

pH值响应性羧甲基琼脂糖-聚多巴胺水凝胶制备及缓释性能

郭雨宁, 黄文灿, 毛相朝*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 开发一种pH值响应性羧甲基琼脂糖-聚多巴胺(carboxymethyl agarose-polydopamine, CMA-PDA)水凝胶载体。通过氯乙酸取代法合成了CMA。采用红外光谱、核磁共振、电子显微镜和热重分析对CMA的理化性质进行表征。进一步通过冷凝方法制备CMA-PDA水凝胶, 系统研究CMA-PDA水凝胶的流变性能和质构性能进行表征。结果表明, PDA的加入提高了水凝胶的凝胶强度、硬度和黏弹性。以阿霉素为模型, 研究该水凝胶在pH 2.0、6.2、6.8、7.4条件下的释放行为, 表明其具有较好的pH值响应性, pH 2.0条件下的释放率显著高于其他条件。同时以L929细胞为模型, 研究该水凝胶的生物相容性, 表明其无明显细胞毒性。这项研究证明了CMA-PDA水凝胶生物相容性良好, 具有pH值响应性和缓释性能, 可以作为潜在的生物活性物质递送载体。

关键词: 羧甲基琼脂糖; 聚多巴胺; pH值响应性; 水凝胶; 递送载体

Preparation and Release Properties of pH Responsive Carboxymethyl Agarose-Polydopamine Hydrogel

GUO Yuning, HUANG Wencan, MAO Xiangzhao*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In this study, a pH responsive carboxymethyl agarose-polydopamine (CMA-PDA) hydrogel carrier was developed. Carboxymethyl agarose (CMA) was synthesized by replacing the hydroxyl groups of agarose with chloroacetic acid and was characterized by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, nuclear magnetic resonance (NMR), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and thermal gravimetric analysis (TGA). Then, the CMA-PDA hydrogel was prepared, and its rheological and texture properties were characterized. The results showed that the gel strength, hardness and viscoelasticity of the hydrogel were increased by the addition of PDA. Doxorubicin (DOX) was used as a model to study the release behavior of the hydrogel at pH 2.0, 6.2, 6.8 and 7.4. The results showed that the hydrogel had good pH responsiveness and the release rate was significantly higher at pH 2.0 than at other pH levels. Moreover, the hydrogel had no cytotoxicity on L929 cells. This study proves that CMA-PDA hydrogel has good biocompatibility, pH responsive and slow release properties, and can be used as a potential carrier for bioactive substance delivery.

Keywords: carboxymethyl agarose; polydopamine; pH responsive; hydrogel; delivery carrier

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210723-277

中图分类号: TS254.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2022)10-0059-07

引文格式:

郭雨宁, 黄文灿, 毛相朝. pH值响应性羧甲基琼脂糖-聚多巴胺水凝胶制备及缓释性能[J]. 食品科学, 2022, 43(10): 59-65. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210723-277. <http://www.spkx.net.cn>

GUO Yuning, HUANG Wencan, MAO Xiangzhao. Preparation and release properties of pH responsive carboxymethyl agarose-polydopamine hydrogel[J]. Food Science, 2022, 43(10): 59-65. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210723-277. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2021-07-23

基金项目: 山东省泰山学者青年专家计划项目 (tsqn201812020)

第一作者简介: 郭雨宁 (1996—) (ORCID: 0000-0001-7145-8543), 男, 硕士, 主要从事海洋多糖水凝胶研究。

E-mail: guoyuning1996@qq.com

*通信作者简介: 毛相朝 (1981—) (ORCID: 0000-0002-6135-1338), 男, 教授, 博士, 主要从事食品生物技术、水产品生物加工和海洋食品生化工程研究。E-mail: xzhmao@ouc.edu.cn

水凝胶具有理想的理化特性、可变的结构、灵活的合成方法和良好的生物相容性^[1],是生物医学中广泛应用的新兴材料^[2]。根据材料的来源,水凝胶可分为合成水凝胶和天然水凝胶。天然水凝胶中研究最为广泛的是多糖水凝胶^[3]和多肽水凝胶^[4]。多糖因其来源丰富^[5]、制备简单、成本低廉^[6],同时还具有生物相容性好、生物可降解性和无免疫原性等优势,在生物材料中获得了广泛的应用^[7]。

pH值响应性水凝胶是指相转变体积随着环境中pH值变化而变化,且溶胀程度不连续的一类刺激响应性水凝胶^[8]。随着pH值的变化,水凝胶的凝胶网络结构和凝胶表面及其内部的电荷分布改变,引起水凝胶溶胀的变化,这种性质可以非常好的利用在递送载体中,实现生物活性物质的可控释放^[9]。

