

交联透明质酸凝胶薄膜的制备和性能表征

聂素云^{1,2}, 卢文庆^{1,2}, 邹孔标^{1,2}

(1 江苏省生物医药功能材料工程研究中心, 江苏 南京 210097; 2 南京师范大学 化学与环境科学学院, 江苏 南京 210097)

[摘要] 用己二酸二酰肼 (ADH) 对透明质酸 (HA) 进行化学修饰, 研究不同交联程度 HA-ADH 的理化性质. 用溶剂挥发法制备出 HA-ADH 薄膜. 经差示扫描量热仪 DSC 分析得知, 交联后产物的微观结构发生了明显改变. 该薄膜在缓冲溶液 中发生溶胀, 有很强的吸水能力, 扫描电镜 SEM 图显示溶胀的薄膜呈现高度多孔的网状结构. 粘度法测定 HA 和 HA-ADH 的特性粘数 $[\eta]$ 分别为 14.69 dL/g 和 20.21 dL/g. 改性后 HA-ADH 薄膜的溶解性比 HA 薄膜的溶解性能明显降低, 可使得高聚物在体内的存留时间增长.

[关键词] 交联透明质酸, 薄膜, 特性粘数, 吸水能力

[中图分类号] O629.12 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1672-1292(2007)01-0054-05

Preparation and Characterization of Cross-linked Hyaluronan Hydrogel Films

Nie Suyun^{1,2}, Lu Wenqing^{1,2}, Zou Kongbiao^{1,2}

(1 Jiangsu Engineering Research Center of Bio-Medical Functional Materials

2 School of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract Hyaluronan (HA) was chemically modified with adipic dihydrazide (ADH), and physicochemical properties of the different cross-linked density HA-ADH were studied. HA-ADH films were prepared with a solvent evaporation method. After cross-linking, differential scanning calorimetric analysis indicated that microstructure of the product was obviously altered. The dried film had strong ability of water uptake, and a highly porous network structure was detected by scanning electron micrograph after the film swelled in buffer. Intrinsic viscosity $[\eta]$ was measured with viscosity method, and $[\eta]$ of HA and HA-ADH are 14.69 dL/g and 20.21 dL/g, respectively. There was a notable decrease in solubility of HA-ADH film, compared with HA film, which could prolong the reservation time of the polymer in vivo.

Key words cross-linked hyaluronan, film, intrinsic viscosity, water uptake ability

0 引言

透明质酸 (Hyaluronan, HA) 是由 β -1,3-糖苷键连接的葡萄糖醛酸及 β -1,4-糖苷键连接的乙酰氨基葡萄糖交替组成的直链聚合物, 分子结构如图 1 所示. 其分子中含有大量的羧基和羟基, 通常是化学修饰的主要部位. HA 是构成玻璃体、皮肤、关节滑液和软骨组织的重要成分, 参与多种细胞活动和生理过程^[1]. 它具有良好的保湿性、润滑性、粘弹性、非免疫原性, 所以在临床上被广泛应用于眼科手术、骨性关节炎 (OA) 和类风湿性关节炎 (RA) 治疗、预防术后粘连以及作为眼科和皮肤外用药物载体.

天然 HA 水溶性极强, 在组织中易扩散和降解, 体内存留时间较短, 在应用上受到限制. 对 HA 衍生物的大量研究表明, HA 经修饰后可改变其溶解性, 在保留生物相容性的同时, 可抗酶降解, 延长了其在体内的存留时间. Yi Luo 等^[2,3]将 HA 的酯化衍生物应用于研究制备靶向和控释药物, 取得了较长时间的缓释效果.

收稿日期: 2006-06-06

基金项目: 江苏省生物医药功能材料工程研究中心 (JHJ03-008) 资助项目.

