

庚酰化乙二醇壳聚糖温敏性水凝胶的制备及其药物缓释研究

李静

齐鲁制药(海南)有限公司, 海南 海口 570000

摘要: 目的: 通过制备和研究庚酰化乙二醇壳聚糖温敏性水凝胶, 探索其在药物缓释领域的应用潜力, 为相关领域的研究和实践提供有价值的参考。方法: 以水溶性乙二醇壳聚糖(GC)为基础材料, 通过酰化改性技术在GC的分子链上引入了疏水性庚酰基团。采用试管倒置法进行测试验证和评估这种改性后的水凝胶(HAGC)的温敏-性能, 调整庚酰度和溶液浓度调控 HAGC 水凝胶的溶胶-凝胶转变温度。通过流变学测试, 分析不同庚酰度和溶液浓度下HAGC 水凝胶的粘度、流动行为等特性。利用扫描电子显微镜(SEM)等微观表征手段观察了水凝胶的内部结构和表面形貌。通过模拟药物释放实验, 评估不同庚酰度和溶液浓度下水凝胶的药物释放速率和效率。结果: HAGC 在室温下液态, 37°C时通过氢键和疏水作用转变为凝胶, 形成物理交联框架。其温度敏感性和高粘弹特性适合体温下原位凝结, 低浓度适应生物体需求。提高庚酰度使 HAGC 水凝胶结构紧凑, 孔径减小, 交联密度增加, 溶胀比降低, 生物降解速率增强。水凝胶有效控制药物释放, 吉西他滨释放周期长达 5 天, 效率高达 70%至91%。结论: HAGC 水凝胶具有优异的温敏性和药物缓释性能, 为药物缓释系统的发展提供了新的思路和方法。

关键词: 乙二醇壳聚糖; 温敏性水凝胶; 药物缓释

水凝胶为吸水性强的三维亲水聚合物基质^[1], 其独特的物理及化学属性, 诸如隔热性、高比表面积和透气能力, 被广泛认为是一种既柔软又具应变能力的高分子材料。该材料在药物释放系统、吸水剂以及组织修复技术等多个领域展现出了极大的应用潜力。合成此类材料时, 可采用自然来源的聚合体, 也可使用人造合成聚合体, 其中天然来源的多糖类物质因其优良生物兼容性、生物可分解性和生物识别能力而被广泛利用。特别是乙二醇改性的壳聚糖(即乙二醇壳聚糖, 简称GC), 作为水溶性壳聚糖衍生物, 常用作生医用水凝胶的材料^[2]。温敏水凝胶由互排斥的疏水与亲水段营构而成, 能够随着外部温度的变化通过内在结构调整实现物质属性的转换, 这种溶胶至凝胶的转变对温度的响应迅速而方便, 可根据需要调节。多年来, 研究人员针对温敏水凝胶在药品输送、血管栓塞材料以及抗菌层等生物医学用途方面进行了深入的研讨与探索^[3]。

为进一步探讨 GC 在药品运输系统中的应用范围, 可通过酰化反应对其基本结构进行调整。本研究通过使用庚酸酐来对 GC 骨架进行酰化修饰, 通过酰胺连接

反应在其上引入疏水性的庚酰基团, 研制出控制庚酰化度(DS)的庚酰化乙二醇壳聚糖(缩写为HAGC)的简易一步合成策略。与其他温敏系统的传统制备方式相比较, HAGC 的特殊之处在于其独到的溶解特性和促使溶胶至凝胶相变行为的提高, 使得 HAGC 在生理 pH 水平下维持为液态, 能在人体温度条件下, 无须添加任何化学型交联剂自发形成一凝固的透明凝胶体^[4], 极适合作为可注射型药物输送系统, HAGC 水凝胶的温度敏感性通过试管倒置法予以检验。本文深入剖析了经特别改性反应生成的温敏水凝胶材料的性能及其在医药运输上的应用潜能, 并对其作为药物载体可能的未来应用进行了深入的讨论。