琼脂糖是提取自红藻的一种线性聚合物,由交替的D-半乳糖和3,6-脱水-L-半乳糖组成^[10]。琼脂糖具有良好的生物相容性^[11],被用作组织工程材料和递送载体。而琼脂糖在室温下水溶性较差,导致其应用受到了一定限制。为解决这一问题,需对琼脂糖进行改性修饰^[12],其中一种方法是向琼脂糖中引入羧甲基,改变琼脂糖的构象,提高水溶性,从而改善生物活性。目前,已有相关文献^[13-14]报道了羧甲基琼脂糖(carboxymethyl agarose, CMA)的合成及表征,但将CMA用于构建水凝胶递送载体的研究较少。目前Khan等^[15]以CMA与聚丙烯酰胺为原料制备了高吸水性水凝胶,并证明该水凝胶作为递送载体的潜力。但由于聚丙烯酰胺具有毒性,使该水凝胶应用受到限制。CMA水凝胶在低含水量时具有一定的机械性能,但在高含水量时机械强度明显下降,在极低的压强下发生碎裂,因此需要提高CMA水凝胶的凝胶强度,使其能够耐受胃肠道的蠕动挤压作用。

聚多巴胺(polydopamine, PDA)是通过多巴胺氧化聚合制备的活性物质,具有优异的亲水性、化学反应性和生物相容性^[16],已被广泛用于各种材料的改性和功能化,提高材料的抗氧化活性^[17]、细胞相容性^[18]和机械强度^[19]。

本研究通过将PDA与CMA相结合,开发具有pH值响应性且能够提高CMA水凝胶的机械强度的水凝胶。以琼脂糖为原料制备了CMA,通过红外光谱、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)、电子显微镜和热重分析等技术对其进行表征。利用CMA和PDA之间的相互作用制备了CMA-PDA水凝胶,并研究了水凝胶的流变性、质构性能、pH值响应性释放性能和细胞相容性,进一步探究CMA-PDA水凝胶用于生物活性物质递送载体的研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

琼脂糖 美国Sigma公司;盐酸、氢氧化钠、氯乙酸、异丙醇、乙醇 国药集团化学试剂有限公司;盐酸多巴胺(98%) 上海麦克林生化科技有限公司;阿霉素(doxorubicin, DOX, 99%)、三羟甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris, 99%)、噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT, 98%)试剂 北京索莱宝科技有限公司。所有其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Nicolet IS10傅里叶变换红外光谱分析仪 美国赛默飞公司;jeol 1400plus透射电子显微镜 日本电子株式会社;QUANTA FEG250扫描电子显微镜 美国FEI公司;AVANCE III 400M NMR仪 德国Bruker公司;TG 209F3热重分析仪 德国耐驰公司;MCR301流变仪 奥地利Anton Paar公司;TMS-TOUCH质构仪 美国FTC公司;FL-4600荧光分光光度计 日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 CMA的制备

参考Huang Wencan等^[20]的方法并加以改进。具体方法如下:首先,在室温下(25℃),准确称取10.0 g的琼脂糖粉末分散在50 mL异丙醇中,然后向悬浮液中缓慢逐滴加50 mL 6.75 mol/L的NaOH溶液。然后在60℃水浴条件下,将7.5 g氯乙酸加入悬浮液中,继续反应2 h。接着向反应溶液加入75%乙醇溶液终止反应10 min。使用抽滤装置过滤反应溶液,并使用75%乙醇溶液洗涤。最后,将过滤后得到的固形物在50℃热风烘箱中干燥24 h,并在25℃贮存以备进一步使用。

1.3.2 CMA的表征

使用傅里叶变换红外光谱分析仪对CMA和琼脂糖进行表征。使用KBr压片法进行测试,测试范围为4 000~400 cm⁻¹,每次测试重复扫描64次以消除背景噪声。

使用透射电子显微镜观察质量分数1%的琼脂糖水溶液和CMA溶液的溶解度差异。

使用扫描电子显微镜观察CMA凝胶和琼脂糖凝胶的微观结构差异。将凝胶在-80℃预冷后,使用冷冻干燥机将其冷冻干燥。在真空条件下,对样品喷金处理,在加速电压20 kV条件下进行扫描,观察结果。

使用NMR仪对CMA和琼脂糖进行表征。将样品溶解在二甲基亚砜-D₆中,记录在二甲基亚砜-D₆中¹H-NMR(400 MHz)和¹³C-NMR(100 MHz)的NMR图谱。每次实验的扫描次数取决于样品质量浓度(40~50 mg/mL)。

使用热重分析仪对CMA和琼脂糖进行表征,称取干燥的琼脂糖粉末和CMA粉末置于热重分析仪中,测试温度为30~800℃,加热速率5℃/min,观察曲线变化趋势。

1.3.3 PDA的制备

参考Luo Hongyong等^[21]的方法。准确称取多巴胺1.0 g,加入1 L pH 8.5的10 mmol/L Tris-HCl缓冲液中,在有氧条件下超声4 h,得到PDA溶液。

1.3.4 水凝胶的制备

称取0.4 g CMA于10 mL去离子水中,将混合溶液加热至CMA完全溶解,将溶液倒入10 mm×10 mm×10 mm硅胶模具中,4℃冷却2 h,冷却后得到CMA水凝胶。