作者简介: 聂素云 (1977-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物医药功能材料的学习与研究. E-mail: nschs@126.com

通讯联系人: 卢文庆 (1953-), 教授, 主要从事材料化学的教学与研究. E-mail: lwenqing@njnu.edu.cn

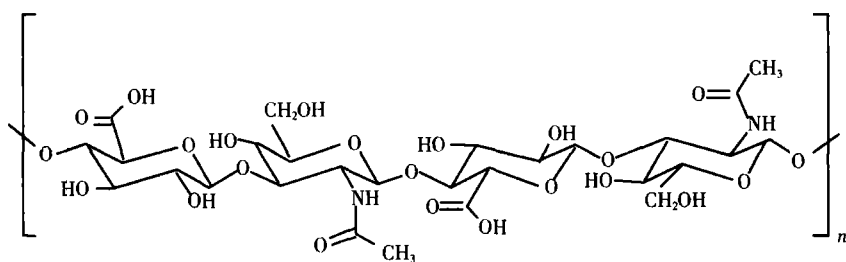


图1 透明质酸的分子结构
Fig.1 Structure of HA molecule

Y iLuo等^[4]对聚乙二醇交联的 HA 衍生物的制备、应用和体外降解进行了研究; 贺艳丽、陈建英等^[5]对以己二酸二酰肼 (ADH) 为交联剂的 HA 衍生物 (HA-ADH) 的生物相容性进行了研究, 结果显示该衍生物有良好生物相容性, 可以作为可降解性植入材料. 本文研究用 ADH 对 HA 进行化学修饰, 测定产物的特性粘数, 制备不同交联程度的 HA-ADH 薄膜, 研究溶胀薄膜的表面形貌、吸水能力、热稳定性等理化性质, 为产物的临床应用提供理论依据.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

试剂: 透明质酸钠盐 (HA, 福瑞达生物化工有限公司); 乙基 (*N,N*-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC I, 四川琢新生物材料研究有限公司, 分析纯); 己二酸二酰肼 (ADH, 海曲化工有限公司, 分析纯); 其他试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水.

仪器: DC-2 600低温恒温槽; S-212 电动恒速搅拌器; DZF-3型真空干燥箱; 电子分析天平 (上海天平仪器厂); JEOL JSM-5610LV 型扫描电子显微镜 (SEM); Peak in-E lmer Thermal Analysis Diamond 差示扫描量热仪 (DSC); Ubbelohde 粘度计; 秒表; 聚四氟乙烯培养皿 (自制).

1.2 实验方法

1.2.1 HA-ADH 膜的制备

用溶剂挥发法制备 HA-ADH 薄膜. 取一定量的 HA 溶于二次水中配成质量百分比浓度为 0.5% 的溶液, 按一定物质的量之比 ($n(\text{羧基}): n(\text{ADH})$) 加入 ADH, 置于三颈瓶中搅拌均匀. 滴加 0.1 mol/L HCl 调节体系 pH 至 4.7, 加入定量的 EDC I 固体, 用 0.1 mol/L HCl 保持反应液 pH 为 4.7, 室温下快速搅拌. 反应至 pH 不再变化时, 用 0.1 mol/L NaOH 调至 pH 为 7.0 时停止反应^[6]. 将混合液用 0.1 mol/L NaCl 溶液进行渗析, 接着用二次水渗析, 提纯后将溶液倾入聚四氟乙烯培养皿中, 室温成膜.

1.2.2 特性粘数的测定

用 Ubbelohde 粘度计 (毛细管直径 $\phi = 0.5 \sim 0.6 \text{ mm}$) 测 HA 的特性粘数 $[\eta]$ ^[1]. 25℃ 时, 0.2 mol/L NaCl 溶液的流出时间为 86.60 s. 配制 4 种不同浓度的 HA 溶液, 以 0.2 mol/L NaCl 为溶剂, 各溶液于室温下磁力搅拌 24 h, 在 25℃ 下分别测定它们的流出时间. 以比浓粘度 η_{sp}/C_i 为纵坐标, C_i 为横坐标作图, 该回归直线外推至 $C_i = 0$ 时与纵轴的截距为特性粘数. 再根据 Mark-Houwink 方程: $[\eta] = 3.6 \times 10^{-4} M_{\eta}^{0.78}$, 求出 HA 的粘均相对分子质量 M_{η} ^[1].

产物 (HA-ADH) 的特性粘数测定同上所述. 为了确定产物的浓度, 取 3 mL 产物溶液先用红外干燥除去大部分溶剂, 再置于真空干燥箱中干燥至恒重, 称重, 由此求得产物的浓度^[7].

1.2.3 薄膜的热分析

用差示扫描量热仪分别对 HA 和 HA-ADH 薄膜进行 DSC 分析. 实验条件为: 温度范围 25~400℃, 升温速率 10℃/min, 氮气气氛, 样品质量为 5 mg, 参比物为 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$.

