

基于可逆共价酰肼键制备海藻酸水凝胶 及其 pH 响应性研究

侯一凡 王闽颖 付丽华 杨 华*

(广西大学化学化工学院, 南宁 530004)

摘 要 利用醛基化海藻酸钠与酰肼基聚乙二醇反应, 获得动态共价键交联的海藻酸水凝胶。通过核磁共振光谱、红外光谱、扫描电镜对水凝胶的结构进行了表征, 采用流变仪测定水凝胶的流变性能。结果表明该水凝胶具有较高的弹性和强度, 并且随 pH 值的变化, 可以实现溶胶-凝胶转化, 即在中性条件下形成凝胶, 在酸性条件下则变为溶胶。基于这种优异的性能, 再加上优良的生物相容性, 将为此类材料在药学生物领域的应用打下坚实的基础。

关键词 海藻酸钠, 水凝胶, pH 响应性, 酰肼键

Preparation of alginate hydrogel based on reversible covalent acylhydrazone bond and its pH-responsiveness

Hou Yifan Wang Mingying Fu Lihua Yang Hua

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004)

Abstract Aldehyde-based alginate was reacted with hydrazide-based PEG to obtain a dynamical covalent cross-linked alginate hydrogel. The structure of hydrogel was characterized by $^1\text{H-NMR}$, FT-IR and SEM. The rheological properties were measured by rheometer. The results showed that the hydrogel had high elasticity and strength, and with the change of pH value, sol-gel conversion can be realized which was the gel forms under neutral conditions and the sol under acidic conditions. Based on this excellent performance, combined with excellent biocompatibility the hydrogel will lay a solid foundation for the application of such materials in the field of pharmaceutical biology.

Key words sodium alginate, hydrogel, pH-responsiveness, acylhydrazone bond

海藻酸是通过(1→4)糖苷键连接古洛糖醛酸(G单元)和甘露糖醛酸(M单元)组成的直链线性多糖。海藻酸的钠盐即为海藻酸钠, 常见的海藻酸钠水凝胶为钙离子(Ca^{2+})交联水凝胶^[1-2]。聚乙二醇(PEG)具有良好的水溶性和生物相容性, 可以采用接枝共聚的方式与海藻酸钠反应, 如 Hall 等^[3]合成了 PEG 接枝海藻酸钠聚合物, 通过向体系中添加 Ba^{2+} 进行交联, 制备成微胶囊。Miao 等^[4]利用 PEG 接枝海藻酸钠制备凝胶微球, 并研究了其药物负载和细胞内的释放性能。利用 PEG 和海藻酸钠进行共聚也可以制备成功能水凝胶, 如 Jeon 等^[5]利用改性的海藻酸钠和 PEG 反应, 制备了具有生物粘附性的生物材料。

随着化学键研究的深入, 动态共价键逐渐成为研究的热点之一。当利用动态共价键交联形成水凝胶时, 由于动态共价键随环境变化具有可逆性, 因此所得水凝胶具有环境响应性^[6]。早在 2005 年, Balakrishnan 等^[7]利用高碘酸钠氧化海藻酸钠制备带有醛基的海藻酸钠, 与明胶中的氨基通过席夫碱反应, 共价交联制备了原位成型的水凝胶。

在动态共价化学领域研究中, 酰肼键是研究的重点之一。在酸性条件下, 通过酰肼键制备的凝胶是一种动态可逆的化学反应^[8-9]。Deng 等^[10]利用聚乙二醇-二苯甲酰肼与三[(4-醛基苯氧基)-甲基]乙烷发生缩聚反应生成酰肼键, 制备三维交联网络状的高分子聚合物水凝胶, 通过改变体系 pH, 该凝

基金项目: 国家自然科学基金(21764003)

作者简介: 侯一凡(1992-), 男, 硕士生研究生, 主要研究方向为药用高分子材料。

联系人: 杨华(1969-), 男, 副教授, 主要从事药用高分子材料的研究。

胶会发生溶胶-凝胶之间的相互转换。张鸿鑫等^[11]以经高碘酸钠氧化后带有醛基的海藻酸和一步反应得到的末端含酰肼基的 PEG 为原料,通过动态共价酰胺键制备水凝胶。研究发现,该水凝胶能够在温和的环境下实现自愈合,且该凝胶还具有 pH 敏感性,在酸碱环境中可发生溶胶-凝胶之间的多次相互转变。