称取0.4 g CMA于10 mL PDA溶液中,混合溶液加热至CMA完全溶解,将溶液倒入10 mm×10 mm×10 mm硅胶模具中,4℃冷却2 h,冷却后得到CMA-PDA水凝胶。

称取0.4 g CMA于10 mL PDA溶液中,加入20.0 mg DOX作为模型药物。将混合溶液加热至CMA完全溶解,将溶液倒入10 mm×10 mm×10 mm硅胶模具中,4℃冷却2 h,冷却后得到载DOX的CMA-PDA水凝胶。

1.3.5 水凝胶流变性能测试

将CMA和CMA-PDA水凝胶切割为厚度为1 mm的水凝胶薄片,使用流变仪对水凝胶进行流变测试。在温度为25℃、形变量1%条件下进行,频率扫描为0.01~10 Hz。每组实验均为3个平行。

1.3.6 水凝胶质构性能测试

将CMA和CMA-PDA水凝胶制备成10 mm×10 mm×10 mm的正方体,使用质构仪对CMA和CMA-PDA水凝胶的质构性能进行表征,采用100 N力量感应元和35 mm圆盘探头测试水凝胶的硬度、内聚性与凝胶强度。每组实验均为3个平行。

1.3.7 水凝胶响应性体外释放性能测试

使用0.10 mol/L盐酸和0.10 mol/L氢氧化钠配制pH值分别为2.0、6.2、6.8、7.4的PBS溶液。将含有2 mg/mL DOX的水凝胶添加到10 mL不同pH值的PBS溶液中,分别在1、2、3、4、5 h和6 h后取出200 μL溶液,使用荧光分光光度计检测波长确定DOX浓度(激发光波长480 nm,发射光波长592 nm)。每组实验均为3个平行。

1.3.8 水凝胶细胞相容性测试

取5.0 g水凝胶于烧杯中,按0.2 g/mL的比例加入DMEM培养基,室温浸泡24 h,得到水凝胶浸提液,灭菌后备用。

水凝胶的体外细胞毒性测定使用MTT法^[20]。将L929细胞复苏后传代2~3代,接种于96孔板上,调节至初始密度 10^5 /mL,在含10% FBS的DMEM培养基中37℃培养

24 h,实验组每孔加入100 μL水凝胶浸提液,空白组每孔加入100 μL DMEM培养基。将96孔板置于5% CO₂培养箱中37℃培养12 h后,使用显微镜观察细胞形态,每孔加入50 μL MTT溶液,在黑暗环境下于5% CO₂培养箱中37℃反应4 h。取出平板,弃去上清液,每孔加入150 μL 二甲基亚砜,摇动平板,在波长570 nm处测定吸光度。

1.4 数据处理

实验结果表示为 $\bar{x} \pm s$ ($n \geq 3$), 数据统计分析采用Excel进行显著性分析($P < 0.05$), 采用Origin 2018进行作图。

2 结果与分析

2.1 CMA的合成与表征

2.1.1 CMA合成

琼脂糖在碱性介质中进行碱化和羧甲基化,使用氯乙酸对琼脂糖进行羧甲基取代。图1显示了琼脂糖的羧甲基化过程。

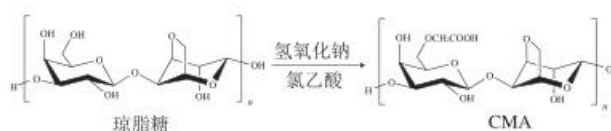


图1 CMA制备原理

Fig. 1 Principle of carboxymethyl agarose preparation

2.1.2 CMA的傅里叶变换红外光谱分析结果

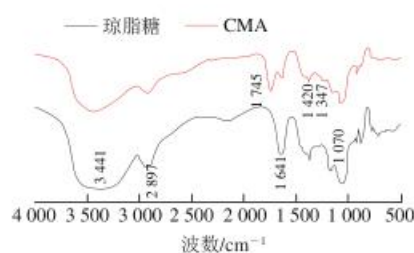


图2 琼脂糖和CMA红外光谱

Fig. 2 FTIR spectra of agarose and carboxymethyl agarose

如图2所示,琼脂糖图谱中,在3441 cm⁻¹处有一个很强的O—H键伸缩振动吸收峰,在2897 cm⁻¹处出现C—H伸缩振动吸收峰,在1070 cm⁻¹处是C—O—C振动吸收峰。与琼脂糖相比,CMA的红外光谱基本相同,但出现了1745 cm⁻¹和1374 cm⁻¹两个新的特征吸收峰。1745 cm⁻¹处为羧基的羰基吸收峰,1374 cm⁻¹处属于羧甲基的剪切振动特征吸收峰,并且1235 cm⁻¹处亚甲基的吸收峰强度增强。而930、892、793、770、738、715、690 cm⁻¹处琼脂糖的特征峰在羧甲基化后未发生明显变化。根据以上结果可以认为,成功制备了CMA。