1.2.4 扫描电镜观察表面形貌

将 HA 凝胶薄膜浸于含 20 mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 的称量瓶中, 于 37℃ 下恒温 3 d 取出后于 -20℃ 冷冻 12 h, 然后冻干. 为使样品导电, 将样品镀金, 用 SEM 分别观测干态、溶胀薄膜的表面形貌.

1. 2. 5 薄膜的吸水性能测试

通过重量的变化评价薄膜的吸水能力^[8]. 称取一定重量 (W_0) 的完全干燥的薄膜, 大小为 $1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$. 将此薄膜浸入盛有 20 mL PBS 的称量瓶中, 于 37°C 下恒温. 每隔一定时间, 从溶液中取出薄膜, 用两片滤纸小心吸去表面的介质后, 称重 (W_t). 此过程不断重复, 直至恒重 (吸水达到平衡).

薄膜的吸水能力计算为: 吸水能力 ($\text{g 水} / \text{g 薄膜}$) = $(W_t - W_0) / W_0$. 式中, W_t 为 t 时刻溶胀薄膜的重量, W_0 为干燥薄膜的重量.

2 结果与讨论

2. 1 HA-ADH 膜的制备

用溶剂挥发法制备 HA-ADH 薄膜. 选择 HA 与 ADH 物质的量之比为 $1:10$ 和 $1:20$ 制备出两种不同交联程度的薄膜. 这两种膜柔软, 韧性适中. 当交联程度较大时, 膜的硬度增加, 韧性下降^[9]. 制备时使用了 ADH 小分子作交联剂, 为除去未反应的小分子和副产物, 对产物进行透析提纯. 成膜时, 考虑到产物有很强的粘附性, 将产物倾入聚四氟乙烯盘中成膜. 将约 20 g 溶液倾入大小为 $9\text{ cm} \times 9\text{ cm}$ 的盘中, 干燥后得到约 0.2 g 干燥薄膜, 用千分尺测量厚度为 0.26 mm .

2. 2 特性粘数

用粘度法测得特性粘数. HA 的 $[\eta]$ 为 14.69 dL/g 经过化学修饰后, HA-ADH ($1:10$)、HA-ADH ($1:20$) 的 $[\eta]$ 分别为 16.27 dL/g 20.21 dL/g 从图 2 可以看出, 比浓粘度与浓度存在较好的线性关系. 产物的 $[\eta]$ 增大, 原因是 HA 经修饰后, 使羧基变成酰胺基, 降低了亲水性; 另外, 经修饰后相对分子质量增加, 也使得特性粘数增大.

