

分类号: Q81
密 级: 公开

学校代码: 10363
学 号: 2210530137



安徽工程大学

Anhui Polytechnic University

硕士学位论文

题 目 CS/ γ -PGA (HA) 水凝胶结构
性能调控研究

论 文 作 者 胡紫微
校 内 导 师 聂光军 教授
校 外 导 师 王立言 博士
专业学位类别 生物与医药
研究方向 (领域) 生物载体材料工程

论文提交日期: 2024 年 5 月 30 日

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2210530137

CS/ γ -PGA (HA) 水凝胶结构性能调控研究
REGULATION OF THE STRUCTURE AND PROPERTIES
OF CS/ γ -PGA (HA) HYDROGEL

学生姓名: 胡紫微

校内教师: 聂光军 教授

校外导师: 王立言 博士

专 业: 生物与医药

研究方向: 生物载体材料工程

论文答辩日期: 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。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。除文中已明确注明和引用的内容外，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及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：胡紫微

日期：2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：胡紫微 指导教师签名：夏光军

日期：2024年5月30日

日期：2024年5月30日

CS/ γ -PGA (HA) 水凝胶结构性能调控研究

摘 要

天然生物大分子水凝胶具有良好的生物相容性和可降解性，广泛应用于生物医学和药物载体等领域。壳聚糖（Chitosan, CS）作为一种天然阳离子聚合物，常与 γ -聚谷氨酸（ γ - Polyglutamic acid, γ -PGA）和透明质酸钠（Sodium hyaluronate, HA）等天然阴离子聚合物，通过静电聚合形成复合非共价水凝胶。然而，非共价作用力较弱，由此形成的水凝胶存在结构不稳定、机械性能低和性能不平衡等问题，限制其进一步发展应用。氨基酸（Amino acid, AA）是含有碱性氨基和酸性羧基的天然化合物，链长较短，在 CS/ γ -PGA (HA) 水凝胶中可发挥桥联、pH 调控和运输载体作用；天然聚合物存在的多分散性和异质性为天然来源的复合水凝胶结构性能调节提供了更多的契机。由此，本文应用 AA 介导调控、基质比例调节、NaOH 溶液浸泡和主客体渗透交联多种策略调控水凝胶的结构性能，对天然来源有机复合水凝胶的研究具有重要理论意义与实际应用价值。具体内容如下：

（1）AA 介导结构和载药行为调控：AA 引入明显改变了 CS/ γ -PGA 水凝胶网络的自组装，相关性能随之发生变化。AA 的作用与其链长和浓度密切相关，尤其是 0.5% β -Ala 的引入显著提高了水凝胶的交联度，孔隙率降低 70%；结构变得更稳定，机械性能随之增强，应力提高 2.08 倍；保水性提高 1.53 倍，水溶性降低 52%，溶胀性降低 30%。值得注意的是， β -Ala 提升了 CS/ γ -PGA 水凝胶的 pH 响应

性，为 CS/ γ -PGA 水凝胶用于定向药物缓释提供了条件。

(2) 结构性能调控方法：调控 CS/HA 水凝胶基质比例，使用不同浓度 NaOH 浸泡处理，引入不同含量 Lys，获得多种水凝胶结构，以溶胀行为连接其微观结构和宏观性能，系统分析 CS/HA 水凝胶结构与性能的变化规律。结果显示，随着 HA 用量增加，CS/HA 水凝胶孔径变大，溶胀率上升，机械性能下降；NaOH 作用与 HA 作用则相反；随着 Lys 含量的提高，机械性能先下降后上升，同时，杨氏模量和溶胀率均呈反比关系。这为水凝胶的结构性能调控提供了参考依据。

(3) 主客体渗透交联策略：以结构相对规则的 CS/HA 大分子聚集体为主体模块，以适量小分子聚集体为客体缠结促进剂，通过客体渗透主体的方式，形成具有高缠结的 CS/HA 水凝胶，韧性提高 3.9 倍，应力提高 2.6 倍，断裂伸长率提高 1.9 倍。这种策略不仅显著改善了天然聚合物复合材料的结构性能，而且揭示了多分散性和分子异质性驱动下，天然高聚物的自组装结构与功能联系，也为天然高聚物的稳定有序组装提供新见解。

本文以 CS 基水凝胶网络为平台，从主体网络构建、小分子介导及其分级组装等环节上，采用多种策略调控水凝胶的结构性能，并揭示其互作关系，丰富了水凝胶结构性能调控方法，为水凝胶新产品开发提供理论与技术支持，推动水凝胶的发展和应用。

关键词：CS/ γ -PGA 水凝胶，CS/HA 水凝胶，氨基酸，结构性能，自组装

REGULATION OF THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF CS/ γ -PGA (HA) HYDROGEL

ABSTRACT

Natural biomacromolecular hydrogels have good biocompatibility and degradability, and are widely used in biomedicine and drug delivery. Chitosan (CS), as a natural cationic polymer, is often combined with natural anionic polymers such as γ -Polyglutamic acid (γ -PGA) and Sodium hyaluronate (HA). Composite noncovalent hydrogels were formed by electrostatic polymerization. However, the non-covalent interaction forces are weak, and the resulting hydrogels have problems such as structural instability, low mechanical properties, and unbalanced properties, which limit their further development and application. Amino acid (AA) is a natural compound containing basic amino group and acidic carboxyl group with short chain length, which can play a role in bridging, pH regulation and transport carrier in CS/ γ -PGA (HA) hydrogel. The polydispersibility and heterogeneity of natural polymers provide more opportunities to adjust

the structure and properties of natural derived composite hydrogels. Therefore, multiple strategies were used to regulate the structure and properties of hydrogels, including AA-mediated regulation, matrix ratio regulation, NaOH solution immersion, and host-guest osmotic cross-linking, which has important theoretical significance and practical application value for the research of natural organic composite hydrogels. The details are as follows:

(1) AA mediates the regulation of structure and drug loading behavior: The introduction of AA significantly changed the self-assembly of CS/ γ -PGA hydrogel network, and the related properties changed accordingly. The effect of AA was closely related to its chain length and concentration. In particular, the introduction of 0.5% β -Ala significantly improved the crosslinking degree of the hydrogel, and the porosity decreased by 70%. The structure became more stable, and the mechanical properties were enhanced. The elastic modulus increased by 2.2 times, and the stress increased by 2.08 times. Water retention increased by 1.53 times, water solubility decreased by 52%, and swelling decreased by 30%. Notably, the pH responsiveness of CS/ γ -PGA hydrogel was enhanced by β -Ala, which provides the conditions for CS/ γ -PGA hydrogel to be used for directed drug delivery.

(2) Structure and properties regulatory methods: A variety of CS/HA hydrogel structures were obtained by adjusting the ratio of CS/HA

hydrogel matrix, soaking with different concentrations of sodium hydroxide, and introducing different content of Lys. The microstructure and macroscopic properties of CS/HA hydrogel were connected by swelling behavior, and the changes in the structure and properties of CS/HA hydrogel were systematically analyzed. The results showed that with the increase of HA dosage, the pore size of CS/HA hydrogel increased, the swelling rate increased, and the mechanical properties decreased. The effect of NaOH was opposite to that of HA. With the increase of Lys content, the mechanical properties first decreased and then increased. At the same time, there was an inverse relationship between Young's modulus and swelling rate. This provides a reference for the regulation of the structure and properties of hydrogels.

(3) Host-Guest permeation crosslinking strategy: The CS/HA hydrogel with high entangled structure was formed by using the relatively regular structure of CS/HA macromolecular aggregates as the main module, and an appropriate amount of small molecular aggregates as the guest entangled promoter through the way of guest penetration. The toughness was increased by 3.9 times, the stress was increased by 2.6 times, and the elongation at break was increased by 1.9 times. This strategy not only significantly improves the structural properties of natural polymer composites, but also reveals the structure-function connection of self-assembly of natural polymers driven by polydispersibility and molecular

heterogeneity, and provides new insights into the stable and ordered assembly of natural polymers.

In this paper, based on the CS-based hydrogel network, a variety of strategies were used to regulate the structure and properties of hydrogels from the aspects of host network construction, small molecular-mediated and hierarchical assembly, and their interactions were revealed. This study enriched the regulation methods of the structure and properties of hydrogels, provided theoretical and technical support for the development of new hydrogel products, and promoted the development and application of hydrogels.

KEY WORDS: CS/ γ -PGA hydrogel, CS/HA hydrogel, Amino acid, Structure and properties, Self assembly

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
目录.....	i
第 1 章 绪论.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 生物大分子水凝胶研究现状.....	1
1.2.1 常用生物大分子.....	1
1.2.2 设计策略.....	3
1.2.3 从结构到性能.....	6
1.3 研究意义与内容.....	9
1.3.1 研究意义.....	9
1.3.2 研究内容.....	10
第 2 章 AA 对 CS/ γ -PGA 水凝胶结构及载药行为的影响	12
2.1 前言.....	12
2.2 实验材料与仪器.....	14
2.2.1 材料与试剂.....	14
2.2.2 仪器.....	14
2.3 实验方法.....	15
2.3.1 水凝胶的制备.....	15
2.3.2 AA 的引入	15
2.3.3 载药与释药.....	15
2.3.4 pH 值影响.....	17
2.3.5 机械性能.....	17
2.3.6 孔隙率.....	18
2.3.7 溶胀、吸水、保水和水溶性.....	18
2.3.8 亲水性.....	19
2.3.9 细胞相容性.....	19
2.3.10 结构表征.....	19
2.4 结果与分析.....	20
2.4.1 氨基酸种类的影响.....	20
2.4.2 氨基酸浓度的影响.....	24
2.4.3 结构变化.....	26
2.4.4 药物装载与释放.....	29
2.5 本章小结.....	36
第 3 章 CS/HA 水凝胶结构与性能关系调控	38
3.1 前言.....	38
3.2 实验材料与仪器.....	38

3.2.1 材料与试剂.....	38
3.2.2 仪器.....	39
3.3 实验方法.....	40
3.3.1 水凝胶制备.....	40
3.3.2 水凝胶结构表征.....	41
3.3.3 机械性能.....	41
3.3.4 溶胀性能.....	41
3.3.5 水蒸气透过率.....	41
3.3.6 水溶解性.....	41
3.4 结果与分析.....	42
3.4.1 基质比例的影响.....	42
3.4.2 NaOH 的影响.....	45
3.4.3 Lys 的作用.....	48
3.5 本章小结.....	49
第 4 章 主客体渗透交联制备高韧性 CS/AA/HA 水凝胶.....	50
4.1 前言.....	50
4.2 实验材料与仪器.....	50
4.2.1 材料与试剂.....	50
4.2.2 仪器.....	51
4.3 实验方法.....	52
4.3.1 水凝胶的制备.....	52
4.3.2 机械性能检测.....	54
4.3.3 溶胀性能检测.....	54
4.3.4 亲水性检测.....	54
4.3.5 水凝胶表征.....	54
4.4 结果与分析.....	55
4.4.1 分离沉淀的影响.....	55
4.4.2 Adhesive 的影响.....	56
4.4.3 水洗的影响.....	57
4.4.4 表征分析.....	59
4.5 本章小结.....	60
第 5 章 总结与展望.....	62
5.1 总结.....	62
5.2 展望.....	63
参考文献.....	64
在校期间发表论文、专利、获奖情况.....	78
致谢.....	79

第 1 章 绪论

1.1 前言

水凝胶是一种通过各种物理或化学交联策略形成三维网络结构的软质材料, 具有优异的亲水性、保水性和与生物软组织相似的机械强度, 被广泛应用于生物医学、组织工程、传感器和食品包装等领域^[1, 2]。根据来源的不同, 水凝胶一般可分为合成水凝胶和天然水凝胶^[3, 4]。常见的合成水凝胶来源于聚乳酸、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺等。然而, 由于合成水凝胶一般不具有生物活性且难以降解, 且形成过程中可能需要引入交联剂和引发剂, 从而可能产生额外的细胞毒性, 因此合成水凝胶在生物医学领域的应用受到极大限制^[5, 6]。目前, 许多研究人员逐渐将注意力转向了透明质酸、壳聚糖、聚谷氨酸、胶原蛋白和海藻酸钠等廉价、丰富、具有生物相容性和功能活性的生物大分子, 用以构建天然水凝胶^[7-9]。水凝胶结构与其性能密切相关, 关系复杂, 控制水凝胶的交联结构以及优化其性能可有效扩大应用范围^[10-12]。