2.1.3 CMA NMR分析结果

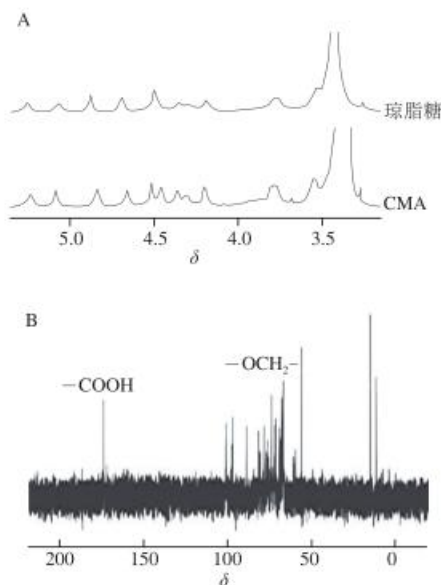
A. 琼脂糖和CMA ^1H -NMR谱图; B. CMA ^{13}C -NMR谱图。

图3 琼脂糖和CMA NMR图

Fig. 3 NMR spectra of agarose and carboxymethyl agarose

如图3所示, 对琼脂糖的 ^1H -NMR谱图进行分峰。琼脂糖的氢谱与CMA的氢谱峰形基本相同。除了琼脂糖的质子峰外, CMA中亚甲基C7的质子出现在 δ 4.46处。CMA的 ^{13}C -NMR光谱结果表明, 在 δ 174.31为羧基碳的信号峰和 δ 75.11为亚甲基碳的信号峰。

2.1.4 CMA热重分析结果

如图4所示, 30~100 $^{\circ}\text{C}$ 的热质量损失为结晶水的脱除引起, 琼脂糖与CMA的质量损失一致, 均为8%。150~800 $^{\circ}\text{C}$ 的质量损失阶段对应琼脂糖的裂解反应。可以看出, CMA在178 $^{\circ}\text{C}$ 即开始分解反应, 低于琼脂糖的起始分解温度(250 $^{\circ}\text{C}$), 说明引入羧甲基后, CMA的稳定性降低。琼脂糖和CMA在150~800 $^{\circ}\text{C}$ 的质量损失分别为72%和67%。

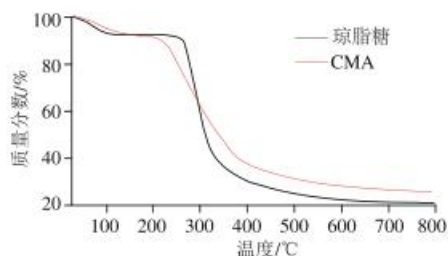


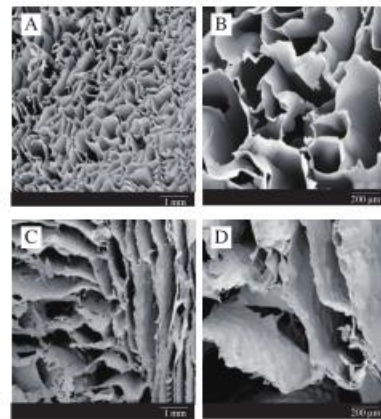
图4 琼脂糖与CMA热重分析结果

Fig. 4 Thermogravimetric analysis of agarose and carboxymethyl agarose

2.1.5 CMA扫描电镜结果

通过扫描电镜观察琼脂糖和CMA水凝胶冻干样品的

微观形态, 结果如图5所示。可以看出琼脂糖和CMA在凝胶骨架的结构上有一些相似之处, 都具有空间网络的微观结构。琼脂糖凝胶骨架结构比CMA致密, 凝胶内孔结构更小, 而CMA凝胶的孔结构大且疏松。



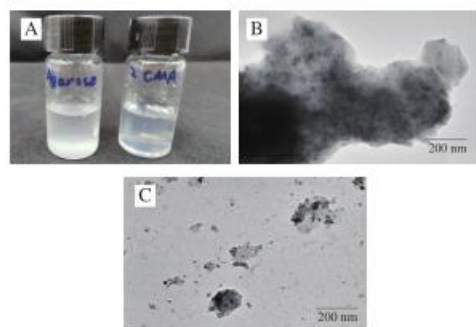
A、B为琼脂糖放大50、200倍扫描电镜图, C、D为CMA放大50、200倍扫描电镜图。

图5 琼脂糖和CMA扫描电镜图

Fig. 5 SEM images of agarose and carboxymethyl agarose

2.1.6 CMA透射电镜结果

用透射电镜观察CMA粉末在水溶液中的微观结构, 结果如图6所示。在引入羧甲基后, CMA的溶解性得到了显著的提高, 通过1%质量分数的琼脂糖溶液和CMA进行观察, 能够明显观察到溶液的透光率有明显区别, 见图6A。琼脂糖溶解度较差, 因此其水溶液相比于水溶性较好的CMA更浑浊。进一步使用透射电镜观察2种水溶液中多糖颗粒的分散性, 由于CMA之间的氢键作用减弱, 并且可以观察到相比于琼脂糖颗粒, CMA颗粒的粒径更小, 因此, CMA颗粒在水溶液中具有更好的分散性。



