>)		pH 7.4 (<i>cis</i>)	
	n	R	n	R	n	R
DGA1	0.59	0.987	0.70	0.992	0.69	0.991
DGA2	0.53	0.986	0.65	0.985	0.62	0.995
DGA3	0.47	0.989	0.62	0.990	0.60	0.987

2.4 结论

(1) 以二甲基亚砜为溶剂，偶氮二异丁腈为引发剂，将甲基丙烯酸缩水甘油酯改性的葡聚糖与偶氮单体 4-(4'-丙烯酰氧基苯基偶氮)苯甲酸自由基共聚交联，合成了具有光及 pH 响应性的葡聚糖水凝胶。FT-IR 和 ¹H-NMR 证实了合成单体及水凝胶的结构，并通过元素分析确定了凝胶中偶氮苯含量。

(2) 溶胀实验表明所得水凝胶的平衡溶胀度随介质 pH 值增大以及凝胶中偶氮含量降低而增大，扫描电镜分析证实偶氮含量高的凝胶具有更致密的网络结构。

(3) 以维生素 B₁₂ 为模型药物，研究了载药水凝胶在不同 pH 及紫外光照下

的药物释放行为。体外药物释放实验表明, 药物释放速率及累积释放量均随凝胶中偶氮含量增加而减小; 不同偶氮含量的载药凝胶在 pH 7.4 缓冲溶液中的药物释放速率均高于在 pH 2.2 缓冲溶液中的药物释放速率, 说明该类水凝胶材料具有 pH 响应的药物释放行为; 且在 pH 7.4 的缓冲溶液中, 当用波长为 365 nm 的紫外光照射时, 水凝胶的释药速率以及最终药物释放量均高于未光照的水凝胶, 因此可利用紫外光照调控药物的释放速率。

参考文献

- [1] Kang MS, Gupta VK. Photochromic cross-links in thermoresponsive hydrogel of poly(N-isopropylacrylamide): enthalpic and entropic consequences on swelling behavior. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106: 4127-4132
- [2] Chiu HC, Lin YF, Hung SH. Equilibrium swelling of copolymerized acrylic acid-methacrylated dextran networks: effects of pH and neutral salt. *Macromolecules*, 2002, 35: 5235-5242
- [3] Watanabe T, Akiyama M, Totani K, Kuebler SM, Stellacci F, Wenseleers W, Braun K, Marder SR, Perry JW. Photoresponsive hydrogel microstructure fabricated by two-photo initiated polymerization. *Advanced Functional Materials*, 2002, 12: 611-614
- [4] Murdan S. Electro-responsive drug delivery from hydrogels. *Journal of Controlled Release*, 2003, 92: 1-17
- [5] Liu TY, Hu SH, Liu KH, Liu DM, Chen SY. Preparation and characterization of smart magnetic hydrogels and its use for drug release. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2006, 304: e397-e399
- [6] Chaterji S, Kwon IK, Park K. Smart polymeric gels: Redefining the limits of biomedical devices. *Progress in Polymer Science*. 2007, 32: 1083-1122
- [7] Yamato M, Akiyama Y, Kobayashi J, Yang J, Kikuchi A, Okano T. Temperature-responsive cell culture surfaces for regenerative medicine with cell sheet engineering. *Progress in Polymer Science*. 2007, 32: 1123-1133
- [8] Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 53: 321-339
- [9] Kumar GS, Neckers DC. Photochemistry of azobenzene-containing polymer. *Chemical Reviews*, 1989, 89: 1915-1925
- [10] Chen L, Li SG, Zhao YP, Wang YC, Wang QW. Photoresponses and pH responses of

- hydrogels composed of acrylamido azobenzene and acrylic acid. *Journal of Applied Polymer Science*, 2005, 96: 2163-2167
- [11] Tomer R, Florence AT. Photo-responsive hydrogels for potential responsive release applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 1993, 99: R5-R8
- [12] Chiu HC, Lin YF, Hsu YH. Effects of acrylic acid on preparation and swelling properties of pH-sensitive dextran hydrogels. *Biomaterials*, 2002, 23: 1103-1112
- [13] De Smedt SC, Lauwers A, Demeester J, Van Steenberghe MJ, Hennink WE, Roefs SPFM. Characterization of the network structure of dextran glycidyl methacrylate hydrogels by studying the rheological and swelling behavior. *Macromolecules*, 1995, 28: 5082-5088
- [14] East AJ. Anisotropic wholly aromatic polyester derived from 4-hydroxy-4'-carboxy azobenzene and process for preparation [P]. US4285852, 1981-08-25
- [15] 成昊, 庾新林, 王晓工等. 新型侧链偶氮聚电解质的合成及性能研究. *高分子学报*, 2002, (1): 96-101
- [16] Mohan YM, Lee K, Premkumar T, Geckeler KE. Hydrogel networks as nanoreactors: a novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications. *Polymer*, 2007, 48: 158-164
- [17] Wu LF, Tuo XL, Cheng H, Chen Z, Wang XG. Synthesis, photoresponsive behavior, and self-assembly of poly(acrylic acid)-based azo polyelectrolytes. *Macromolecules*, 2001, 34, 8005-8013
- [18] Quintana JR, Valderruten NE, Katime I. Synthesis and swelling kinetics of poly(dimethylaminoethyl acrylate methyl chloride quaternary-co-itaconic acid) hydrogels. *Langmuir*, 1999, 15: 4728-4730
- [19] Guilherme MR, Moia TA, Reis AV, Paulino AT, Rubira AF, Mattoso LHC, Muniz EC, Tambourgi EB. Synthesis and water absorption transport mechanism of a pH-sensitive polymer network structured on vinyl-functionalized pectin. *Biomacromolecules*, 2009, 10:190-196
- [20] Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 1987, 5: 37-42

第3章 光响应型支链淀粉基纳米水凝胶的研究

3.1 前言

近年来,环境响应性聚合物胶束(亦称为纳米凝胶)作为药物控释载体得到广泛的研究和应用^[1-3]。其疏水内核对难溶性药物具有增溶作用,且聚合物胶束的结构在外界刺激的作用下能可逆地发生变化,因而可实现对负载物的可控包藏和释放。与传统的刺激相比,光作为刺激手段具有独特的优势。因为光源安全、清洁、易于使用和控制,可方便地实现对响应性聚合物胶束的可控刺激,在生物医药领域更具广阔的应用前景^[4-6]。

偶氮苯及其衍生物是一类典型的光致异构分子,在光照下发生可逆顺反异构化反应。利用偶氮苯分子的光敏特性,制备具有光响应性的聚合物胶束或纳米凝胶受到人们的关注。其中,侧链含偶氮的合成高分子类两亲性聚合物,其自聚集及光致异构化行为已被广泛报道。王晓工等^[7-9]利用侧基偶联反应将偶氮单体连接到聚丙烯酸主链上,得到的两亲性聚合物通过自组装形成光响应性聚合物胶束。Zhao等^[10-12]通过原子转移自由基活性聚合得到含偶氮基团的两亲性嵌段共聚物,在选择性溶剂中通过憎水相互作用自组装形成纳米胶束或囊泡。在365 nm紫外光和可见光的照射下,聚合物胶束发生可逆的胶束聚集和解聚行为,这种可逆的转变是通过光致偶氮苯顺反异构产生的分子偶极距的改变,导致偶氮分子在水和二氧六环的混合溶剂中的溶解性发生变化而表现出的光致可逆性。江明等^[13]最近也把具有光敏性的偶氮分子引入到非共价键结合胶束中,利用无取代基的偶氮苯分子的顺式和反式构型在甲苯中的溶解性变化,研究了含偶氮的非共价键结合胶束在紫外和可见光的照射下的响应性行为。

然而到目前为止,对于以天然高分子为主链,偶氮为疏水侧链的两亲性多糖接枝物的自聚集及光响应行为研究鲜见报道^[14]。在本工作中,我们以具有良好生物降解性和生物相容性的支链淀粉为原料,合成含偶氮苯疏水侧链的两亲性支链淀粉接枝物(Amy-Azo),利用 Amy-Azo 在水溶液中的疏水缔合交联作用,得到光响应型支链淀粉基纳米水凝胶。通过激光粒度分析和透射电镜测定紫外光照前后 Amy-Azo 纳米水凝胶的粒径大小及分布,利用紫外-可见光谱研究 Amy-Azo 在 H₂O/DMSO 溶液中的疏水聚集过程,并探讨纳米水凝胶对疏水性药物吡哆美辛的包埋与光控释放行为。

3.2 实验部分

3.2.1 原料与试剂

支链淀粉, 东京化成工业株式会社; 苊, Sigma 公司, 用乙醇重结晶; 吡啶, Fluka 公司; 1,6-二溴己烷和 4-羟基偶氮苯, Alfa Aesar 公司; 二甲亚砜 (DMSO): 分析纯, 广州化学试剂厂, 用 4 Å 分子筛浸泡一周后使用; 其余试剂, 均为市售分析纯。

3.2.2 合成与表征

(1) 4- ω -溴己氧基偶氮苯的合成

在 N_2 氛下, 将 25 mL (39.8 g, 0.163 mol) 1,6-二溴己烷, 12.1 g (0.0875 mol) K_2CO_3 和 0.5 g 的 KI 加入到 125 mL 丙酮中, 搅拌均匀后升温至 65 °C, 将 4.95 g (0.025 mol) 的 4-羟基偶氮苯溶于 65 mL 丙酮中, 在 1 h 内逐滴滴加到上述混合溶液中, 滴加完毕后加热回流 20 h, 然后趁热过滤除去无机盐, 并用丙酮洗涤, 滤液浓缩后逐滴滴加到冰冷的乙醇中沉淀, 过滤, 固体再用乙醇重结晶, 得黄色片状固体, 产率 72.6%。 1H -NMR ($CDCl_3$, ppm): δ 1.52-1.60 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_2CH_2Br$), 1.81-1.97 (m, 4H, $CH_2(CH_2)_2CH_2OAr$), 3.45 (t, 2H, CH_2CH_2Br), 4.06 (t, 2H, CH_2CH_2OAr), 6.98-7.01 (d, 2H, aromatic), 7.4-7.53 (m, 3H, aromatic), 7.84-7.94 (dd, 4H, aromatic).

(2) 侧链含偶氮苯两亲性支链淀粉接枝物(Amy-Azo)的合成

在 70 °C 下, 将 1 g 支链淀粉溶于 25 mL 干燥的 DMSO 中, 然后降至室温, 通 N_2 30min 后加入 250 μ L 20 wt% 的氢氧化钠水溶液, 在 N_2 氛下继续搅拌 1 h, 再升温至 60 °C, 称取一定量的 4-溴己氧基偶氮苯, 用 5 mL 的 DMSO 溶解, 逐滴滴加到支链淀粉的溶液中。在 60 °C 反应 5 h 后, 加入稀盐酸中和, 再滴加到乙醇中沉淀, 离心, 沉淀用乙醇反复洗涤, 滤液用紫外分光光度计检测直至不再出现偶氮苯的吸收峰。得到的接枝物在 40 °C 真空干燥 48 h。 1H -NMR ($DMSO-d_6$, ppm): δ 1.21-1.83 (m, 8H, $CH_2(CH_2)_4CH_2$), 3.03(CH_2CH_2O -Amy), 4.02 (m, 2H, CH_2CH_2OAr), 3.40-5.71 (H-glucopyranose unit), 6.94-7.95 (9H, Ar-H). FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3400 (broad), 2928 (m), 1595, 1502, 1248 (m, Benz ring), 1011 (s).

(3) 结构表征

采用美国 Nicolet 公司产 Nexus 670 型傅立叶变换红外光谱仪测定试样的红外光谱图 (KBr 压片); 采用美国 Varian 公司产 Mercury-Plus 300 MHz 核磁共振仪测定试样的 ^1H -NMR; 采用德国 Elementar 公司产元素分析仪测定试样中 N 元素含量; 采用 Varian Cary 300 紫外光谱仪测定试样的紫外-可见光谱, 用于紫外光照的紫外灯为 125 W 的飞利浦汞灯, 主波长为 365 nm, 光强为 0.9 mW/cm^2 , 购自上海亚源照明电器有限公司。

3.2.3 纳米水凝胶的制备

根据文献^[15]的方法, 采用透析方法制备纳米水凝胶。将 100 mg 的 Amy-Azo 溶于 10 mL 的 DMSO 中, 溶液用 $0.22 \mu\text{m}$ 针式过滤器过滤除尘, 再转移至透析袋中用 1 L 二次蒸馏水透析 24 h (MWCO 14000), 每 5 h 更换新鲜蒸馏水, 然后将得到的纳米凝胶水分散液用 $0.22 \mu\text{m}$ 针式过滤器过滤。准确量取一定体积的纳米凝胶水分散液进行冷冻干燥, 以计算纳米凝胶水分散液的浓度, 剩余的纳米凝胶水分散液置于 4°C 冰箱中保存备用。

3.2.4 纳米水凝胶粒径的测定

取一滴 Amy-Azo 纳米凝胶水分散液于 200 目碳膜覆盖的铜网上, 自然干燥 5 min, 以滤纸轻轻吸干铜网上的液珠, 然后把铜网浸在 2 wt% 的磷钨酸溶液中染色 1 min, 常温下自然干燥, 采用日本 JEM-2010HR 型透射电子显微镜观察, 加速电压为 100 kV。纳米水凝胶粒径及其分布采用 Brookhaven 公司产 Mastersizer 2000 激光粒度分析仪测定, 所有纳米凝胶水分散液均采用 $0.22 \mu\text{m}$ 针式过滤器过滤除尘。

3.2.5 临界胶束浓度的测定

以芘作为荧光探针, 配成 0.1 mg/mL 的乙醇溶液, 取 $1.2 \times 10^{-5} \text{ L}$ 芘的乙醇溶液于 10 ml 容量瓶中, 用氮气吹扫除去乙醇, 再加入一定体积的 Amy-Azo 水分散液, 定容后芘的最终浓度为 $6 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。配制好的样品溶液在室温超声 30 min, 再于水浴振荡器中振摇 1 h, 然后避光静置 24 h 后测试。采用 Shimadzu RF-5301 荧光分光光度计测定样品荧光发射光谱, 激发波长 $\lambda_{\text{ex}}=335 \text{ nm}$, 扫描波长范围 $\lambda=350\sim450 \text{ nm}$, 激发光和发射光的检测狭缝均设定为 3.0 nm , 温度由控温系统控制在 25°C 。

3.2.6 药物负载与控制释放研究

(1) 药物负载

采用与制备纳米水凝胶相同的方法制备载药纳米水凝胶。将 100 mg 的 Amy-Azo 溶于 10 mL DMSO 中, 然后再加入 60 mg 的吲哚美辛, 溶液用 0.22 μm 针式过滤器过滤除尘, 再转移至透析袋中用 1 L 二次蒸馏水透析 24 h (MWCO 14000), 每 5 h 换一次水, 将载药纳米凝胶水分散液用 0.45 μm 针式过滤器过滤以除去未负载的药物。将一部分准确称量的载药纳米凝胶水分散液冷冻干燥来计算载药纳米凝胶水分散液的浓度, 剩余的载药纳米凝胶水分散液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

(2) 药物负载量的测定

首先绘制吲哚美辛的标准曲线, 准确称取一定质量的吲哚美辛, 用乙醇溶解, 再用去离子水稀释配成一系列浓度的标准溶液, 用紫外光谱仪测定吲哚美辛在 320 nm 处的吸光度, 绘制标准曲线。然后准确称取一定量冷冻干燥后的载药纳米水凝胶, 加入丙酮使药物溶出, 得到的混合液室温超声 10 min, 然后磁力搅拌 8 h, 用 0.22 μm 针式过滤器过滤, 滤液用紫外分光光度计测定 320 nm 波长处的吸光度, 根据标准曲线计算负载的药物含量。载药纳米水凝胶的负载率(Load capacity, LC)和负载效率(Load efficiency, LE)根据以下公式计算:

$$LC(\%) = M_2 \times 100 / M_0 \quad (3-1)$$

$$LE(\%) = M_2 \times 100 / M_1 \quad (3-2)$$

其中, M_0 为 Amy-Azo 的质量, M_1 为加入的吲哚美辛的质量, M_2 为负载的药物质量。

(3) 体外药物释放

取 1 mL 载药纳米凝胶水分散液, 装入到截留分子量为 14000 的透析袋中, 然后置于 10 mL PBS (pH 7.4) 溶液中, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温振荡水槽中进行药物释放。每间隔一段时间取出 1 mL 释放液, 同时补充相同体积的新鲜缓冲溶液, 以维持释放体系的体积不变。通过紫外分光光度法测定释放液中吲哚美辛的含量, 以不含药物的纳米凝胶水分散液做空白释放, 计算药物累积释放率, 所有实验平行三次取平均值。

3.3 结果与讨论

3.3.1 两亲性接枝物的结构表征

图 3-1 为侧链含偶氮苯两亲性支链淀粉衍生物(Amy-Azo)的合成路线图。在氢氧化钠的作用下^[16], 将 4-溴己氧基偶氮苯接枝到支链淀粉主链上, 通过元素分析计算 Amy-Azo 中偶氮苯的取代度, 结果见表 3-1。

图 3-2 为支链淀粉原料与 Amy-Azo 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱, 图中 δ 1.21~1.83 为己氧基偶氮苯单元中亚甲基上的质子峰, δ 3.4~5.7 为支链淀粉糖环上的质子峰, δ 6.94~7.95 为偶氮苯苯环上的质子峰。图 3-3 为支链淀粉原料与 Amy-Azo 的 FT-IR 谱图, 图中出现了支链淀粉上糖苷键的 C-O-C 的伸缩振动峰(1011 cm^{-1}), 也出现了偶氮单元苯环的特征吸收峰($1595, 1502, 1248\text{ cm}^{-1}$)。 $^1\text{H-NMR}$ 和 FT-IR 分析均表明偶氮苯单体已接枝到支链淀粉主链上。

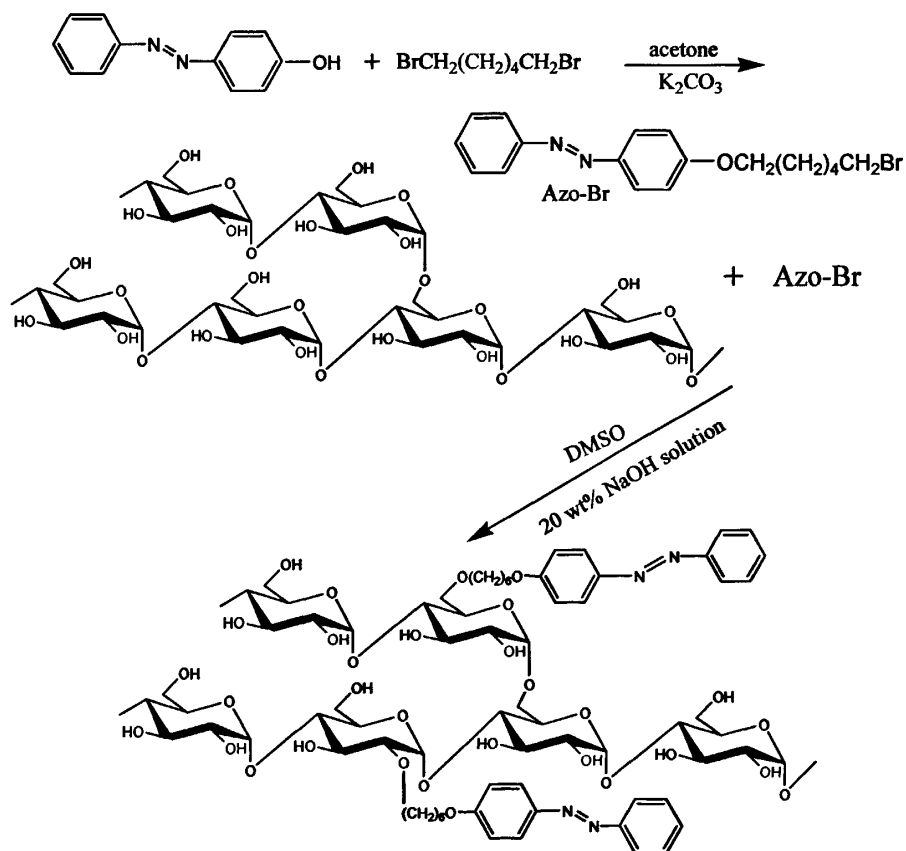


Figure 3-1 The synthetic scheme of Amy-Azo

Table 3-1 Synthesis of Amy-Azo with various *DS* of the azobenzene moiety

Samples	Amylopectin (g)	Azo-Br (g)	<i>DS</i> ^a (mol%)
Amy-Azo-4	1.00	0.15	3.86
Amy-Azo-10	1.00	0.60	9.92

^a Azobenzene groups per 100 anhydroglucose units of amylopectin determined by elemental analysis