1.2 生物大分子水凝胶研究现状

1.2.1 常用生物大分子

1.2.1.1 壳聚糖

壳聚糖 (Chitosan, CS) 由 N -乙酰氨基葡萄糖和 D -氨基葡萄糖通过 1,4-糖苷键连接的重复单元组成, 是天然多糖中唯一的碱性多糖, 由几丁质脱除部分乙酰基制得, 几丁质和 CS 的化学结构如图 1-1 所示。当 D-氨基葡萄糖的单位数量不超过 50%时, 几丁质分子内和分子间广泛的氢键阻碍了生物聚合物在有机溶剂中的热转变和溶解度, 限制了这种生物材料的应用。然而, 当脱乙酰化程度大于 50%时, CS 在轻度在酸性介质中 ($\text{pH} \leq 6.5$) 游离氨基即可发生电离, 促进 CS 链的增溶^[13-15]。溶解后的 CS 是一种带有活泼羟基与氨基的线型聚电解质, 具有生物降解性、生物相容性、无毒性、抑菌等多种生理功能, 广泛应用

于生物医用材料、化妆品、废水处理、农业等领域^[13, 16]。在医药领域，由于具有伤口愈合和止血的特性，CS 已被用于生物医学缝合线和绷带^[17]，交联的 CS 水凝胶已被用作靶向药物载体，能够控制药物释放^[18, 19]；由于具有生物可吸收性和生物相容性，同时具有良好的机械性能，CS 已被用于制造组织工程的支架^[20]；由于其生物相容性，保持水分的能力，无致敏性和无毒性，CS 也被用于化妆品中^[21]；由于 CS 在酸性溶液中呈阳离子状态，它也被用于絮凝或凝结废水中的带负电荷的有机和无机杂质，吸附废水中的重金属离子也得到了广泛的研究^[22]；在农业中，使用 CS 水凝胶进行水的持续释放，由于 CS 的抗菌特性，它也被用作种子的保护膜和叶面处理剂^[23, 24]。显然，在所有应用形式中，CS 基质水凝胶具有非常重要的价值。

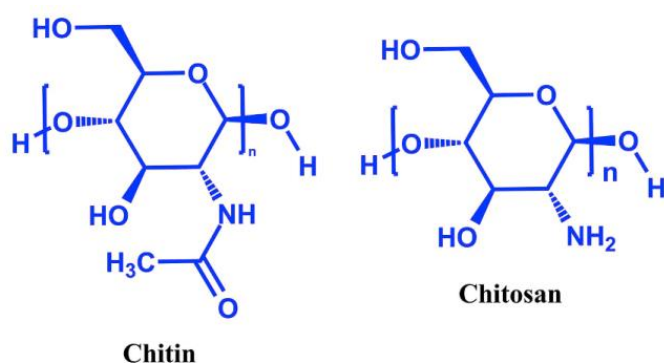
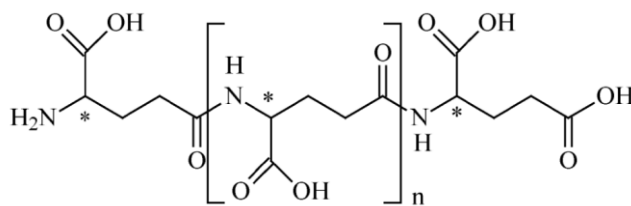


图 1-1 几丁质和壳聚糖的结构^[25]

Figure 1-1 The structure of chitin and chitosan

1.2.1.2 聚谷氨酸

γ -聚谷氨酸 (γ -Polyglutamic acid, γ -PGA) 是 D-谷氨酸或 L-谷氨酸的天然聚合物， γ -PGA 是谷氨酸通过 α -氨基和 γ -羧酸之间的酰胺键连接在一起的^[26]， γ -PGA 主要由芽孢杆菌生产^[27]。 γ -PGA 具有优良的水溶性、可生物降解和可食用的，它已被用作动物饲料补充剂、生物聚合物絮凝剂、化妆品中的保湿剂，和天然杀菌剂^[28]。 γ -PGA 的化学结构如图 1-2 所示，含有丰富的游离羧基，允许它在适当的 pH 值下与 CS 形成聚电解质水凝胶。

图 1-2 γ -聚谷氨酸的结构^[29]Figure 1-2 The structure of γ -Polyglutamic acid

1.2.1.3 透明质酸

透明质酸（Hyaluronic acid, HA）是一种具有非免疫原性和生物降解性的线性阴离子酸性多糖，是由 D-葡萄糖醛酸及 N-乙酰葡萄糖胺组成的双糖单位糖胺聚糖，由 β -1,3-糖苷和 β -1,4-糖苷键交替连接^[30]，化学结构如图 1-3 所示。1934 年首次从牛眼的玻璃体幽默中分离出来，广泛存在于人与动物的玻璃体、皮肤、脐带和滑液中。HA 具有优良的保湿性能、生物相容性和生物降解性，还具有多种必要的生理功能，与细胞分裂、信号转导等许多人体生理活动密切相关^[31-33]。HA 多糖链在生理溶液中稀释后采用扩展的随机螺旋结构，在高浓度时，HA 可以形成具有粘弹性行为的纠缠态大分子网络^[34]。目前，大量化学改性的 HA 水凝胶已被制备并广泛应用于药物递送、细胞培养、再生医学等领域^[35]。HA 中存在的羟基、羧基可通过静电相互作用和离子相互作用与 CS 形成聚电解质水凝胶，然而，长期以来，这种物理相互作用的 CS/HA 粘弹性水凝胶的高酶易损性和弱机械强度阻碍了其更广泛的应用^[36]。

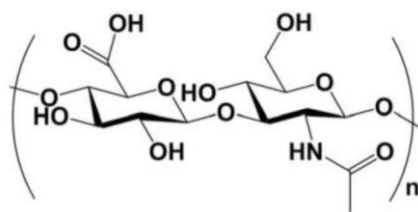
图 1-3 透明质酸的结构^[37]

Figure 1-3 The structure of hyaluronic acid

1.2.2 设计策略

为了成功地满足预期应用的特定要求，生物大分子水凝胶可用多种不同的方法制备，通过图 1-4 相应技术，分别制备出多种不同形态（膜、海绵、微粒和

纤维)生物大分子水凝胶。

1.2.2.1 溶剂铸造法

溶剂铸造是将水凝胶成膜的主要方法。它包括制备聚合物前体溶液,根据需求是否加入添加剂(引发剂、交联剂、塑化剂等),然后将其倒入合适的模具中,在一定温度下干燥并剥离获得水凝胶支架^[38]。通常用玻璃、聚苯乙烯、特氟龙等惰性材料制成的培养皿作模具。通过在前驱体溶液中添加增塑剂(如甘油),可以提高所获得的膜的柔韧性。溶剂浇铸法是一种常见的水凝胶制备方法,本课题主要采用此方法制备物理相互作用(静电引力、氢键)水凝胶。

1.2.2.2 造孔法

盐/造孔剂浸出方法涉及将某些 3D 模板引入反应混合物中,例如聚合纳米颗粒(如聚乳酸纤维、聚甲基丙烯酸甲酯颗粒、聚苯乙烯)、盐(如 NaCl)和无机颗粒(如二氧化硅)。它的去除可在水凝胶基质中产生孔隙。通过调节造孔剂类型和浓度,可以控制网络的孔径和孔隙度^[39]。然而,它们难以从水凝胶框架中去除,通常使用有机溶剂(如甲苯、甲醇、二甲基亚砷、乙腈、氯仿等),对孔的取向和互连的低控制是该方法的主要局限性^[40, 41]。

在发泡法中,通过在水凝胶前驱液中产生气泡形成孔隙^[40]。通过分解碳酸氢钠(产生 CO_2)或碳酸氢铵(形成 CO_2 和 NH_3),或在一定压力下将惰性气体鼓泡到前驱体混合物中,原位产生气泡^[42]。通过调节发泡剂浓度或调节气泡气体压力可优化孔隙度和孔径。起泡法的优点在于避免使用有机溶剂,缺点是内部形态不均匀,孔隙互连性差^[43]。

冻干方法首先冷冻水凝胶前驱液,然后在真空下通过升华去除水分^[40, 43],水凝胶孔隙率,孔隙大小和孔壁厚度受前驱液浓度和冻干过程中使用压强的影响。通过这种方法获得的水凝胶网络通常显示相互连接的孔隙。缺点是所得水凝胶的弹性较低,耗时耗电^[43]。

冻融法一般经过几个连续的冷冻-融化循环,冷冻涉及到以冰晶作为致孔剂形成三维聚合物网络,前驱体溶解在水中,在冻结后导致相分离,以生长的冰晶为代表的固相和含有前驱体的浓缩液相^[43-45],由于诱导的空间约束,前驱体在浓液相中反应生成交联聚合物网络,而冰晶在室温下熔化后会形成孔隙。通过改变冷却的方向和速度^[46],通过调整反应混合物中前驱体的浓度以及溶剂类

型^[47]，可以控制它们的内部形态和孔的大小。冻融法最显著的优点是不使用化学交联剂，因此获得的水凝胶具有生物相容性^[48]，此外，具有弹性和对外部刺激（如pH值、离子强度）的响应性^[49]，缺点是耗时长，相较于烘干，获得的材料常表现出较差的机械性能^[43]。

1.2.2.3 颗粒成型法

挤出是聚合物溶液通过毛细管缓慢滴下进行的，在重力作用下形成单个液滴颗粒水凝胶，形成的液滴被收集在含有交联剂的凝胶浴中。同时存在逆向挤出，即将含有交联剂的溶液滴入聚合物溶液中。制备的水凝胶的直径和形态受到许多操作参数的影响，包括聚合物和交联剂溶液的浓度，毛细管尖端的直径，以及毛细管尖端与收集浴之间的距离。通过挤压，制备出微颗粒水凝胶。优点是所需设备简单，可容易地包封各种亲水或疏水的生物活性化合物，缺点是要获得均匀尺寸球形颗粒需要繁琐的控制工程^[50]。

喷雾干燥用于制备精细和均匀的水凝胶颗粒，通过在加热的容器中雾化反应混合物，以快速去除溶剂，随后收集所得微粒^[50]。这是一种便捷的方法，用以制备微/纳米颗粒水凝胶。

乳化是在乳化剂存在下，将两种不混溶的前驱相（亲水相和亲脂相）均质化^[50]，其优点是制备的水凝胶微粒容易将亲水性和疏水性生物活性物质包封，缺点是均质技术，如微流化、超声，均需要复杂的设备和高能量输入。

凝聚是制备水凝胶微粒的另一种简单方法，可分成简单凝聚（使用一种聚合物）和复杂凝聚（使用两种或两种以上的聚合物）。在简单凝聚中，微凝胶的形成是通过在聚电解质的溶液中加入小分子盐，从而导致其相分离而发生的。复杂凝胶涉及两个或多个带相反电荷的聚电解质之间的静电相互作用，通过调节介质的pH值和离子强度来控制微粒^[51, 52]。

1.2.2.4 静电纺丝法

静电纺丝是将水凝胶制备成具有不同直径（微米或纳米）和成分纤维的主要策略。它包括将前驱体溶液加载到毛细管中，在高压电流下将其作为射流推出，细线状溶液被吸引到带相反电荷的收集器上，同时溶剂蒸发。静电纺丝可以制备物理相互作用水凝胶，也可以制备共价作用水凝胶。共价水凝胶可以通过不同的方法来实现，如将交联剂与聚合物溶液同时注入毛细管，将预先获得

的非交联纤维浸泡在含有交联剂的溶液中，通过高温或紫外线辐射激活交联剂。通过改变前驱体溶液的温度、粘度和电导率，改变施加电压和毛细尖端与收集器之间的距离，可以调控纤维的性能^[53]。纤维状水凝胶的主要优点是其高比表面积和均匀结构，类似于细胞外基质^[54]，缺点表现出较低的机械性能，孔隙率难以控制。