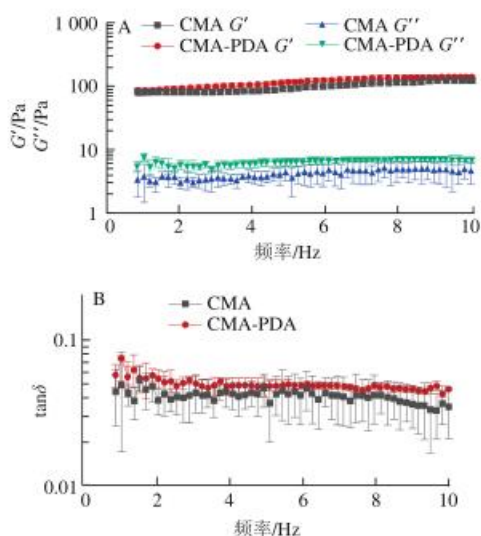
A. 琼脂糖和CMA溶液; B. 琼脂糖透射电镜图; C. CMA透射电镜图。

图6 琼脂糖和CMA溶液及透射电镜图

Fig. 6 TEM images of agarose and carboxymethyl agarose

2.2 水凝胶流变性能表征

对水凝胶的流变学性质进行表征, 测量CMA水凝胶和CMA-PDA水凝胶储能模量(G')和损耗模量(G'')随频率变化的结果, 结果如图7所示。

A. CMA水凝胶和CMA-PDA水凝胶 G' 和 G'' ;

B. CMA水凝胶和CMA-PDA水凝胶损耗因子。

图7 CMA水凝胶和CMA-PDA水凝胶的流变学测试结果

Fig. 7 Results of rheological test of CMA and CMA-PDA hydrogels

由图7A可知,在整个频率范围内,所有水凝胶的 G' 均大于 G'' ,所有水凝胶都显示出主要的弹性固体行为。图7B结果显示,水凝胶的 $\tan\delta$ 值均小于1,表明所有水凝胶由其弹性行为而不是黏性决定。CMA-PDA水凝胶的 G' 和 G'' 均大于CMA水凝胶,表明PDA的加入提高了水凝胶的黏弹性。并且CMA-PDA水凝胶的 $\tan\delta$ 值大于CMA水凝胶,表明PDA的加入提高了水凝胶吸收外加能量的能力。

2.3 水凝胶质构性能表征

如表1所示,添加PDA后,CMA-PDA水凝胶的硬度和凝胶强度均有所提高,而CMA-PDA水凝胶的内聚性相比CMA水凝胶有所下降。质构结果表明,PDA的加入提高了水凝胶的硬度和凝胶强度,降低了水凝胶的内聚性。

表1 CMA水凝胶和CMA-PDA水凝胶的质构性能

Table 1 Texture properties of CMA and CMA-PDA hydrogels

水凝胶	硬度/N	内聚性	凝胶强度/(N·mm)
CMA水凝胶	4.41±0.05	0.68±0.03	8.09±0.23
CMA-PDA水凝胶	4.89±0.29*	0.59±0.04*	8.91±0.51*

注:*,差异显著($P<0.05$)。

2.4 pH值响应性释放

以DOX为模型,研究水凝胶在不同pH值条件下的释放情况。通过带负电荷的CMA链和带正电荷的DOX分子之间的静电相互作用和DOX与PDA之间的 $\pi-\pi$ 相互作用,将DOX加载到了CMA-PDA水凝胶中,并研究负载DOX的水凝胶在模拟肠道环境(pH 7.4)、肿瘤组织环境(pH 6.8、pH 6.2)和胃环境(pH 2.0)的PBS溶液中的释放DOX的能力,结果如图8所示。