1 资料与方法

1.1 试剂与仪器

乙二醇壳聚(纯度为 60%), 庚酸酐(纯度>97%), 无水甲醇(纯度>99.5%), 吉西他滨(纯度>99%)。

1.2 水凝胶的制备

使用 FA2004 型精密电子天平称量 0.25 克乙二醇壳聚糖, 转移到烧杯中, 加入 25 毫升脱离子水, 搅拌

直至壳聚糖彻底溶解，倒入等体积的无水甲醇 25 毫升，进一步稀释，并在常温下持续搅拌 15 至 20 分钟。根据庚酸酐与乙二醇壳聚糖上氨基的预设摩尔比，量取 0.050 至 0.065 毫升的庚酸酐，利用 HJ-4A 型磁力搅拌器缓缓向溶液中滴加，持续反应 24 小时以确保反应彻底。反应完成后，将产物转入分子量截留范围为 8 至 14kDa 的透析袋中，使用脱离子水进行 48 小时透析，移除未反应的残余物质和副产物。透析后，使用 FD-1 型裂解干燥机进行冻干处理得到 HAGC。将一定量的 HAGC 置于血清瓶中，加入 1ml 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4, 并浓度为 0.01M)，通过 TDZ4-WS 型振荡器震荡 5 至 10 分钟并在 4℃ 下冷藏溶解，制备出不同质量百分比 (5%wt、4%wt、3%wt、2%wt) 的水凝胶样品。

1.3 测试与性能表征

利用傅立叶变换红外光谱仪 (FTIR) 对 HAGC 样本进行了红外光谱分析。将 HAGC 样本与溴化钾 (KBr) 的混合物研磨至均质，压制成薄片。薄片被置于光谱仪中进行扫描，其扫描频率范围设定为 4000 至 500 cm^{-1} ，累计扫描次数为 32 次，且设置分辨率为 4 cm^{-1} 。为得到 HAGC 的 ^1H NMR 光谱图，将其样本溶解在重水 (D_2O) 中，配置为 1.0% 的溶液质量比。该溶液经由核磁共振氢谱仪检测，仪器的条件设置在 400 兆赫。采用试管倒置法对 HAGC 水凝胶的 sol-gel (溶胶-凝胶) 转变温度进行测定。HAGC 样本溶解于磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 值为 7.4, 0.01mol/L) 中，配制出不同质量比 (5%wt、4%wt、3%wt、2%wt) 的溶液，这些溶液被放置于恒温孵育容器中进行加热 (加热速率为每分钟 0.2℃)。过一段时间后，将试管取出并倒置以观察内部溶液是否流动。如果其在倒置状态下保持不动持续 30 秒，该温度便被认为是凝胶化温度 (T_{gel})。为了获取准确值，此操作重复三次，并取平均温度值。

通过旋转流变仪，对 HAGC 溶液在 5 至 45℃ 温度范围内的储能模量 (G') 与损耗模量 (G'') 进行测量。实验条件为频率设定在 1hz，应变率为 0.1%。储能模量与损耗模量的交点被定义为凝胶转变温度 (T_{gel})。为进一步评估水凝胶的吸水性，对 HAGC 干燥样品进行准确称重，然后将其浸入 PBS 缓冲液中，在 37℃ 的环境下测试其吸水能力。按设定时间将样品取出，在移去

表面 PBS 后再称量。使用场发射扫描电镜 (FE-SEM) 观察 HAGC 水凝胶的微观结构。将水凝胶样品经冷冻干燥处理一天后，使用液氮淬冷，制备成薄片进行电镜镀膜，之后观察其微观结构。同时对 HAGC 水凝胶的生物降解能力进行了评估，将制备的 HAGC 水凝胶样品冷冻干燥后称重，将其至于含有 10mg/ml 溶菌酶的 PBS 溶液中。隔 48 小时替换一次溶液。在预定时间内将水凝胶取出、用去离子水清洗并重复冷冻干燥和称重的过程。