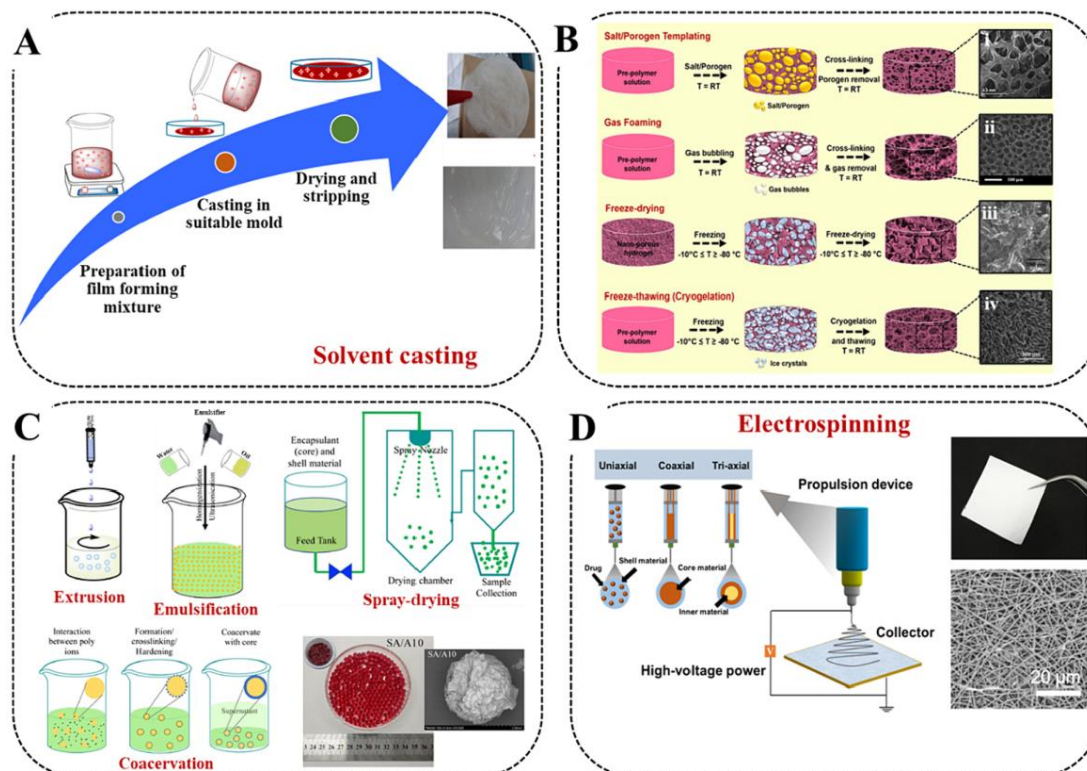


图 1-4 溶剂铸造 (a)，造孔 (b)，颗粒成型 (c) 和电纺丝 (d) 水凝胶制备方法^[55]

Figure 1-4 Solvent casting (a), pore forming (b), pellet forming (c) and electrospinning (d) hydrogel preparation methods

1.2.3 从结构到性能

以 CS 基水凝胶为例，说明水凝胶的结构特征与相应功能之间的关系。CS 基水凝胶通过各种相互作用相互连接，形成 3D 网络。目前，根据水凝胶凝胶网络的制备，最合理的是根据交联结构中占主导地位的相互作用是物理交联还是化学交联进行分类。智能水凝胶是一种具有高度可控性和响应性的材料。目前已知，智能 CS 基水凝胶被广泛应用于组织工程、酶固定、药物控释和靶向给药等领域^[56]。

1.2.3.1 物理交联

物理交联水凝胶是由静电吸引、氢键、疏水相互作用和结晶等次级相互作用驱动形成，根据水凝胶网络中的主导作用划分为以下三大类：

(1) 静电相互作用

CS 是一种源自天然聚合物的阳离子多糖，CS 上的阳离子氨基可与带负电荷的分子和阴离子之间发生静电相互作用。这种正负电荷之间的静电相互作用会导致 CS 与其他物质之间的吸引力，从而促使水凝胶形成。CS 的存在使得水凝胶具有良好的生物相容性、生物可降解性和可调控的溶胀性能。水凝胶的性能可通过调整 CS 的含量、交联程度和其他添加剂来进行调控，以满足特定应用^[57]。Tsao^[28]等制备的 CS/ γ -PGA 水凝胶具有良好的抗菌活性和生物相容性，随着络合程度的增加，水凝胶的压缩模量上升，吸水率降低，在相同络合程度下，CS 为主的水凝胶压缩模量较大， γ -PGA 为主的水凝胶吸水量较大。Lin^[58]等开发的 CS/HA 水凝胶具有无药物性、易获得性、良好的生物相容性和良好的创面愈合效果等特点，在慢性糖尿病创面治疗中具有广阔的临床应用前景。然而，目前 CS/HA 水凝胶存在机械强度低，韧性差等问题^[59-61]，限制了其进一步开发应用。

(2) 氢键

在 CS 溶液中加入碳酸氢盐和 NaOH 会增加 pH 值，当 pH 高于 6.5 时，壳聚糖会发生溶胶-凝胶转变，由于氢键的物理连接作用，CS 会形成三维网络^[62, 63]。Liu^[64]等人利用 NaHCO_3 研究了 CS 的凝胶化，在 4°C 的低温 CS 溶液中加入 NaHCO_3 ，为了产生凝胶，将温度提高到 37°C，这导致 CS 溶液 pH 逐渐升高，伴随着 CO_2 的排放，使得 CS 链之间的氢键得以重组。

(3) 疏水相互作用

Chenite^[65]等人最早提出使用磷酸多元醇进行 CS 热可逆凝胶化，当温度升高至 37°C 时，壳聚糖/磷酸多元醇/水三元体系转向凝胶化。磷酸多元醇增加了 CS 溶液的 pH 值，而不会引起凝胶化或相分离，这种行为归因于 CS 阳离子向磷酸多元醇的质子转移，以及在 CS 链周围形成磷酸多元醇的保护性水合层。当温度升高到 37°C 时，保护性水合层可能被破坏，使 CS 链之间发生疏水相互作用，导致凝胶化^[66]。这意味着水凝胶利用疏水相互作用在分子之间形成网络。

1.2.3.2 化学交联

在化学交联水凝胶中，聚合物链间存在共价键或金属配位键，它们形成的交联点是稳定的，不易被裂解^[67]。

(1) 共价键

CS 基共价交联水凝胶一般通过 CS 与交联剂中官能团之间建立共价键形成三维网络，包含席夫碱键、酰胺键和仲氨键^[56]。举例如下，醛基可以与壳聚糖的氨基形成席夫碱键，戊二醛是 CS 基水凝胶最常用的交联剂。戊二醛与 CS 交联的优点是易于合成、反应速度快、反应物的生物相容性可接受等，主要挑战是如何去除反应体系中具有神经毒性的残留的戊二醛^[68]。酰胺键是一种通过羧酸或羧酸衍生物与氨基之间的酯化反应形成的共价键，在这个反应中，羧酸中的羧基（-COOH）与氨基（-NH₂）发生酯化反应，产生一个酰胺结构，同时释放出水分子。Kaczmarek^[69]等利用 EDC 和 NHS 活化 HA 的羧基，生成活性的 NHS 酯中间体，与掺入的 CS 的氨基形成酰胺键，形成共价交联水凝胶，改善了支架的力学参数和热稳定性。

(2) 金属配位键

CS 中含有丰富的氨基和羟基，对许多金属阳离子具有亲和力，由于氮元素上的自由电子偶联，金属阳离子可以螯合吸附在 CS 的氨基上，羟基（特别是在 C-3 位置）也可能有助于吸附^[70]。Nie^[71]等用不同的金属离子研究 CS 水凝胶的凝胶过程和结构变化，揭示了两种不同的机制，CS 与金属离子的强亲和力导致结构从取向向多层转变，弱亲和力导致原位形成无机颗粒的复合凝胶，这为水凝胶形态的调控提供策略，有利于设计具有层次结构的新型 CS 基水凝胶。

1.2.3.3 智能水凝胶

智能水凝胶可以通过调控其结构、组成或交联程度，以及响应刺激的方式和强度来实现对外界刺激的敏感性和可控性。分为以下三大类：刺激响应型水凝胶、仿生水凝胶和高强度水凝胶。

(1) 刺激响应型水凝胶

刺激响应型水凝胶是一类具有对特定刺激做出响应的水凝胶材料。它们能够通过外界刺激（如温度、pH 值、离子浓度、光照等）的变化，实现水凝胶结构形态的改变。这种可控的响应性使其在药物控释、组织工程、传感器技术等

领域具有广泛的应用潜力。例如，壳聚糖/聚（N-乙烯基-2-吡咯烷酮）/聚丙烯酸水凝胶在酸性 pH 下表现出低溶胀，在碱性 pH 下表现出高溶胀，溶胀随 pH 的升高而升高，可装载磺胺嘧啶银（烧伤伤口抗生素）进行 pH 响应释放^[72]。

（2）仿生水凝胶

仿生水凝胶是一种模仿生物体组织和生物材料特性的水凝胶材料。它在结构、功能和性能上与生物体具有相似性，具有高度的生物相容性和生物活性。例如，通过半柔性 O-羧甲基壳聚糖（主链）和柔性二苯甲醛封端的遥爪聚乙二醇（交联剂）的动态亚胺交联，制备一系列应变硬化的自修复仿生水凝胶，可以可逆地硬化以抵抗变形，甚至可以在反复损伤后恢复到其原始状态^[73]。

（3）高强度水凝胶

很多 CS 基水凝胶在低应力下会破裂，尤其是生物相容性较好的非共价交联水凝胶，这限制了其进一步开发利用。目前，越来越多对水凝胶的研究集中在增强其机械性能上，增强策略如构建双网络水凝胶，纳米复合水凝胶等^[74]。双网络水凝胶是由两种不对称结构的聚合物网络组成的，第一个网络被称为“刚性网络”，它由高交联密度的聚合物形成，提供了材料的强度和刚性，通常由刚性聚合物，如聚丙烯酰胺、聚丙烯酸构建。第二个网络被称为“可拉伸网络”，它由低交联密度的聚合物形成，具有较高的延展性和可伸缩性，通常由可拉伸聚合物，如聚乙烯醇、聚乙二醇构建。两个网络通过交联点相互交织在一起，形成了双网络结构，刚性网络提供了整体的强度和稳定性，而可拉伸网络则允许材料在应力作用下发生形变和延展^[75]。

1.3 研究意义与内容

1.3.1 研究意义

近年来，有关 CS 基水凝胶的研究日益增长，CS 基水凝胶在生物医学、农业和化妆品等领域应用广泛，具有极大的开发前景。然而，共价交联带来毒性、物理交联机械性能弱等问题限制了 CS 基水凝胶的进一步发展。

CS/ γ -PGA 物理交联水凝胶虽然具有良好的生物相容性和吸保水性能，但存在网络不均匀、机械强度差、功能性不足等问题。CS/HA 物理作用水凝胶的力

学性差，限制了其在一些负重或复杂应力环境下的应用。因此设计合适的策略来提高网络的交联密度，拓展其功能性至关重要。水凝胶的结构（交联方式、孔隙率、结晶度等）和性能（吸水性、保水性、吸附行为、机械性能等）密切相关，然而，系统性研究水凝胶结构与性能关系的报道较少，结构与性能关系复杂，研究模式较为单一，因此，调控水凝胶的结构，分析结构与性能之间的变化关系具有重要研究意义。

基于上述问题，本课题采用多种策略调控水凝胶的结构，如 AA 介导调控、基质比例调节、NaOH 溶液浸泡和主客体渗透交联等，试图提高水凝胶的多种性能，并研究其结构与性能之间的关系，丰富了水凝胶结构性能调控方法，提供了水凝胶网络结构性能调控理论参考，有利于推动水凝胶的实际应用。

1.3.2 研究内容

为解决上述问题，本文开展以下研究内容：

（1）AA 的调控作用对 CS/ γ -PGA 水凝胶结构及载药行为的影响

在 CS/ γ -PGA 水凝胶中引入不同 AA，通过改变网络的自组装来改善水凝胶的多种性能，选择最优的 β -Ala 作为桥梁，通过静电相互作用将 CS 和 γ -PGA 两个骨架大分子连接起来。静电相互作用是可逆的，有助于 β -Ala 和大分子的自组装，形成密集交联，获得更稳定的结构。特别是在可逆相互作用中， β -Ala 可以在碱性条件下与带正电的药物自由结合，形成大量的中性络合物，以改善 CS/ γ -PGA 水凝胶用于碱性伤口愈合的药物释放行为。

（2）CS/HA 水凝胶结构与性能关系研究

以静电作用 CS/HA 水凝胶为研究对象，通过分离水凝胶前驱液的沉淀和上清获得了高溶胀 CS/HA 水凝胶，同时，CS/HA 水凝胶的溶胀行为具有敏感的制备条件响应性，通过调控 HA 基质比例，使用不同浓度 NaOH 浸泡处理和引入不同含量 Lys 等手段获得多种不同的水凝胶，以溶胀行为连接其微观结构和宏观性能，系统分析 CS/HA 水凝胶结构与性能的变化规律。

（3）主客体渗透交联制备高韧 CS/AA/HA 水凝胶

天然聚合物的多分散性和异质性对其结晶、交联和链缠结等有着复杂的影响，首先通过静置分层 CS/HA 水凝胶前驱液，实现大分子 CS/HA 聚集体（主

体)和悬浊液中的小分子聚集体(客体)的分离重排,消除多余小分子对大分子聚集体结晶的干扰,也为后续水凝胶的组装提供更多的交联位点。然后,用去离子水洗涤 CS/HA 大分子聚集体进一步去除其中的小分子聚集体,提升大分子聚集体的规整度。设计不同的小分子聚集体并引入大分子聚集体中,测量其机械性能并进行多种表征,阐明主客体渗透交联的增韧机理。