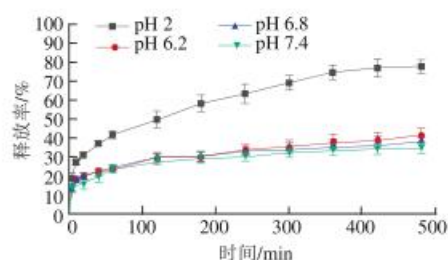


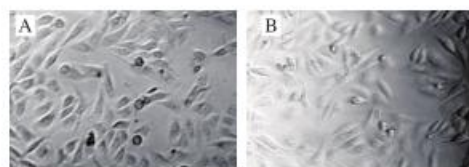
图8 CMA-PDA水凝胶pH值响应性释放曲线

Fig. 8 pH responsive release curves of CMA-PDA hydrogels

由图8可知,CMA-PDA水凝胶表现出了明显的pH值响应性。在pH 2.0酸性条件下,水凝胶中DOX的释放速度明显高于pH 6.2、6.8、7.4的环境中,在释放20 min后,pH 2.0环境中DOX的累积释放率已经达到31.24%,而pH 6.2、6.8、7.4的环境中,DOX的释放率仅为20.26%、20.12%和16.11%。尽管高浓度的DOX对肿瘤细胞的杀伤性更强,但过快的释放会使DOX的有效率下降,并且对周围正常组织细胞造成伤害。在释放初期,CMA-PDA水凝胶都表现出了DOX的快速释放。前期快速的释放有利于DOX达到一定的浓度,从而控制肿瘤的生长。在pH 2.0条件下,释放6 h后,DOX的释放速率逐渐减小并最终趋于平缓。而在pH 6.2、6.8、7.4的环境中,释放超过2 h后,DOX的释放速率趋于平缓。在释放8 h后,在pH 6.2、6.8、7.4的环境中,水凝胶分别累积释放了41.36%、37.88%和34.53%的DOX,而pH 2.0条件下,DOX释放率达到77.83%。

2.5 水凝胶细胞相容性

合适的pH值触发生物活性物质释放时,一个关键的问题是水凝胶作为传递载体在递送过程中是否具有潜在毒性。在选择合适的递送载体时,水凝胶载体的细胞毒性是一个需考虑的重要因素^[22]。因此,一种安全的递送载体必须低毒甚至无毒性。



A. DMEM培养基处理后细胞形态;

B. CMA-PDA水凝胶浸提液处理后细胞形态。

图9 细胞形态

Fig. 9 Cell morphology

以L929成纤维细胞为模型,将细胞与水凝胶浸提液和DMEM培养基孵育,分别测定细胞活性,并使用显微镜观察孵育后细胞形态,以评价CMA-PDA水凝胶的细胞相容性。图9显示了孵育后的L929细胞形态。与DMEM培养基组相比,可以观察到水凝胶浸提液处理后,细胞形态未发生明显变化,说明水凝胶无细胞毒性。如图10所

示,以DMEM培养基中培养的细胞作为对照,CMA-PDA水凝胶提取液共孵育的细胞活性均保持在95%以上。结果表明,该水凝胶具有良好的生物相容性,细胞毒性可忽略不计,可用作递送载体。

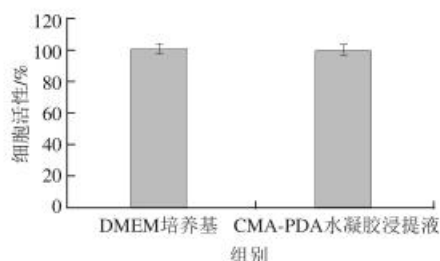


图10 CMA-PDA水凝胶的细胞活性

Fig. 10 Cell compatibility of CMA-PDA hydrogels

3 讨论

通过氯乙酸取代的方法制备CMA,通过傅里叶变换红外光谱、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、热重分析、扫描电镜、透射电镜等对其进行了表征。傅里叶变换红外光谱结果表明,CMA光谱出现了 $1\,745\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,374\text{ cm}^{-1}$ 两个新的特征吸收峰,并且 $1\,235\text{ cm}^{-1}$ 处亚甲基的吸收峰强度增强^[13]。琼脂糖的结构特征峰在羧甲基化后未发生明显变化,说明羧甲基化没有破坏琼脂糖的主要结构^[23]。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 的结果进一步表明成功制备了CMA,氢谱可以观察到羧甲基亚甲基氢的质子峰^[24],碳谱观察到羧甲基中亚甲基碳和羧基碳的信号峰,峰形较尖,强度和琼脂糖骨架中碳的信号强度相当,说明只在D-半乳糖的C6位上进行了较完全的羧甲基化,C2和C5位均没有被羧甲基化^[25]。热重分析结果表明CMA的保湿性提高、热稳定性下降,这是由于CMA中存在大量的羧甲基,阻碍了CMA的链缠结、减弱了链间氢键的强度,进而导致了较低的热稳定性^[23],经过羧甲基改性后,CMA中的C元素含量提高,热解最终形成的残留物增加,因此,CMA的残余质量高于琼脂糖。与羧甲基淀粉的结果^[26]类似,羧甲基后琼脂糖的热稳定性也降低。扫描电镜结果与Tuvikene^[27]和Kaity^[28]等的研究结果基本一致。根据Xia Kai^[29]和Cao Mingzhao^[13]等对羧甲基琼脂的研究认为,羧甲基取代基的引入削弱了凝胶内部的氢键,阻碍了双螺旋的形成,使凝胶结构变疏松,难以形成大的琼脂糖螺旋结构,从而形成类似于片状的CMA结构。透射电镜结果表明,CMA颗粒更小,溶解度和水分散性提高,结合水的能力更强。