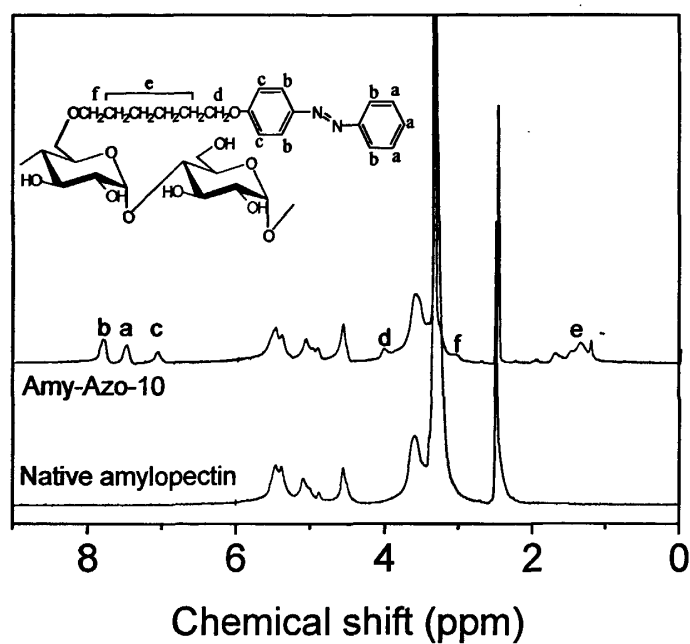


Figure 3-2 ¹H-NMR spectra of native amylopectin and Amy-Azo-10 in DMSO-d₆

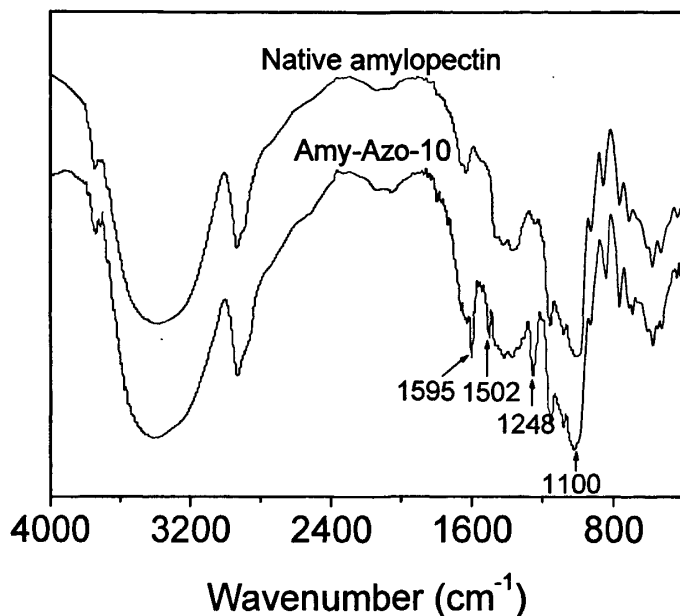


Figure 3-3 FT-IR spectra of native amylopectin and Amy-Azo-10

3.3.2 纳米水凝胶的制备与表征

利用 Amy-Azo 在水溶液中的疏水缔合交联作用(如图 3-4), 可得到光响应型纳米支链淀粉基水凝胶。首先我们采用芘做荧光探针来确定两亲性支链淀粉衍生物在水溶液中的临界胶束浓度。在芘的荧光发射光谱中, 其第一(372 nm)、第三(383 nm)振动峰强度的比值(I_{372}/I_{383})随环境极性的改变而变化; 当芘进入到聚合物胶束的疏水核中时, I_{372}/I_{383} 将减小, 利用这个性质可确定聚合物的临界胶束浓度^[17,18]。图 3-5 给出了激发波长(λ_{ex})为 335 nm 时不同浓度 Amy-Azo-10 溶液的荧光发射光谱, 图 3-6 进一步给出了 I_{372}/I_{383} 随 Amy-Azo-10 溶液浓度变化的结果。

由如图 3-6 可见, 在较低浓度下 I_{372}/I_{383} 基本保持不变, 某一浓度后 I_{372}/I_{383} 开始减小, 标志着胶束开始形成, 这一浓度即为临界胶束浓度; 由此得出 Amy-Azo-4、Amy-Azo-10 的临界胶束浓度分别为 36.7、12.1 mg/L, 即偶氮苯取代度大的 Amy-Azo-10 具有较小的临界胶束浓度。

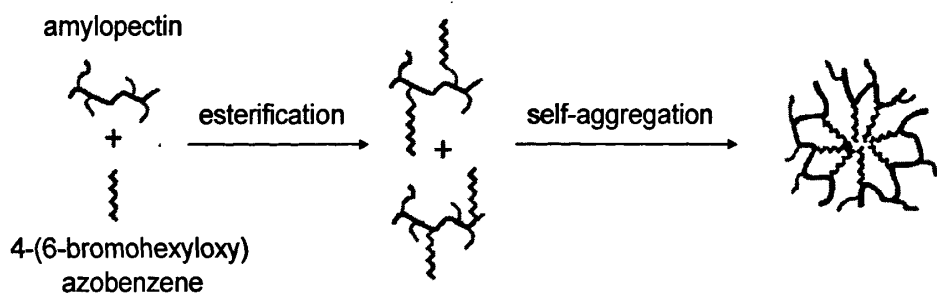


Figure 3-4 The hydrophobical aggregation of Amy-Azo amphiphilic grafts in aqueous solution

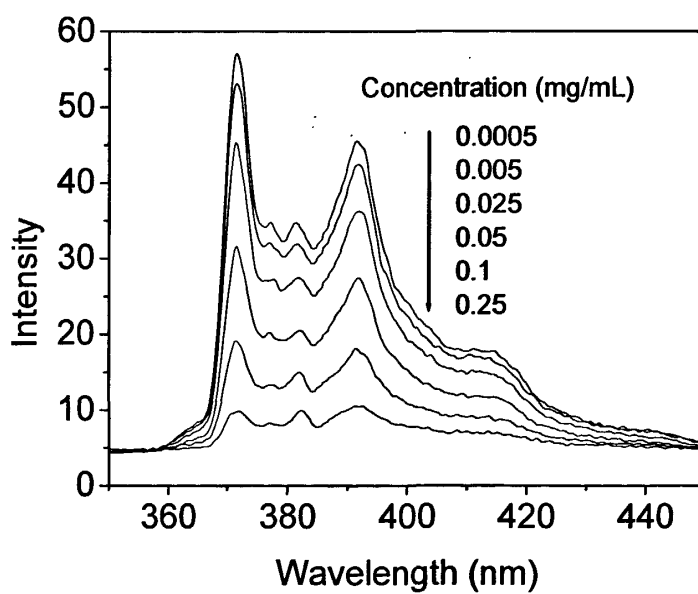


Figure 3-5 Emission spectra of pyrene at $\lambda_{ex}=335$ nm in aqueous Amy-Azo-10 solutions with different concentrations

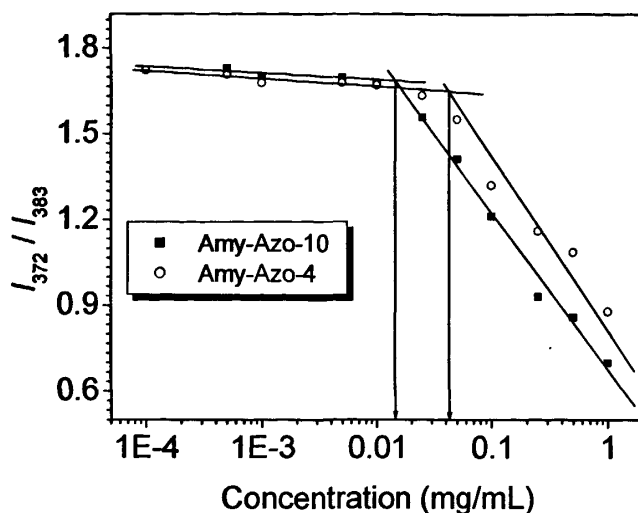


Figure 3-6 Changes of the intensity ratio(I_{372}/I_{383}) from excitation of pyrene with various concentrations of Amy-Azo-4 and Amy-Azo-10

进一步通过激光粒度分析测定了紫外光照前后 Amy-Azo 纳米水凝胶的粒径大小及分布。图 3-7 给出了 Amy-Azo-4 和 Amy-Azo-10 纳米水凝胶在光照前后粒径大小及分布情况,且粒径的具体数值列于表 3-2 中。所有纳米水凝胶的粒径均呈现两种尺寸分布,一种粒径尺寸较小(d_1),另一种粒径尺寸较大(d_2)。较小的粒径可能是 Amy-Azo 在水溶液中形成单分子链胶束,而较大的粒径为胶束进一步聚集形成更大的聚集体^[19,20]。由图 3-7 和表 3-2 可以看出, Amy-Azo-4 纳米水凝胶的粒径大于 Amy-Azo-10 纳米水凝胶,即随 Amy-Azo 中偶氮苯基团取代度增大,纳米水凝胶的粒径减小。这可能是因为 Amy-Azo 中疏水基团越多,疏水作用力越强,更易形成紧密的疏水核,导致纳米水凝胶的粒径减小。而 Amy-Azo 纳米水凝胶经 365 nm 的紫外光照射后,由于稳定的反式偶氮苯变为不稳定的、更为亲水的顺式结构,因此疏水作用力减弱,疏水核变得松散,导致粒径增大^[14]。

图 3-8 为 Amy-Azo-4 和 Amy-Azo-10 纳米水凝胶的透射电镜图。由图可以看出,纳米粒子形状呈规整的圆形,粒径也呈现两种尺寸分布,较小尺寸的粒径均在 25 nm 左右, Amy-Azo-4 纳米水凝胶的较大粒径在 75~90 nm,而 Amy-Azo-10 样品的较大粒径在 45~65 nm,略低于激光粒度仪所测得的数据(对应为 119.4 nm 和 88.2 nm)。产生这种现象是因为纳米粒度仪测量结果是纳米粒子在水溶液中的粒径,而透射电镜测试的是干态下的聚集体粒径^[15]。

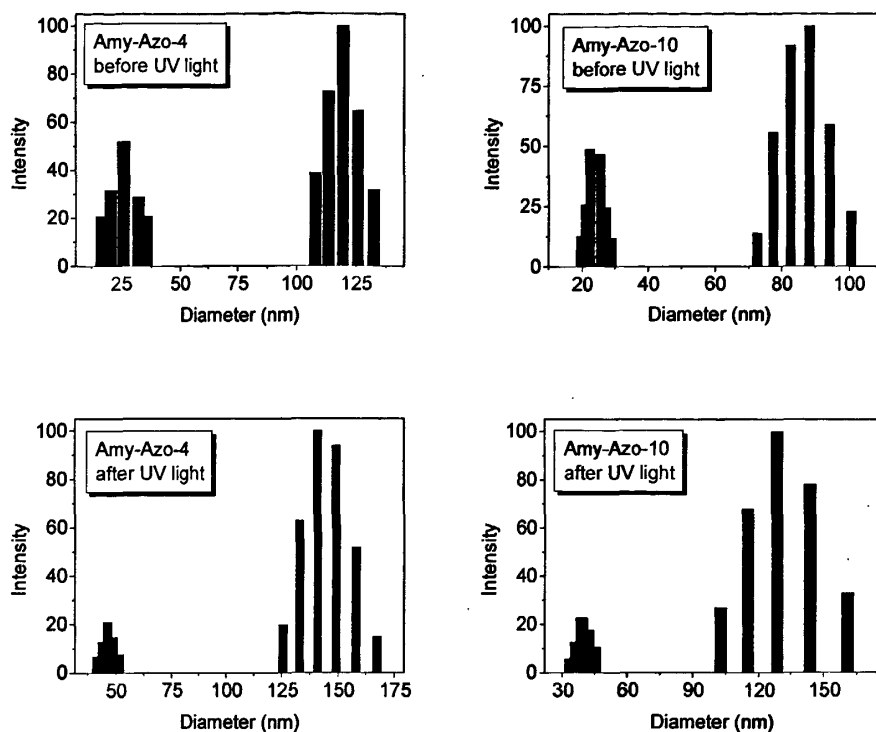


Figure 3-7 Size distributions of Amy-Azo-4 and Amy-Azo-10 nanogels before and after 365 nm UV light

Table 3-2 Properties of Amy-Azo self-aggregated nanoparticles

Samples	cac ^b (mg/L)	<i>trans</i>		<i>cis</i>	
		d ₁ ^c	d ₂ ^c	d ₁ ^c	d ₂ ^c
Amy-Azo-4	36.7	26.0	119.4	45.1	140.9
Amy-Azo-10	12.1	24.1	88.2	38.9	128.6

^b Critical aggregation concentration (cac) determined from I_{377}/I_{383} data

^c Mean diameter (d, nm) determined by laser particle size distribution analysis

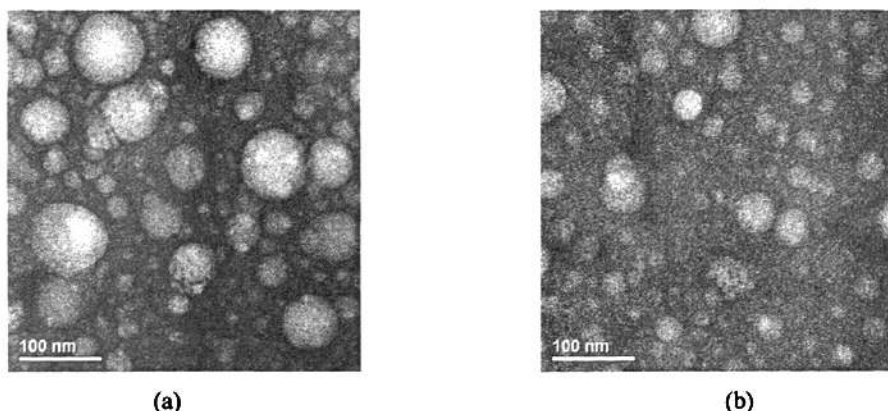


Figure 3-8 TEM images of Amy-Azo nanogels for Amy-Azo-4 (a) and Amy-Azo-10 (b)

3.3.3 两亲性接枝物在 $H_2O/DMSO$ 中的聚集行为

通过透析方法,我们将 Amy-Azo 的 DMSO 溶液在去离子水中透析,利用 Amy-Azo 中偶氮苯疏水侧链在溶液中的疏水缔合交联作用来制备光响应型纳米水凝胶,因此我们通过紫外-可见光谱研究了 Amy-Azo 在 $H_2O/DMSO$ 溶液中的疏水聚集过程。

偶氮苯的光异构化行为与偶氮苯单元所处的环境有关,例如在不同的溶剂中,偶氮苯在紫外光照下达到光稳态的异构化速率和异构化程度是不同的。图 3-9 给出了在不同光照时间下, Amy-Azo-10 的 DMSO 溶液及其纳米凝胶水分散液的紫外-可见吸收光谱。Amy-Azo 在良溶剂 DMSO 中呈现出偶氮苯分子的两个特征吸收峰: 352 nm (*trans* $\pi-\pi^*$ transition)和 440 nm (*cis* $n-\pi^*$ transition); 当用 365 nm 紫外光照时,反式构型 $\pi-\pi^*$ 跃迁的吸收峰 (352 nm)处强度逐渐降低,而对应于顺式构型 $n-\pi^*$ 跃迁的吸收峰(440 nm)处强度逐渐增大,这说明偶氮分子在 DMSO 溶液中发生了反式到顺式的光致异构化。当 Amy-Azo 在水中发生疏水聚集形成纳米水凝胶后,其紫外-可见吸收光谱图形状与在 DMSO 溶液中相似,但在光照前其最大吸收峰(λ_{max})明显蓝移,位移值达 15 nm,表明 Amy-Azo 中偶氮苯生色团在疏水聚集过程中形成 H-聚集体^[21]。

H-聚集对偶氮生色团光谱的影响可用 Kasha 等^[22,23]的双激子模型解释。当偶氮生色团聚集时,激发态偶极矩间相互作用加强,激子耦合产生能级裂分。当偶氮生色团排列成 H-聚集体时,激子分裂能为正值,基态跃迁到激发态时的能隙增大,因而吸收峰位置蓝移。 λ_{max} 蓝移是偶氮生色团发生 H-聚集的典型光谱特征。

我们对 Amy-Azo 中偶氮苯生色团从反式到顺式异构化动力学进行了研究。以 352 nm 处吸光度对光照时间作图,结果可以用一级指数衰减函数拟合,取自然对数后转换成下式:

$$\ln[(A_t - A_e)/(A_0 - A_e)] = -kt \quad (3-3)$$

其中, A_0 、 A_t 和 A_e 分别表示紫外光照前、时间 t 和紫外光照至顺反异构平衡后 352 nm 处的吸光度, k 为异构化速率常数。图 3-10 给出了 Amy-Azo 的 DMSO 溶液及其纳米凝胶水分散液的光致反顺异构化一阶动力学曲线, 通过直线斜率得出 Amy-Azo 在 DMSO 溶液中的速率常数 $k_{\text{DMSO}} = 0.095 \text{ s}^{-1}$, 其纳米凝胶水分散液的速率常数 $k_{\text{H}_2\text{O}} = 0.090 \text{ s}^{-1}$, 略低于在 DMSO 溶液中的速率常数, 表明 Amy-Azo 中偶氮生色团在纳米凝胶中的光响应速率比 DMSO 中慢。

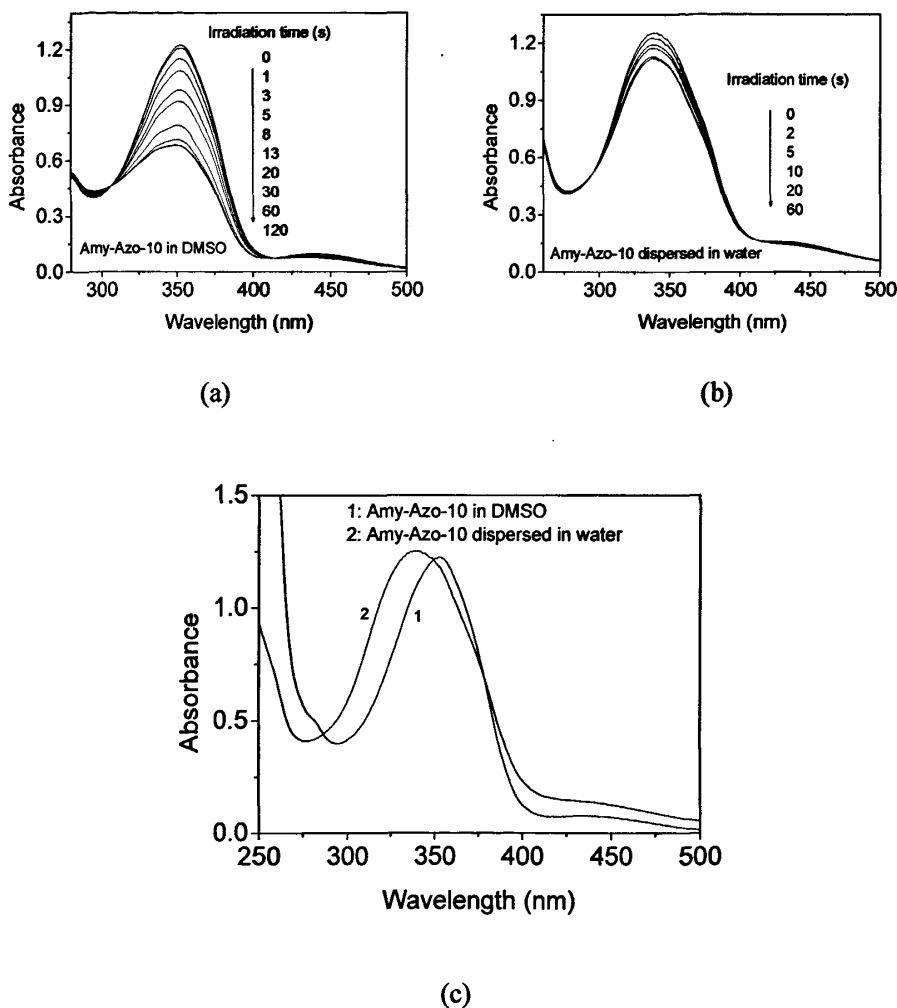


Figure 3-9 UV-Vis spectra of Amy-Azo-10 upon UV irradiation in DMSO solution (0.1 mg/mL) (a); dispersed in water (0.12 mg/mL) (b); before UV irradiation in DMSO solution and dispersed in water (c)

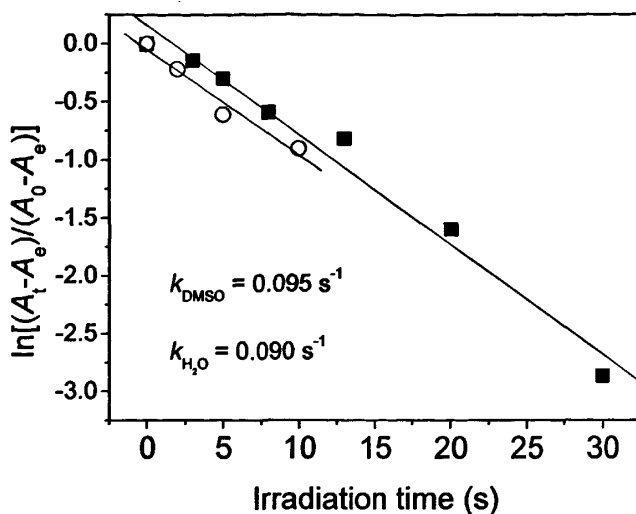


Figure 3-10 The dependence of $\ln[(A_t - A_e)/(A_0 - A_e)]$ on irradiation time of Amy-Azo dissolved in DMSO solution (■) and the nanogels in water (○)

偶氮生色团在选择性溶剂中发生 H-聚集对 Amy-Azo 的光响应性有显著的影响, 我们研究了 Amy-Azo-10 在不同配比 DMSO/水溶液中的光响应行为。首先, 我们制备不同配比 DMSO/水的 Amy-Azo-10 溶液。将 Amy-Azo 溶于 DMSO 中, 在手动搅拌条件下, 以大概 5 $\mu\text{L/s}$ 的速度向接枝物的 DMSO 溶液中缓慢滴加去离子水, 到达一定溶剂配比后停止, 在室温下避光放置至少 24 h 后使用。

然后用 365 nm 紫外光照射上述不同配比 DMSO/水的 Amy-Azo-10 溶液, 使其逐渐达到反顺异构化平衡, 用不同光照时间的吸光度(A_t)与光照前吸光度(A_0)的比值(A_t/A_0)对光照时间 t 作图, 如图 3-11 所示。随着光照时间延长, A_t/A_0 逐渐减小, 30 s 后不再下降。偶氮生色团的异构化程度可用下式表示:

$$D(\%) = (A_0 - A_e) \times 100 / A_0 \quad (3-4)$$

表 3-3 列出了不同配比 DMSO/水的 Amy-Azo-10 溶液, 在紫外光照前的 λ_{max} 变化以及光照异构化平衡时偶氮生色团的反顺异构化程度。由表 3-3 可见, 混合溶液中水含量越高, λ_{max} 和偶氮生色团的反顺异构化程度均减小, 这是由偶氮生色团的 H-聚集引起的。偶氮生色团发生 H-聚集后, π 电子激发跃迁需要更多的能量, 从而引起 λ_{max} 蓝移; 而发生 H-聚集后的偶氮生色团在进行反式至顺式光异构化反应时, 需克服更大的位阻效应, 导致偶氮生色团的反顺异构化程度减小。