第 2 章 AA 对 CS/ γ -PGA 水凝胶结构及载药行为的影响

2.1 前言

伤口往往是由于皮肤、粘膜表面或器官组织的完整性遭到破坏而造成的，很容易受到病原体的侵袭^[76]。如果护理不当，感染会延迟伤口愈合^[77]。一般来说，愈合过程要经历止血、炎症、增殖和重塑^[78]。其中，由于细菌破坏和碎片清除导致的炎症是伤口修复的重要步骤。创面敷料拦截细菌感染，抑制创面炎症，清除创面渗出物，加速组织再生，提高创面愈合效率^[79]。水凝胶是最流行的伤口敷料之一，因为它的 3D 网络具有与软组织相似的弹性，可以保持湿润的伤口环境，便于疼痛缓解、组织再生和伤口愈合。此外，多孔网络可以装载许多生物活性分子并持续释放在伤口上，加速伤口愈合过程^[80-82]。鉴于 pH 响应水凝胶对创面 pH 值变化的敏感反应，在创面敷料中具有很大的应用潜力^[83]。皮肤损伤后，创面 pH 值在短期急性期（止血期和炎症期）略有下降，在增殖期有所升高，但最终恢复正常（5.5 ~ 6.5）。尤其对于感染、烧伤、褥疮、糖尿病等具有异常持续性炎症的慢性创面，在炎症、增殖和重塑阶段，pH 值始终保持碱性^[84]。然而，据报道，大多数 pH 响应水凝胶用于在酸性环境中释放药物。因此，迫切需要构建适合于碱性慢性伤口愈合^[85]的 pH 响应伤口敷料。

CS 基水凝胶具有可生物降解、生物相容性好、无毒、抗菌、生物黏附和吸湿等作用^[86]，是加速伤口愈合的理想材料，尤其适用于过度炎症性和慢性伤口感染。CS 是一种重要的阳离子聚合物， γ -PGA 是一种具有非免疫原性和可生物降解性的阴离子聚合物。它们可以很容易地组装成多聚电解质复合物（Polyelectrolyte complexes, PECs），用于伤口敷料，PECs 的形成是由静电相互作用驱动的，这种相互作用取决于 pH 值的变化^[87]。因此，CS/ γ -PGA 水凝胶具有敏感的 pH 响应行为。但在碱性环境下，CS/ γ -PGA 水凝胶作为伤口敷料面临着网络不稳定、机械强度差、带正电荷药物释放能力低等挑战。主要原因可能集中在静电相互作用上。首先，CS/ γ -PGA 水凝胶是通过 CS 的质子化氨基亲电聚合形成的，因此聚合通常发生在酸性环境中，在碱性环境下，聚合变得非常弱，聚合网络开始解离。CS/ γ -PGA 水凝胶网络在碱性环境下不稳定，容易膨胀。

其次, 相对于小分子, 基于静电相互作用的 CS 与 γ -PGA 大分子之间的交联更稳定, 导致分子张力更高, 从而降低了分子间的碰撞概率和交联度, 导致机械强度较差。因此, CS/ γ -PGA 水凝胶不能作为理想的伤口敷料, 在碱性环境下有效地装载和释放药物。为此, 两亲肽作为交联剂已被报道改善超分子水凝胶在中性 pH 值下的释放行为^[88]。简单阳离子两亲二肽的水凝胶已被开发用于控制药物释放, 但释放通常在酸性环境下进行^[89]。另一方面, 抑制溶胀有助于保留水凝胶的机械性能^[90]。在 CS 和 γ -PGA 之间加入半胱氨酸 (Cys), 构建共价骨架网络, 调节 CS/ γ -PGA 水凝胶的载药和持续释放的行为^[91], 但共价连接降低了其 pH 响应行为。氨基酸 (Amino acid, AA) 是最简单的生物构建单元, 能够通过超分子自组装形成离散的纳米结构^[92]。将 AA 引入 CS/ γ -PGA 水凝胶中, 增强 CS 与 γ -PGA 之间的静电相互作用, 并进一步增强骨架网络的交联。本章充分利用 AA 的性质, 设计了一种新颖的策略, 即选择最优的 AA 作为桥梁, 通过静电相互作用将 CS 和 γ -PGA 两个骨架大分子连接起来。静电相互作用是可逆的, 有助于 AA 和大分子的自组装, 形成密集的连接, 以获得更稳定的结构。特别是在可逆相互作用中, AA 可以在碱性条件下与带正电的药物自由结合, 形成大量的中性络合物, 以改善 CS/ γ -PGA 水凝胶用于碱性慢性伤口愈合的药物释放行为。

苯扎氯铵 (Benzalkonium chlorides, BAC) 是一种具有广谱抗菌性能的季铵盐化合物。自 1935 年以来, BAC 已被制成各种产品, 如消毒剂、防腐剂和消毒剂, 特别是在当前的抗生素耐药性危机中作为消毒剂来防止病原体的传播。然而, 大多数研究和政府机构都认为 BAC 不是一种无害物质^[93]。欧盟委员会将食品中 BAC 最大残留量的规定从 0.5 mg/kg 更改为 0.1 mg/kg^[94]。因此, 在实际应用中利用水凝胶的包封和缓释能力来降低 BAC 的用量具有重要意义。

本章系统地研究了几种 AA 对 CS/ γ -PGA 水凝胶的结构性能和各种行为的影响, 选择最优的 AA 来克服水凝胶的缺点。为了增强 β -Ala 桥接的水凝胶在碱性环境下的抗菌效果, 进一步研究了 pH 变化对水凝胶 BAC 负载和释放的影响。结果显示, CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶是一种潜在的碱性伤口敷料材料。

2.2 实验材料与仪器

2.2.1 材料与试剂

表 2-1 主要材料与试剂

Table 2-1 Main materials and reagents

名称	级别	生产厂家
γ -聚谷氨酸	结晶体	陕西清雅生物科技有限公司
甘氨酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
β -丙氨酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
γ -氨基丁酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
氯化钠	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
壳聚糖	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
冰醋酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
苯扎氯铵	80%纯度	麦克林生化科技有限公司
亚甲基蓝	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
甲基橙	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸氢二钠	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钠	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司

2.2.2 仪器

表 2-2 主要实验仪器

Table 2-2 Main instruments

仪器	型号	生产厂家
超纯水机	LD-DI-15V	上海硕鼎水处理设备公司
集热式恒温加热磁力搅拌器	DF-101SZ	河南省巩义予华仪器有限责任公司
真空冷冻干燥机	SJIA-10N	宁波市双嘉仪器有限公司
扫描电子显微镜	S-4800	日本日立公司
傅里叶变换红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
X-射线衍射仪	D8Advance	德国布鲁克公司
光学接触角仪器	SL250	美国科诺有限公司
流式细胞仪	CytoFLEX	美国贝克曼库尔特有限公司
差示扫描量热仪	DSC25	美国 TA 仪器沃特斯公司
紫外分光光度计	UV-5500PC	上海元析仪器有限公司
激光粒度仪	90PlusPALS	美国布鲁克海文仪器公司

2.3 实验方法

2.3.1 水凝胶的制备

将 100 mg γ -PGA 溶解于 15 mL 1×10^{-5} mol/L NaOH 溶液中，在 45°C 下 550 rpm 搅拌 30 min。然后在溶液中加入 300 mg CS, 550 rpm 搅拌 5 min，使其均匀分布。将 5 mL 的 4% 冰醋酸溶液以每分钟 10 滴的速度滴入 CS/ γ -PGA 混合物中，在 550 rpm 和 45°C 下搅拌 45 min。将前驱体浆液缓慢倒入培养皿 (Φ 9 cm) 中，在 45°C 下加热干燥过夜，形成前驱体水凝胶，在 15 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液中浸泡 2 h。然后用去离子水冲洗，直到洗脱液的 pH 值不变。最后，将水凝胶置于 45°C，直到恒重。

2.3.2 AA 的引入

在上述水凝胶的制备过程中 γ -PGA 完全溶解后，分别加入 0.5% Gly、 β -Ala 和 γ -GABA，可分别形成 CS/Gly/ γ -PGA、CS/ β -Ala/ γ -PGA 和 CS/ γ -GABA/ γ -PGA 水凝胶。利用 SEM、FTIR、XRD 和 DTG 对水凝胶进行表征。测试了水凝胶的拉伸性能和孔隙率，并测定了水凝胶的溶胀、吸水、保水性和水溶性。以 CS/ γ -PGA 水凝胶为对照，研究了 AA 链长度对水凝胶结构性能和各种行为的影响。在 CS/ γ -PGA 水凝胶中加入 0 - 1% 的 β -Ala，并测试上述参数。系统分析了 β -Ala 含量对 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶结构性能和行为的影响。

2.3.3 载药与释药

2.3.3.1 药物模型装载

以 MB ($K_{\max} = 661$ nm) 和 MO ($K_{\max} = 505$ nm) 分别作为带正电荷和带负电荷的药物模型，评价水凝胶的装载能力^[95]。将 50 mg 干燥的水凝胶放入 5 mL 浓度为 0.01 mg/mL 的药物模型溶液中 1 h，收集原模型溶液和加载 1 h 的药物模型溶液，分别用紫外分光光度计测定 661 nm 和 505 nm 处的吸光度值 A_0 和 A_t 。装载率 (Loading rate) 使用公式 (2-1) 计算。

$$\text{Loading rate} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (2-1)$$

2.3.3.2 BCA 装载

对 CS/ γ -PGA 膜和 CS/0.5% β -Ala/ γ -PGA 膜装载 BAC 的时间和浓度对抑菌圈大小的影响进行探究, 均按照 50 mg 干膜 5 mL 苯扎氯铵溶液进行装载, 选定的装载浓度分别为 0%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%, 装载时间分别为 0 min、5 min、10 min、20 min、40 min、60 min。分别取 100 μ L 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌种子液于平板培养基中均匀涂布。取出不同 BAC 浓度和装载时间处理后的膜, 一致去除表面明显水分, 然后用直径为 6 mm 的打孔器对其进行打孔, 将得到的小圆片置于上述平板培养基中, 并在小圆片中心滴加 5 μ L 蒸馏水。最后将上述平板倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 12-16 h。用游标卡尺测定抑菌圈的大小, 确定最佳装载浓度和时间。

2.3.3.3 抑菌性能检测

采用流式细胞仪检测不同样品装载 BAC 后的抑菌效果。首先将 50 mg CS/ γ -PGA 水凝胶干膜和 50 mg CS/ β -Ala/ γ -PGA(0.5%)水凝胶干膜分别浸泡在 5 mL 0.04% BAC 溶液中 40 min 进行 BAC 的装载, 随后使用 5 mL PBS (pH7.4) 缓冲液浸提 5 h, 取上清液备用。将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌培养至对数生长期, 4000 rpm 离心 10 min 收集菌体, 再用 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液反复重悬冲洗菌体 2 遍。之后再分别用 CS/ γ -PGA 水凝胶、CS/ β -Ala/ γ -PGA(0.5%)水凝胶装载 BAC 后的浸提液 1 mL 重悬菌体, 将加入 1 mL PBS 缓冲液重悬处理的菌体作为阴性对照, 将加入 1 mL PBS 缓冲液重悬处理并进行 100 $^{\circ}$ C 沸水浴灭活的菌体作为阳性对照, 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C, 150 rpm 的摇床中孵化 45 min, 然后 4000 rpm 离心 10 min 收集菌体, 并分别加入 1 mL 浓度为 6.6 μ L/mL 的 PI 染料进行避光染色 30 min, 再 4000 rpm 离心 10 min 收集菌体, 使用 1 mL PBS 缓冲液重悬后采用流式细胞仪分析死细胞数量。

2.3.3.4 药物模型释放

将 50 mg 装载过亚甲基蓝的样品, 即 2.3.3.1 中装载结束的样品, 置于 45 $^{\circ}$ C 烘箱中烘干, 分别加入到 10 mL pH4.92-8.67 缓冲液中, 25 $^{\circ}$ C 浸泡 0-16 h, 每 2 h 取出 2 mL 溶液, 用紫外分光光度计 UV-5500PC 在 661 nm 波长下检测吸光度, 同时, 在释放系统中加入 2 mL 新鲜缓冲液, 然后根据公式 (2-2) 计算药物模型的累积释放量 (Cumulative Release, CR)。

$$CR = V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_{n-1} + V_0 C_n \quad (2-2)$$