以CMA与PDA为原料,构建CMA-PDA水凝胶作为递送载体。对水凝胶的流变性能进行表征,结果表明,

PDA的加入提高了水凝胶的黏弹性。水凝胶黏弹性的提高是由于PDA的加入,能够在水凝胶内部与CMA形成氢键,从而形成更致密氢键网络,从而能够耗散外加应力导致的能量变化。水凝胶的质构结果进一步证明了PDA的加入提高了水凝胶的硬度和凝胶强度。CMA-PDA水凝胶表现出明显的pH值响应性,原因是在酸性条件下,大量的氢离子破坏了CMA链上的羧基与DOX的结合,并且提高了DOX氨基的质子化程度,进一步破坏了PDA与DOX之间的 $\pi-\pi$ 键相互作用,使得DOX更容易从PDA表面解离^[30],从而使水凝胶结合DOX的能力下降,导致DOX大量的释放出来。与Khan等^[15]合成的水凝胶载体相比,CMA-PDA水凝胶合成过程中避免了使用丙烯酰胺,水凝胶的安全性得到了提高。相比Hyun等^[31]合成的水凝胶载体,CMA-PDA水凝胶表现出更好的DOX缓释能力。通过细胞相容性实验验证了CMA-PDA水凝胶没有潜在的细胞毒性,可以安全应用于生物活性物质递送。

4 结论

以琼脂糖为原料,通过氯乙酸取代引入了羧甲基,并对其进行了表征,结果表明成功制备CMA。同时以CMA与PDA为原料,成功制备具有pH值响应性的CMA-PDA水凝胶,并对其流变性能和质构性能进行表征。以CMA-PDA水凝胶为载体进行DOX的释放研究,观察DOX的可控释放,结果表明水凝胶对DOX具有缓释作用。此外,MTT实验证明CMA-PDA水凝胶细胞相容性良好。基于此,认为CMA-PDA水凝胶具有作为递送载体的潜力。

参考文献:

- [1] LI J Y, MOONEY D J. Designing hydrogels for controlled drug delivery[J]. *Nature Reviews Materials*, 2016, 1(12): 16071. DOI:10.1038/natrevmats.2016.71.
- [2] SLAUGHTER B V, KHURSHID S S, FISHER O Z, et al. Hydrogels in regenerative medicine[J]. *Advanced Materials*, 2010, 21(32/33): 3307-3329. DOI:10.1002/adma.200802106.
- [3] LI J L, XING R R, BAI S, et al. Recent advances of self-assembling peptide-based hydrogels for biomedical applications[J]. *Soft Matter*, 2019, 15(8): 1704-1715. DOI:10.1039/C8SM02573H.
- [4] ZHAO W, YANG J H, LIU Z Q, et al. Novel biocompatible polysaccharide-based self-healing hydrogel[J]. *Advanced Functional Materials*, 2015, 25(9): 1352-1359. DOI:10.1002/adfm.201401502.
- [5] KUMAR S, MARRERO-BERRIOS I, KABAT M, et al. Recent advances in the use of algal polysaccharides for skin wound healing[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 25(11): 1236-1248. DOI:10.2174/1381612825666190521120051.
- [6] YANG X, LIU W, LI N, et al. Design and development of polysaccharide hemostatic materials and their hemostatic mechanism[J]. *Biomaterials Science*, 2017, 5(12): 2357-2368. DOI:10.1039/c7bm00554g.