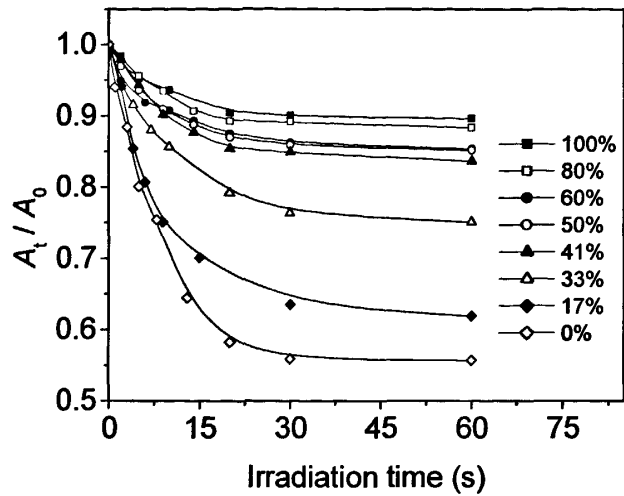


Figure 3-11 Plot of the relative absorbance (A_t/A_0) of Amy-Azo-10 in various media vs the irradiation time

Table 3-3 $\lambda_{\max}$ and the isomerization degree ($D\%$) at photostationary state of Amy-Azo-10 as a function of water content

water content (v%)	0	17	33	41	50	60	80	100
$\lambda_{\max}$ (nm)	352	351	345	342	339	337	337	337
D (%)	44	38	25	17	15	14	12	10

3.3.4 药物负载与控制释放研究

通过透析方法, Amy-Azo 在发生疏水缔合作用形成纳米水凝胶的同时负载疏水药物吲哚美辛, 图 3-12 给出了不同偶氮取代度的 Amy-Azo 纳米水凝胶对吲哚美辛的负载率和负载效率。由图可以看出, Amy-Azo-10 纳米水凝胶对药物的负载率和负载效率均相对较高。这是因为随 Amy-Azo 中偶氮苯取代度增大, 组成纳米凝胶内核的疏水基团增加, 与疏水性药物分子的相互作用也相对增加, 增溶到纳米凝胶内核的药物分子增多, 导致纳米凝胶的药物负载率增大。在加入相同初始质量药物的条件下, 纳米水凝胶对药物的负载量越大, 其负载效率也越高。

图 3-13 为 Amy-Azo 载药纳米水凝胶在缓冲溶液(PBS, pH=7.4)中的释放曲线。由图可以看出, Amy-Azo 中偶氮基团取代度越大, 其载药纳米水凝胶的药物释放速率及累积释放量均减小, 这可能是因为随着组成纳米凝胶内核的疏水基

团数量增加,与疏水药物的亲和能力增强,药物分子扩散至纳米凝胶内核外的阻力增大,导致药物释放速率减小,因而药物的突释减少,缓释作用增强。此外,在 pH 7.4 的缓冲溶液中,当用波长为 365nm 的紫外光照射时,载药纳米水凝胶的释放速率以及最终药物释放量均高于未光照的纳米水凝胶。在紫外光照下,偶氮苯生色团由稳定的反式结构转变为不稳定、更为亲水的顺式结构,纳米凝胶的疏水内核遭到破坏,药物分子更容易从疏水内核中扩散出来,导致药物释放速率增大,Patnaik 等人^[14]也得到类似的实验结果。

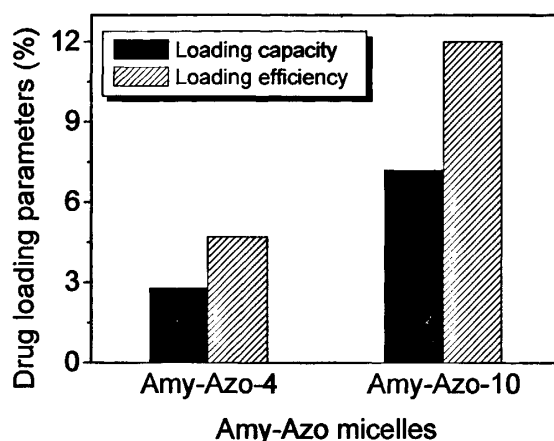


Figure 3-12 Indomethacin loading capacity and loading efficiency of Amy-Azo nanogels

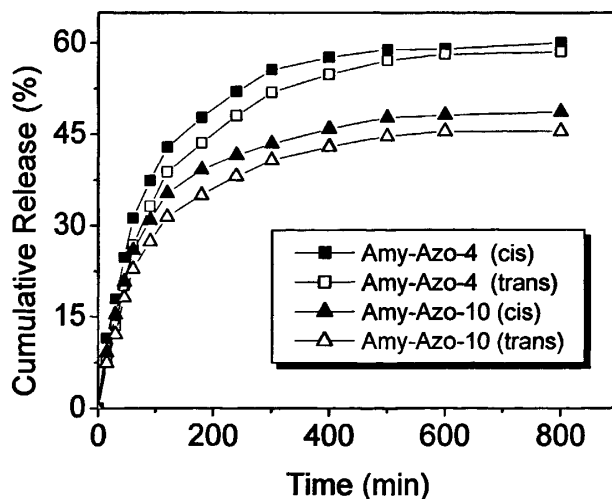


Figure 3-13 Indomethacin release profiles of Amy-Azo nanogels in PBS (pH 7.4) at 25 °C
(*cis*, under 365 nm UV irradiation; *trans*, in dark condition)

3.4 结论

(1) 合成了含偶氮苯疏水侧链的两亲性支链淀粉接枝物(Amy-Azo), 利用 Amy-Azo 在水溶液中的疏水缔合交联作用, 得到光响应型支链淀粉基纳米水凝胶。

(2) 激光粒度分析和透射电镜显示 Amy-Azo 纳米水凝胶的粒径随 Amy-Azo 中偶氮苯基团取代度增大而减小, 且 Amy-Azo 纳米水凝胶经 365 nm 的紫外光照射后, 其粒径增大。

(3) 用芘做荧光探针确定了 Amy-Azo 在水溶液中的临界胶束浓度, 并利用紫外可见光谱研究了 Amy-Azo 在 H₂O/DMSO 溶液中的疏水聚集过程, 结果显示偶氮生色团的反顺异构化程度和异构化速率均随混合溶液中水含量增加而减小。

(4) 以吲哚美辛为模型药物, 研究了所形成的纳米水凝胶对药物的负载能力, 发现偶氮苯取代度大的 Amy-Azo 所形成的纳米水凝胶具有较高的药物负载率和负载效率。体外释放实验表明, 随 Amy-Azo 中偶氮苯基团取代度增大, 载药纳米水凝胶的药物释放速率及累积释放量减小; 当用波长为 365 nm 的紫外光照射时, 载药纳米水凝胶的释放速率以及最终药物释放量均高于未光照的纳米水凝胶, 因此可通过紫外光照来调控纳米水凝胶的药物释放速率。

参考文献

- [1] Rapoport N. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 2007, 32: 962-990
- [2] Wang Q, Xua HB, Yang XG, YangYJ. Drug release behavior from in situ gelatinized thermosensitive nanogel aqueous dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 361: 189-193
- [3] Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60: 1638-1649
- [4] Yagai S, Karatsu T, Kitamura A. Photocontrollable self-assembly. *Chemistry-A European Journal*, 2005, 11: 4054-4063
- [5] Li MH, Keller P. Stimuli-responsive polymer vesicles. *Soft Matter*, 2009, 5: 927-937
- [6] Motornov M, Roiter Y, Tokarev I, Minko S. Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems. *Progress in Polymer Science*, 2010, 35: 174-211

- [7] Cheng H, Tuo XL, Wang GJ, Wang XG. A novel polyelectrolyte with branched azo side chains: synthesis, characterization and self-Assembled nanostructures. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2001, 202: 3530-3535
- [8] Li YB, Deng YH, Tong XL, Wang XG. Formation of photoresponsive uniform colloidal spheres from an amphiphilic azobenzene-containing random copolymer. *Macromolecules*, 2006, 39: 1108-1115
- [9] Deng YH, Li YB, Wang XG. Colloidal sphere formation, H-aggregation, and photoresponsive properties of an amphiphilic random copolymer bearing branched azo side chains. *Macromolecules*, 2006, 39: 6590-6598
- [10] Wang G, Tong X, Zhao Y. Preparation of azobenzene-containing amphiphilic diblock copolymers for light-responsive micellar aggregates. *Macromolecules*, 2004, 37: 8911-8917
- [11] Tong X, Wang G, Zhao Y. How can azobenzene block copolymer vesicles be dissociated and reformed by light? *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109: 20281-20287
- [12] Zhao Y. Rational design of light-controllable polymer micelles. *The Chemical Record*, 2007, 7: 286-294
- [13] Liu XK, Jiang M. Optical switching of self-Assembly: micellization and micelle-hollow-sphere transition of hydrogen-bonded polymers. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45: 3846-3850
- [14] Patnaik S, Sharma AK, Garg BS, Gandhi RP, Gupta KC. Photoregulation of drug release in azo-dextran nanogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 342: 184-193
- [15] Lee J, Cho EC, Cho K. Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles. *Journal of Controlled Release*, 2004, 94: 323-335
- [16] Kondo T, Gray DG. Facile method for the preparation of tri-O-(alkyl) cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 1992, 45: 417-423
- [17] Nagasaki Y, Okada T, Scholz C, Iijima M, Kato M, Kataoka K. The reactive polymeric micelle based on an aldehyde-ended Poly(ethylene glycol)/Poly(lactide) block copolymer. *Macromolecules*, 1998, 31: 1473-1479
- [18] Nouvel C, Frochot C, Sadtler V, Dubois P, Dellacherie E, Six JL. Polylactide-grafted dextrans: synthesis and properties at interfaces and in solution. *Macromolecules*, 2004, 37: 4981-4988
- [19] Besheer A, Hause G, Kressler J, Mäder K. Hydrophobically modified hydroxyethyl starch: Synthesis, characterization, and aqueous self-assembly into nano-sized polymeric micelles and vesicles. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 359-367

- [20] Liu KH, Chen SY, Liu DM, Liu TY. Self-assembled hollow nanocapsule from amphiphatic carboxymethyl-hexanoyl chitosan as drug carrier. *Macromolecules*, 2008, 41: 6511-6516
- [21] Kuiper JM, Engberts JBFN. H-Aggregation of azobenzene-substituted amphiphiles in vesicular membranes. *Langmuir*, 2004, 20: 1152-1160
- [22] Czikkely V, Försterling HD, Kuhn H. Light absorption and structure of aggregates of dye molecules. *Chemical Physics Letters*, 1970, 6: 11-14
- [23] Czikkely V, Försterling HD, Kuhn H. Extended dipole model for aggregates of dye molecules. *Chemical Physics Letters*, 1970, 6: 207-211

第4章 光交联型壳聚糖水凝胶的研究

4.1 前言

以天然多糖为基质的水凝胶由于具有良好的生物相容性和生物降解性,作为生物材料在药物控释、固定化酶、组织工程等领域获得了广泛的应用^[1-7]。与其它交联方式相比,光交联方法制备水凝胶具有如下优点^[8]: (1) 可使聚合物前驱体水溶液原位交联,因而可用于制备可注射水凝胶; (2) 在室温或生理温度下快速聚合形成水凝胶; (3) 产物几何形状易于控制; (4) 原位聚合过程中产生较低的热量等。这种温和的凝胶方式特别适合于制备生物凝胶材料,因此,光交联聚合物水凝胶广泛用作药物载体^[9,10]、细胞和生长因子载体^[11,12]、基因载体^[13]等。

为得到可光交联的多糖衍生物,通常是将甲基丙烯酸缩水甘油酯、马来酞酐、(甲基)丙烯酸酯类单体与多糖反应引入双键^[14-17],然后在光引发剂的作用下引发聚合反应形成凝胶,但残留在凝胶体系中的光引发剂及光裂解碎片具有一定的细胞毒性。肉桂酸可发生光二聚反应,在波长 $\lambda > 280$ nm的紫外光照下,发生[2+2]加成反应形成环丁烷结构^[18]。肉桂酸通过光二聚反应形成凝胶的性质,广泛应用于光刻胶及半导体工业领域^[19],而将肉桂酸连接到多糖上形成凝胶的报道还较少。已见报道的有将肉桂酸衍生物连接到明胶^[20]或透明质酸^[21]上,但他们只考察了所得凝胶的溶胀性能及细胞毒性,对凝胶的力学性能、在生物医药领域的应用未做进一步的研究。在本实验中,我们首先合成了水溶性的羧甲基壳聚糖,再通过4-硝基肉桂酸活化酯与羧甲基壳聚糖上的氨基反应得到可光交联的羧甲基壳聚糖衍生物(CMCS-NC)。在无外加光引发剂的条件下,利用CMCS-NC中肉桂酸酯基在365 nm紫外光照下的光二聚反应,制备适合用作生物材料的光交联型羧甲基壳聚糖水凝胶。讨论了紫外光照时间和CMCS-NC中肉桂酸酯基取代度对所得水凝胶溶胀性能、粘弹性、生物降解性以及体外药物释放的影响。

4.2 实验部分

4.2.1 原料与试剂

壳聚糖,脱乙酰度为75-85%,低分子量(粘度20-200 cp),美国Aldrich公司; 4-硝基肉桂酸(NC),上海晶纯试剂有限公司; *N,N*-二环己基碳二亚胺(DCC),

美国 Aldrich 公司; N-羟基丁二酰亚胺(NHS), 国药集团化学试剂有限公司; 盐酸阿霉素, USP 级, 加拿大 BioBasic 公司; 溶菌酶, 分子量 14300, 酶活力 ≥ 20000 U/mg, 美国 Aldrich 公司; 其它试剂均为市售分析纯, 直接使用。

4.2.2 硝基肉桂酰基羧甲基壳聚糖衍生物的合成

(1) 水溶性 *O*-羧甲基壳聚糖(CMCS)的合成

参考文献^[22,23]合成。向 10 g 粉末状壳聚糖中加入 50 mL 50%的 NaOH 溶液, 在-18 °C 下碱化过夜, 解冻后用 100 mL 异丙醇稀释, 在快速机械搅拌下滴加 100 mL 含 25 g 氯乙酸的异丙醇溶液, 滴加过程中用水浴维持体系的温度在 25 °C, 1 h 内滴加完毕, 然后在 25 °C 下继续反应 6 h。反应结束后, 用盐酸中和, 抽滤, 固体用乙醇多次洗涤得到白色粉末状沉淀, 真空干燥。然后将干燥后的沉淀溶于水中, 在去离子水中透析 48 h (截留分子量为 14000), 然后离心, 将清液冷冻干燥得到完全水溶的 *O*-羧甲基壳聚糖(CMCS), 产率 31.8%。产物的羧甲基取代度(DS)用电位滴定法^[24]测得: 准确称取 0.5 g 羧甲基壳聚糖, 溶于 50 mL 0.1 mol/L 的盐酸标准溶液中, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定, 分别记下 pH 2.1 和 pH 4.2 时所消耗的氢氧化钠体积 V_1 、 V_2 , 根据下式计算取代度:

$$DS = 0.203A / (1 - 0.058A), \quad A = (V_2 - V_1) N / W \quad (4-1)$$

其中, N 是氢氧化钠标准溶液的物质的量浓度(mol/L), W 是羧甲基壳聚糖的质量(g)。按上述方法测得羧甲基取代度为 0.72。

(2) *N*-琥珀酰亚胺对硝基肉桂酸酯(NC-NHS)的合成

在 40 °C 下, 将 1.93 g (10 mmol) 4-硝基肉桂酸溶于 35 mL 的 *N,N'*-二甲基甲酰胺(DMF)中, 再加入 NHS (1.2 g, 10 mmol)和 DCC (2.1 g, 10 mmol), 在 40 °C 避光反应 24 h。反应完毕后, 过滤除去生成的副产物二环己基脲, 滤液倾入水中沉淀, 得到的固体真空干燥后用 DMF/乙醇重结晶, 产率 75.2%。¹H-NMR (DMSO- d_6 , ppm): 2.85 (s, 4H), 7.18 (d, 1H), 7.23 (d, 1H), 8.12 (d, 2H), 8.26 (d, 2H)。

(3) 4-硝基肉桂酸接枝羧甲基壳聚糖(CMCS-NC)的合成

将 0.4 g CMCS 溶于 50 mL pH 8.3 的 NaHCO_3 溶液中, 在室温下滴加 40 mL DMF, 将一定量的 NC-NHS 溶于 10 mL DMF, 缓慢滴加到上述 CMCS 溶液中, 混合溶液在室温避光反应 72 h。反应完毕后, 将混合溶液逐滴滴加到 150 mL 的四氢呋喃(THF)中沉淀, 过滤, 固体用 THF 洗涤后真空干燥。将干燥后的固体溶于去离子水中, THF 沉淀, 得到的固体用 THF 反复洗涤至用紫外可见分光光谱

仪检测不到肉桂酸的吸收峰，然后 40 °C 真空干燥 48 h。

4.2.3 光交联凝胶的制备

取等量的 CMCS-NC 水溶液于聚四氟乙烯模具中，置于 365 nm 的紫外灯下光照不同时间。光照后形成的凝胶室温干燥 48 h，称重后在去离子水中浸泡 24 h，以除去未交联的 CMCS-NC，再室温干燥 48 h 后称重，得到的干凝胶再置于去离子水中浸泡 24 h 以达到溶胀平衡。CMCS-NC 紫外光照的凝胶产率和溶胀度分别用 Gelation efficiency 和 Swelling degree 来表示，计算公式如下：

$$\text{Gelation efficiency (\%)} = (M_2 \times 100) / M_1 \quad (4-2)$$

$$\text{Swelling degree} = (M_3 - M_2) / M_2 \quad (4-3)$$

其中， M_1 为光照后干凝胶的重量， M_2 为用去离子水浸泡除去未交联的 CMCS-NC 后干凝胶的重量， M_3 为在去离子水中浸泡达到溶胀平衡后凝胶的重量。

4.2.4 结构表征

采用美国 Nicolet 公司产 Nexus 670 型傅立叶变换红外光谱仪测定试样的红外光谱图 (KBr 压片)；采用美国 Varian 公司产 Mercury-Plus 300 MHz 核磁共振仪测定试样的 $^1\text{H-NMR}$ ；采用北京普析 TU-1901 紫外-可见分光光度计测定试样的紫外-可见光谱，用于紫外光照的紫外灯为 200 W 的飞利浦汞灯，主波长为 365 nm，光强为 0.9 mW/cm²，购自上海亚源照明电器有限公司。采用日本 Hitachi 公司 S4800 扫描电子显微镜观察凝胶表面形态，用于观察的凝胶样品冷冻干燥后用液氮脆断，真空镀金，观察其断面形态；样品的流变测试采用 TA ARES/RFS 高级扩展流变系统，采用 25 mm 平行板夹具，实验温度固定在 25 °C。为保证样品的动态测试在线性范围内，首先对凝胶样品进行动态应变扫描，固定频率为 1 Hz，扫描范围 0.05%~300%；样品的动态频率扫描，在线性范围内固定应变为 0.5%，扫描范围 0.1~100 rad/s。

4.2.5 光交联凝胶的生物降解性

将 CMCS-NC 水溶液在 365 nm 的紫外灯下光照 45 min，得到的凝胶在去离子水中浸泡 24 h，以除去未交联的 CMCS-NC，再室温干燥 48 h 后称重。将干凝胶置于 10 mL 4 mg/mL 溶菌酶 PBS 溶液中 (pH 7.4，溶液中含有 0.1% NaN₃)，在 37 °C 的恒温振荡水槽中进行降解。每隔 10 天取出凝胶，用去离子水冲洗凝胶，室温干燥 48 h 后称重，再将凝胶置于新鲜的溶菌酶 PBS 溶液中进行降解。

比较凝胶样品降解前后的质量变化, 质量损失率 (Mass loss) 用下式计算:

$$\text{Mass loss} = (W_0 - W_t) \times 100 / W_0 \quad (4-4)$$

其中, W_0 是凝胶样品的初始质量, W_t 是 t 时刻干燥凝胶样品的质量。

4.2.6 药物的原位光包埋与控制释放研究

将一定浓度的CMCS-NC水溶液与盐酸阿霉素的水溶液混合均匀, 使体系中阿霉素的含量为20 mg/g, 混合溶液在365 nm的紫外灯下光照45 min, 得到原位包埋阿霉素的载药凝胶。

(1) 阿霉素标准曲线的绘制: 准确配制一系列浓度的阿霉素溶液(1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g/mL}$), 用紫外-可见分光光谱仪测定 481 nm 处的吸光度, 同一样品做三次取平均值, 以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 拟合公式为 $A = 0.02439 \times C + 0.00524$ (A 为吸光度, C 为阿霉素的浓度, $R=0.99998$)。

(2) 载药凝胶的体外药物释放行为

向载药凝胶中加入10 mL PBS缓冲溶液(pH 7.4, 0.01 mol/L), 在37 °C的恒温振荡水槽中进行药物释放。每隔一定时间取出1 mL释放液, 同时补充相同体积的新鲜缓冲溶液, 以维持释放体系的体积不变。取出的释放液在481 nm处测定其吸光度, 根据标准曲线计算不同时间阿霉素从凝胶中释放出的含量, 测定结果以累积释放率表示。