式中， V_e 和 V_0 分别为2 mL和10 mL， C_n 为n次采样后溶液中药物模型的浓度，所有检测均重复三次。

2.3.4 pH 值影响

2.3.4.1 不同 pH 溶液处理的 Zeta 电位

采用激光纳米粒径仪（NanoBrook 90PlusPALS，美国）测定其 Zeta 电位。将不同的水凝胶干燥样品研磨碎，分别取 50 mg 置于 pH4.92、6.81、8.67 磷酸二氢钠-磷酸二氢钾缓冲液以及 pH7.4 的 PBS 缓冲液中浸提一夜，4000 rpm 离心 10 min，取上清液测 Zeta 电位。

2.3.4.2 不同 pH 溶液下的溶胀性能

将水凝胶切成 1 cm × 1 cm 大小，在 45°C 下干燥至恒重 (M_0)。然后将样品浸泡在 5 mL pH 4.92-8.67 磷酸二氢钠/钾缓冲液中 2 h，在空气中悬挂 1 min 以去除表面的游离水，测定水凝胶片的重量为 M_2 。用公式 (2-3) 计算溶胀率 (Swelling behavior)，公式 (2-4) 计算相对溶胀率 (Relative swelling)。

$$\text{Swelling behavior} = \frac{M_2 - M_0}{M_0} \times 100\% \quad (2-3)$$

$$\text{Relative swelling} = \frac{\text{Swelling behavior at different pH values}}{\text{Swelling behavior at pH 4.92}} \times 100\% \quad (2-4)$$

2.3.4.3 不同 pH 溶液下药物模型装载

将两份 50 mg 干燥的水凝胶分别浸泡在 10 mL pH 4.92-8.67 缓冲溶液中，温度为 25°C，过夜。将其中一份水凝胶加热烘干，将烘干的水凝胶和湿的水凝胶分别浸入两份 5 mL 0.01 mg/mL MB 溶液 0-24 h。用紫外分光光度计测定原模型溶液和载药溶液在 661 nm 处的吸光度分别为 A_0 和 A_t 。装载率 (Loading rate) 由公式 (2-5) 计算。

$$\text{Loading rate} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (2-5)$$

2.3.5 机械性能

单轴拉伸试验采用电子单纱强度测试仪进行。试样的长度、宽度、厚度统

一为 50mm、5mm、1.5 mm。试验条件设置为:量程为 5000 cN, 预紧力为 10 cN, 夹紧距离为 20 mm, 拉伸速率为 30 mm/min。断裂伸长率 (E_b) 和杨氏模量 (Young's modulus) 由公式 (2-6) 和公式 (2-7) 计算。

$$E_b = \frac{E_t}{E_0} \times 100\% \quad (2-6)$$

式中, E_t 和 E_0 分别为 t (s) 和 0 (s) 时水凝胶的伸长值。

$$\text{Young's modulus} = \frac{S_m}{E_{bm} \times W \times T \times 100} \quad (2-7)$$

式中, S_m 和 E_{bm} 均取前 5% 拉伸对应的值, W 和 T 分别指水凝胶的宽度 (mm) 和厚度 (mm)。

2.3.6 孔隙率

孔隙率采用密度法^[96]测定。首先, 将干燥后的水凝胶切成尺寸相同的 1.1 cm × 1.1 cm 的样品。用螺旋千分尺测定厚度 (d) 5 次, 得到平均值, 用分析天平测定原始重量 (M_1)。其次, 将样品在 20 mL 无水乙醇中浸泡 30 min, 然后取出, 用滤纸除去样品表面游离乙醇, 将处理后的水凝胶称量为 M_2 。孔隙率 (Porosity) 采用式 (2-8) 计算。

$$\text{Porosity} = \frac{M_2 - M_1}{\rho \times V_1} \times 100\% \quad (2-8)$$

式中, ρ 为无水乙醇的密度 (0.789 g/mL)。 V_1 为样品的原始体积, 等于 $1.21 \times d$ (cm³)。

2.3.7 溶胀、吸水、保水和水溶性

按照文献报道的方法^[97, 98], 将水凝胶切成 1 cm × 1 cm 大小的小块, 在 45°C 下干燥至恒重 (M_0)。然后用 5 mL 去离子水浸泡 1h、4h 或一定时间 t_h , 在空气中悬挂 60 秒, 以去除表面的游离水分。此时, 测定各组片的重量值分别为 M_1 、 M_4 或 M_t 。将 M_1 称量的片放入带过滤器的管中, 以 3500 rpm 离心 3 min, 重量测定为 M_d 。将 M_4 称量的片在 45°C 下干燥至恒重 (M_s)。溶胀率 (Swelling behavior)、吸水 (Water absorption)、保水 (Water retention) 和水溶性 (Water solubility) 分别用公式 (2-9)、(2-10)、(2-11) 和 (2-12) 计算。

$$\text{Swelling behavior} = \frac{(M_t - M_0)}{M_0} \times 100\% \quad (2-9)$$

$$\text{Water absorption} = \frac{(M_1 - M_0)}{M_0} \times 100\% \quad (2-10)$$

$$\text{Water retention} = \frac{(M_d - M_0)}{(M_1 - M_0)} \times 100\% \quad (2-11)$$

$$\text{Water solubility} = \frac{(M_0 - M_s)}{M_0} \times 100\% \quad (2-12)$$

2.3.8 亲水性

将水凝胶塑形为 1 cm × 1 cm 的薄片，浸入去离子水中充分溶胀，取出去除表面的游离水，固定在玻璃载玻片上，使用光学接触角仪测定水凝胶的接触角，以观察水凝胶的亲水性。

2.3.9 细胞相容性

采用 MTT 试剂盒检测不同样品对细胞活力的影响来评估水凝胶的细胞相容性。

2.3.10 结构表征

2.3.10.1 SEM

用导电胶带将干燥的水凝胶固定在短金属管上，通过溅射的方法涂上一层薄薄的金层。用 S-4800SEM 在 5 千伏下获得水凝胶的形态图像。

2.3.10.2 FTIR

水凝胶样品在 60°C 下热干燥 12 h 后，用干燥的溴化钾研磨，压成薄片，使用 FTIR 光谱仪在 400-4000 cm⁻¹ 波数范围内以 4 cm⁻¹ 分辨率收集光谱。

2.3.10.3 XRD

用 XRD 仪分析了样品的晶体性质。扫描速度设置为 2°/min，范围为 5-50°，X 射线管在 40 kV 和 40 mA 下工作。

2.3.10.4 TGA

采用岛津 DTG-60H 微型差示热平衡仪对样品进行热重分析 (TGA)。8-10

mg 样品在 20 mL/min N₂ 中, 以 10 °C/min 温度从 30°C 加热至 700°C。

2.4 结果与分析

2.4.1 氨基酸种类的影响

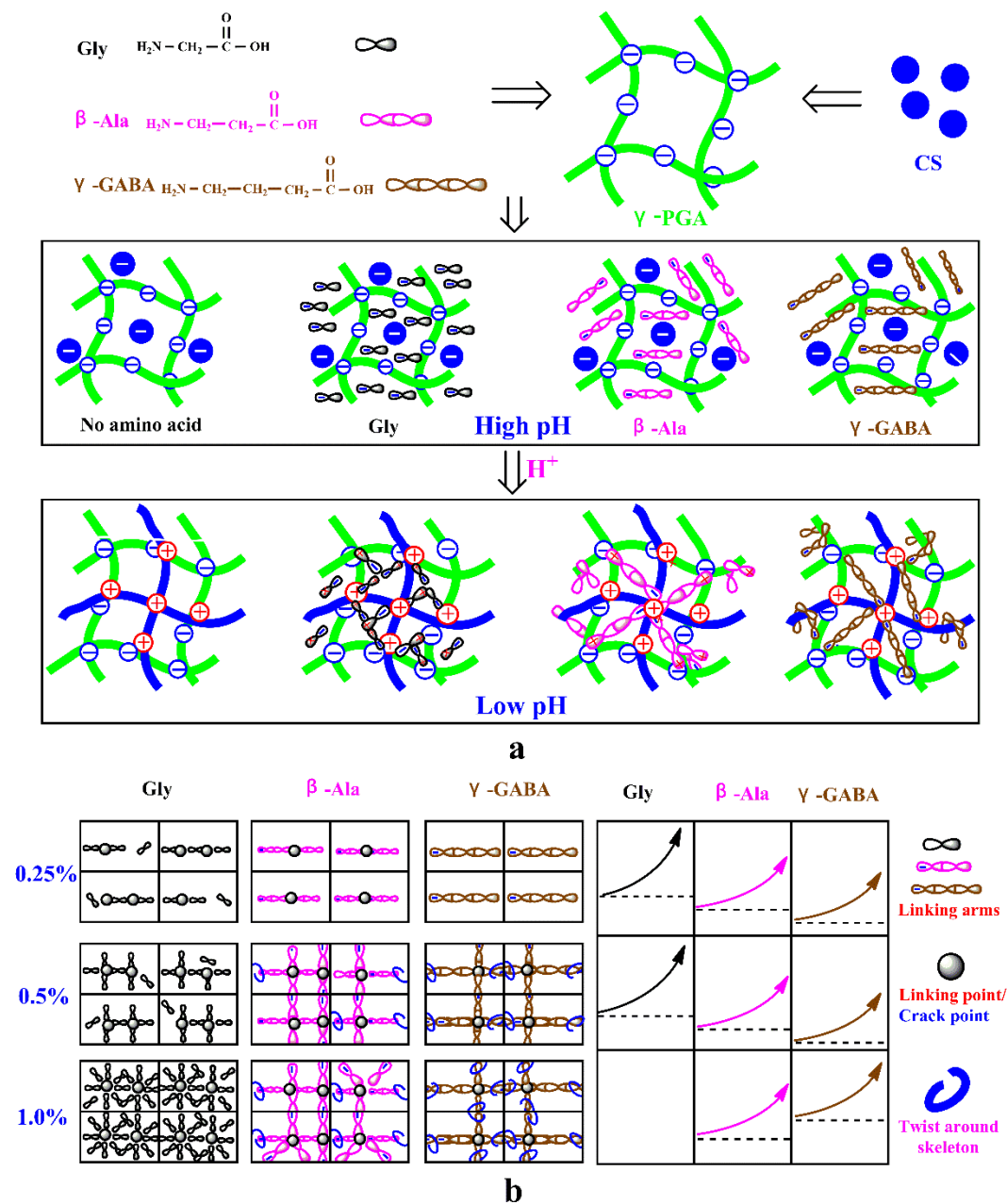


图 2-1 基于 pH 调节的 AA 连接水凝胶的制备 (a) 及 AA 交联影响水凝胶的机理 (b)

Figure 2-1 Preparation of AA linked hydrogels based on pH adjustment (a) and mechanism of AA cross-linking affecting hydrogels (b)

如图 2-1 所示, 选用链长从长至短分别为 γ -GABA、 β -Ala 和 Gly 的三种不同链长的 AA 探究其对水凝胶结构和性能的影响。拉伸行为对水凝胶的实际应用非常重要。如图 2-2 所示, AA 的侵入增加了水凝胶的应力和断裂伸长率。其中, CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶的应力最高, 为 1.57 MPa, 是 CS/ γ -PGA 水凝胶的 2.08 倍, 其次是 CS/Gly/ γ -PGA 水凝胶。CS/Gly/ γ -PGA 水凝胶的断裂伸长率最高, 为 62.85%, 是 CS/ γ -PGA 水凝胶的 1.7 倍。如图 2-2a 插图所示, CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶的弹性模量最高, 为 3.36 MPa, 是 CS/ γ -PGA 水凝胶的 2.2 倍, 其次是 CS/Gly/ γ -PGA 水凝胶。 β -Ala 和 Gly 可以显著改善了 CS/ γ -PGA 水凝胶的拉伸性能。这可以归结为: 1) AA 中含有一个氨基和一个羧基, 它们是连接 γ -PGA 和 CS 的桥梁, 提高了水凝胶的交联度。2) 由于 AA 分子量较低, 在固定含量为 0.5% 时, Gly 和 β -Ala 的摩尔数比 γ -GABA 高, 并且提供更多的连接臂, 在水凝胶网络中形成更多的交联点, 如图 2-1b 所示。理论上, 交联点越多, 交联度越高, 孔隙度越低^[99]。如图 2-1b 所示, β -Ala 明显降低了水凝胶孔隙度, 通过提高交联度加强了水凝胶的力学行为。此外, 交联点处的非共价关节通常是可逆的, 交联点的断裂消耗了能量, 交联点稳定了水凝胶的骨架网络^[100, 101]。因此, AA 的非共价交联可以基于弱键断裂耗能机制提高水凝胶的韧性。