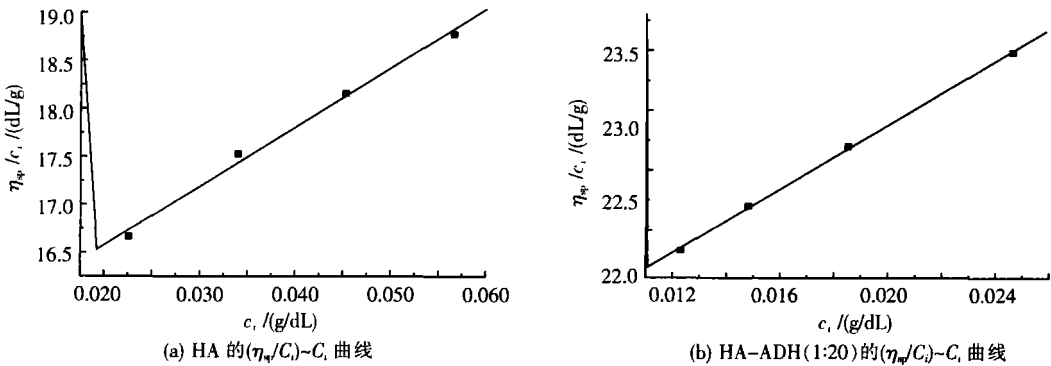


图 2 比浓粘度与浓度的关系

Fig.2 The relationship between η_{sp}/C_i and concentration

特性粘数与粘均相对分子质量的 Mark-Houwink 方程 $[\eta] = K M_n^\alpha$ 反映了高分子与溶剂分子之间的内摩擦, 式中 K 和 α 是与温度、溶剂及聚合物性质有关的常数, K 值受温度的影响较为明显; α 是与分子形状有关的经验常数, 主要决定于高分子线团在某温度下某溶剂中的舒展程度. 因此, 若知道 K 和 α 值即可根据所测的 $[\eta]$ 值计算试样的 M_n . 目前尚无 HA-ADH 的 Mark-Houwink 方程, 但根据产物的 $[\eta]$ 明显增大, 表明产物的粘均相对分子质量 M_n 应有所增加. 为了能大致知道 HA-ADH 的粘均相对分子质量, 考虑到实验中所用的温度、溶剂都与测定 HA 时相同, 因此用 HA 的 K 和 α 近似估算 HA-ADH 的 M_n . 根据 Mark-Houwink 方程计算 HA 的粘均相对分子质量为 8.3×10^5 , 近似估算的 HA-ADH ($1:10$)、HA-ADH ($1:20$) 的粘均相对分子质量分别为 9.3×10^5 和 12.3×10^5 . HA 经化学修饰后, 特性粘数和相对分子质量增加, 可以提高制剂的粘弹性, 降低高聚物的溶解性以及体内的代谢速度.

2. 3 薄膜的热分析

用 DSC 分析 HA 和 HA-ADH 薄膜的热性能, 如图 3 所示. DSC 图谱表明 HA 和 HA-ADH 都有明显的放热峰, 表明了两者是具有晶态结构的聚合物. HA 在结晶温度 $T_c = 239.8^\circ\text{C}$ 处出现放热峰, 而 HA-ADH 在 235.0°C 时有尖锐的放热峰, 放热峰的移动表明 HA 经交联成 HA-ADH 后, 聚合物的微观结构发生了改变.

考虑到医用材料在使用前可能用加热法灭菌消毒, 所以热稳定性是生物医用材料的重要特征. 可以看

出, HA 经改性后 T_g 略有下降, 但仍保持了较高的热稳定性.

2.4 薄膜的表面形貌

用 SEM 分别对干态及溶胀的 HA-ADH 薄膜进行表面形貌分析, 如图 4 所示. 其中 (a) 和 (c) 表明干态薄膜的表面光滑平整, 这说明在干态时膜的结构很紧凑. 而 (b) 和 (d) 显示当薄膜水化溶胀后, 出现明显规则的多孔结构, 孔与孔之间的相互连接构成复杂的网状结构. (b) 与 (d) 相比较, 孔径大小相当, 但是 (d) 的孔径大小比较规则、均匀. (d) 的微观结构用 SEM 测得的几何尺寸表示, 并由图像分析仪统计网孔平均孔径. 孔径大小范围为 38.4~78.2 μm , 孔径大小比较均匀, 测量周围相邻的 50 个孔的孔径大小, 统计结果表明平均孔径为 70.0 μm .

(d) 中网孔的平均孔径大小介于明胶-透明质酸海绵^[10]的平均孔径和壳聚糖-透明质酸海绵^[11]的平均孔径之间. 与用于人造皮肤的明胶-藻酸盐海绵^[11]相比较, 孔径的尺寸大小相当. 本实验中薄膜的制作工艺较简单, 不需要苛刻的低温条件 (-70°C) 和对生物体有毒的丙酮作溶剂.