4.3 结果与讨论

4.3.1 硝基肉桂酰基羧甲基壳聚糖衍生物的合成与表征

如图 4-1 所示, 通过三步反应合成以 4-硝基肉桂酸为侧基的水溶性壳聚糖衍生物。首先对壳聚糖进行羧甲基化改性, 将壳聚糖在-18 °C 下碱化过夜, 并在较低的温度下(25 °C)进行羧甲基化反应, 以保证羧甲基化在 O 位进行^[22-23]。产物通过离心分离, 可得到完全水溶的 O -羧甲基壳聚糖(CMCS)。然后利用 NHS 对 4-硝基肉桂酸中的羧基进行活化, 通过偶联反应引入到羧甲基壳聚糖的骨架上。通过改变肉桂酸活化酯的投料量, 得到不同肉桂酸含量的羧甲基壳聚糖衍生物, 采用紫外可见光谱仪来测定肉桂酸的取代度(100 个糖环单元上所含的肉桂酸基团数)。具体操作如下: 准确配制备一系列 4-硝基肉桂酸的 DMF 溶液(1, 2.5, 5, 7.5,

10, 15 $\mu\text{g/mL}$), 用紫外可见分光光谱仪测定 311 nm 处的吸光度, 得到 4-硝基肉桂酸的摩尔消光系数为 $1.93 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 与文献报道^[20]相符, 由此计算羧甲基壳聚糖衍生物中肉桂酸基团的取代度(见表 4-1)。由于样品 CMCS-NC-0.6 中肉桂酸基团的含量太低, 在紫外光照下, 只能得到粘稠溶液。

图4-2为CMCS 和 CMCS-NC-11的FT-IR谱图。从图中可以看出, CMCS中 1662 cm^{-1} 处为酰胺I的特征吸收峰, 1602 和 1415 cm^{-1} 为羧基的伸缩振动吸收峰, 1325 为C-N伸缩振动吸收峰, 1070 cm^{-1} 为C-O伸缩振动吸收峰。与CMCS谱图相比, CMCS-NC-11的IR谱图中 1662 cm^{-1} 处的吸收峰增强, 1500 和 1400 cm^{-1} 处出现的弱吸收峰为苯环的特征吸收峰, 这表明羧甲基壳聚糖中的胺基与4-硝基肉桂酸中的羧基反应生成了酰胺键。

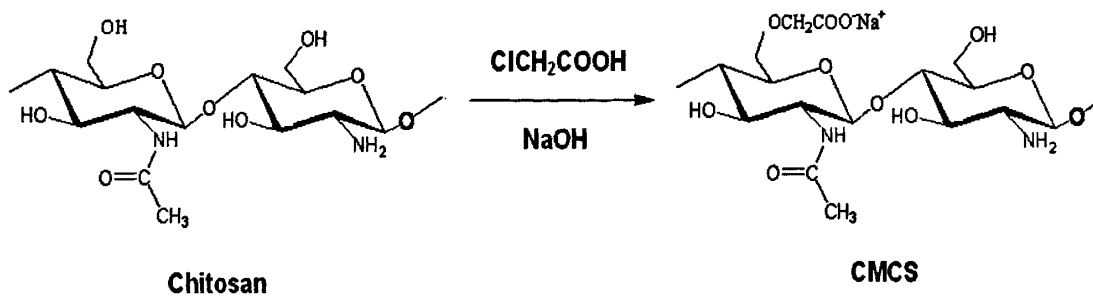
图4-3为CMCS和CMCS-NC-11的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。由图中可见, CMCS中 $\delta 1.95$ 为羧甲基壳聚糖乙酰胺基中甲基的质子峰, $\delta 2.60$ 为与伯胺基相连的 C_2 的质子峰^[25], $\delta 3.1\sim 4.0$ 为糖环中 C_3 , C_4 , C_5 和 C_6 的质子峰, $\delta 4.35$ 为羧甲基中亚甲基的质子峰; CMCS-NC谱图中出现了肉桂酸基团的质子峰, $\delta 6.72$ 和 7.53 为双键上的质子峰, $\delta 7.71$ 和 8.14 为苯环上的质子峰, 表明肉桂酸基团连接到羧甲基壳聚糖主链上。

Table 4-1 Synthesis of CMCS-NC with different *DS* of the cinnamate moiety

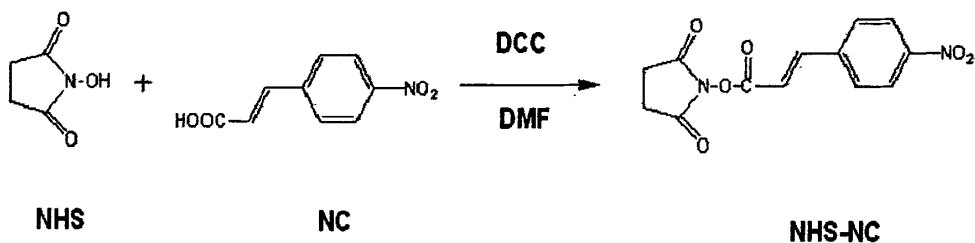
samples	CMCS (g)	NC-NHS (g)	<i>DS</i> of cinnamate ^a	Yield (%)
CMCS-NC-0.6	0.400	0.105	0.6	81.4
CMCS-NC-2	0.400	0.150	1.9	71.2
CMCS-NC-11	0.400	0.240	11.2	65.5

^a cinnamate groups per 100 sugar residues of CMCS determined by UV-vis spectroscopy

(1) Preparation of carboxymethylated chitosan (CMCS)



(2) Preparation of NHS-activated nitrocinnamate (NHS-NC)



(3) Conjugation of CMCS with NHS-NC

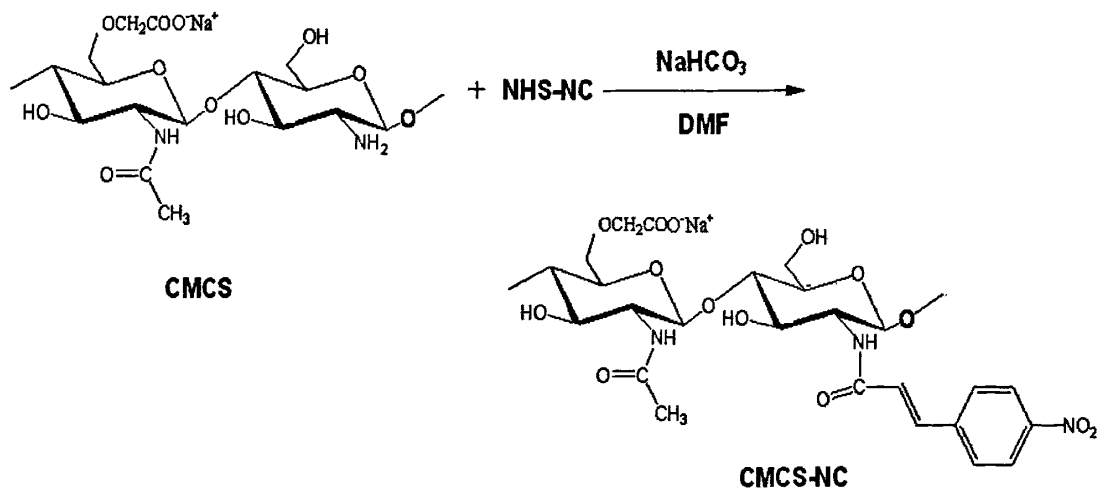


Figure 4-1A three-step reaction strategy for the preparation of water-soluble chitosan derivative (CMCS-NC) containing nitrocinnamate moiety

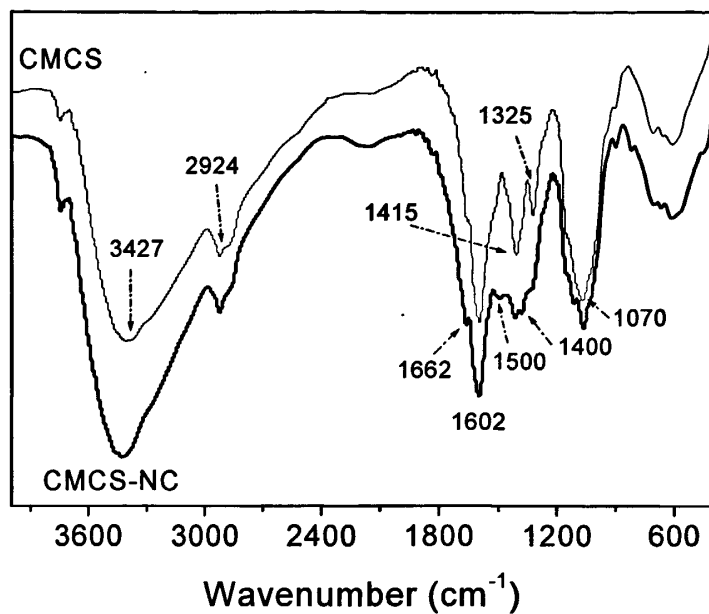


Figure 4-2 FT-IR spectra of CMCS and its conjugate (CMCS-NC-11) sample (KBr pellets)

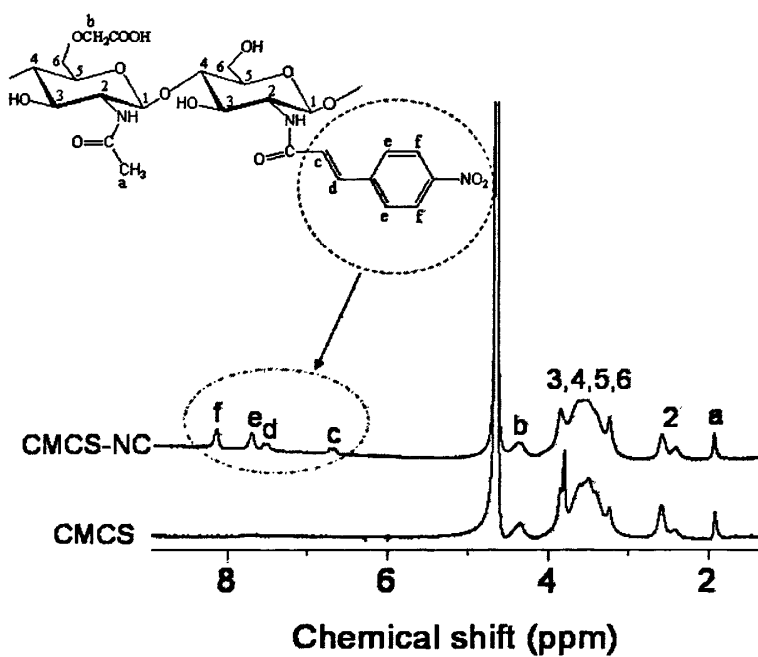
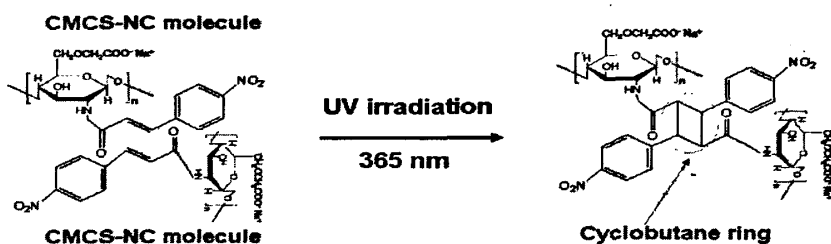


Figure 4-3 ^1H -NMR of CMCS and its conjugate (CMCS-NC-11) (D_2O , 25 °C)

4.3.2 光交联凝胶的制备与表征

肉桂酸酯类基元在365 nm紫外光照下可发生[2+2]光二聚反应形成环丁烷结构。因此，利用CMCS-NC中肉桂酸酯基的光二聚反应，可制备光交联型羧甲基壳聚糖基水凝胶(如图4-4)。我们用紫外-可见光谱考察了CMCS-NC中肉桂酸酯基的光二聚交联过程，如图4-5所示。由图可见，在紫外光照前，CMCS-NC中肉桂酸酯基在314 nm处出现最大吸收值；当用365 nm的紫外光照CMCS-NC溶液时，随着光二聚反应的发生，肉桂酸酯基的吸光度下降且最大吸收峰位置发生蓝移。光照20 s时，其吸光度值下降了近16%，最大吸收峰从314 nm蓝移至309 nm，文献^[26,27]也报道了类似的规律。

(a) Intermolecular cycloaddition formation



(b) Network structure formation

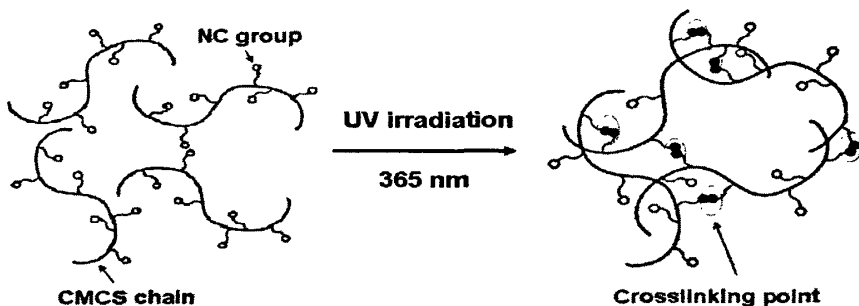


Figure 4-4 A possible mechanism for the photogelation of aqueous CMCS-NC solution

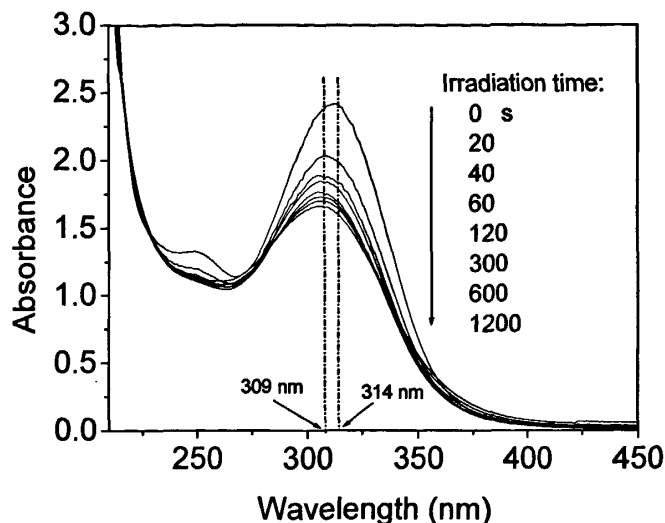


Figure 4-5 UV-vis absorbance of aqueous CMCS-NC-11 solution with a concentration of 0.24 mg/mL during UV irradiation at $\lambda = 365$ nm (irradiation time, 0-1200 s)

4.3.3 光交联凝胶的溶胀性能

一定浓度的 CMCS-NC 水溶液在 365 nm 的紫外光照下发生光二聚反应，得到的凝胶在去离子水中浸泡除去未交联的 CMCS-NC，提纯后的干凝胶质量与光照前 CMCS-NC 质量之比称为凝胶产率，如图 4-6 所示。随光照时间的延长，凝胶产率增加，当光照时间超过 45 min 后，凝胶产率增加幅度变缓。这是因为随光照时间增加，更多的肉桂酸基团发生光二聚反应，导致凝胶产率增加；当光照时间达到 45 min 时，CMCS-NC 中大多数肉桂酸基团发生了光二聚反应，继续延长光照时间，凝胶产率只略微增加。从图 4-6 还可以看出，随着 CMCS-NC 中肉桂酸基团取代度由 2 增大到 11 时，凝胶产率显著增加；而保持肉桂酸基团取代度不变，CMCS-NC-11 浓度由 5% 增大到 7% 时，凝胶产率变化不大。

图 4-7 给出了光交联凝胶在去离子水中达到平衡溶胀时的情况。由图可见，随着光照时间延长、CMCS-NC 中肉桂酸基团取代度增大以及 CMCS-NC-11 浓度增加，所得水凝胶的溶胀度下降，这可能是由凝胶的交联密度增加引起的。图 4-8 为凝胶的扫描电镜图，从图中可以看出，在相同浓度下(5%)，肉桂酸基团取代度高的 CMCS-NC-11 凝胶的孔径明显减小；而保持肉桂酸基团取代度不变，CMCS-NC-11 浓度由 5% 增大到 7% 时，凝胶的网络结构也变得更加致密。

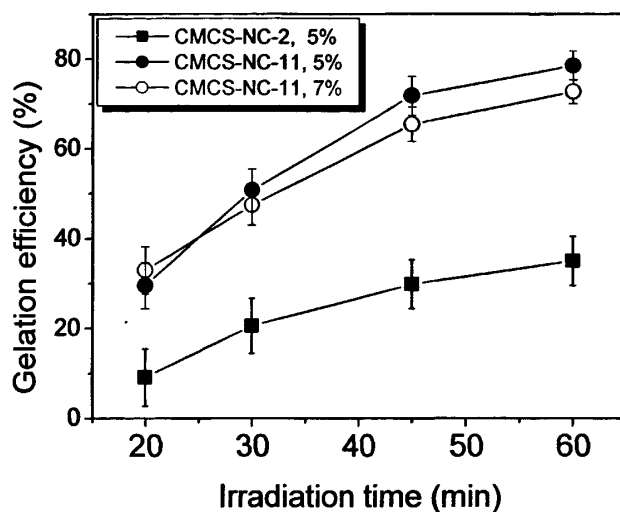


Figure 4-6 The gelation efficiency as a function of irradiation time, concentration and DS of cinnamate for aqueous solutions of CMCS-NC samples upon exposure to 365 nm irradiation in the absence of photoinitiator

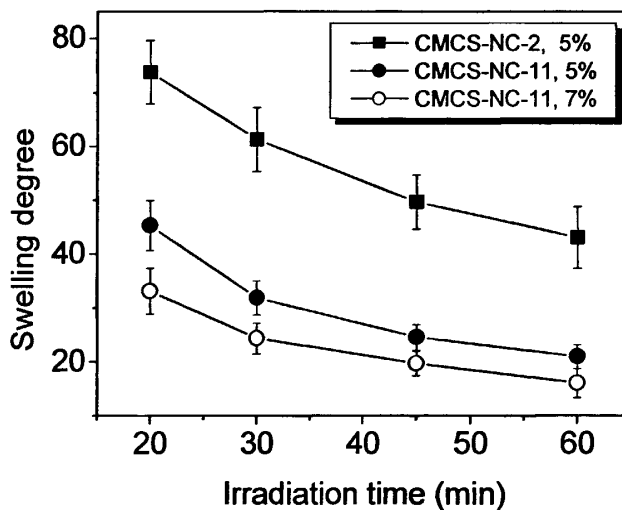


Figure 4-7 The swelling degree as a function of irradiation time, concentration and DS of cinnamate for the hydrogels formed from aqueous solutions of CMCS-NC samples upon exposure to 365 nm irradiation in the absence of photoinitiator

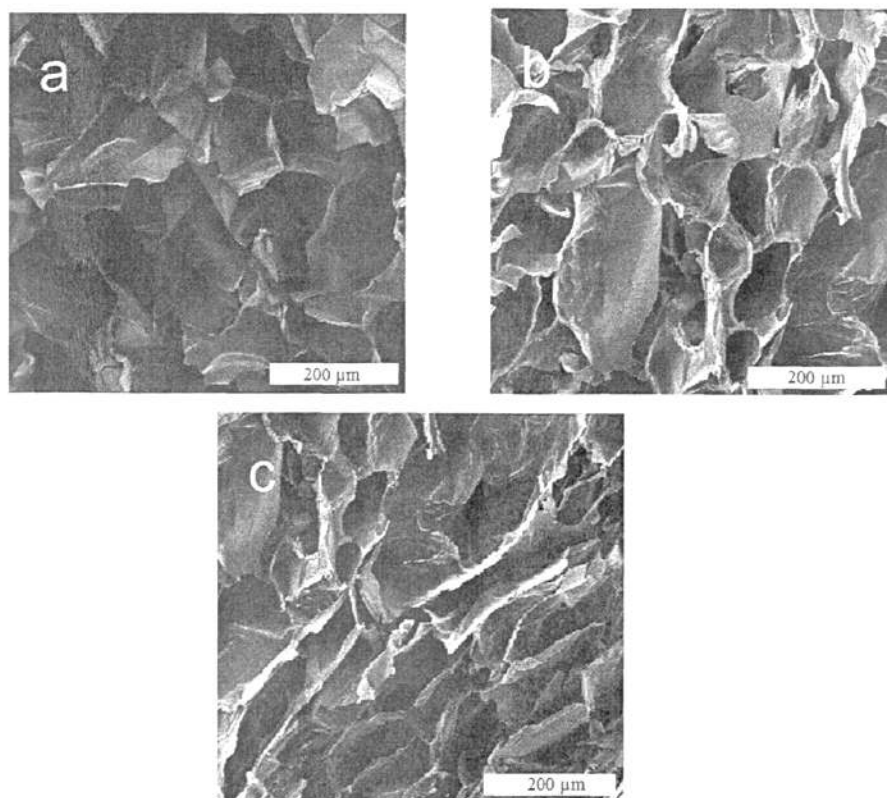


Figure 4-8 SEM images of three CMCS-NC hydrogels obtained upon 45 min UV irradiation for CMCS-NC-2, 5% (a), CMCS-NC-11, 5% (b), and CMCS-NC-11, 7% (c)

4.3.4 光交联凝胶的流变性能

将 CMCS-NC 水溶液在 365 nm 紫外灯下光照 45 min，通过流变仪对所得水凝胶的力学强度进行表征。图 4-9 为 CMCS-NC-11 水溶液与其光交联水凝胶的动态频率扫描曲线及其数码照片图。对于 CMCS-NC 水溶液，其粘性模量大于弹性模量，表现溶液性质。而光交联水凝胶在线性粘弹区间内(固定应变为 0.5%)，如图 4-10 所示，随着 CMCS-NC 中肉桂酸基团取代度增大，水凝胶的弹性模量明显增加；而当 CMCS-NC-11 浓度由 5% 增加到 7% 时，所得水凝胶的弹性模量略有增加；且三种水凝胶均没有明显的频率依赖性，呈现出凝胶行为。