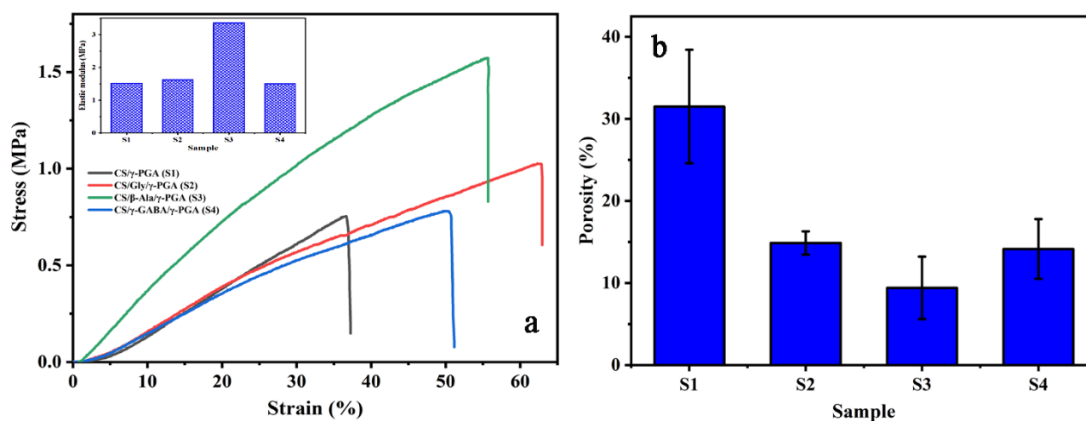


图 2-2 水凝胶的应力-应变曲线、弹性模量 (插图) (a) 和孔隙率 (b)。S1、S2、S3 和 S4 分别为 CS/ γ -PGA、CS/Gly/ γ -PGA、CS/ β -Ala/ γ -PGA 和 CS/ γ -GABA/ γ -PGA 水凝胶, 氨基酸浓度为 0.5% (w/v)

Figure 2-2 Stress strain curve, elastic modulus (inset) (a) and porosity (b) of hydrogel. S1, S2, S3, and S4 are respectively CS/ γ - PGA, CS/Gly/ γ - PGA, CS/ β - Ala/ γ - PGA and CS/ γ - GABA/ γ - PGA hydrogel, amino acid concentration is 0.5% (w/v)

利用类橡胶弹性理论、平衡溶胀理论和网目尺寸理论建立了膨胀聚合物网络假说，提出了溶胀、刚度和溶质扩散率之间的相关性。水凝胶的膨胀行为与交联度呈负相关，而与孔隙度呈正相关^[102,103]。如图 2-3a 所示，AA 的加入显著降低了水凝胶的溶胀行为和溶胀速率，且作用随着 AA 链长的增加而增强。使用 DoseResp 模型拟合相关关系，如图 2-3b 所示，膨胀能力随着链长的增加而降低，与吸水率相似，但与保水率相反。由此得出，膨胀能力与吸水率成正相关，与保水率成负相关。AA 在水溶液中以阳离子、两性离子或阴离子的形式存在，这取决于 pH 值和其他热力学条件。有报道称，基于 pH 值调节的电荷调节可以很好地控制 AA 的静电状态，从而使 AA 通过静电相互作用与骨架分子交联，限制水凝胶的膨胀行为^[102-105]。一般来说，水凝胶的溶胀过程主要包含两个步骤：1) 溶剂分子渗透到水凝胶的内部自由空间；2) 聚合物链在吸收溶剂后松弛膨胀，在溶胀初期，吸水受聚合物链松弛的控制^[106]。如图 2-1b 所示，链长的 AA 可以很容易地缠绕在 CS/ γ -PGA 骨架上，更有效地约束骨架网络的松弛。结果表明，相较于 Gly， γ -GABA 和 β -Ala 更加降低了 CS/ γ -PGA 水凝胶的溶胀作用。AA 链越长，疏水性压缩水凝胶表面的水层的作用越强，降低吸水率。保水性恰恰是膨胀的相反过程，它是由水凝胶中水分子与亲水性基团之间的氢键和范德华力决定的^[107]。此外，增强的交联延缓了被吸收的水分子的蒸发，从而提高了保水性^[103]。

水凝胶的溶胀行为也受 AA 浓度的影响。如图 2-3c 所示，AA 连接水凝胶的溶胀能力随着 AA 的浓度和链长的增加而降低，这可能归因于交联度和缠绕程度的增加。如图 2-1b 所示，随着 AA 浓度的增加，连接臂的数量和交联点的数量增加，扭转程度随着 AA 链长的增加而增加，这减少了 AA 连接水凝胶的膨胀。

采用多项式模型拟合 AA 浓度与溶胀行为之间的关系。如表 2-1 所示，Cubic 模型对 Gly 较好，Poly4 模型对 β -Ala 和 γ -GABA 较好。这可归因于 AA 的活度系数。活度系数随 AA 浓度和链长的增加而显著降低，这是由于吸引能的减小。相对于 Gly， β -Ala 和 γ -GABA 中额外的甲基增加了疏水作用，并使它们周围的水层更加结构化。溶剂化壳的较高有序性削弱了 AA 与水的相互作用，降低了水凝胶的水扩散率^[104]。

表 2-1 拟合 AA 浓度与 AA 连接水凝胶溶胀率关系模型

Table 2-1 Fitting models for the correlation of AA concentration with the swelling rate of

AA-linked hydrogels			
Sample	Gly	β -Ala	γ -GABA
Model	Cubic	Poly4	Poly4
Equation	$y = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4$		
a	286.7876	284.9155	287.7934
b	-222.1509	-536.6411	-995.4189
c	535.0985	1224.0900	2996.5007
d	-413.5967	-1238.2372	-3447.5173
e	0	469.0903	1356.5771
R square	1	0.9957	1

一般认为，水溶性是表征水凝胶在水中结构稳定性的重要指标。如图 2-3d 所示，CS/ γ -PGA 水凝胶的水溶性为 8.3%，远高于 AA 连接的水凝胶。特别是， β -Ala 使水凝胶的水溶性降低了 52%。由此可见，AA 提高了水凝胶的结构稳定性。渗透是 CS 聚合物凝胶化的一个指标，在中性溶液中，由于带正电荷的 CS 链表现出对各向同性取向的偏好，因此 CS 水凝胶网络可以以缓慢的速率渗透^[108]。 β -Ala 作为一种小分子，可以很容易地渗透到 CS/ γ -PGA 水凝胶的网络中。在中性环境下， β -Ala 主要作为两性离子，在 CS 的带正电氨基残基和 γ -PGA 的带负电羧基残基之间架起桥梁，增强了两个骨架分子之间的分子间相互作用，稳定了结构网络。与 β -Ala 相比， γ -GABA 可以增加水凝胶的水溶解率，这可能是由于增强的静电斥力^[102]，Gly 也是如此，可能是因为较小的分子量和更高的亲水性。

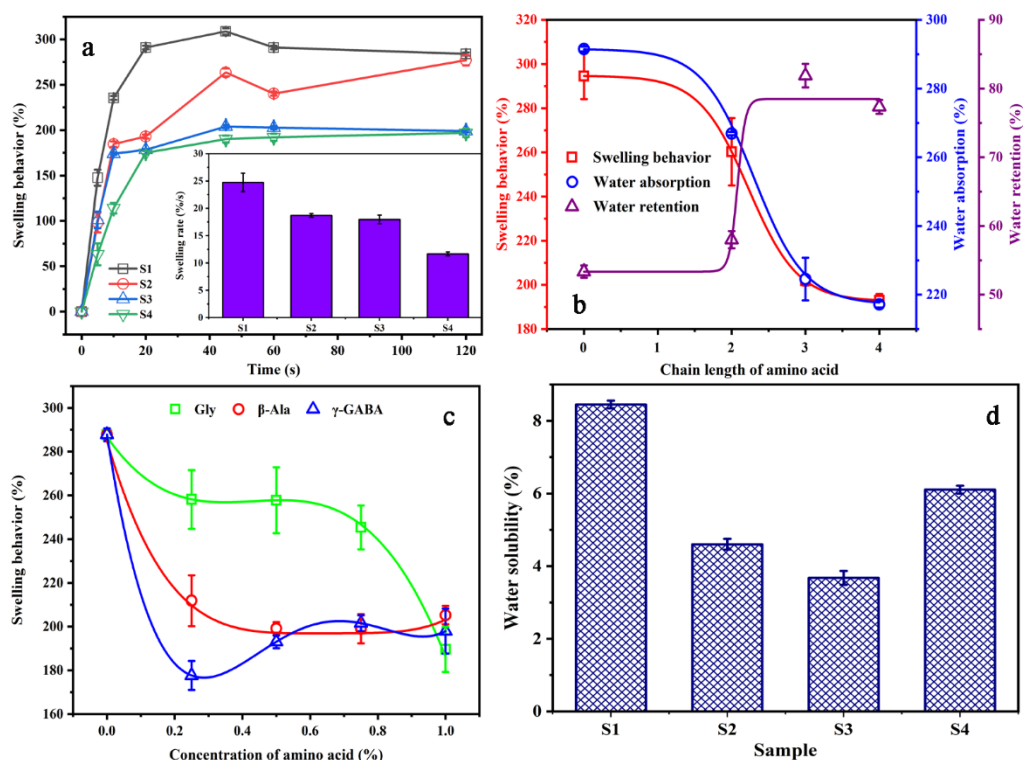


图 2-3 不同水凝胶的溶胀行为和溶胀速率（插图）（a），AA 链长与水凝胶溶胀行为、吸水性和保水性的相关性（b），AA 含量对水凝胶溶胀行为的影响（c）以及不同水凝胶的水溶性（d）。S3 和 S4 分别为 CS/γ-PGA、CS/Gly/γ-PGA、CS/β-Ala/γ-PGA 和 CS/γ-GABA/γ-PGA 水凝胶，AA 浓度为 0.5% (w/v)

Figure 2-3 Swelling behavior and swelling rate of different hydrogels (inset) (a), correlation between AA chain length and hydrogel swelling behavior, water absorption and water retention (b), influence of AA content on hydrogel swelling behavior (c) and water solubility of different hydrogels (d). S3 and S4 are CS, respectively/ γ- PGA, CS/Gly/ γ- PGA, CS/ β- Ala/ γ- PGA and CS/ γ- GABA/ γ- PGA hydrogel, AA concentration is 0.5% (w/v)

2.4.2 氨基酸浓度的影响

其中，β-Ala 对 CS/γ-PGA 水凝胶力学性能的增强效果最好。如图 2-4a 所示，添加 0.5% β-Ala 的水凝胶弹性模量最高，为 3.36 MPa，应力最大，为 1.57 MPa；添加 1% β-Ala 的水凝胶次之，断裂伸长率最高，为 62.85%。由此可见，适量的 β-Ala 含量（0.5%左右）能较好地改善水凝胶的力学性能。低浓度的 β-Ala 导致水凝胶交联不足，但高浓度的 β-Ala 活度系数较低，与 CS/γ-PGA 骨架的相互作用

用减弱^[104]。另一方面, AA 浓度会影响 CS/ γ -PGA 骨架的电荷数, 这与静电聚合有关^[109]。因此, 合适的浓度对于 β -Ala 与骨架高效交联至关重要。

一般来说, 水凝胶的孔隙度与交联度呈负相关^[110]。图 2-4b 表明, 含有 0.5% β -Ala 的水凝胶, 交联网络最密集, 孔隙度最低。进一步证明了水凝胶的孔隙度和力学性能呈负相关关系。如图 2-4c 所示, 0.5% β -Ala 构建的水凝胶结构最稳定, 水溶性最低, 为 3.54%, 远低于未添加 AA 时的 8.13%。溶胀通常与吸水率成正比, 而与保水率相反, 良好的保水能力归因于一种新颖的水凝胶结构^[98]。图 2-4d 表明, 含有 0.5% β -Ala 的水凝胶具有最高的保水性和几乎最低的吸水性, 这意味着一种适用于药物缓释的新型结构。如图 2-4e 所示, 随着 β -Ala 含量的增加, 水凝胶的滚动角增加, 但接触角减小, 表明对皮肤友好的亲水性越来越强。 β -Ala 提供了大量与水分子亲和的羧基, 有利于优异的保水性和亲水性^[98]。综上所述, 具有密集交联网络的水凝胶具有较低的吸水性、较高的保水性和较低的水溶性。 β -Ala 浓度对 β -Ala 与 CS/ γ -PGA 水凝胶骨架网络的交联有显著影响, 可改变水凝胶的各种行为, 0.5%可能是改善这些行为的最优浓度。