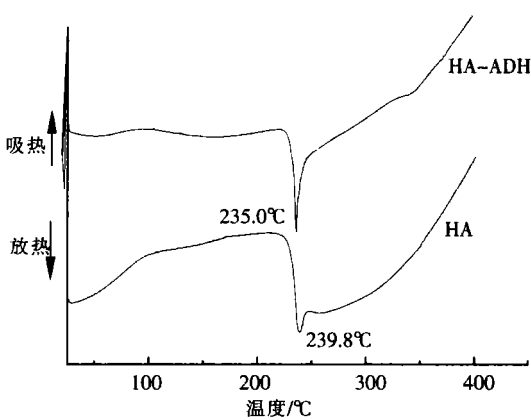


图 3 HA 和 HA-ADH 薄膜的 DSC 谱图
Fig.3 DSC spectra of HA and HA-ADH films

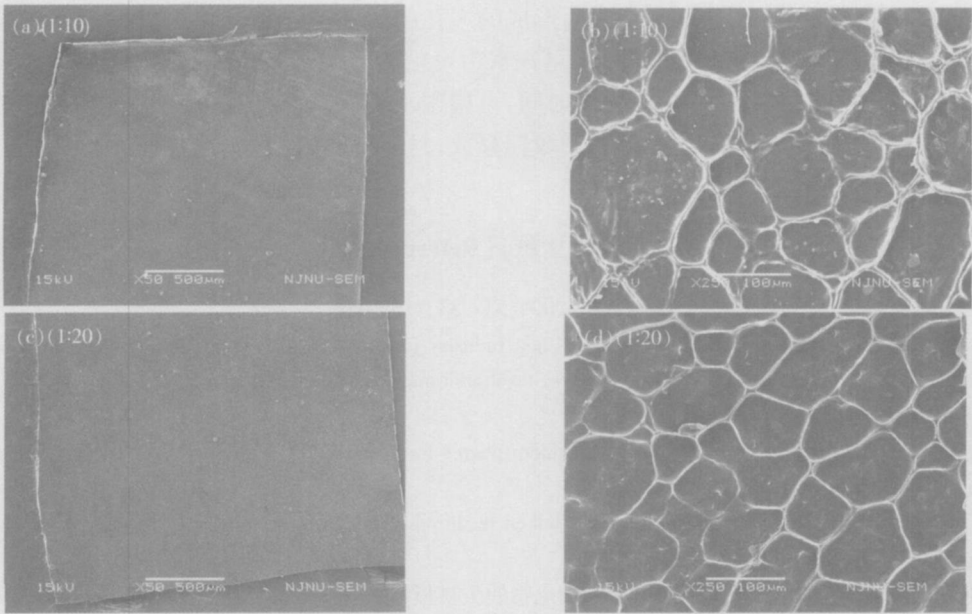


图 4 溶胀前 (a,c) 和溶胀后 (b,d) HA-ADH 薄膜的扫描电镜图
Fig.4 SEM images of HA-ADH films before (a,c) and after (b,d) swollen

2.5 薄膜的吸水能力

分别对不同交联程度的 HA-ADH 膜在 PBS 溶液中的吸水性能进行测试, 得吸水量 ($\text{g 水} / \text{g 薄膜}$) 随时间变化的曲线如图 5 所示. 曲线表明两种交联产物仍具有一定的吸水能力, 3 d 后这两种膜能吸附为自身重量 7~9 倍的水份. HA-ADH (1:20) 膜 3 d 后吸水基本达到平衡, 其质量为干燥薄膜质量的 7 倍. HA-ADH (1:10) 膜吸水量呈先增加后下降的趋势, 此膜最大吸水量为初始干燥薄膜的 10 倍, 薄膜的吸水量与壳聚糖-透明质酸海绵^[7]的吸水能力相当. 后一阶段 HA-ADH (1:10) 的吸水量下降, 可能是由于交联程度低, 膜溶解或降解的速率大于吸收水的速率, 从而造成总量减少. 从整体上看, 随着交联程度的提高, 薄膜的吸水能力下降, 溶解性降低. 这与 HA 和其他材料交联后, 吸水能力下降的性质相似.

交联结构的高聚物与溶剂接触时, 一方面溶剂力图渗入高聚物内使其膨胀; 另一方面, 由于交联高聚物膨胀导致网状分子链向三度空间伸展, 使分子网受到应力而产生弹性收缩能, 力图使分子网收缩. 当这两种相反的倾向相互抵消时, 达到了溶胀平衡, 吸收水的质量不再变化. 交联程度越大, 薄膜的吸水能力越小. 可能原因是: (1) HA 分子中存在大量的 $-\text{COOH}$ 及 $-\text{OH}$ 基团 (如图 1 所示), 使其具有较高的亲水性

能,经 ADH 化学修饰后 HA 分子中的一COOH 占的比例减少,降低了产物的亲水能力;(2)在相同条件下,增加交联剂的用量,使分子链之间的交联度增加,从而使溶胀比减小,吸水能力下降。

作为对照,分别将 HA、HA-ADH 薄膜放入 PBS 液中,磁力搅拌。HA 薄膜很快溶解,而交联后的薄膜 HA-ADH (1:20)在 PBS 溶液中放置 5 d 后,仍保持一定的形状,体积增大,发生了明显的溶胀现象。经剧烈搅拌后,得到无色、均一、透明的颗粒状凝胶。继续搅拌,1 d 后,颗粒状凝胶消失,得到均一透明的溶液。说明经改性后较大程度地降低了 HA 的溶解性能。