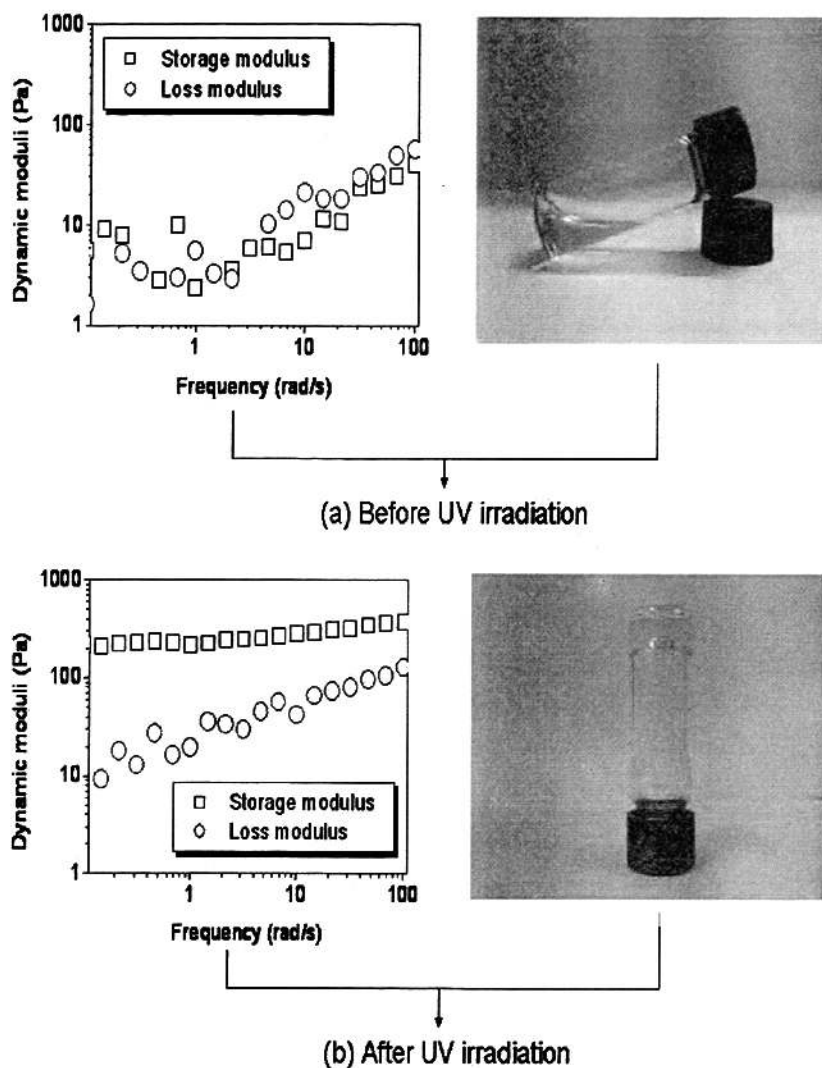


Figure 4-9 Dynamic storage and loss moduli of 5.0% aqueous CMCS-NC-11 solution before and after UV irradiation (365 nm, 45 min, room temperature) in the absence of photoinitiator and corresponding optical photos for their sol and gel states

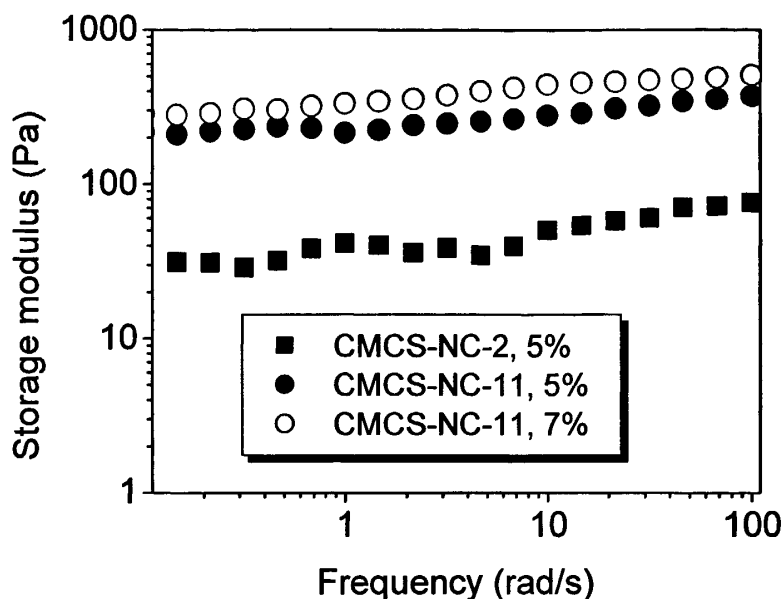


Figure 4-10 Storage modulus as a function of frequency for three CMCS-NC hydrogels

4.3.5 光交联凝胶的生物降解性

Tomihata 等人^[28]报道壳聚糖能被溶菌酶降解,且随着壳聚糖脱乙酰度的降低以及壳聚糖衍生物水溶性的增加,壳聚糖的降解速率增加。在本实验中,我们考察了不同交联密度的光交联羧甲基壳聚糖水凝胶在溶菌酶溶液中的降解情况,如图 4-11 所示,随着 CMCS-NC 中肉桂酸基团取代度增大,以及 CMCS-NC-11 浓度增加,所得水凝胶的交联密度增加,溶菌酶越难进入到凝胶内部,导致降解速率下降。从图中我们可以看出,光交联羧甲基壳聚糖水凝胶的降解速率较慢,在溶菌酶溶液中降解 60 天,质量损失率仅 30%~50%,且比 Amsden 等人^[29]报道的乙二醇壳聚糖在溶菌酶溶液中的降解速率略大。

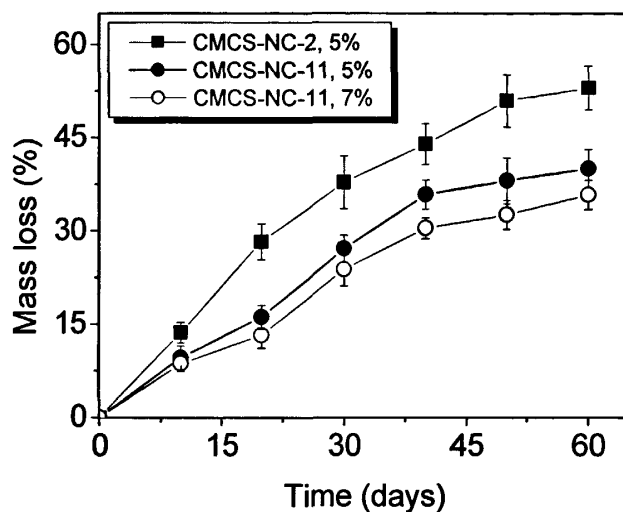


Figure 4-11 In vitro biodegradation of three CMCS-NC hydrogels in 4 mg/mL lysozyme solution of pH 7.4 at 37°C

4.3.6 光交联凝胶的药物释放研究

阿霉素(DOX)是一种治疗恶性肿瘤的有效药物,但具有抑制骨髓造血功能、心脏毒性等副作用^[30]。将阿霉素通过共价键连接到聚合物上^[31],或者包埋到聚合物胶束^[32]、凝胶^[33,34]等载体中,通过对药物的控制释放,可降低阿霉素对人体的毒副作用。在本工作中,我们将阿霉素溶液与CMCS-NC溶液混合,在紫外光照下,阿霉素原位包埋到CMCS-NC凝胶中。图4-12给出了包埋阿霉素光交联水凝胶在37°C下的体外控制释放行为。从图中可以看出,在药物释放初期(0~1.5 h),突释现象明显,四个载药水凝胶的药物释放率均在20%左右。在这个阶段,一方面,凝胶表面的DOX较快的扩散到释放介质中;另一方面,一部分DOX随未反应的CMCS-NC从凝胶中溶出到释放介质中。当释放时间超过1.5 h后,药物释放进入缓释阶段,且随着CMCS-NC中肉桂酸基团取代度增大,以及CMCS-NC-11浓度增加,凝胶内部变得越来越致密,孔径越来越小(见图4-8),阿霉素越不容易扩散到凝胶外部,导致水凝胶的释药速率与最终累积释药量均减小;当在浓度为5%的CMCS-NC-11光交联凝胶的释放介质中加入4 mg/mL的溶菌酶时,由于溶菌酶对凝胶骨架的降解作用,该水凝胶的释药速率与最终累积释药量均明显增加。为了研究阿霉素的释放机理,通过Peppas方程^[35]对药物释放

曲线进行线性拟合, 计算得到的扩散指数 n 见表 4-2。三种载药水凝胶在 PBS 缓冲溶液中释放时, 其 n 值均在 0.5 左右, 阿霉素的释放机制属于 Fickian 扩散, 药物分子的释放是通过分子扩散实现的; 当在浓度为 5% 的 CMCS-NC-11 载药凝胶的释放介质中加入 4 mg/mL 的溶菌酶时, 由于溶菌酶对凝胶骨架的降解作用, 使 n 值增大至 0.72, 此时药物分子的释放主要受凝胶骨架松弛机制控制。

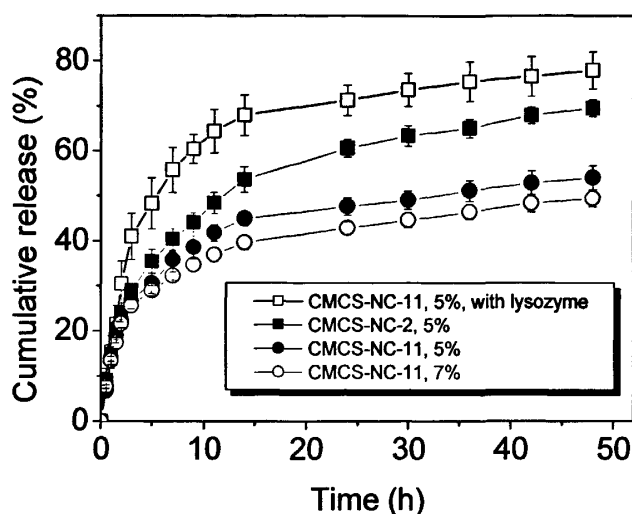


Figure 4-12 In-vitro release profiles of DOX from the photocrosslinked CMCS-NC hydrogels in a pH 7.4 phosphate-buffered saline at 37 °C

Table 4-2 Release characteristics of DOX from the the CMCS-NC hydrogels (pH 7.4, 37 °C)

samples	concentration	lysozyme	n	R
CMCS-NC-11	5%	4 mg/mL	0.72	0.985
CMCS-NC-2	5%	—	0.53	0.987
CMCS-NC-11	5%	—	0.45	0.986
CMCS-NC-11	7%	—	0.44	0.989

4.4 结论

(1) 通过三步反应合成了以 4-硝基肉桂酸为侧基的水溶性壳聚糖衍生物 (CMCS-NC), FT-IR 和 $^1\text{H-NMR}$ 证实硝基肉桂酸连接到羧甲基壳聚糖大分子链

上。利用 CMCS-NC 中肉桂酸酯基在 365 nm 紫外光照下的光二聚反应, 制备了光交联型羧甲基壳聚糖水凝胶。

(2) 研究了紫外光照时间和 CMCS-NC 中肉桂酸酯基取代度对所得水凝胶溶胀性能、力学性能及生物降解性的影响, 结果显示随光照时间延长和 CMCS-NC 中肉桂酸酯基取代度增大, 所得水凝胶的平衡溶胀度和生物降解速率减小, 而力学强度增加。

(3) 以抗肿瘤药物盐酸阿霉素为模型药物, 在无外加光引发剂的条件下, 研究了该类水凝胶对盐酸阿霉素的原位包埋与体外药物释放行为, 结果发现药物释放速率随肉桂酸酯基取代度增大而下降; 当在释放介质中加入 4 mg/mL 溶菌酶时, 由于溶菌酶对凝胶骨架的降解作用, 水凝胶的释药速率以及最终累积释药量均明显增加。

参考文献

- [1] Liu Y, Chan-Park MB. Hydrogel based on interpenetrating polymer networks of dextran and gelatin for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 2009, 30: 196-207
- [2] Kopeček J. Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials*, 2007, 28: 5185-5192
- [3] Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54: 13-36
- [4] Zhang LM, Yang C, Yan L. Perspectives on: Strategies to fabricate starch-based hydrogels with potential biomedical applications. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2005, 20: 297-314
- [5] Liang YY, Zhang LM, Jiang W, Li W. Embedding magnetic nanoparticles into polysaccharide-based hydrogels for magnetically assisted bioseparation. *ChemPhysChem*, 2007, 8: 2367-2372
- [6] Zhao SP, Ma D, Zhang LM. New semi-interpenetrating network hydrogels: Synthesis, characterization and properties. *Macromolecular Bioscience*, 2006, 6: 445-451
- [7] Zhang LM, Wang GH, Lu HW, Yang C, Yan L. A new class of starch-based hydrogels incorporating acrylamide and vinyl pyrrolidone: Effects of reaction variables on water sorption behavior. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2005, 20: 491-501
- [8] Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2002, 23: 4307-4314
- [9] Cho YI, Park S, Jeong SY, Yoo HS. In vivo and in vitro anti-cancer activity of

- thermo-sensitive and photo-crosslinkable doxorubicin hydrogels composed of chitosan-doxorubicin conjugates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 73: 59-65
- [10] Han J, Wang KM, Yang DZ, Nie J. Photopolymerization of methacrylated chitosan/PNIPAAm hybrid dual-sensitive hydrogels as carrier for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, 44: 229-235
- [11] Fedorovich NE, Oudshoorn MH, van Geemen D, Hennink WE, Alblas J, Dhert WJA. The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels. *Biomaterials*, 2009, 30: 344-353
- [12] Yoon JJ, Chung HJ, Park TG. Photo-crosslinkable and biodegradable Pluronic/heparin hydrogels for local and sustained delivery of angiogenic growth factor. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, 83: 597-605
- [13] Chun KW, Lee JB, Kim SH, Park TG. Controlled release of plasmid DNA from photo-cross-linked pluronic hydrogels. *Biomaterials*, 2005, 26: 3319-3326
- [14] Li JM, Zhang LM. Characteristics of novel starch-based hydrogels prepared by UV photopolymerization of acryloylated starch and a zwitterionic monomer. *Starch*, 2007, 59: 418-422
- [15] Kim SH, Won CY, Chu CC. Synthesis and characterization of dextran-maleic acid based hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, 46: 160-170
- [16] Li Q, Williams CG, Sun DDN, Wang J, Leong K, Elisseeff JH. Photocrosslinkable polysaccharides based on chondroitin sulfate. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 2004, 68: 28-33
- [17] Smeds KA, Pfister-Serres A, Miki D, Dastgheib K, Inoue M, Hatchell DL, Grinstaff MW. Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, 54: 115-121
- [18] Lewis FD, Quillen SL, Hale PD, Oxman JD. Lewis acid catalysis of photochemical reactions. 7. Photodimerization and cross-cycloaddition of cinnamic esters. *Journal of the American Chemical Society*, 1988, 110: 1261-1267
- [19] Reiser A. *Photoreactive Polymers*, Wiley, New York, 1989
- [20] Gatts-Asfura KM, Weisman E, Andreopoulos FM, Micic M, Muller B, Sirpal S, Pham SM, Leblanc RM. Nitrocinnamate-functionalized gelatin: synthesis and "smart" hydrogel formation via photo-cross-linking. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 1503-1509
- [21] Miyamoto K, Sasaki M, Minamisawa Y, Kurahashi Y, Kano H, Ishikawa S. Evaluation of *in vivo* biocompatibility and biodegradation of photocrosslinked hyaluronate hydrogels

- (HADgels). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004, 70: 550-559
- [22] Chen XG, Park HJ. Chemical characteristics of *O*-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 53: 355-359
- [23] Peng XH, Zhang LN. Formation and morphologies of novel self-assembled micelles from chitosan derivatives. *Langmuir*, 2007, 23: 10493-10498
- [24] Riccardo AAM, Fabio T, Monica E, Sabina M. N-(carboxymethylidene) chitosans and N-(carboxymethyl) chitosans: novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate. *Carbohydrate Research*, 1982, 107: 199-214
- [25] Stepnova EA, Tikhonov VE, Babushkina TA, Klimova TP, Vorontsov EV, Babak VG, Lopatin SA, Yamskov IA. New approach to the quaternization of chitosan and its amphiphilic derivatives. *European Polymer Journal*, 2007, 43: 2414-2421
- [26] Lee S, Kim SI, Lee B, Choi W, Chae B, Kim SB, Ree M. Photoreactions and photoinduced molecular orientations of films of a photoreactive polyimide and their alignment of liquid crystals. *Macromolecules*, 2003, 36: 6527-6536
- [27] Yuan XF, Fischer K, Schaertl W. Photocleavable Microcapsules Built from Photoreactive Nanospheres. *Langmuir*, 2005, 21: 9374-9380
- [28] Tomihata K, Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*, 1997, 16: 567-575
- [29] Amsden BG, Sukarto A, Knight DK, Shapka Sn. Methacrylated glycol chitosan as a photopolymerizable biomaterial. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 3758-3766
- [30] De Beer EL, Bottone AE, Voest EE. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. *European Journal of Pharmacology*, 2001, 415: 1-11
- [31] Yoo HS, Lee EA, Park TG. Doxorubicin-conjugated biodegradable polymeric micelles having acid-cleavable linkages. *Journal of Controlled Release*, 2002, 82: 17-27
- [32] Nakanishi T, Fukushima S, Okamoto K, et al. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, 2001, 74: 295-302
- [33] Fan HY, Dash AK. Effect of cross-linking on the in vitro release kinetics of doxorubicin from gelatin implants. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 213: 103-116
- [34] Kang GD, Cheon SH, Song SC. Controlled release of doxorubicin from thermosensitive poly(organophosphazene) hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 319: 29-36
- [35] Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 1987, 5: 37-42

第5章 光交联型支链淀粉基水凝胶的研究

5.1 前言

随着生物技术的发展,蛋白类生物大分子药物不断涌现。但这些药物在胃肠道内稳定性差,易被水解酶降解并失活,口服利用度低。目前,这些药物大多以注射用溶液或冻干粉针剂应用于临床,但其生物半衰期较短,需频繁给药,患者的顺应性较差,治疗费用较高^[1-3]。因此,如何保持蛋白类药物的生物活性并延长其半衰期,成为蛋白类药物研究领域的一项重要研究课题。

将蛋白类大分子药物包埋于聚合物凝胶中,使其在通过胃肠道时免受酶以及pH的影响,并能够达到缓释的效果,可一定程度地保持其生物活性并延长其半衰期^[4]。光聚合由于具有反应速率快、反应条件温和、反应放热低等优点,可最大程度的保持生物分子的活性,适合于制备原位包埋生物活性分子的水凝胶^[5]。

用于蛋白类生物大分子药物控释载体的光交联型水凝胶,依据其主要原料来源可分为合成高分子类光交联水凝胶和天然高分子类光交联水凝胶。在光交联水凝胶的制备过程中,通常利用的光活性基团为大分子单体末端丙烯酸酯中的双键。常用的化学合成前驱体有聚乙二醇(甲基)丙烯酸酯衍生物、聚乙二醇聚丙交酯嵌段共聚物(甲基)丙烯酸酯衍生物等。Dadsetan 等^[6]以聚乙二醇双丙烯酸酯为大单体,在光引发剂的存在下,通过光交联原位包埋软骨细胞。考察了聚乙二醇光交联凝胶的交联密度对包埋软骨细胞的贴附、生长情况的影响。实验发现,随凝胶交联密度增大,细胞越容易粘附于凝胶;将载有细胞的凝胶体外培养3周后,观察到有软骨细胞外基质生成。Liu^[7]等也报道了相似的光交联聚乙二醇凝胶用于原位包埋溶菌酶。但是这类化学合成前驱体不具备良好的生物降解性,其应用受到一定的限制。

与合成高分子类水凝胶相比,天然高分子类光交联水凝胶具有无毒易降解等优点,作为蛋白类生物大分子药物载体更具发展潜力。Leach^[8]等将透明质酸与甲基丙烯酸缩水甘油酯反应引入双键,再与牛血清蛋白溶液混合,在光引发剂Irgacure 2959的作用下发生光交联反应,原位包埋牛血清蛋白。Jeon 等^[9]以Irgacure 2959为光引发剂,将甲基丙烯酸酯海藻酸盐与牛软骨细胞混合,在365 nm的紫外光照下聚合,原位包埋牛软骨细胞。通过对活/死细胞的染色和MTT实验发现,原位包埋于光交联海藻酸盐凝胶中的牛软骨细胞具有一定生物活性。但是,有关合成时均使用了有一定细胞毒性的光引发剂,且在光聚合过程中,光

引发剂可能诱导蛋白类生物大分子发生自由基聚合而导致蛋白类生物大分子失去活性^[7,10]。因此,如何在不加光引发剂条件下利用光交联技术制备适用的天然高分子类水凝胶,便成为生物医学工程材料领域的一项重要课题。

在本实验中,我们以具有良好生物降解和生物相容性的支链淀粉为基本原料,合成了侧链含 4-硝基肉桂酸的支链淀粉衍生物(Amy-NC),在无外加光引发剂的条件下制备光交联型支链淀粉基水凝胶。研究了 Amy-NC 溶液浓度和紫外光照时间对所得水凝胶溶胀性能、力学性能以及体外生物降解性的影响;并以溶菌酶为蛋白类生物大分子模型药物,在无外加光引发剂的条件下,研究了该类光交联水凝胶对溶菌酶的原位包埋与控制释放,探讨了经原位光包埋后溶菌酶的二级构象及生物活性。

5.2 实验部分

5.2.1 原料与试剂

支链淀粉,东京化成工业株式会社;4-硝基肉桂酸,上海晶纯试剂有限公司;*N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、微球菌、溶菌酶(分子量为 14300,酶活力 ≥ 20000 U/mg),美国 Sigma 公司; α -淀粉酶,酶活力 >50 U/mg, Fluka 公司;二甲基亚砜(DMSO),分析纯,广州化学试剂厂,用 4 Å 分子筛浸泡一周后使用;其它试剂均为市售分析纯,直接使用。