通过紫外-可见吸收光谱 (UV-Vis) 评估 HAGC 水凝胶作为药物载体释放吉西他滨的性能，以 4.0%wt HAGC 溶于含 10mg/ml 吉西他滨的 PBS 缓冲液中，在 4℃ 条件下溶解，制备出载药的水凝胶。该水凝胶被转移到含 30 毫升 PBS 的容器中，放置于 37℃ 的恒温水浴中，以 20 转/分钟的速度振荡培养。定期取出 1ml PBS 溶液以测量，同时补充等量的新鲜 PBS，以此过程继续。通过 UV-Vis 光谱法测定被吸取 PBS 中的药物浓度，并以此数据绘制药物释放曲线。

2 结果

2.1 HAGC 的合成与表征

图 1 呈现了 HAGC 制备的工艺路线，表 1 详细记录了配比方案。指定的配比方案将庚酸酐和乙二醇壳聚糖氨基端的摩尔比限定在 0.20 至 0.25 之间，通过控制此比例，合成出庚酰化度不同的 HAGC—HAGC1、HAGC2 以及 HAGC3。观察到，当摩尔比提高时，所得 HAGC 的庚酰化度 (DS) 也随之提升，其范围介于 26% 到 32%。这些 HAGC 样品的产率一般维持在 85% 到 90%。图 2 呈现了原壳聚糖 (GC) 与各种庚酰化配比的 HAGC 样品的傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 分析结果。

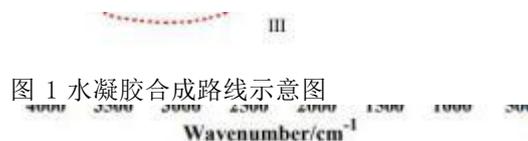


图 1 水凝胶合成路线示意图

图 2 FTIR 谱图表 1 HAGCs 的合成配比

Sample	Molar ratio	DS (%)	Yield (%)
HAGC1	0.20:1	26.4	86.3
HAGC2	0.22:1	29.6	89.9
HAGC3	0.24:1	31.3	87.0

图 3 展现了 GC 及其庚酰化衍生物 HAGC 的 ^1H NMR 光谱。所有谱图中，溶剂重水 (D_2O) 的氢原子吸收显示于化学位移 $\delta = 4.65$ 处，该峰定为参考峰。

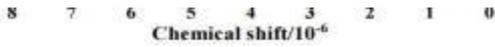


图 3 ¹H NMR 谱图

2.2 HAGC 水凝胶的温敏性溶胶-凝胶转变

将疏水性庚酰基团嫁接至 GC 骨架，获得温敏性的庚酰化乙二醇壳聚糖 (HAGC)，该材料具备溶胶至凝胶的温度响应相变特性，温度的提升促成 HAGC 分子间通过氢键与疏水互作形成物理交联网络，导致其由液态的溶胶转变为固态的凝胶，见图 4。

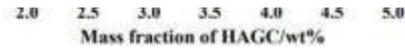


图 4 溶胶-凝胶转变相图

2.3 HAGC 水凝胶的流变性能

图 5 描绘了 HAGC 水凝胶储存模量 (G') 与损耗模量 (G'') 如何随温度改变而变化，展示了该水凝胶体现出的流变特性对温度的敏感性。

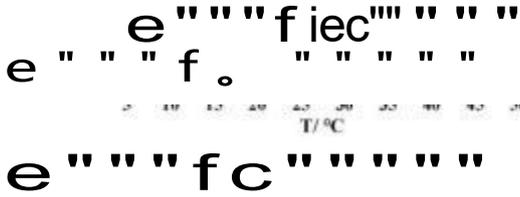


图 5 HAGCs 水凝胶的温度依赖性流变行为

2.4 HAGC 水凝胶的溶胀性能

HAGC 水凝胶展示出的吸水特性归因于聚合物骨架挂载的亲水性基团。通过测定材料在达到溶胀平衡之前后重量的变化，计算其溶胀比 (S_w)。根据图 6 所示，随时间推移，HAGC 水凝胶的 S_w 值呈逐步升高趋势，最终趋于稳定。在初始 4 小时内，溶胀比例迅猛攀升 ($S_w > 25$)，进入后期，溶胀速率显著放缓，趋近于零。