本研究以 PEG 和海藻酸为原料,海藻酸经过高碘酸钠氧化制备带有醛基的部分氧化海藻酸(ADA),PEG 经过三步化学改性得到聚乙二醇-二苯甲酰肼,再通过酰肼基与醛基反应生成酰胺键。与已有文献相比较,主要区别在于张鸿鑫等^[11]合成的 PEG 末端带有碳链的酰肼基,本研究中 PEG 末端为带有苯环结构的酰肼基,且封端率达到 97%。从原理上讲,端基酰胺键的电子能够更好地被此结构分散,可以使末端酰肼基的极性降低,端基的稳定性被大大提高;在凝胶形成过程中,由于酰胺键和苯环之间“ π 键”的存在,使得酰胺键上的电荷被分散得更均匀,因此提高了交联点的稳定性,从而使制备的水凝胶具有更好的弹性和强度。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

主要实验试剂:海藻酸钠(极低黏度),上海安耐吉化学有限公司;PEG2000(分析纯),上海安耐吉化学有限公司;高碘酸钠(分析纯),上海安耐吉化学有限公司;甲磺酰氯(分析纯),成都西亚化工股份有限公司;对羟基苯甲酸甲酯(分析纯),上海安耐吉有限公司;水合肼(80%,分析纯),广东光华科技股份有限公司。

主要实验仪器和设备:冷冻干燥机(FD-1A-50),北京博医康实验仪器有限责任公司;傅里叶红外变换光谱(FT-IR, Thermo Nicolet IS50),赛默飞世尔科技有限公司;扫描电子显微镜(SEM, S-3400N),日本日立公司;600 兆核磁共振波谱仪(^1H -NMR, Avance III HD600),德国 Bruker 公司;流变仪(R/S-CC),德国 Rookfield 公司。

1.2 ADA 的制备及表征

1.2.1 ADA 的制备

参照文献^[7]来制备 ADA,其反应机理见图 1。准确称取 10g 海藻酸钠,均匀分散在 50mL 乙醇/水($v/v=1:1$)混合溶剂中;然后加入 5.4g 高碘酸钠,在室温且避光条件下搅拌 6h,再加入与高碘酸钠等

物质的量的乙二醇终止反应;反应 1h 后,将产物置于透析袋中透析(截留分子量 8000~14000),每天换去离子水 4 次,透析 3 天;当去离子水的电导率不发生变化时,在冷冻干燥机中干燥 3d 制得 ADA 样品(样品代号为 G1)。

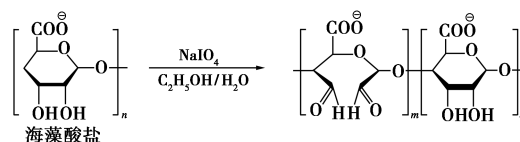


图1 海藻酸盐的氧化反应机理图

取少量 ADA 样品,与 KBr 共混压片制样,用傅里叶红外变换光谱仪进行 FT-IR 表征分析。

1.2.2 ADA 氧化度的测定

被高碘酸钠氧化的糖醛酸单元数占海藻酸钠总糖醛酸单元中的摩尔百分数称之为氧化度 DO。在加入乙二醇之前,移取出 5mL ADA 反应液置于 100mL 锥形瓶;将 10mL 饱和的 NaHCO_3 溶液加入锥形瓶中,再加入 2mL 20% (wt, 质量分数,下同)的 KI 溶液在避光条件下反应 20min;之后用硫代硫酸钠的标准液进行滴定测定,指示剂采用淀粉,将样品平行测定 3 次。由公式(1)计算 ADA 的氧化度^[12]。

$$DO = \frac{198n}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中,DO 为氧化度,%;198 为海藻酸钠单元的相对分子质量,g/mol; n 为所消耗的 NaIO_4 物质的量,mol; m 为样品的质量,g。

1.3 聚乙二醇-二苯甲酰肼的合成与表征

1.3.1 聚乙二醇-二甲磺酸酯的合成

参照文献^[10]制备聚乙二醇-二甲磺酸酯,其反应机理见图 2。称取 30g PEG2000 置于 250mL 的圆底烧瓶中,加入少量苯共沸除水,室温冷却下后加入 60mL 二氯甲烷、8.3mL 三乙胺;在冰浴条件下置于磁力搅拌器中,在 30min 内逐滴加入 4.8mL 甲磺酰氯和少量的二氯甲烷混合液;在室温和氮气保护下磁力搅拌 72h,停止反应加入 300mL 水进行稀释;再用 400mL 二氯甲烷(每次 80mL,萃取 5 次)萃取,合并有机相;所得有机相依次用 200mL 的 1mol/L 的盐酸水溶液(每次 50mL,萃取 4 次)萃取,用 300mL 饱和氯化钠水溶液(每次 100mL,洗涤 3 次)洗涤,再用无水硫酸钠干燥经洗涤后的有机相;将其静置过夜后,采用旋蒸浓缩;之后置于 300mL 冰乙醚中,直至产生大量白色沉淀,再将其