5.2.2 支链淀粉-对硝基肉桂酸接枝物的合成

在 90 °C 下,将 2.50 g 支链淀粉溶于 50 mL 干燥 DMSO,然后降温至 40 °C,加入 DCC (0.62 g, 3 mmol)和 DMAP (0.18 g, 1.50 mmol),搅拌溶解后,将 4-硝基肉桂酸 (0.58 g, 3 mmol) 溶于 25 mL DMSO,滴加到上述支链淀粉溶液中,混合溶液在 40 °C 避光反应 24 h。反应完毕后,过滤除去沉淀物,将滤液逐滴滴加到 6 倍体积的乙醇中,过滤得到的沉淀用乙醇反复洗涤至用紫外可见分光光谱仪检测不到肉桂酸的吸收峰,然后 40 °C 真空干燥 48 h,产率 65%。用紫外光谱法测得该支链淀粉-对硝基肉桂酸接枝物中,每 100 个糖环上含有对硝基肉桂酸酯基数目为 1.6。

5.2.3 光交联凝胶的制备

取等量 Amy-NC 的磷酸盐缓冲溶液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)于聚四氟乙烯模具中, 置于 365 nm 的紫外灯下光照不同时间。光照后形成的凝胶在去离子水中浸泡 24 h, 以除去未交联的 Amy-NC, 再室温干燥 48 h 后称重, 得到的干凝胶再置于 PBS 缓冲溶液中浸泡 24 h 以达到溶胀平衡。Amy-NC 凝胶的平衡溶胀度用 Swelling degree 表示, 计算公式为:

$$\text{Swelling degree} = (W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}}) / W_{\text{dry}} \quad (5-1)$$

其中, W_{dry} 为用去离子水浸泡除去未交联的 Amy-NC 后干凝胶的重量, W_{wet} 为在缓冲溶液中浸泡达到溶胀平衡后凝胶的重量。

5.2.4 结构表征

采用美国 Nicolet 公司产 Nexus 670 型傅立叶变换红外光谱仪测定试样的红外光谱图(KBr 压片); 采用美国 Varian 公司产 Mercury-Plus 300 MHz 核磁共振仪测定试样的 $^1\text{H-NMR}$; 采用北京普析 TU-1901 紫外-可见分光光度计测定试样的紫外-可见光谱, 用于紫外光照的紫外灯为 ZF-6 型三用台式紫外分析仪, 波长为 365 nm, 光强为 0.6 mW/cm^2 。采用日本 Hitachi 公司 S4800 扫描电子显微镜观察凝胶表面形态, 用于观察的凝胶样品冷冻干燥后用液氮脆断, 真空镀金, 观察其断面形态; 样品的流变测试采用 TA ARES/RFS 高级扩展流变系统, 采用 25 mm 平行板夹具, 实验温度固定在 25°C 。为保证样品的动态测试在线性范围内, 首先对凝胶样品进行动态应变扫描, 固定频率为 1.0 Hz, 扫描范围 0.05%~350%; 样品的动态频率扫描, 在线性范围内固定应变为 1%, 扫描范围 0.1~100 Hz。

5.2.5 微结构分析

Shih 等人^[11]于 1990 年建立了标度理论, 该理论认为胶体凝胶是由具有弹性特征的形状不规则絮团所形成的。凝胶形成的驱动力分为絮团内部或絮团之间两种作用力。根据这两种作用的贡献程度不同, 可将凝胶的链接类型可分为强链接和弱链接两种。当絮团之间的作用是形成凝胶的主要驱动力时, 体系属于强链接型凝胶; 当絮团内部的作用为主要驱动力时, 体系则属于弱链接型凝胶。强链接类型的凝胶在远离凝胶点时的弹性模量(G')和线性极限应变值(γ_0)与粒子体积分数(ϕ)存在以下关系:

$$G' \sim \phi^{(d+x)/(d-Df)} \quad (5-2)$$

$$\gamma_0 \sim \varphi^{-(1+x)/(d-D_f)} \quad (5-3)$$

其中, d 是欧氏几何维数(三维体系中 $d=3$); D_f 是絮团的分形维数; x 是絮团的骨架分形维数, x 的取值范围是 1.0 到 1.3 之间。弱链接类型的凝胶则满足以下关系:

$$G' \sim \varphi^{(d-2)/(d-D_f)} \quad (5-4)$$

$$\gamma_0 \sim \varphi^{1/(d-D_f)} \quad (5-5)$$

判断凝胶类型的标准如下: 当体系的 γ_0 随着物质浓度的增加而增加时则认为此凝胶属于弱链接类型; 而 γ_0 随着物质浓度的增加而降低时则属于强链接类型。

然而, Shih 模型只考虑了两种极端的情况, 在两种作用同时存在时并不能给出很好的解释。于是在此基础上, Wu 和 Morbidelli^[12]于 2001 年将该理论进一步发展, 他们用微观弹性常数($\alpha \in [0,1]$)分析体系分子间和分子内链接的弹性贡献。该理论指出了这两种贡献的相对重要性并对凝胶体系具有普适性。完全强链接体系(分子间作用力为主导)的微观弹性常数等于 0; 而完全弱链接体系(分子内作用力为主导)的微观弹性常数等于 1; 若处于过渡态, 该数值在 0 和 1 之间。Wu 和 Morbidelli 模型的数学表达式如下:

$$G' \sim \varphi^{\beta/(d-D_f)} \quad (5-6)$$

$$\gamma_0 \sim \varphi^{(d-\beta-1)/(d-D_f)} \quad (5-7)$$

$$\beta = (d-2) + (2+x)(1-\alpha) \quad (5-8)$$

其中, d 为欧氏几何维数(三维体系中 $d=3$); D_f 是分形维数; 指数 β 与 α 和 x 相关; α 是微观弹性常数($0 \leq \alpha \leq 1$); x 是絮状物骨架的分形维数($1 \leq x \leq D_f$)。 D_f 和 β 可以通过 G' 和 γ_0 对 φ 作图后算出。利用参数 β 和对骨架分形维数的假设($x \in [1,1.3]$)可以算出对应 α 的数值, 用以分析凝胶体系的弹性贡献模式。

5.2.6 光交联凝胶的生物降解性

将 Amy-NC 的 PBS 溶液在 365 nm 的紫外灯下光照, 得到的凝胶在去离子水中浸泡 24 h, 以除去未交联的 Amy-NC, 再室温干燥 48 h 后称重。将干凝胶置于 5 mL 2 μ g/mL α -淀粉酶 PBS 溶液中(pH 7.4), 在 37 $^{\circ}$ C 的恒温水槽中进行降解。隔一定时间取出凝胶, 用去离子水冲洗凝胶, 室温干燥 48 h 后称重, 再将凝胶置于新鲜的 α -淀粉酶 PBS 溶液中进行降解。比较凝胶样品降解前后的重量变化, 重量损失率(Weight loss)用下式计算:

$$\text{Weight loss (\%)} = (W_0 - W_t) \times 100 / W_0 \quad (5-9)$$

其中, W_0 是凝胶样品的初始质量, W_t 是 t 时刻干燥凝胶样品的质量。

5.2.7 溶菌酶的原位光包埋与控制释放研究

将一定浓度Amy-NC的PBS溶液与溶菌酶的PBS溶液混合均匀,使体系中溶菌酶的浓度为2 mg/mL,混合溶液在365 nm的紫外灯下光照形成凝胶。向载有溶菌酶的光交联水凝胶中加入20 mL PBS缓冲溶液,在37 °C的恒温振荡水槽中进行药物释放,每隔一定时间取出4 mL释放液,同时补充相同体积的新鲜缓冲溶液,以维持释放体系的体积不变。通过考马斯亮蓝法^[13]测定释放液中溶菌酶的含量,测定结果以累积释放率表示。

(1) 溶菌酶标准曲线的绘制

- 1) 蛋白试剂考马斯亮蓝G-250的配制: 将100 mg考马斯亮蓝G-250溶于50 mL 95%的乙醇中,加入100 mL 85% (w/v)的磷酸,再用蒸馏水定容至1000 mL。
- 2) 准确配制一系列浓度的溶菌酶 PBS 溶液: 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ 。
- 3) 向 10 mL 带塞试管中加入 5 mL 的考马斯亮蓝溶液和 1 mL 的溶菌酶溶液,将试管中溶液纵向倒转混合均匀,静置 5 min 后用紫外-可见分光光谱仪测定 595 nm 处的吸光度,同一样品平行做三次取平均值,以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,拟合公式为 $A = 6.4811 \times C + 0.04748$ (A 为吸光度, C 为溶菌酶的浓度, $R=0.9989$)。

(2) 圆二色谱法

采用圆二色谱法(J-810圆二色光谱仪,日本 JASCO公司)测定溶菌酶二级结构的变化。室温条件下记录260~200 nm范围内的扫描信号,扫描速率50 nm/min,光谱带宽1 nm,5次循环取平均值。PBS缓冲溶液按照同样条件扫描,作为背景曲线。

(3) 溶菌酶结构的荧光分析

溶菌酶的荧光发射光谱采用 Shimadzu RF-5301 荧光分光光度计测定,激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$,扫描波长范围 $\lambda = 300 \sim 450 \text{ nm}$,激发光和发射光的检测狭缝均设定为 5.0 nm,温度由控温系统控制在 25 °C。

(4) 溶菌酶活性测定

以微球菌为底物,用磷酸盐缓冲溶液(pH 6.24, 0.1 mol/L)配置微球菌溶液,使其在 450 nm 波长处的吸光度值在 1.3 左右。然后取 2.5 mL 微球菌溶液,加入到 1 cm 的石英比色皿中,调温至 25 °C,再加入 0.5 mL 浓度适宜的溶菌酶释放

液,将这两种溶液快速混合均匀,用 UV-vis 分光光度计测定反应液在 450 nm 下吸光度值随时间的变化。以吸光度对时间作图,直线部分的斜率代表溶菌酶的活性^[14]。以新配制的已知浓度的溶菌酶 PBS 溶液为标准,记为 100%生物活性,释放液中溶菌酶的活性用相对活性来表示,相对活性为释放液的酶活性与新配制溶菌酶活性的比值。释放液中溶菌酶的浓度由考马斯亮蓝法测定。

5.3 结果与讨论

5.3.1 支链淀粉-对硝基肉桂酸接枝物的合成与表征

支链淀粉-对硝基肉桂酸接枝物(Amy-NC)的合成路线如图 5-1 所示,以 DMSO 为溶剂,利用 DCC/DMAP 活化对硝基肉桂酸中的羧基,将肉桂酸基团引入到支链淀粉大分子链上。通过紫外光谱法测得所得 Amy-NC 中,每 100 个糖环上含有对硝基肉桂酸酯基数目为 1.6。

图5-2为支链淀粉和Amy-NC的IR谱图。Amy-NC谱图上不仅出现了酯基的特征吸收峰(1710 cm^{-1}),而且出现了肉桂酸基团中苯环的特征吸收峰(1520 cm^{-1}),表明对硝基肉桂酸接枝到支链淀粉大分子链上。Amy-NC的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图中出现了肉桂酸酯基的质子峰(如图5-3),其中 $\delta 6.68$ 和 7.96 为双键上的质子峰, $\delta 7.73$ 和 8.18 为苯环上的质子峰, $^1\text{H-NMR}$ 分析进一步证实了Amy-NC的化学结构。

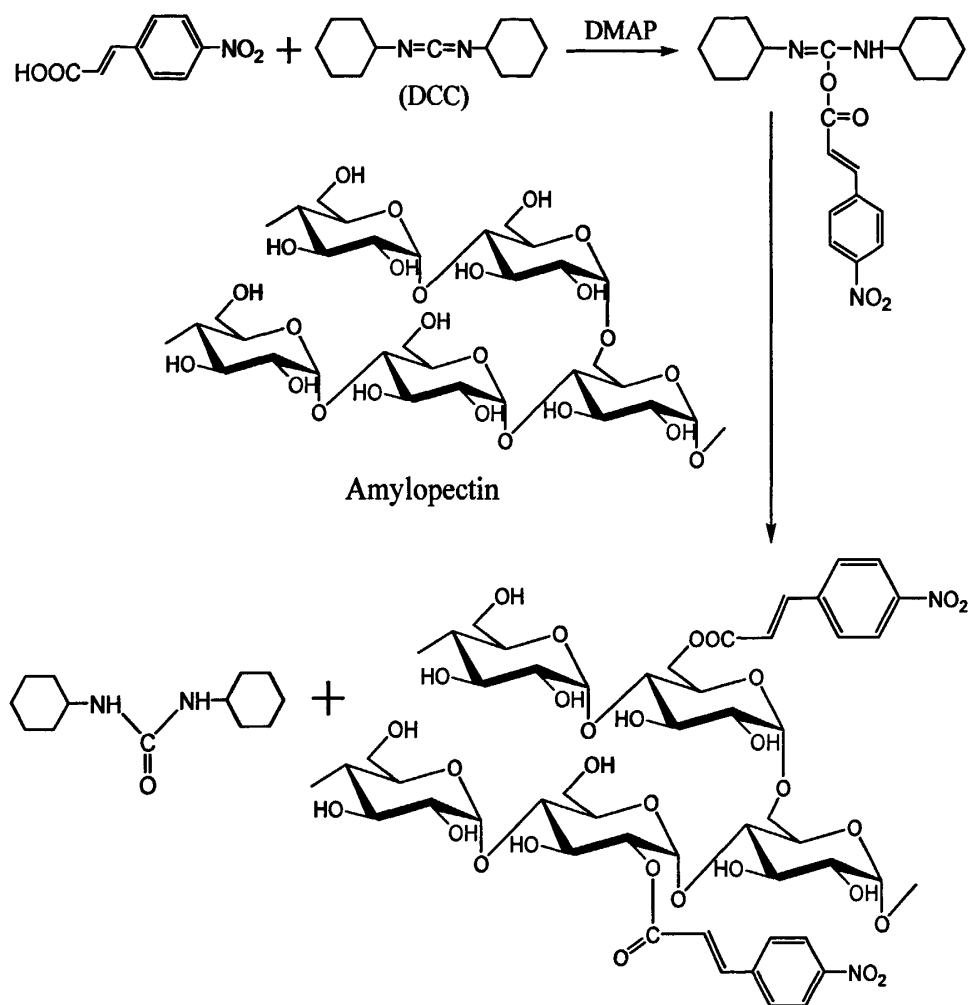


Figure 5-1 Synthetic scheme of water-soluble amylopectin derivative (Amy-NC) containing nitrocinnamate moiety

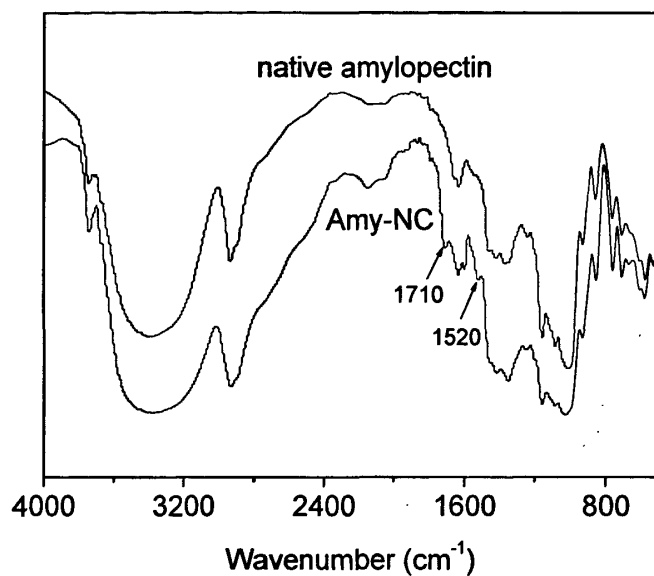


Figure 5-2 FT-IR spectra of native amylopectin and its conjugate samples (KBr pellets)

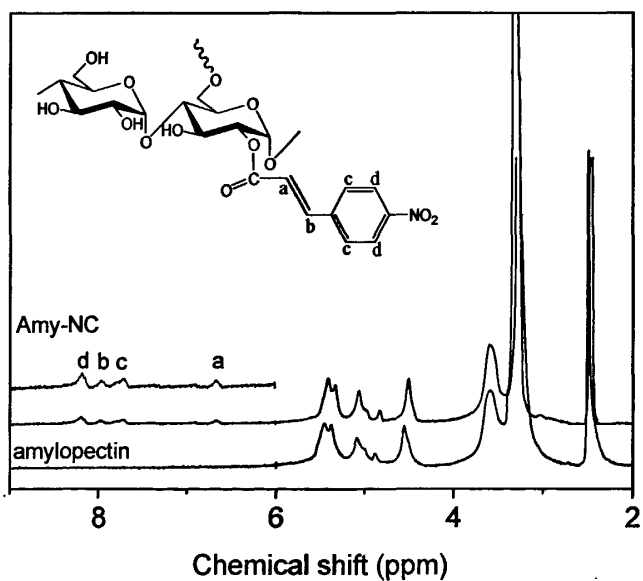


Figure 5-3 ^1H -NMR of native amylopectin and its conjugate (DMSO- d_6 , 25 °C)

5.3.2 光交联凝胶的制备与表征

基于侧基含4-硝基肉桂酸支链淀粉衍生物的合成, 在无外加光引发剂的条件下制备光交联型支链淀粉基水凝胶。通过紫外-可见光谱研究了Amy-NC中硝基肉桂酸酯基的光二聚反应过程, 如图5-4所示。由图可见, 在紫外光照前, Amy-NC中肉桂酸酯基在310 nm处出现最大吸收值; 当用365 nm的紫外光照CMCS-NC溶液时, 随着光二聚反应的发生, 肉桂酸酯基的吸光度下降且最大吸收峰位置发生蓝移。光照1800 s时, 其吸光度值下降了近36%, 最大吸收峰从310 nm蓝移至296 nm。

Amy-NC中肉桂酸酯基在最大吸收波长处的吸光度变化(A_{310})可反映其交联的程度^[15], 其交联度的计算公式如下:

$$D(\%) = [(A_{310})_0 - (A_{310})_t] \times 100 / (A_{310})_0 \quad (5-10)$$

其中, D 表示肉桂酸酯基的交联度, $(A_{310})_0$ 和 $(A_{310})_t$ 分别表示光照前后肉桂酸酯基在310 nm处的吸光度。图5-5显示了Amy-NC PBS溶液在310 nm处的吸光度及交联度随光照时间的变化, 由图可见, 光照时间超过600 s后, Amy-NC PBS溶液在310 nm处的吸光度变化不大, 表明肉桂酸酯基的光二聚速度变慢; 且光照1800 s后的交联度为38%, 这说明肉桂酸酯基的光二聚反应程度较低, 原因可能是有一部分肉桂酸酯基发生顺反异构化而未参与光二聚反应^[16]。

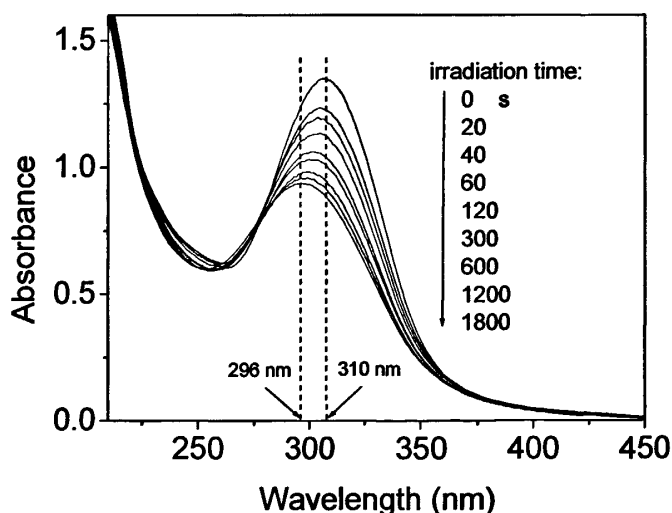


Figure 5-4 UV-vis absorbance of Amy-NC PBS solution with a concentration of 1 mg/mL during UV irradiation at $\lambda = 365$ nm (irradiation time, 0-1800 s)

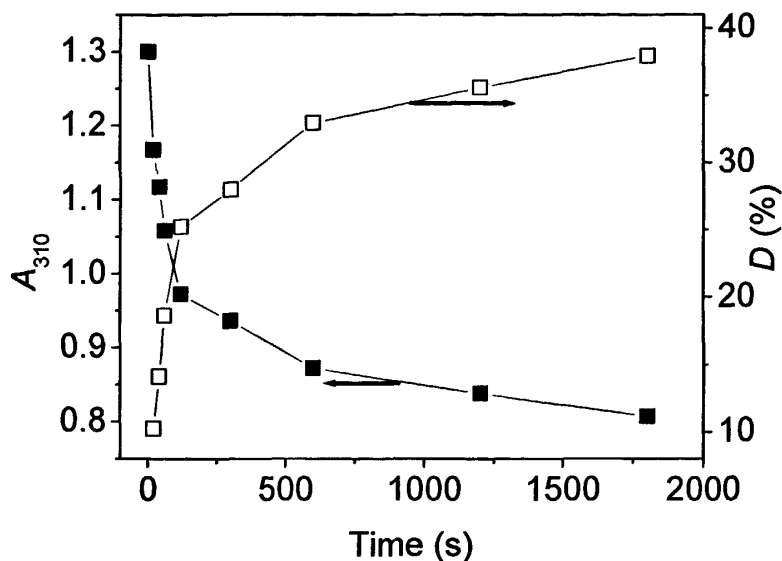


Figure 5-5 Plots of the absorbance (A_{310}) at 310 nm and cross-linking degree ($D\%$) of Amy-NC against the irradiation time during photodimerization

5.3.3 光交联凝胶的溶胀性能

图 5-6 和图 5-7 分别给出了随光照时间及 Amy-NC 溶液浓度变化, 光交联水凝胶在 PBS 溶液中达到平衡溶胀时的情况。由图可见, 随着光照时间延长, 以及 Amy-NC 溶液浓度增大, 所得凝胶的平衡溶胀度下降, 这可能是由水凝胶的交联密度增加引起的。图 5-8 为凝胶的扫描电镜图, 由图可见, 随着光照时间延长(图 a, b, c), 以及 Amy-NC 溶液浓度的增大(图 d, a, e), Amy-NC 凝胶的孔洞明显变小, 凝胶具有更致密的网络结构。