图 6 水凝胶的溶胀速率图

2.5 HAGC 水凝胶的体外降解

图 7 展示了 HAGC 水凝胶在溶菌酶溶液中的体外降解情况。



图 7 水凝胶的体外降解图

2.6 HAGC 水凝胶的体外药物释放

图 8 呈现了在体外 37°C 条件下，HAGC 水凝胶中吉西他滨释放率的时间相关变化，由于其多孔特性，HAGC 水凝胶适用于包裹水溶性药物，据此进行了吉西他滨的体外释放实验。



图 8 体外药物释放曲线

2.7 HAGC 水凝胶的药物释放动力学

速率常数由 k 表示，而释放指数由 n 表征。当 n 的值小于 0.5 时，释放行为可划归为伪菲克扩散 (pseudo-Fickian diffusion)，而释放过程的曲线呈现出与 Fickian 曲线相似的特性。此类释放通常表现为药物通过扩散作用释放，达到平衡状态的速度较慢。正如表 2 中所揭示的，所有水凝胶的 n 值均介于 0.20 到 0.36 之间，归属于伪菲克扩散机制。

表 2 HAGC 水凝胶对吉西他滨的释放机制

Sample	k	N	Release characteristics
HAGC1	0.44	0.20	pseudo-Fickian
HAGC2	0.46	0.23	pseudo-Fickian
HAGC3	0.51	0.36	pseudo-Fickian

3 讨论

HAGC 光谱展示了在 3400cm^{-1} 位置的宽峰，此为羟基和氨基的伸缩振动重叠。在 2890cm^{-1} 与 1596cm^{-1} 的峰分别代表了 GC 中甲基和氨基的弯曲振动。相较于 GC 光谱，HAGC 在 1655cm^{-1} 和 1555cm^{-1} 处新增了吸收区域，这分别对应酰胺键 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动及酰胺 II 带的弯曲振动。FTIR 光谱分析显示，在 1555cm^{-1} 处的酰胺 II 带的出现及 1596cm^{-1} 的氨基振动峰的消失，这两个变化标志了 HAGC 的成功合成。3.0 至 4.0 δ 的重叠峰显现了 GC 和 HAGC 分子上的吡喃环葡萄糖单元中的 H2 至 H8 氢原子的信号，初级胺基残留的质子峰位于 2.65 δ ，GC 中乙酰基的甲基质子则于 2.0 δ 处形成峰值。相较于 GC 光谱，HAGC 的光谱中新增了四组信号峰，这些新增峰位对应于甲基氢的新信号及己酰基特征峰，进一步印证了己酰基化反应的顺利完成，HAGC 光谱中 2.65 δ 处的初级胺基质子峰的消失，表明胺基已参与化学反应。¹H NMR 谱的结果对庚酰酐与 GC 分子链胺基的酰胺键形成反应进行了验证，通过比较 2.2 δ 的庚酰基峰与 3.0 至 4.0 δ 之间吡喃环葡萄糖的氢原子峰的面积，可计算 HAGC 的庚酰化程度。

生物组织的物质交换与功能维持依赖于三维结构及其孔隙性，这些特征为药物携带、细胞迁徙、血管新生以及营养成分和代谢产物的扩散提供了必要空间^[5]。通过观察不同庚酰化程度下相等浓度的 HAGC 水凝

胶, 发现其展现了三维微孔结构, 孔径分布介于 60 至 250 μm , 并且孔隙相互连通。孔径与 HAGC 水凝胶的庚酰化程度成反比, 主要是由于庚酰化程度提高时, 水凝胶的交联密度随之上升, 内部构建的交联点增加, 孔隙数量上升, 同时交联点间的距离缩减, 孔径相应减小。大孔径对物质的循环与交换较为有利, 故 HAGC1 水凝胶在物质传输方面可能更为高效, 这种多孔结构赋予了 HAGC 水凝胶在吸收水分及在物质交换和药物载体领域的应用中具备特殊的优越性^[6]。