放置于 40℃ 真空干燥箱中过夜,得到 27.3g 白色固体即聚乙二醇-二甲磺酸酯(样品代号为 A),测得基产率为 91%。

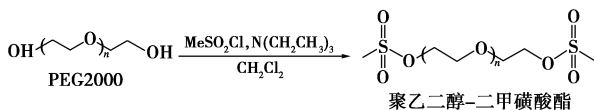


图 2 聚乙二醇-二甲磺酸酯的合成机理图

1.3.2 聚乙二醇-二苯甲酸酯的合成

聚乙二醇-二苯甲酸酯的反应机理见图 3。称取上述制得的聚乙二醇-二甲磺酸酯 27g,将其投入 250mL 的圆底烧瓶中,加入 180mL 丙酮并磁力搅拌至完全溶解;随后依次将 5.71g 对羟基苯甲酸甲酯、20.9g 碳酸钾加入到圆底烧瓶中,在 80℃ 下回流并磁力搅拌反应 24h 之后停止反应;利用旋转蒸发将丙酮移除,加入 250mL 水进行溶解,用 320mL 二氯甲烷进行萃取(每次 80mL,萃取 4 次),合并有机相;用 300mL 饱和氯化钠水溶液(每次 100mL,洗涤 3 次)洗涤有机相,用无水硫酸钠干燥经洗涤后的有机相,将其静置过夜后,采用旋蒸浓缩;之后置于 300mL 冰乙醚中,直至产生大量白色沉淀,再将其放置于 40℃ 真空干燥箱中过夜,得到 23.8g 白色固体即聚乙二醇-二苯甲酸酯(样品代号为 B),测得其产率为 85%。

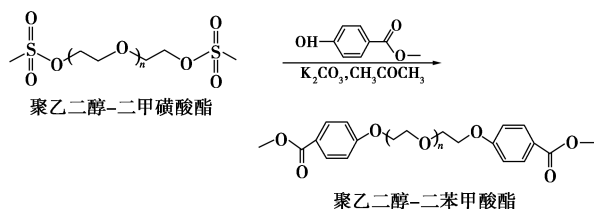


图 3 聚乙二醇-二苯甲酸酯的合成机理图

1.3.3 聚乙二醇-二苯甲酰肼的合成

聚乙二醇-二苯甲酰肼的反应机理见图 4。称取 16g 上述制备的干燥的聚乙二醇-二苯甲酸酯,将其投入 250mL 的圆底烧瓶中,加入 100mL 无水乙醇;充分溶解后,缓慢向圆底烧瓶中滴加 40mL 的 80% 水合肼和 40mL 无水乙醇混合液,于 80℃ 回流磁力搅拌下反应 36h 后停止反应;用旋转蒸发除去大部分乙醇,之后加入 300mL 水,用 400mL 二氯甲烷进行萃取(每次用 80mL,共萃取 5 次);合并有机相后,用 300mL 饱和氯化钠水溶液洗涤(每次 100mL,洗涤 3 次)有机相,用无水硫酸钠干燥经洗涤后的有机相,将其静置过夜后,采用旋蒸浓缩;之后置于 300mL 冰乙醚中,直至产生大量白色沉淀,