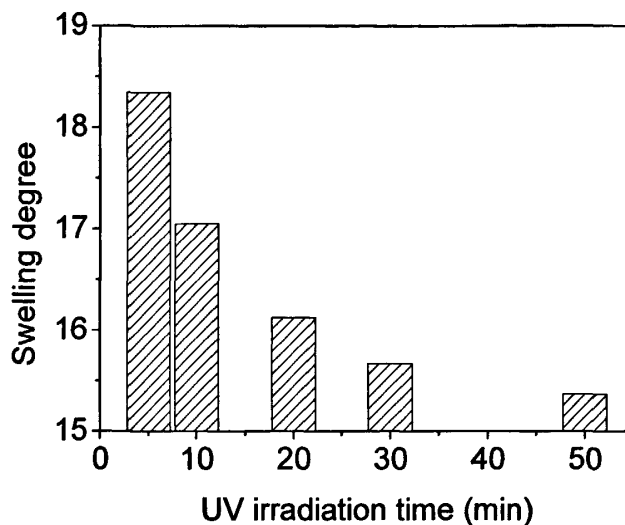


Figure 5-6 The swelling degree as a function of irradiation time for the hydrogels formed from 10% w/v PBS solutions of Amy-NC samples upon exposure to 365 nm irradiation in the absence of photoinitiator

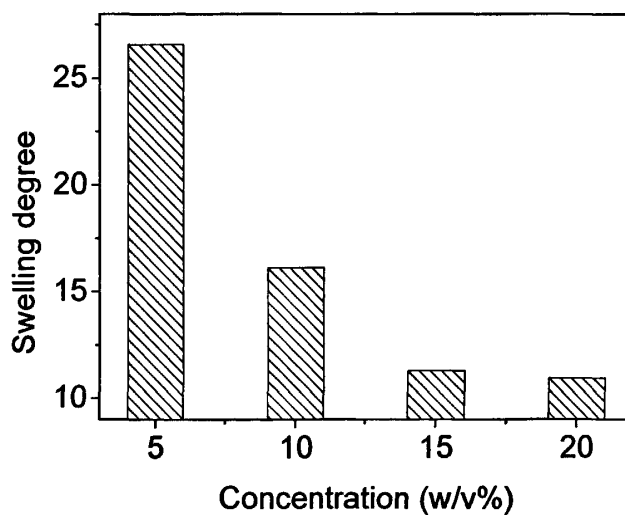


Figure 5-7 The swelling degree as a function of Amy-NC concentrations for the hydrogels formed from PBS solutions of Amy-NC samples upon exposure to 365 nm irradiation for 20 min in the absence of photoinitiator

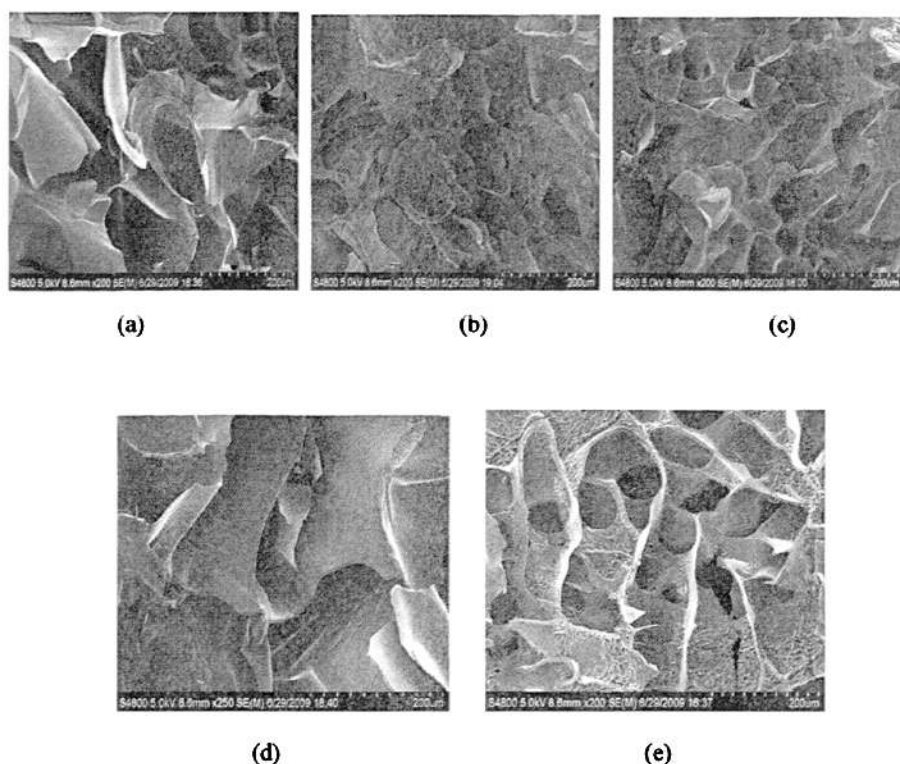


Figure 5-8 SEM photos of Amy-NC hydrogels obtained upon UV irradiation for 5 min (a), 20 min (b), 50 min (c) with 10 w/v% concentration, and upon 20 min UV irradiation at a concentration of 5 w/v% (d), 15 w/v% (e)

5.3.4 光交联凝胶的流变性能

将 Amy-NC PBS 溶液在 365 nm 的紫外灯下光照不同时间得到光交联水凝胶，通过流变仪对所得水凝胶的力学性能进行表征。图 5-9 为 Amy-NC 水溶液与光交联水凝胶的动态频率扫描曲线及其数码照片图。对于 Amy-NC PBS 溶液，其粘性模量(G'')大于弹性模量(G')，表现溶液性质；而光交联水凝胶在线性粘弹区间内(固定应变为 1%)，其弹性模量大于粘性模量，且无明显的频率依赖性，呈现出凝胶行为。

图 5-10 显示了光照时间对 Amy-NC 凝胶粘弹性的影响，随光照时间增加，所得水凝胶的储能模量增加。图 5-11 给出了频率为 10 Hz 时，凝胶的储能模量

与损耗模量随光照时间的变化情况,从图中可以看出,光照时间从 5 min 增加至 50 min,所有凝胶的储能模量均大于损耗模量,说明凝胶主要表现为弹性响应行为,并且 G' 和 G'' 均有增大趋势,特别是光照时间超过 10 min 后,储能模量与损耗模量的差距变大,表明随光照时间延长,凝胶强度增大;当光照时间超过 20 min 后,凝胶强度增加幅度变缓。

Amy-NC 溶液浓度对凝胶储能模量与损耗模量的影响如图 5-12 和图 5-13 所示。从图中可以看出, Amy-NC 溶液浓度从 5 w/v% 上升到 20 w/v% 时,所有凝胶的 G' 均大于 G'' ,说明凝胶主要表现为弹性响应行为,并且随着 Amy-NC 溶液浓度的增大, G' 与 G'' 的差距变大(图 5-13)。与光照时间对水凝胶强度的影响相比, Amy-NC 溶液浓度对凝胶强度的影响更大,这是由于随着 Amy-NC 溶液浓度增加,相同体积内肉桂酸基团含量增加,即交联点增多,导致凝胶的强度和刚性随之增加。

为了进一步定量地得到凝胶网络的微结构信息,对 Amy-NC 水凝胶进行了动态应变测试。图 5-14 为 Amy-NC 凝胶的弹性模量-应变曲线,随着应变的增加,在一系列聚合物浓度下制得凝胶的弹性模量均出现先恒定后下降的趋势,将图中弹性模量平台值降低 5 % 处所对应的应变值定义为最大线性粘弹区域应变值^[11]。然后用得到的弹性模量平台值和最大线性粘弹区域应变值分别对 Amy-NC 浓度进行双对数作图,结果如图 5-15 所示。从图中可以看到,随着 Amy-NC 浓度的增加,弹性模量平台逐渐增加,而最大线性粘弹区域应变值逐渐降低。将图中数据进行线性拟合后用 Wu 和 Morbidelli 模型^[12]进行处理,用公式(5-6)和(5-7)进行计算得出 D_f 和 β 分别为 1.86 和 2.31。然后用公式(5-8)计算得到微观弹性常数 α , 当 $x=1$ 时 $\alpha=0.56$; 当 $x=1.3$ 时 $\alpha=0.60$ 。因此可以判断凝胶形成的驱动力是分子间和分子内两种作用力等同贡献的,属于过渡型凝胶。

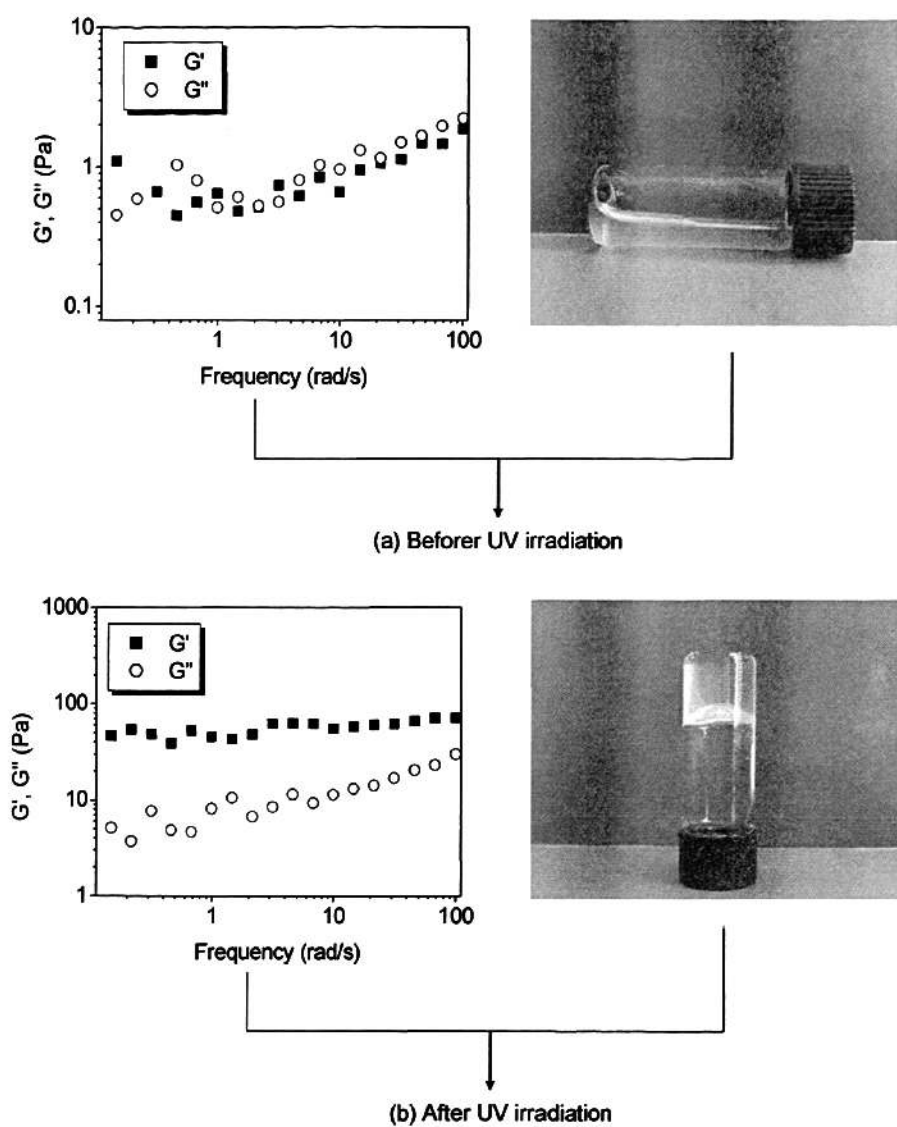


Figure 5-9 Dynamic storage (G') and loss moduli (G'') of 10 w/v% aqueous Amy-NC solution before and after UV irradiation (365 nm, 20 min, room temperature) in the absence of photoinitiator and corresponding optical photos for their sol and gel states

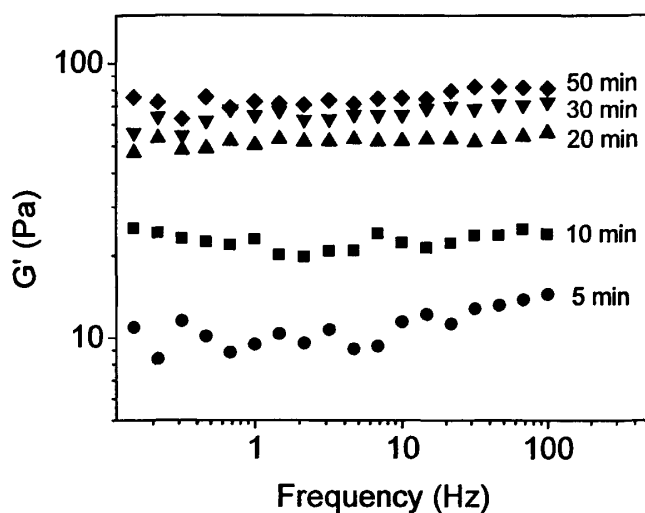


Figure 5-10 The frequency dependence of G' for the photo crosslinking hydrogels with different irradiation time. Hydrogels were prepared from 10 w/v% Amy-NC PBS solutions (1% strain)

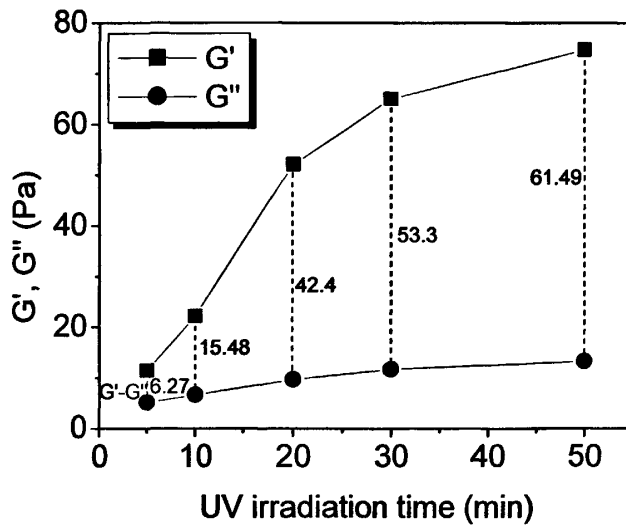


Figure 5-11 Effects of UV irradiation time on the G' and G'' for the photo crosslinking hydrogels prepared from 10 w/v% Amy-NC PBS solutions (10 Hz, 1% strain)

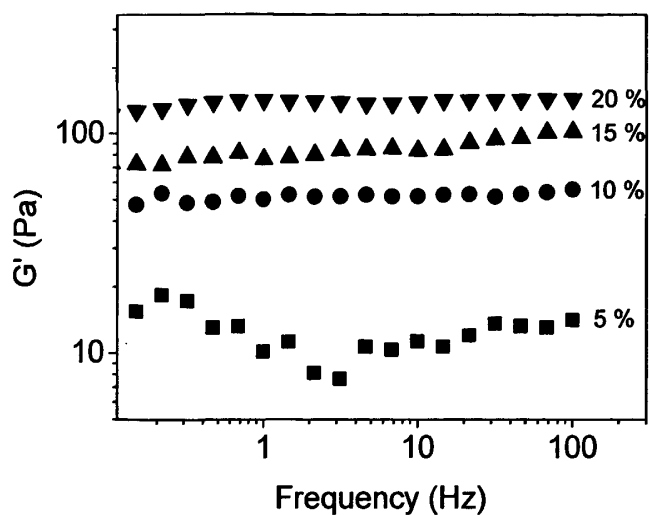


Figure 5-12 The frequency dependence of G' for the photo crosslinking hydrogels with different Amy-NC concentrations. Hydrogels were prepared from Amy-NC PBS solutions upon UV irradiation for 20 min (1% strain)

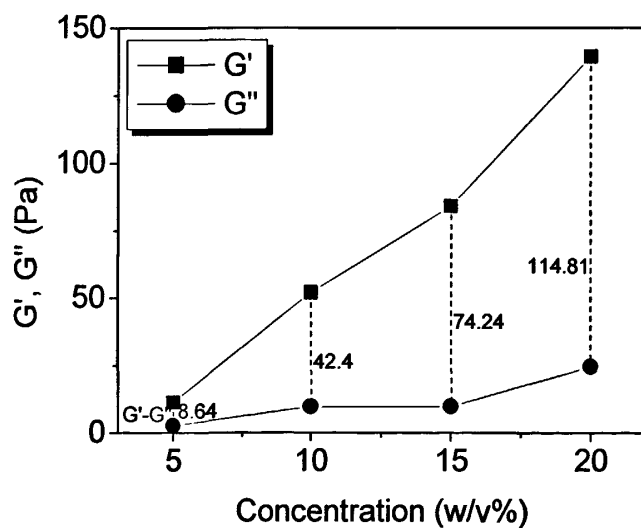


Figure 5-13 Effects of Amy-NC concentration on the G' and G'' for the photo crosslinking hydrogels prepared from Amy-NC PBS solutions upon UV irradiation for 20 min (10 Hz, 1% strain)

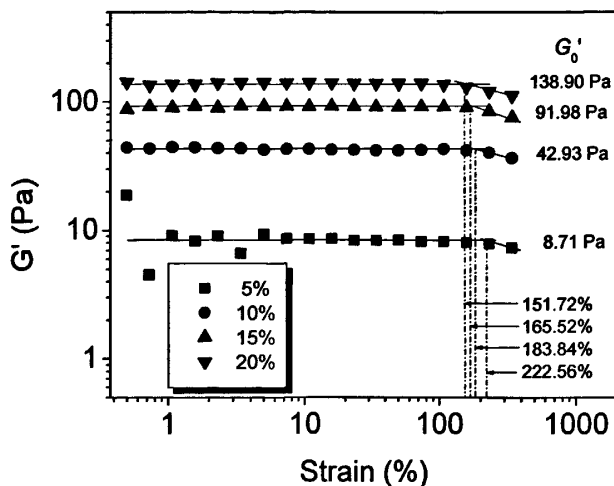


Figure 5-14 The strain dependence of elastic modulus (G') for the photo crosslinking hydrogels with different Amy-NC concentration. Hydrogels were prepared from Amy-NC PBS solutions upon UV irradiation for 20 min (1.0 Hz)

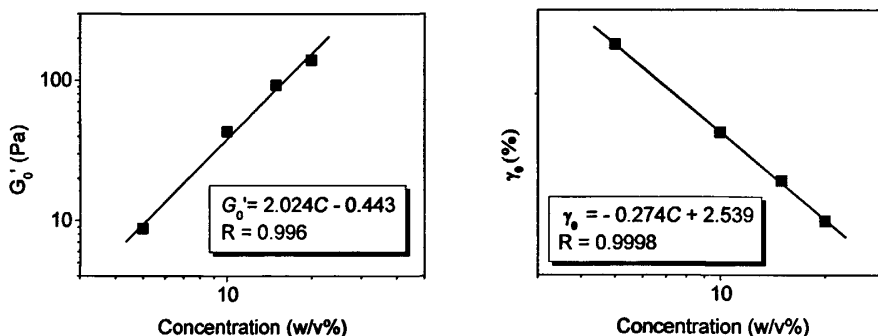


Figure 5-15 Double-logarithmic plots of the maximum elastic modulus (G'_0) and the critical strain (γ_0) versus Amy-NC concentration for the photo crosslinking hydrogels

5.3.5 光交联凝胶的生物降解性

支链淀粉可被 α -淀粉酶降解，支链淀粉的 α -1,4-糖苷键被切断，分解为麦芽糖、葡萄糖^[17]。图 5-16 和图 5-17 给出了光交联支链淀粉基水凝胶在 α -淀粉酶 PBS 溶液中的降解情况。由图可见，光交联支链淀粉基水凝胶在 α -淀粉酶的作用下，凝胶结构迅速被破坏，12 h 后凝胶基本降解完全。且 Amy-NC 水凝胶的降解规律与溶胀规律类似，随着光照时间延长，以及 Amy-NC 浓度的增大，光交联水

凝胶的降解速率下降，这主要是由凝胶的交联密度增加引起的。光交联凝胶的交联密度增加， α -淀粉酶越难进入到凝胶内部，导致降解速率下降。

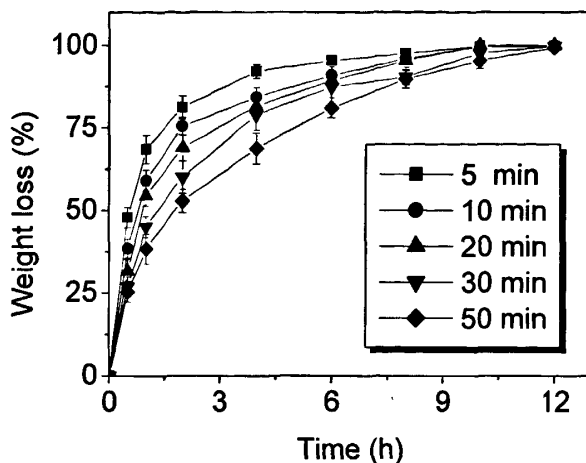


Figure 5-16 *In-vitro* biodegradation as a function of irradiation time for the hydrogels formed from 10 w/v% PBS solutions of Amy-NC samples upon exposure to 365 nm irradiation in 2 μ g/mL α -amylase PBS solution of pH 7.4 at 37 $^{\circ}$ C