通过试管倒置法测得具有不同庚酰化程度的 HAGC1、HAGC2、HAGC3 水凝胶样本的凝胶化温度 (T_{gel}), 发现通过调整 HAGC 的庚酰化程度和溶液浓度, 可以有效地控制 T_{gel} 。对于特定庚酰化水平的 HAGC 样本, 随着浓度的增加, T_{gel} 表现出降低的趋势。例如, HAGC3 的 2%wt、3%wt、4%wt 和 5%wt 重量溶液, 其 T_{gel} 分别是 47 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、31 $^{\circ}\text{C}$ 和 27 $^{\circ}\text{C}$ 。以 HAGC3 样品为例, 所制备的 2%wt、3%wt、4%wt 以及 5%wt 溶液, 其凝胶化温度 (T_{gel}) 依次为 47 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、31 $^{\circ}\text{C}$ 和 27 $^{\circ}\text{C}$ 。观察到, 在保持相同重量百分比的情况下, 庚酰化程度较高的 HAGC 溶液表现出更低的 T_{gel} ; 例如, 在 4%wt 浓度下, HAGC1、HAGC2 和 HAGC3 的 T_{gel} 分别为 40 $^{\circ}\text{C}$ 、34 $^{\circ}\text{C}$ 和 31 $^{\circ}\text{C}$ 。实验还发现, HAGC 材料在升温时, 会发生从液态到凝胶态的相变, 并且该相变具有可逆性—即当温度下降时, 固态的凝胶能够重返液态的溶胶形态。这种突出的温度敏感性使 HAGC 适用于药物递送场景, 如将 HAGC 溶液注射入模具中并加热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 使 3% 的 HAGC3 溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下变为凝胶状态, 有望在目标区域形成有效的药物释放系统^[7]。

对 HAGCs 样本在 3wt% 和 4wt% (PBS 溶液) 的浓度下进行了储能模量 (G') 与损耗模量 (G'') 随温度变化的测试。在初始温度下, 即低于 T_{gel} 时, G' 小于 G'' , HAGCs 处于流动的液体状态, 并未发生溶胶向凝胶的状态转变。然而, 随着温度的提升至特定点, G' 开始急剧上升并与 G'' 相交, 标志着由溶胶到凝胶状态的转变现象, 此时的相交点为 T_{gel} 。从所呈现的数据图表可见, HAGC2 样本在 3wt% 和 4wt% 浓度下的 T_{gel} 分别是 41.0 $^{\circ}\text{C}$ 和 33.2 $^{\circ}\text{C}$, 对于 HAGC3 样本, 相应 T_{gel} 值为 37.3 $^{\circ}\text{C}$ 和 31.5 $^{\circ}\text{C}$, 与采用试管倒置法得到的数据具有一致性。

经过 24 小时在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的浸泡, HAGC1、HAGC2 以及 HAGC3 水凝胶的溶胀率 (S_w) 达到最大值, 分别为 9.71、8.32、6.36。这一现象揭示了 HAGC 水凝胶适度

吸收并保留水分的能力。研究表明, 具有不同度酰化水平 (DS) 的 HAGC 水凝胶, 展现出不同的吸水特性。具体而言, DS 较低的海 AGC1 比 DS 较高的 HAGC2 和 HAGC3 呈现出稍高的 S_w 值。DS 增加导致更高的交联密度和羰基增多, 增强了疏水作用, 结果是水凝胶的吸水速度和溶胀率有所下降。HAGC 水凝胶达到吸水平衡的时间和 S_w 可以通过调整其交联程度来精准控制, 从而生成可在广泛范围内调节溶胀特性的水凝胶。适宜的 S_w 对于维持正常眼压至关重要, 这一特性不仅对固定视网膜位置具有重要作用, 还是实现药物释放速率控制的关键变量。

随着暴露时间的增加, 水凝胶分子结构逐渐被溶菌酶侵蚀, 导致 HAGC 水凝胶的降解程度持续上升。研究显示, 在庚酰化程度增高的情况下, 不同配方的 HAGC 水凝胶表现出逐步增加的降解率。统计数据显示, 在 48 小时测试周期内, HAGC1、HAGC2、HAGC3 样本的最高降解率分别达到了 79.5%、88.2% 和 96.0%。由于庚酰化葡糖胺对溶菌酶具有较高的敏感性, HAGC3 样本在具有更高庚酰化程度下显示出最迅速的降解特性。通过调整水凝胶的庚酰化水平, 可以有效操控水凝胶的生物降解速率和程度, 提高 HAGC 水凝胶的生物降解性能。