再放置于 50℃ 真空干燥箱中过夜,得到 12.8g 白色固体即聚乙二醇-二苯甲酰肼(样品代号为 G2),测得其产率为 80%。

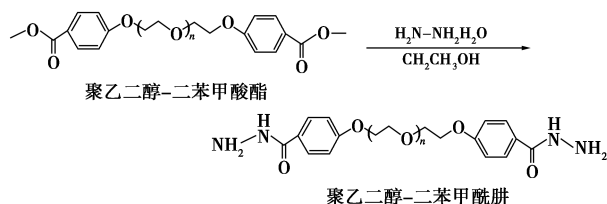


图 4 聚乙二醇-二苯甲酰肼的合成机理图

取少量真空干燥后的样品 A、B 和 G2 分别溶于氘代试剂中,置于核磁管中,用 600 兆核磁共振波谱仪进行 ^1H -NMR 测试。

1.4 水凝胶的制备和表征

称取 0.7g 样品 G1 和 0.3g 样品 G2 分别溶于 4.5mL 去离子水中(pH=7.2)形成溶液,两种溶液直接混合置于 37℃ 的超声仪中,使其均匀混合(醛基与酰肼基在整个体系中的摩尔比约为 2:1),即可形成质量浓度为 10% 的水凝胶;将制成的水凝胶放在真空干燥箱中过夜至恒重后,称重,再将其完全浸没于去离子水中;在不同的时间点取出凝胶,用滤纸擦干凝胶表面的水分,再称重,反复数次操作直至凝胶质量不再发生改变。由公式(2)计算水凝胶的溶胀率(W_R)。

$$W_R = W/W_0 \quad (2)$$

式中, W_R 为水凝胶的溶胀率; W_0 为溶胀之前湿凝胶质量,g; W 为溶胀之后凝胶的质量,g。

使用傅里叶红外变换光谱仪分别对经过真空干燥后的凝胶因子样品 G2 和水凝胶进行 FT-IR 测试。

测试水凝胶的力学性能:将制备好的水凝胶切片后转移到流变仪中上,于室温下测试其存储模量(G')和损耗模量(G'')随角速度的变化。

将冻干后的水凝胶放置于扫描电子显微镜下,观察其内部结构。

2 结果与讨论

2.1 氧化海藻酸的 FT-IR 表征和氧化度测定

海藻酸钠氧化前后的 FT-IR 图见图 5,与海藻酸钠 FT-IR 图相比,ADA 新的吸收峰出现在 1737.68cm^{-1} 处,该峰应归属于醛基的 $\text{C}=\text{O}$ 振动吸收峰;另一醛基特征峰出现在 2881.25cm^{-1} 处,该峰应归属于 $\text{CO}-\text{H}$ 振动吸收峰。由此可证明,经过高碘酸钠氧化制备得到的样品为带有醛基的

ADA。

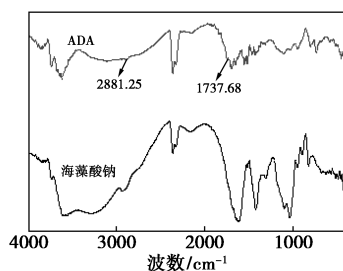


图5 氧化前后的海藻酸钠 FT-IR 谱图

通过滴定法测定 ADA 的氧化度,发现在古洛糖醛酸单元与高碘酸盐摩尔比为 2:1 时,其氧化度为 47.65%。

2.2 聚乙二醇-二苯甲酰肼的 $^1\text{H-NMR}$ 表征

聚乙二醇-二苯甲酰肼的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图中各个质子化学位移如图 6 所示,在 $\delta=9.6\text{ppm}$ 处出现 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 新的酰肼官能团质子吸收峰,同时在 $\delta=4.4\text{ppm}$ 处出现 $-\text{NH}_2$ 质子吸收峰。通过积分以上两处的质子吸收峰,发现峰面积不是 1:2,这可能是一 NH_2 中的活泼氢所造成。通过积分图 6 中 b、c 与 g 的峰面积,发现酰肼官能度均达到 97%,证明聚乙二醇-二苯甲酰肼被合成。