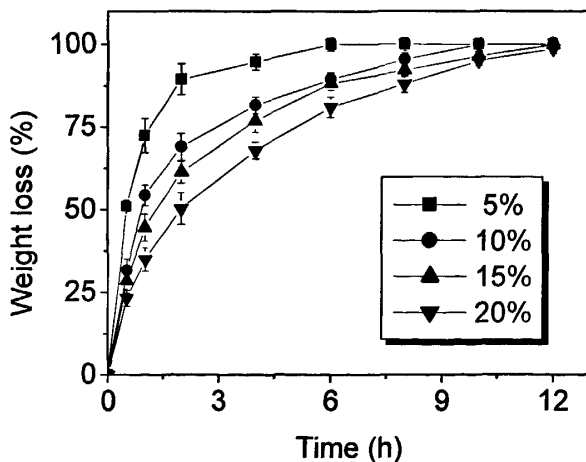


Figure 5-17 *In-vitro* biodegradation as a function of Amy-NC concentrations for the hydrogels formed from PBS solutions of Amy-NC samples upon exposure to 365 nm irradiation for 20 min in 2 μ g/mL α -amylase PBS solution of pH 7.4 at 37 $^{\circ}$ C

5.3.6 光交联凝胶的药物释放研究

以溶菌酶为蛋白类生物大分子模型药物,在无外加光引发剂的条件下,研究 Amy-NC 光交联水凝胶对溶菌酶的原位包埋与控制释放。紫外光照对蛋白质的结构和活性可能有一定的影响,因此我们首先通过荧光光谱和圆二色谱考察了低能量的紫外光照对溶菌酶结构的影响。溶菌酶在 340 nm 左右的内源荧光峰来自于色氨酸((Trp))残基,蛋白质的 Trp 荧光对微环境的变化很敏感,可用来分析蛋白质内部结构的微小变化。将 2 mg/mL 的溶菌酶 PBS 溶液在紫外光照 5~50 min 后,再稀释至 0.1 mg/mL 进行荧光测试,如图 5-18 所示。由图可见,当紫外光照 50 min 后,溶菌酶的荧光光谱没有明显的变化,说明低能量的紫外光照对溶菌酶的结构没有明显的影响。图 5-19 为溶菌酶 PBS 溶液在紫外光照 5~50 min 后的圆二色谱图(CD 图),由图可见,当紫外光照 50 min 后,溶菌酶的 CD 谱没有明显的变化,亦说明低能量的紫外光照对溶菌酶的结构没有明显的影响。

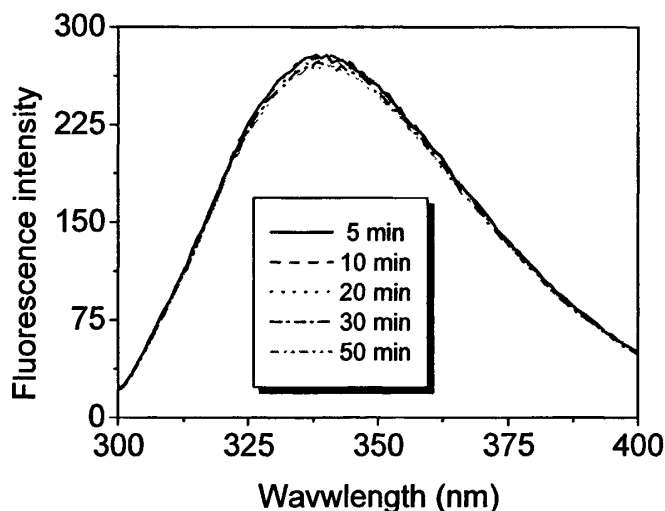


Figure 5-18 Fluorescence spectra of lysozyme PBS solutions subjected to low energy UV irradiation (intensity 0.6 mW/cm^2 at 365 nm) for up to 50 min

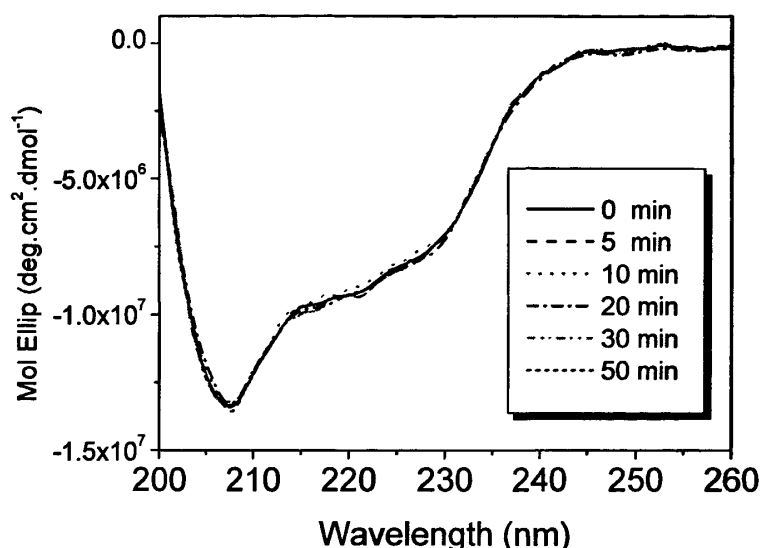


Figure 5-19 Circular dichroism spectra of lysozyme PBS solutions subjected to low energy UV irradiation (intensity 0.6 mW/cm^2 at 365 nm) for up to 50 min

图 5-20 和 5-21 给出了 Amy-NC 凝胶体系在 37°C 条件下溶菌酶的体外释放曲线。由图可以看出, 不同光照时间和不同浓度的 Amy-NC 水凝胶对溶菌酶均有一定的缓释效果, 在 48h 内持续释放, 且无明显的初期暴释现象。随着光照时间的延长(图 5-20)以及 Amy-NC 浓度的增大(图 5-21), 凝胶内部的交联网络结构变得越来越致密(见图 5-8), 溶菌酶越不容易扩散到凝胶外部, 导致溶菌酶的释放速率与最终累积释放量均减小。为了研究溶菌酶的释放机理, 通过 Peppas 方程^[19]对释放曲线进行线性拟合, 计算得到的扩散指数 n 见表 5-1。载有溶菌酶的 Amy-NC 水凝胶在 PBS 缓冲溶液中释放时, 其 n 值均在 0.45 左右, 说明溶菌酶的释放机制属于 Fickian 扩散, 药物分子的释放是通过分子扩散实现的。

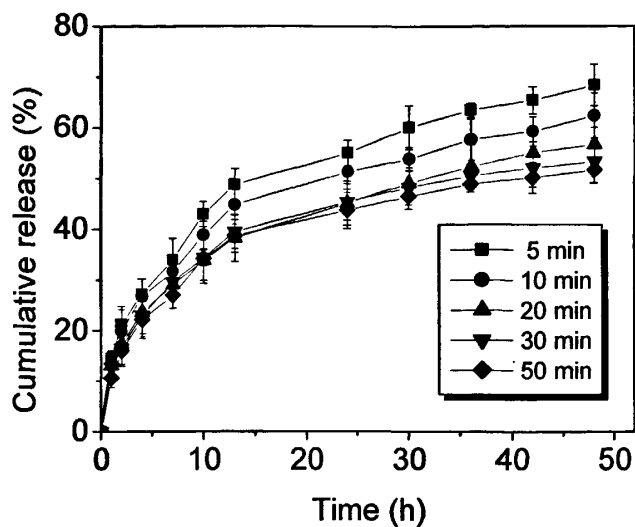


Figure 5-20 Effects of UV irradiation time on lysozyme release from 10 w/v% Amy-NC hydrogels (PBS, pH 7.4, 37 °C)

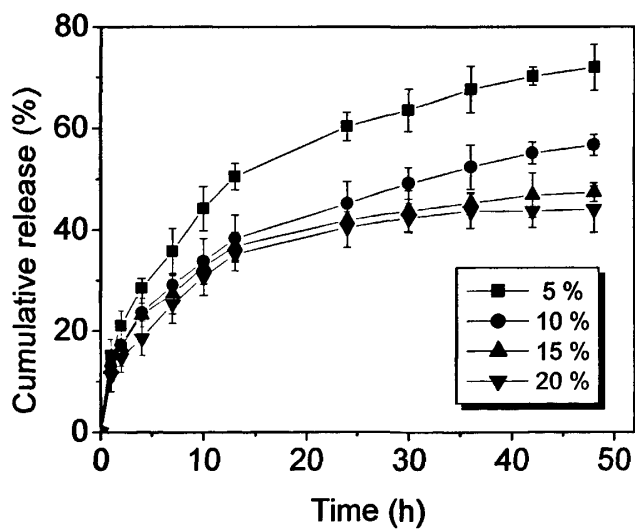


Figure 5-21 Effects of Amy-NC concentration on lysozyme release from Amy-NC hydrogels obtained from 20 min UV exposure (PBS, pH 7.4, 37 °C)

Table 5-1 Release characteristics of lysozyme from the the Amy-NC hydrogels (pH 7.4, 37 °C)

Samples	irradiation time (min)	concentration (w/v%)	<i>n</i>	R
Amy-NC-1	5	10	0.46	0.987
Amy-NC-2	10	10	0.45	0.991
Amy-NC-3	20	10	0.42	0.989
Amy-NC-4	30	10	0.44	0.996
Amy-NC-5	50	10	0.45	0.993
Amy-NC-6	20	5	0.46	0.992
Amy-NC-7	20	15	0.44	0.989
Amy-NC-8	20	20	0.45	0.986

蛋白类大分子药物包埋与释放的关键是保持蛋白质大分子的生物活性，由于环境刺激而导致蛋白质二级结构发生变化是蛋白质失活的重要原因。图 5-22 给出了不同 Amy-NC 凝胶释放液中溶菌酶的圆二色谱图。对于不同光照时间以及不同浓度的 Amy-NC 凝胶，其 24 h 释放液中溶菌酶的 CD 谱图在 207 nm 和 222 nm 附近存在明显的负的谱带，曲线形状跟新配置的溶菌酶 PBS 溶液没有明显区别，说明 24 h 释放液中的溶菌酶仍很好地保持了其二级构象；从同一凝胶 (Amy-NC-3) 在不同时间释放出的溶菌酶的 CD 曲线来看(如图 5-23)，其二级构象与新配置溶菌酶的 CD 谱图相比没有明显的变化，说明经原位光包埋后的溶菌酶在释放时间内可有效地保持其二级构象。

溶菌酶的生物活性可以通过其对微球菌的溶菌实验得到。将新配置的细菌悬浮液在 450 nm 处的吸光度值调至 1.3 左右，然后加入含有溶菌酶的释放液，迅速混合均匀，同时开始测量吸光度随时间的变化，曲线的斜率大小反映溶菌酶的活性。图 5-24 给出了不同条件下 Amy-NC 载药凝胶释放出溶菌酶的相对活性，图中的样品编号与表 5-1 中的一致。由图可见，随着紫外光照时间的延长以及 Amy-NC 浓度的增加，释放 1 h 后溶液中溶菌酶的生物活性略有降低，但无显著变化，其相对活性均在 90% 以上；随着释放时间的延长，释放出的溶菌酶的生物活性有所降低，释放 48 h 后溶液中溶菌酶的相对活性亦在 83% 以上，说明经原位光包埋后的溶菌酶仍具有良好的生物活性。

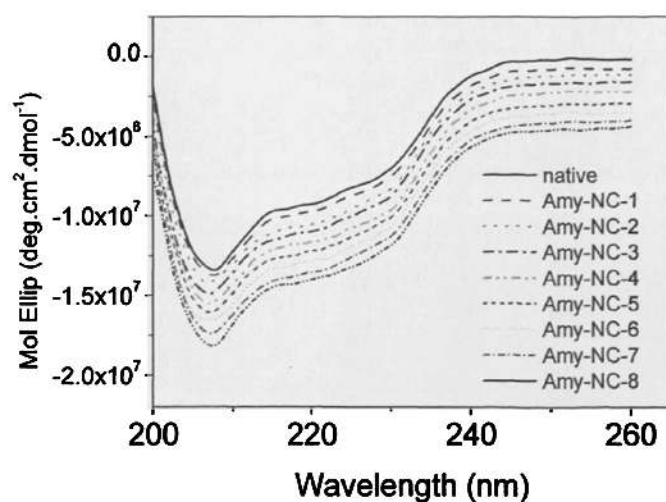


Figure 5-22 Circular dichroism spectra of lysozyme released from Amy-NC hydrogels with different fabrication conditions (24 h released samples)

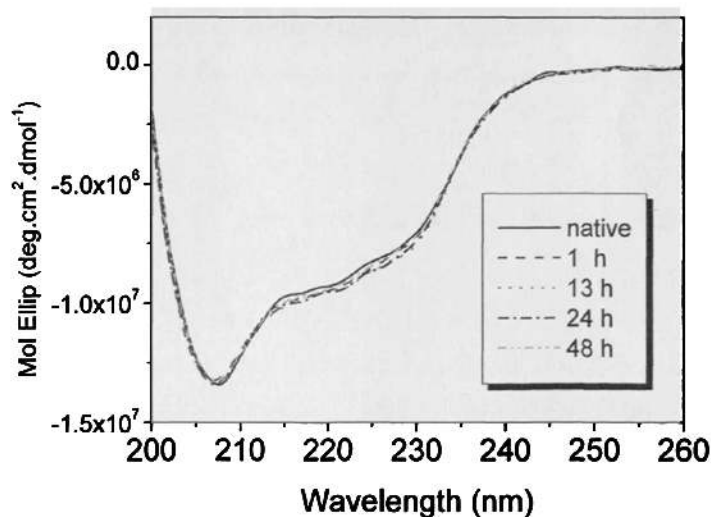


Figure 5-23 Circular dichroism spectra of lysozyme released from the Amy-NC-3 hydrogel sample

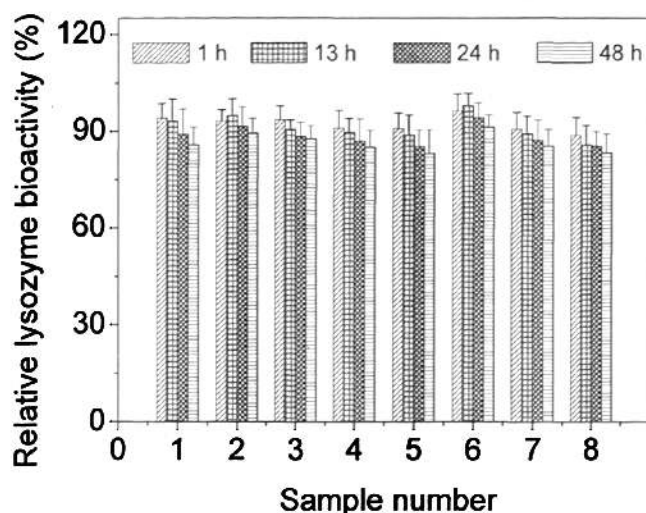


Figure 5-24 The relative bioactivity of lysozyme released from Amy-NC hydrogels with different fabrication conditions

5.4 结论

(1) 基于侧链含 4-硝基肉桂酸支链淀粉衍生物(Amy-NC)的合成, 在无外加光引发剂的条件下制备了光交联型支链淀粉基水凝胶。通过紫外可见光谱研究了 Amy-NC 中硝基肉桂酸酯基的光二聚反应过程, 发现紫外光照 1800 s 后其交联度为 38%。

(2) 研究了紫外光照时间和 Amy-NC 溶液浓度对所得水凝胶溶胀性能、力学性能及生物降解性的影响, 结果显示随光照时间延长和 Amy-NC 溶液浓度增大, 所得水凝胶的平衡溶胀度和生物降解速率减小, 而力学强度增加。流变数据和分形模型分析揭示该水凝胶体系具有分形特征, 凝胶形成的驱动力是分子间和分子内两种作用力等同贡献, 属于过渡型凝胶。

(3) 以溶菌酶为蛋白类生物大分子模型药物, 在无外加光引发剂的条件下, 研究了该类光交联水凝胶对溶菌酶的原位包埋与控制释放。体外药物释放实验表明, 该类水凝胶对溶菌酶均有一定的缓释效果, 且随光照时间的延长及 Amy-NC 溶液浓度的增大, 溶菌酶的释放速率与最终累积释放量均减小。通过 Peppas 方程对释放曲线进行线性拟合, 其 n 值均在 0.45 左右, 说明溶菌酶的释放机制属于 Fickian 扩散。圆二色谱研究证实经原位光包埋后的溶菌酶可有效地保持其二

级构象；通过微球菌的溶菌实验测定溶菌酶的生物活性，结果显示药物释放 48 h 后溶液中溶菌酶的相对活性在 83% 以上，说明经原位光包埋后的溶菌酶仍具有良好的生物活性。

参考文献

- [1] Carino GP, Mathiowitz E. Oral insulin delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1999, 35: 249-257
- [2] Determan AS, Wilson JH, Kipper MJ, Wannemuehler MJ, Narasimhan B. Protein stability in the presence of polymer degradation products: consequences for controlled release formulations. *Biomaterials*, 2006, 27: 3312-3320
- [3] Lee KY, Yuk SH. Polymeric protein delivery systems. *Progress in Polymer Science*, 2007, 32: 669-697
- [4] Lee F, Chung JE, Kurisawa M. An injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel system for protein delivery, *Journal of Controlled Release*, 2009, 134: 186-193
- [5] Quick DJ, Macdonald KK, Anseth KS. Delivering DNA from photocrosslinked, surface eroding polyanhydrides. *Journal of Controlled Release*, 2004, 97: 333-343
- [6] Dadsetan M, Szatkowski JP, Yaszemski MJ, Lu LC. Characterization of photo-cross-linked oligo[poly(ethylene glycol) fumarate] hydrogels for cartilage tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 1702-1709
- [7] Liu CC, Sawicki SM, Metters AT. Free-radical-mediated protein inactivation and recovery during protein photoencapsulation. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 75-83
- [8] Leach JB, Schmidt CE. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 2005, 26: 125-135
- [9] Jeon O, Bouhadir HK, Mansour JM, Alsberg E. Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials*, 2009, 30: 2724-2734
- [10] Gu F, Neufeld R, Amsden B. Maintenance of vascular endothelial growth factor and potentially other therapeutic proteins bioactivity during a photo-initiated free radical cross-linking reaction forming biodegradable elastomers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, 66: 21-27
- [11] Shih W H, Shih W Y, Kim S I, Liu J, Aksay I A. Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels. *Physical Review A*, 1990, 42: 4772-4779

- [12] Wu H, Morbidelli M. A model relating structure of colloidal gels to their elastic properties. *Langmuir*, 2001, 17: 1030-1036
- [13] Bezemer J M, Radersma R, Grijpma D W, Dijkstra P J, Feijen J, Blitterswijk C A. Zero-order release of lysozyme from poly(ethylene glycol) / poly(butylene terephthalate) matrices. *Journal of Controlled Release*, 2000, 64: 179-192
- [14] Shi Lianjun, Khondee Supang, Linz Thomas H., and Berkland Cory. Poly(*N*-vinylformamide) nanogels capable of pH-sensitive protein Release. *Macromolecules*, 2008, 41: 6546-6554
- [15] Ren Biye, Zhao Dongli, Liu Shanshan, Liu Xingxing, and Tong Zhen. Synthesis and characterization of poly(ferrocenylsilanes) with coumarin side groups and their photochemical reactivity and electrochemical behavior. *Macromolecules*, 2007, 40: 4501-4508
- [16] Miyamoto K, Sasaki M, Minamisawa Y, Kurahashi Y, Kano H, Ishikawa S. Evaluation of *in vivo* biocompatibility and biodegradation of photocrosslinked hyaluronate hydrogels (HADgels). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004, 70: 550-559
- [17] Russo M.A.L, Truss R, Halley P.J. The enzymatic hydrolysis of starch-based PVOH and polyol plasticised blends. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77: 442-448
- [18] Ritger Philip L, Peppas Nikolaos A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 1987, 5: 37-42
- [19] Ritger Philip L, Peppas Nikolaos A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 1987, 5: 37-42

附录：攻读博士学位期间发表的论文

- [1] **Hu Rong**, Chen Yu-Yun, Zhang Li-Ming. Synthesis and characterization of in-situ photogelable polysaccharide derivative for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 393: 96-103. 属于论文第 4 章.
- [2] **扈蓉**, 张黎明. 利用支链淀粉-对硝基肉桂酸接枝物原位包埋蛋白类生物大分子的方法. 中国发明专利, 申请号: 200910213940.8. 属于论文第 5 章.
- [3] **Hu Rong**, Zhang Li-Ming A novel polysaccharide derivative capable of photogelation in the absence of photoinitiator and its hydrogel properties. *Proceedings of 10th International Hydrocolloids Conference*, 2010. 属于论文第 4 章.
- [4] **Hu Rong**, Zhang Li-Ming Azobenzene-modified amylopectin and its photoresponsive nanogels. *Proceedings of 10th International Hydrocolloids Conference*, 2010. 属于论文第 3 章.

致 谢

本论文是在导师张黎明教授的精心指导和亲切关怀下完成的。从论文的选题、实验方案的拟定到论文的撰写与修改，无不倾注了导师大量的心血。张老师严谨求实的治学态度、锐意创新的学术作风、谦逊平易的学者风范和忘我的拼搏精神给我留下了深刻的印象并使我终身受益。深深感谢张老师在我遇到困难和挫折时给予的包容、支持和鼓励。恩师之情，终身难忘！愿在今后的工作和学习中能有幸继续得到张老师的启迪与点拨。

很庆幸能够生活在这样一个温暖和睦的集体里，能够认识这么多老师和同学让我倍感幸运。感谢他们在平时的学习和生活中给予的帮助与鼓励，他们是：李玮老师、杨立群老师、易菊珍老师、王冠海博士、陈继平博士、时焕英博士、梁媛媛博士、李本刚博士、卢红伟博士、宋飞博士；博士研究生邹小武、王红飞、马栋、邓俊杰、杨惠康、林坚涛、李楠楠；硕士研究生唐春燕、邓敏敏等同学；本科生陈宇云、王倩仪等；在此一并表示感谢！

最后，感谢我的家人对我的关爱和支持，你们的期望是我前进的最大动力。特别感谢我的爱人程德喜一直以来对我的默默支持和鼓励，你是我能顺利完成学业的坚强后盾。

向所有关心我的亲人和朋友表示衷心的感谢！祝你们一生幸福！

扈 蓉

2010 年 4 月于康乐园