HAGC 水凝胶因其多孔性质, 适用于包裹水溶性药物。将吉西他滨载于 HAGC 水凝胶中, 探索体外药物释放行为。实验初期, 水凝胶迅速释放吉西他滨, 释放率不超过 25%, 有助于抑制病原体增长。时间延长后, 内部药物缓慢递出, 水凝胶内外浓度差异缩小, 导致释放速率下降。24 小时以后, 药物的释放速度进一步放慢, 尽管如此, 释放过程依旧在以较低的速度继续, 药物释放率逐步升高并最终趋于稳定。随着庚酰化程度的上升, 药物释放率有所下降, 这可归因于高庚酰化水平带来的更高交联密度和更紧密的结构, 限制了药物分子的外扩散。当吉西他滨释放达到平衡状态时, HAGC1、HAGC2 和 HAGC3 水凝胶的释放率分别为 91%、83% 和 70%, 能持续作用至 5 日, 显示出 HAGC 水凝胶在减缓释放方面的能力, 这种对温度敏感的可注射 HAGC 水凝胶在药物递送系统方面展现出广阔的应用前景。

研究发现, HAGC 溶液在常温下呈现液体状态, 升温至 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, 通过氢键结合及亲疏水相互作用转化为凝胶状, 形成了物理交联网络。该温敏水凝胶展现了卓越的粘弹性质, 可于体温环境中实现原位成胶, 且

其所需的低浓度有利于生物体内使用。随着庚酰度的上升, HAGC 水凝胶表现出更紧密的三维多孔网络, 孔径减小, 交联点增多, 降低了其溶胀比率, 提升了生物降解性。水凝胶亦显示出延缓药物释放的能力; 以吉西他滨为例, 可以实现长达五天的持续释放, 释放

率介于 70%至 91%之间。因其具备低成胶浓度、响应温度变化、生物相容、精细的孔隙结构与缓释药物效果等特性, HAGC 水凝胶被视为药物输送系统中的理想材料, 其在药物递送领域有着广泛应用潜力, 因此未来应针对其应用转化进行深入研究。

参考文献

- [1] KADRI R,BACHAROUCHE J,ELKHOURY K,et al.Role of active nanoliposomes in the surface and bulk mechanical properties of hybrid hydrogels[J].Materials Today Bio,2020,6:100046.
- [2] WANG Y,WU Y,LONG L,et al.Inflammation-Responsive Drug-Loaded Hydrogels with Sequential Hemostasis,Antibacterial,and Anti-Inflammatory Behavior for Chronically Infected Diabetic Wound Treatment[J].ACS applied materials&interfaces,2021,13(28):33584-33599.
- [3] MISHRA B,UPADHYAY M,ADENA S K R,et al.Hydrogels:an introduction to a controlled drug delivery device,synthesis and application in drug delivery and tissue engineering[J].Austin J Biomed Eng,2017,4(1):1037-1049.
- [4] HADDOW P,MCAULEY W,KIRTON S,et al.Poly (N-isopropyl acrylamide)-poly (ethylene glycol)-poly (N-isopropyl acrylamide)as a thermoreversible gelator for topical administration[J].Materials Advances,2020,1(3):371-386.
- [5] 石士慧,潘卫东. 盐酸吉西他滨壳聚糖纳米粒的制备及其体外释药特性研究 [J]. 中国新药杂志,2011,20(23):2372-2376.
- [6] 许超. 吉西他滨水凝胶的设计合成及其在胰腺癌的抗癌效果研究[D]. 天津医科大学,2016.
- [7] 李征征,徐子扬,高留意,等. 温敏性乙二醇壳聚糖水凝胶的制备及药物缓释性能[J]. 高等学校化学学报,2016,12:2299-2305.