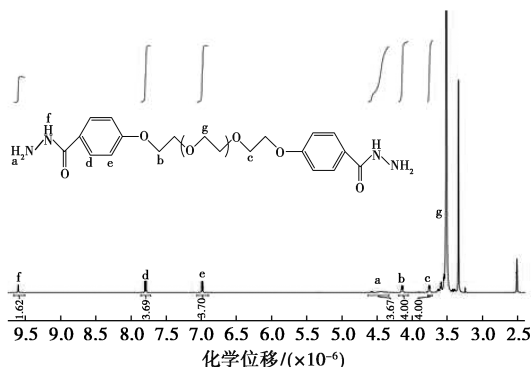


图6 聚乙二醇-二苯甲酰肼的 $^1\text{H-NMR}$ 图

2.3 水凝胶的溶胀性能测试

溶胀是凝胶的最大特性。凝胶因吸收溶剂而溶胀,排出溶剂而收缩,以此来达到动态热力学平衡。水凝胶的溶胀率通过其吸水、排水引起的质量变化

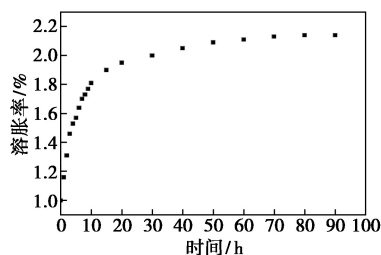


图7 水凝胶的溶胀率随时间的变化曲线图

来测定,水凝胶的溶胀率随时间的变化如图 7 所示。由图可知,在 20h 之内溶胀率随时间的推移而快速增加,且质量增加到原来的 1.95 倍;而在 50h 之后溶胀率基本不再随时间的变化而变化,达到了溶胀平衡。

2.4 凝胶因子 G2 和水凝胶的 FT-IR 表征

为了证明水凝胶是通过共价化学交联而成,而不是由其他等物理方法形成,对水凝胶进行了 FT-IR 表征,结果如图 8 所示。当 AGA 和聚乙二醇-二苯甲酰肼发生共价交联时,相应的峰的位置会发生较大变化。图 8(a) 是 G2 在 $2000\sim 1500\text{cm}^{-1}$ 范围内的 FT-IR 谱图,在 1645cm^{-1} 和 1612cm^{-1} 处出现了明显的吸收峰,为 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动吸收峰。图 8(b) 是水凝胶在 $2000\sim 1500\text{cm}^{-1}$ 范围内的 FT-IR 谱图,在 1626cm^{-1} 处出现了 $\text{C}=\text{N}$ 伸缩振动吸收峰,同时在 1737cm^{-1} 处的醛基 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动吸收峰消失,证明了水凝胶是由动态共价酰胺键形成的,也表明所形成的是化学凝胶。

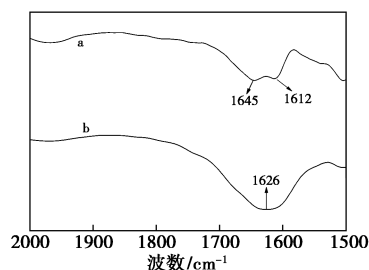


图8 G2(a)和水凝胶(b)的 FT-IR 谱图

2.5 水凝胶的力学性能表征

在水凝胶浓度为 10%, $\text{pH}=7.2$,应变为 1% 的条件下,通过流变仪测定其储存模量 (G') 和损耗模量 (G'') 随着角速度 (ω) 的变化曲线,见图 9。由图可以直观看出 $G' > G''$,在高频区 G' 随角速度的增加而基本保持不变,对角速度没有依赖性。表明了具有较高质量分数的水凝胶交联度大,内部更加趋近于三维网络结构,在整个频率变化范围内是以凝

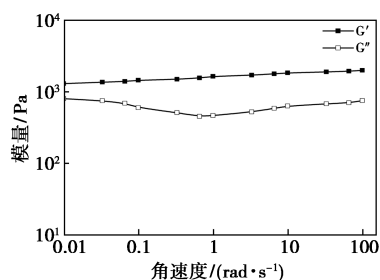


图9 水凝胶的流变性能示意图

胶的状态呈现出来,与固体有类似的状态。同时,由图可见水凝胶的 $G' > 1000 \text{ Pa}$,表明该水凝胶具有较好的弹性。

2.6 水凝胶的 SEM 观察

用不同放大倍数对水凝胶进行电镜扫描,结果见图 10。由图可以看出,水凝胶内部呈三维网络结构和形貌。水凝胶是由 AGA 的双醛基与聚乙二醇-二苯甲酰肼的酰肼基交联成的动态共价酰肼键,由图 10 可清楚地观察到其内部稳定的三维网络构造。

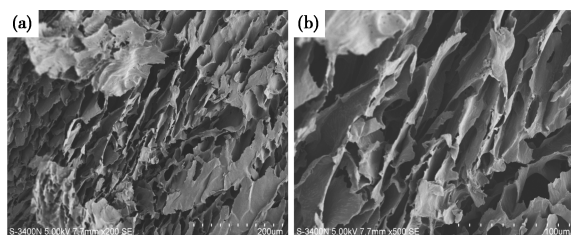


图 10 水凝胶的 SEM 图

[(a) $\times 200$; (b) $\times 500$]