一个经过认证的创面敷料产品必须满足生物安全性的要求。如图 2-4f 所示, 以玻片为对照, 含有 0.5% β -Ala 的水凝胶上的细胞存活率为 146%, 远大于商用硅酮水凝胶的 46%, 表明 β -Ala 连接的水凝胶具有理想的细胞相容性。细胞活力的提高可归因于 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶亲水性的提高。此外, CS 和 γ -PGA 都是无毒的天然聚合物, 因此各种 CS/ γ -PGA 水凝胶因其良好的生物相容性而被用作伤口敷料^[110, 111]。 β -Ala 作为天然 AA, 对生物机体也无毒副作用, CS 与 γ -PGA、 β -Ala 之间的可逆非共价交联产物对细胞无损伤, CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶具有良好的细胞相容性。

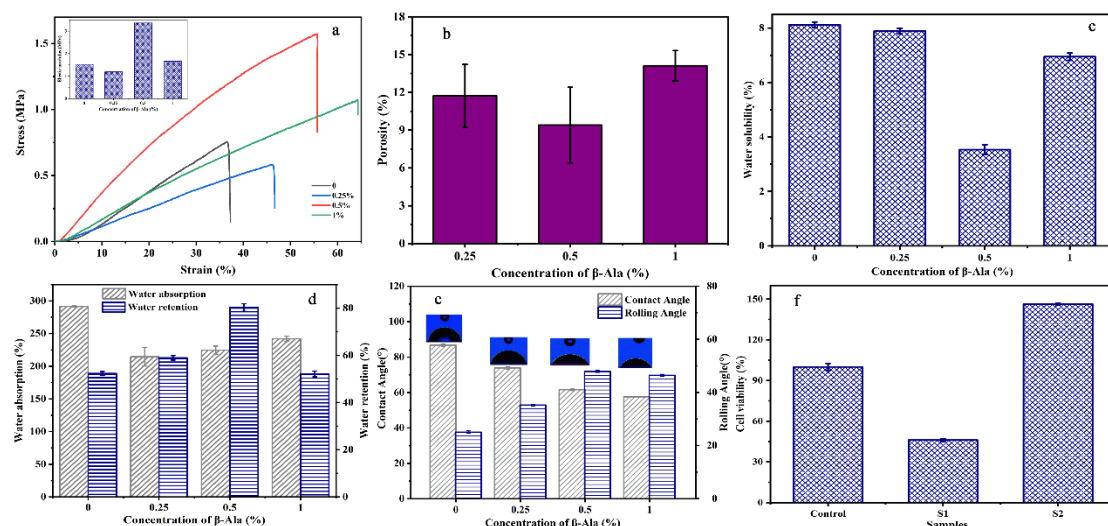


图 2-4 不同浓度 β -Ala 水凝胶的应力-应变曲线和弹性模量（插图）（a）、孔隙率（b）、水溶性（c）、吸水性和保水性（d）、接触角和滚动角（e），以及水凝胶的细胞相容性（f）。对

照为 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶，S1 和 S2 为玻片，商业硅胶水凝胶

Figure 2-4 The stress-strain curve and elastic modulus (inset) of different concentrations β -Ala (a), porosity (b), water solubility (c), water absorption and water retention (d), contact angle and rolling angle (e), and cellular compatibility (f) of the hydrogel. The control is CS/ β -Ala/ γ -PGA hydrogel, S1 and S2 are glass slides, and commercial silicone hydrogel

2.4.3 结构变化

静电相互作用是桥接 AA 和 CS/ γ -PGA 骨架网络的主要驱动力，用于 CS/AA/ γ -PGA 水凝胶的自组装。因此，AA 侵入骨架不可避免地干扰了 CS/ γ -PGA 水凝胶的自组装。如图 2-5A 所示，CS/ γ -PGA 水凝胶表面分布着一些小的脊状结构，而 CS/Gly/ γ -PGA 水凝胶表面相对光滑。Gly 作为一种两性小分子，可以增强 CS/ γ -PGA 水凝胶的交联，改变其自组装。随着 AA 链长的增加，水凝胶表面变得越来越粗糙。 β -Ala 的进入导致许多更清晰的突起不规则地分布在水凝胶表面。 γ -GABA 诱导水凝胶形成更规则的表面结构。相对于 Gly 和 γ -GABA， β -Ala 能使 CS/ γ -PGA 水凝胶更好地自组装，这可能与 AA 的链长有关。这可能是 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶孔隙率最低的原因。在 XRD 研究中也观察到类似的结果。如图 2-5B(a)所示，除了含有 0.5% β -Ala 的水凝胶外，在所有水凝胶的光谱中都普遍观察到 19.88° 附近的优势峰，在 10.4° 附近的次要峰也出现在水凝胶的

光谱中。它们在半峰全宽（Full width at half maximum, FWHM）和清晰度上有不同的值。由此可见，AA 进入 CS/ γ -PGA 骨架能够真正改变其结构的自组装。含有 β -Ala 和 γ -GABA 的水凝胶在 19.88° 附近的锐度低于不含 AA 的水凝胶。但在 FWHM 方面，添加 0.5% AA 的水凝胶比不添加 AA 的水凝胶要高。其中， β -Ala 连接的水凝胶具有最低的锐度和最大的 FWHM，而 Gly 连接的水凝胶则相反。理论上，越低的 FWHM 意味着越大的晶体颗粒，越高的锐度意味着越好的结晶性能。结果表明， β -Ala 比 Gly 和 γ -GABA 更能诱导水凝胶的自组装。需要补充的是， γ -GABA 导致峰值中心从 19.88° 到 20.24° 的最大位移，表明相对于其他 AA， γ -GABA 对晶体形态的影响更大，这可能是由于 γ -GABA 链最长所致。有趣的是，当 β -Ala 含量增加到 1% 时，水凝胶光谱的 FWHM 和锐度在 19.88° 附近，这有利于自组装，并且在 10.4° 处出现了较小的侧峰。说明 β -Ala 浓度对水凝胶的自组装有显著影响，但过量的 β -Ala 可能产生反作用。FTIR 进一步研究了 AA 与 CS/ γ -PGA 骨架的交联作用。如图 2-5B(b) 所示，在不含 AA 的水凝胶的光谱中，在 3415cm^{-1} 和 1620cm^{-1} 附近观察到最深的峰。由此可见，AA 的入侵降低了两个峰的深度。据报道， $3500\text{--}3000\text{cm}^{-1}$ 的宽峰对应于游离羟基的拉伸振动与 N-H 弯曲振动的重叠^[98, 112]。其中， $3455\text{--}3410\text{cm}^{-1}$ 和 $3375\text{--}3340\text{cm}^{-1}$ 处的峰为分子内氢键， $3310\text{--}3230\text{cm}^{-1}$ 处的峰为分子间氢键^[113]，即氢键的变化很可能影响 $3500\text{--}3000\text{cm}^{-1}$ 处峰的形态，这些峰以 3415cm^{-1} 为中心分布在 $3700\text{--}3100\text{cm}^{-1}$ 范围内。另一方面， 1645cm^{-1} 处的峰值对应于 C-O 拉伸振动^[112]， $1510\text{--}1650\text{cm}^{-1}$ 处的峰值对应于 N-H 弯曲振动^[114]，它们以 1620cm^{-1} 为中心分布在 $1750\text{--}1550\text{cm}^{-1}$ 范围内。CS/ γ -PGA 水凝胶具有大量的羧基、氨基和羟基。随着 AA 的加入，CS/ γ -PGA 水凝胶中更多的氨基和羧基增强了静电相互作用，解构了 CS/ γ -PGA 骨架的原始氢键，从而将 CS/ γ -PGA 水凝胶的原始形态分别在以 3415cm^{-1} 和 1620cm^{-1} 为中心的范围转化为新的形态。这种转化可能归因于静电聚合与氢键之间的相互作用^[115, 116]。为了进一步研究 AA 与 CS/ γ -PGA 骨架的相互作用，我们分析了 3415cm^{-1} 处峰与 1620cm^{-1} 处峰的积分面积和 FWHM 之比。如图 2-5B (b) 插表所示，这两个比值随着 AA 链长的增加而减小。这是由于在固定含量为 0.5% 时，具有较长链的 AA 具有较少的氨基和羧基，减少了对 CS/ γ -PGA 水凝胶原始光谱的干扰。当 β -Ala 含量增加到 1% 时，FWHM 的比例

增加,但积分面积的比例下降,过量的 β -Ala 降低了骨架分子的 pH 值,改变了骨架分子的电荷性质,从而降低了氨基和羧基等亲水性基团的有效活性。结果,氢键与静电相互作用被打破了。因此,适度的 β -Ala 含量可能是维持平衡的最佳条件,这是增强 CS/ γ -PGA 水凝胶机械性能所必需的。此外,在水凝胶的光谱中,在 $1000-400\text{cm}^{-1}$ 的指纹区有很大的差异,证明了 AA 在水凝胶的自组装中起着重要的作用。

采用热重分析研究 AA 对水凝胶热稳定性的影响。如图 2-5C(a)所示, β -Ala 能显著提高水凝胶在 400°C 以上的热稳定性。如图 2-5C(b)所示,DTG 研究发现,CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶在第一分解阶段的分解温度最低,为 132°C ,CS/Gly/ γ -PGA 水凝胶的分解温度小于 150°C ,CS/ γ -GABA/ γ -PGA 水凝胶的分解温度为 137°C 。而 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶在第二阶段分解温度最高,为 291°C ,高于 Gly 和 γ -GABA 水凝胶的 289°C 。大分子的降解过程经过脱水、解聚和分解等步骤^[117, 118]。 200°C 以下的第一次分解主要是游离水的去除^[119], $275-350^\circ\text{C}$ 的第二次分解是糖苷键的随机断裂^[120], $300-600^\circ\text{C}$ 的最后分解是糖环结构的分解^[95, 121]。因此, β -Ala 降低了水凝胶的第一次分解温度,这可能是由于水凝胶的保水率最高。水凝胶网络中的大孔隙率和大孔隙的连通性决定了吸水的自由体积^[122],不含 AA 的水凝胶孔隙率大,吸水率高,降低了首次分解温度。与 Gly 和 γ -GABA 相比, β -Ala 在 CS/ γ -PGA 水凝胶的第二和最后分解阶段的热稳定性得到了最好的改善。结果表明, β -Ala 是增强和稳定 CS/ γ -PGA 水凝胶网络的最佳 AA。然而,从第二阶段的分解速率发现,过量的 β -Ala 可能不利于提高水凝胶的热稳定性。