- [7] LIU J Y, LI Y, HU Y, et al. Hemostatic porous sponges of cross-linked hyaluronic acid/cationized dextran by one self-foaming process[J]. Materials Science and Engineering: C, 2018, 83: 160-168. DOI:10.1016/j.msec.2017.10.007.
- [8] KOCAC G, TUNCER C, BÜTÜN V. pH-Responsive polymers[J]. Polymer Chemistry, 2017, 8(1): 144-176. DOI:10.1039/C6PY01872F.
- [9] HAIDARI H, KOPECKI Z, SUTTON A T, et al. pH-Responsive "smart" hydrogel for controlled delivery of silver nanoparticles to infected wounds[J]. Antibiotics, 2021, 10(1): 49. DOI:10.3390/antibiotics10010049.
- [10] SOYLU H M, CHEVALLIER P, COPEL F, et al. A novel strategy to coat dopamine-functionalized titanium surfaces with agarose-based hydrogels for the controlled release of gentamicin[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 678081. DOI:10.3389/fcimb.2021.678081.
- [11] KHODADADI YAZDI M, TAGHIZADEH A, TAGHIZADEH M, et al. Agarose-based biomaterials for advanced drug delivery[J]. Journal of Controlled Release, 2020, 326: 523-543. DOI:10.1016/j.jconrel.2020.07.028.
- [12] 李龙, 苏永昌, 吴钢, 等. 几种琼脂糖提取及改性方法概述[J]. 福建水产, 2013, 35(1): 73-77. DOI:10.3969/j.issn.1006-5601.2013.01.013.
- [13] CAO M Z, LIU X, LUAN J M, et al. Characterization of physicochemical properties of carboxymethyl agar[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111: 449-455. DOI:10.1016/j.carbpol.2014.04.036.
- [14] KHOLIYA F, CHAUDHARY J P, VADODARIYA N, et al. Synthesis of bio-based aldehyde from seaweed polysaccharide and its interaction with bovine serum albumin[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 150: 278-285. DOI:10.1016/j.carbpol.2016.05.022.
- [15] KHAN H, CHAUDHARY J P, MEENA R. Anionic carboxymethylagarose-based pH-responsive smart superabsorbent hydrogels for controlled release of anticancer drug[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124: 1220-1229. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.045.
- [16] TANG P F, HAN L, LI P F, et al. Mussel-inspired electroactive and antioxidative scaffolds with incorporation of polydopamine-reduced graphene oxide for enhancing skin wound healing[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(8): 7703-7714. DOI:10.1021/acsami.8b18931.
- [17] O'CONNOR N A, SYED A, WONG M, et al. Polydopamine antioxidant hydrogels for wound healing applications[J]. Gels, 2020, 6(4): 39. DOI:10.3390/gels6040039.
- [18] TANG Z W, MIAO Y N, ZHAO J, et al. Mussel-inspired biocompatible polydopamine/carboxymethyl cellulose/polyacrylic acid adhesive hydrogels with UV-shielding capacity[J]. Cellulose, 2021, 28(3): 1-14. DOI:10.1007/s10570-020-03596-7.
- [19] HUANG J X, ZHANG W, LI H, et al. An autonomous self-healing hydrogel with high polydopamine content for improved tensile strength[J]. Journal of Materials Science, 2020, 55(36): 1-11. DOI:10.1007/s10853-020-05252-8.
- [20] HUANG W C, YING R, WANG W, et al. A macroporous hydrogel dressing with enhanced antibacterial and anti-inflammatory capabilities for accelerated wound healing[J]. Advanced Functional Materials, 2020, 30(21): 2000644. DOI:10.1002/adfm.202000644.
- [21] LUO H Y, GU C W, ZHENG W H, et al. Facile synthesis of novel size-controlled antibacterial hybrid spheres using silver nanoparticles loaded with poly-dopamine spheres[J]. RSC Advances, 2015, 5(18): 13470-13477. DOI:10.1039/C4RA16469E.
- [22] CHATURVEDI K, GANGULY K, NADAGOUDA M N, et al. Polymeric hydrogels for oral insulin delivery[J]. Journal of Controlled Release, 2013, 165(2): 129-138. DOI:10.1016/j.jconrel.2012.11.005.
- [23] ORTIZ J A, CATALINA F, CORRALES T, et al. Thermo-responsive microfibrillar graft copolymer based on carboxymethylagarose and *N*-isopropylacrylamide[J]. Polymer Testing, 2020, 81: 106266. DOI:10.1016/j.polymertesting.2019.106266.
- [24] TRIVEDI T J, KUMAR A. Efficient extraction of agarose from red algae using ionic liquids[J]. Green and Sustainable Chemistry, 2014, 4(4): 190-201. DOI:10.4236/gsc.2014.44025.
- [25] LEONG K H, CHUNG L Y, NOORDIN M I, et al. Carboxymethylation of kappa-carrageenan for intestinal-targeted delivery of bioactive macromolecules[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(4): 1507-1515. DOI:10.1016/j.carbpol.2010.09.062.
- [26] LI X, GAO W Y, HUANG L J, et al. Preparation and physicochemical properties of carboxymethyl *Fritillaria ussuriensis* Maxim. starches[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 768-773. DOI:10.1016/j.carbpol.2009.12.025.
- [27] TUVIKENE R, TRUUS K, ROBAL M, et al. The extraction, structure, and gelling properties of hybrid galactan from the red alga *Furcellaria lumbricalis* (Baltic Sea, Estonia)[J]. Journal of Applied Phycology, 2010, 22(1): 51-63. DOI:10.1007/s10811-009-9425-x.
- [28] KAITY S, GHOSH A. Carboxymethylation of locust bean gum: application in interpenetrating polymer network microspheres for controlled drug delivery[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2013, 52(30): 10033-10045. DOI:10.1021/ie400445h.
- [29] XIA K, LIU X, ZHAO J K, et al. The physicochemical property characterization of agar acetate[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 110: 32-37. DOI:10.1016/j.carbpol.2014.03.036.
- [30] ZHANG S Q, LIU X, SUN Q X, et al. CuS@PDA-FA nanocomposites: a dual stimuli-responsive DOX delivery vehicle with ultrahigh loading level for synergistic photothermal-chemotherapies on breast cancer[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2020, 8(7): 1396-1404. DOI:10.1039/C9TB02440A.
- [31] HYUN H, YOO Y B, KIM S Y, et al. Hydrogel-mediated DOX/HCl/PTX delivery system for breast cancer therapy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4671. DOI:10.3390/ijms20194671.