2.7 水凝胶的 pH 响应性分析

可逆动态共价酰肼键可以在室温下酸催化条件下不断地形成和断裂,所以通常通过改变体系中 pH 的大小来达到凝胶-溶胶之间的相互转化。凝胶-溶胶之间的相互转化关系见图 11。在形成水凝胶的小瓶子中加 $25 \mu\text{L}$ 乙酸,此时体系中 pH 约为 3.5,将其置于超声仪中数分钟,凝胶逐渐变成溶液状态;再向小瓶中加入 $30 \mu\text{L}$ 三乙胺,此时用 pH 试纸测体系的 pH 约为 7.0,静置 5min 后观察到体系又形成了凝胶状态。以上过程验证了基于可逆的动态共价键制备的水凝胶,存在凝胶-溶胶的相互转变,并且可以转变数次反复进行。随着转变次数的增加,体系中凝胶因子的浓度降低,交联能力下降,最终不再具有 pH 响应性的变化。转变的次数由开始制备水凝胶中的凝胶因子浓度决定,本实验体系中固含量为 10% 时可以实现 5 次凝胶-溶胶相互转变。

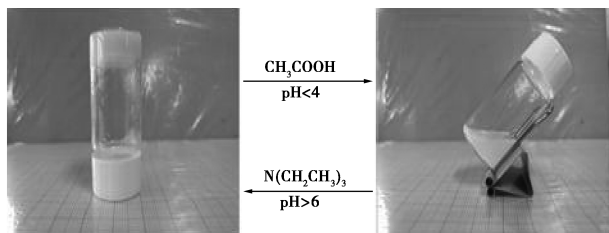


图 11 凝胶-溶胶相互转变关系图

3 结论

本研究以带有部分醛基的海藻酸和聚乙二醇-

二苯甲酰肼为原料,利用可逆动态共价酰肼键的特点,制备得到具有较高的弹性和 pH 响应性的水凝胶。该水凝胶可以在温和的生理条件下实现数次的凝胶-溶胶之间的相互转化,这种具有多次响应性水的水凝胶在药物运载、器官修复等方面具有潜在的应用价值。同时,该水凝胶是以优良的生物相容性海藻酸和聚乙二醇为原料制备而得,因而有望应用于可注射性细胞工程支架和药物释放等智能材料中。

参考文献

- [1] Rasmussen M R, Snabe T, Pedersen L H. Numerical modeling of insulin and amyloglucosidase release from swelling Ca-alginate beads[J]. *Journal of Controlled Release*, 2003, 91(3): 395-405.
- [2] Mladenovska K, Raicki R S, Janevik E I, et al. Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from chitosan-Ca-alginate microparticles[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 342(1-2): 124-136.
- [3] Hall K K, Gattas-Asfura K M, Stablfr C L. Microencapsulation of islets within alginate/poly(ethylene glycol) gels cross-linked via staudinger ligation[J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(2): 614-624.
- [4] Miao T X, Rao K S, Spees J L, et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through alginate-graft-poly(ethylene glycol) microsphere-mediated intracellular growth factor delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 192: 57-66.
- [5] Jeon O, Samorezov J E, Alsberg E. Single and dual crosslinked oxidized methacrylated alginate/PEG hydrogels for bioadhesive applications[J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(1): 47-55.
- [6] Sun J Y, Zhao X H, Llleperuma W R K, et al. Highly stretchable and tough hydrogels[J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 133-136.
- [7] Balakrishnan B J, Jayakrishnan A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(18): 3941-3951.
- [8] Han X J, Dong Z Q, Fan M M, et al. pH-induce shape-memory polymers [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2012, 33(12): 1055-1060.
- [9] Ding F Y, Wu S P, Wang S S, et al. A dynamic and self-crosslinked polysaccharide hydrogel with autonomous self-healing ability[J]. *Soft Matter*, 2015, 11(20): 3971-3976.
- [10] Deng G H, Tang C M, Li F Y, et al. Covalent cross-linked polymer gels with reversible sol-gel transition and self-healing properties[J]. *Macromolecules*, 2010, 43(3): 1191-1194.
- [11] 张鸿鑫, 鲁路, 李立华, 等. 海藻酸动态共价交联水凝胶的制备及其自愈合性能[J]. *高分子学报*, 2016(3): 368-374.
- [12] Wu N Q, Pan C Y, Zhang B J, et al. Preparation and properties of a thermo-sensitive hydrogel based on oxidized sodium alginate[J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2007, 6: 497-502.

收稿日期: 2018-01-21