3 结论

用溶剂挥发法制备了 HA 凝胶薄膜。SEM 分析表明,干态薄膜的结构是紧凑的,溶胀后变成多孔的网状结构。经 DSC 热分析,HA-ADH 的放热峰发生了移动,说明 HA 转变成 HA-ADH 后微观结构发生了改变。HA-ADH 的 $[\eta]$ 为 16.27 dL/g 近似估算的粘均相对分子质量 M_n 分别达到 12.3×10^5 。3 d 后这两种膜能吸附自身重量 7~9 倍的水份,这与其交联后形成的多孔的三维网络结构有关。通过交联反应,将极易溶于水的 HA,改变成比较难溶于水的 HA-ADH,可在水中发生明显的溶胀现象。经过化学修饰,相对分子质量和特性粘数均增大,可以延长在体内的存留时间,可望用于关节组织的辅助治疗。薄膜柔韧性能好,呈多孔的网状结构,能否作为药物载体,用于药物的缓控释放,目前正在研究中。

[参考文献] (References)

- [1] 凌沛学.透明质酸[M].北京:中国轻工业出版社,2000:53-83,216-285
Ling Pekue Hyaluronic Acid[M]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 2000: 53-83, 216-285. (in Chinese)
- [2] Luo Y, Ziebell M R, Prestwich G D. A hyaluronic acid-taxol antibody conjugate targeted to cancer cells [J]. Biomacromolecules 2000, 1(2): 208-218
- [3] Yun Y H, Goetz D J, Yellen P, et al Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site specific targeting [J]. Biomaterials 2004, 25 (1): 147-157.
- [4] Yi Lu, Kelly R, Kierker Glenn D, Prestwich. Cross linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery [J]. Controlled Release 2000, 69: 169-184
- [5] 贺艳丽,陈建英,王玉玲,等.酰胺交联透明质酸衍生物的生物相容性[J].食品与药品,2005,7(8A):32-35.
He Yanli, Chen Jianying, Wang Yuling, et al The biocompatibility of the hyaluronan derivatives cross-linked by adipic dihydrazide [J]. Food and Drug 2005, 7 (8A): 32-35 (in Chinese)
- [6] Glenn D, Prestwich Dale M, et al Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications and biodegradation of hydrazide derivatives [J]. Controlled Release 1998, 53: 93-103.
- [7] Pablyana L R, Cunha Rondinelle R, Castro, Francisco A C, Rocha, et al Low viscosity hydrogel of guar gum: preparation and physicochemical characterization [J]. Biological macromolecules 2005, 37: 99-104.
- [8] Camen Remunan-Lopez, Rodniger. Mechanical water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan, glutamate and alginate films [J]. Controlled Release 1997, 44: 215-225.
- [9] Tian W M, Zhang C L, Hou S P, et al Hyaluronic acid hydrogel/Nogo-66 receptor antibody delivery system for the repairing of injured rat brain in vitro [J]. Controlled Release 2005(2): 13-22
- [10] 李承明.明胶基海绵的研究[J].明胶科学与技术,2003,23(1):24-26
Li Chengming The research of gelatin-based sponge [J]. The Science and Technology of Gelatin 2003, 23(1): 24-26 (in Chinese)
- [11] Young Seon Choi, Sung Ran Hong, Young Moo Lee. Study on gelatin-containing artificial skin. I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge [J]. Biomaterials 1999, 20: 409-417.

[责任编辑:严海琳]

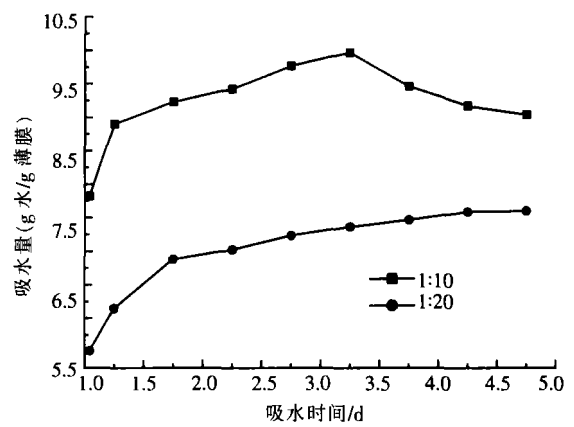


图 5 HA-ADH 薄膜的吸水能力

Fig.5 Water uptake of HA-ADH films