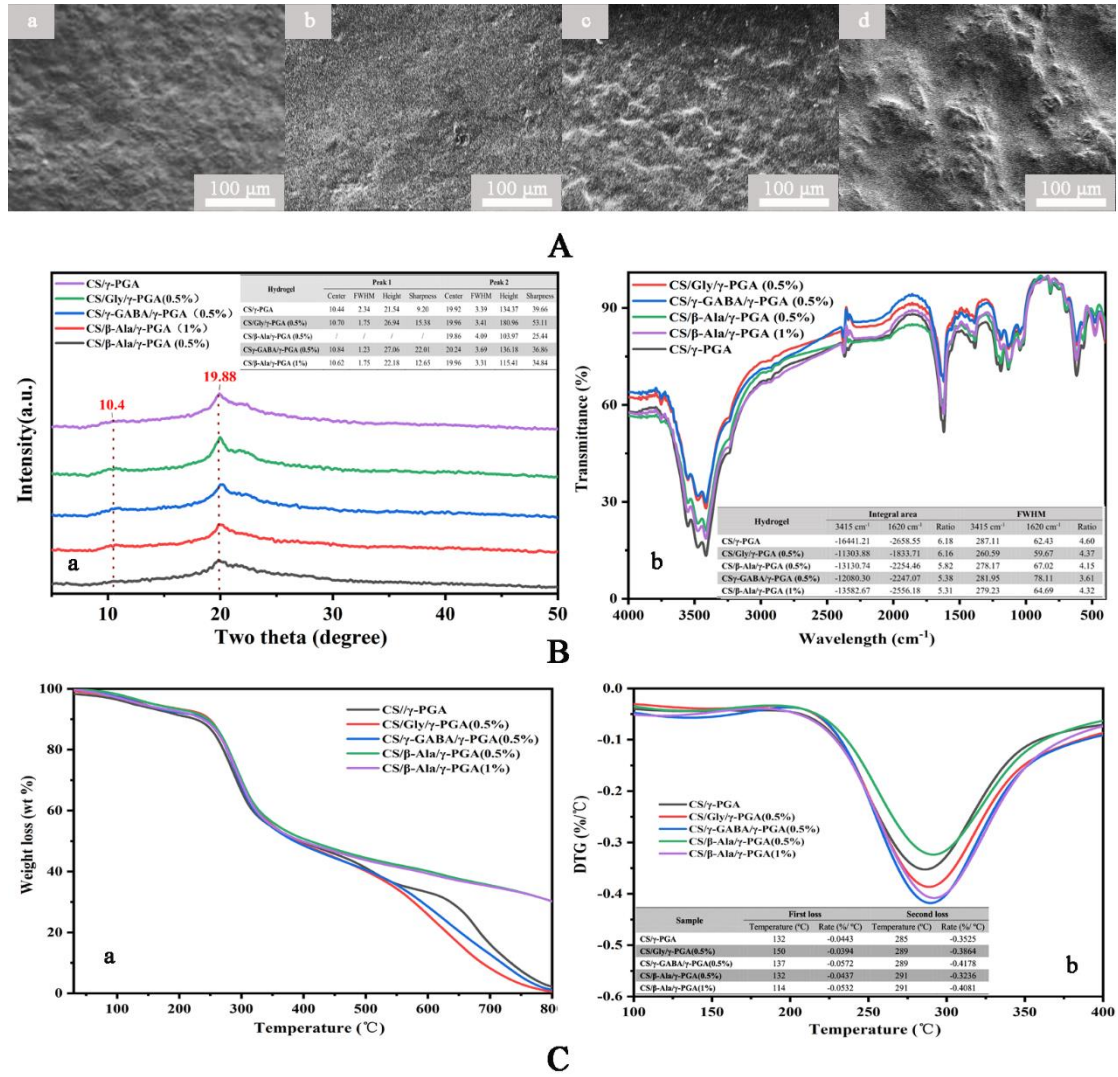


图 2-5 不同 AA 制备的水凝胶的 SEM (A)、XRD 和 FTIR (B)、TGA 和 DTG (C) 图谱。图 A 中, a: CS/γ-PGA 水凝胶、b: CS/Gly/γ-PGA 水凝胶、c: CS/β-Ala/γ-PGA 水凝胶、d: CS/γ-GABA/γ-PGA 水凝胶, AA 的浓度为 0.5% (w/v)

Figure 2-5 SEM (A), XRD and FTIR (B), TGA and DTG (C) patterns of hydrogels prepared with different AAs. In Figure A, a: CS/γ-PGA hydrogel, b: CS/Gly/γ-PGA hydrogel, c: CS/β-Ala/γ-PGA hydrogel, d: CS/γ-GABA/γ-PGA hydrogel, AA concentration is 0.5% (w/v)

2.4.4 药物装载与释放

CS/β-Ala/γ-PGA 水凝胶具有良好的亲水性、高保水性、较好的拉伸性能和细胞相容性等优点, 是一种理想的伤口敷料材料。为了评价 CS/β-Ala/γ-PGA 水凝胶的载药行为, 以 MB 和 MO 为正电荷和负电荷药物模型, 以 CS/γ-PGA 水凝

胶为对照。由图 2-6a 可知, CS/ β -Ala/ γ -PGA 和 CS/ γ -PGA 水凝胶可以装载 70% 以上的 MB, 远至 0.9% 的 MO, 表明水凝胶可以很好地装载带正电的药物。如图 2-7a 所示, 两种水凝胶均含有负电荷, CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶的负电荷多于 CS/ γ -PGA 水凝胶。由此可见, β -Ala 可以提高水凝胶的电负性, 从而使带正电的药物具有更高的装载能力。为了进一步提高装载效率, 对 BAC 浓度和装载时间进行了研究。由图 2-6b-c 可知, 载药水凝胶的抗菌效果随 BAC 浓度和载药时间的增加而增加, 且浓度为 0.04%, 40 min 时, 载药效果最佳。不同的是, CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶比 CS/ γ -PGA 水凝胶能装载更多的 BAC, 且具有更强的抗菌能力。用流式细胞分析证实了这一观察结果。如图 2-6d 所示, 不含 BAC 的两种水凝胶的抗菌效果最低, 与阴性对照相似。在对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果方面, BAC 装载的 CS/ β -Ala/ γ -PGA 和 CS/ γ -PGA 水凝胶的抑菌率分别为 80% 和 73%, 接近或超过阳性对照。因此, 相对于 CS/ γ -PGA 水凝胶, CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶被认为是一种更适合用于伤口敷料装载带正电药物的候选材料。

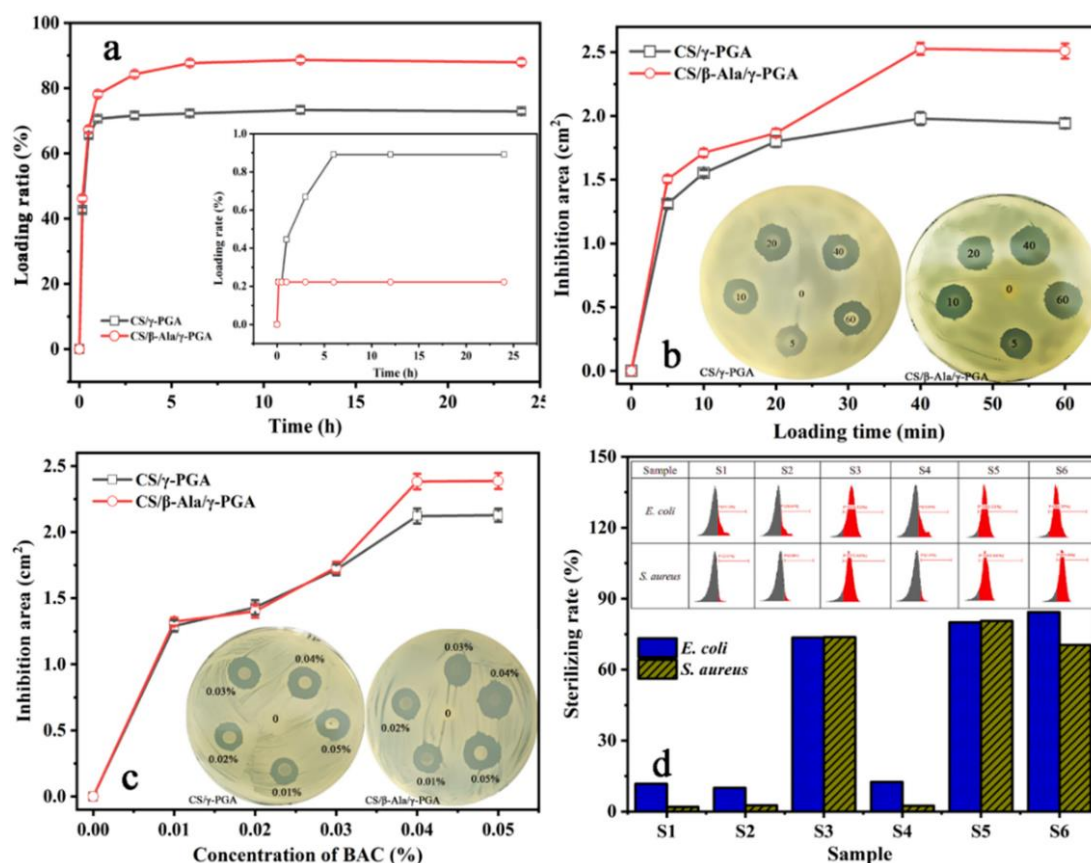


图 2-6 CS/γ-PGA 和 CS/β-Ala/γ-PGA 水凝胶对 MB 和 MO 的装载率（插图）（a），装载时间（b），BAC 浓度（c）对抗菌行为的影响，和不同样品对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌率的影响（d）。S1、S2、S3、S4、S5 和 S6 分别为阴性对照，无 BAC 和含 BAC 的 CS/γ-PGA 水凝胶，无 BAC 和含 BAC 的 CS/β-Ala/γ-PGA 水凝胶，以及阳性对照，水凝胶中 β-Ala 含量为 0.5% (w/v)

Figure 2-6 Loading ratio of CS/γ-PGA and CS/β-Ala/γ-PGA hydrogels for MB and that for MO (inset) (a), the effects of loading time (b) and BAC concentration (c) on the antibacterial behavior, and sterilizing rate of different samples against *E. coli* and *S. aureus* (d). S1, S2, S3, S4, S5 and S6 refer to negative control, CS/γ-PGA hydrogels without and with BAC, CS/β-Ala/γ-PGA hydrogels without and with BAC, and positive control, respectively. β-Ala content in the hydrogel is 0.5 % (w/v)

CS/β-Ala/γ-PGA 水凝胶装载带正电荷药物的能力随着 pH 值的变化而变化，这是因为羧酸基(-COO⁻和-COOH)的质子化和去质子化过程可以通过 pH 变化来调节^[112]。由于 γ-PGA 的 pKa 为 4.09^[123]，在高于 4.09 的 pH 值下，-COOH 去质子化被激发为-COO⁻，CS 的 pKa 在 6.5 左右，这取决于脱乙酰化的程度。pH 低

于 6.5 时, CS 的伯胺基质子化程度越来越高^[109, 124]。如图 2-1a 所示, CS 和 γ -PGA 混合物首先溶解在 pH 为 9.0 的水溶液中, 具有大量的负电荷, 用 4%冰醋酸溶液(pH 2.64)逐步中和负电荷, 直至 pH 值低于 6.5, CS 与 γ -PGA 发生静电聚合。当 pH 值滑降至 4.92 时, 小部分 CS 带正电荷, CS/ γ -PGA 骨架的电负性降低, 如图 2-7a 所示。然而, 随着 β -Ala 的进入, 电负性会增强, 并随着 β -Ala 含量的增加而进一步增强。AA 的静电状态可以通过 pH 变化来精确调节^[105]。 β -Ala 的 pK_1 为 2.36, pK_2 为 9.99, 在 pH 值 4 ~ 8 之间以两性离子形式存在。两性离子的进入会影响羧酸基和胺基的质子化和去质子化过程, 这种影响可以通过 AA 浓度来调节^[125]。另一方面, 随着 pH 值增大至 8.67, β -Ala 的负电荷越来越多, 与 CS/ γ -PGA 骨架网络的静电相互作用减弱。因此, β -Ala 分子可以很容易地扩散到浸出液中进行 Zeta 电位测定。从 β -Ala 在水凝胶的电负性增强中得到启发, 如图 2-9 所示, β -Ala 很容易从水凝胶中游出, 可作为一种传递物, 在碱性环境中运输一些带正电的药物。

如图 2-7b 所示, 水凝胶的溶胀能力随着 pH 值的增大而增大。溶胀是由溶剂扩散、pH 值、离子浓度等因素刺激的链重排过程^[107, 109, 126, 127]。随着 CS/ γ -PGA 溶液的 pH 值在 4.09 ~ 6.5 之间波动时, CS 与 γ -PGA 之间的静电相互作用最强, 抑制了重排。因此, 水凝胶具有相对较低的溶胀能力。但当 pH 超 6.5 时, 骨架分子的负电荷随着 pH 值的增加而增加, 静电相互作用越来越弱, 从而增强了溶胀能力。有趣的是, pH 值变化对 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶在肿胀行为中的作用小于 CS/ γ -PGA 水凝胶, 这是因为 β -Ala 引起的交联增强, 这使得 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶有可能应用于炎症伤口的伤口敷料。

水凝胶的溶胀行为往往与药物的装载和释放行为密切相关。如图 2-7c 所示, 随着 pH 值的升高, CS/ γ -PGA 和 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶均可以加载越来越多的 MB, 且 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶的装载能力始终高于 CS/ γ -PGA 水凝胶。为了进一步研究膨胀行为对水凝胶 MB 装载的影响, 使用干燥的 CS/ γ -PGA 和 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶代替溶胀的水凝胶来装载 MB。如图 2-7c 插图所示, 在任何 pH 值下, 干燥的 CS/ γ -PGA 水凝胶总是比干燥的 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶加载更多的 MB。这与溶胀的情况正好相反。得出的结论是, 水凝胶的负载能力可能与膨胀行为和静电吸引有关。首先, 干燥水凝胶的膨胀过程加速了 MB 的装载。

相对于 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶, CS/ γ -PGA 水凝胶具有更高的溶胀能力, 从而具有更高的负载能力。在使用充分膨胀水凝胶时, 膨胀过程已结束, 对其装载能力的影响可以忽略不计, 但 pH 变化对其装载能力的影响越来越大。随着 pH 的升高, 水凝胶中负电荷的增加, 增强了对带正电荷的 MB 的静电吸引力, 从而使装载能力增加, 释放能力降低, 如图 2-7c-d 所示。由此可见, 静电吸引在药物的装载和释放中起主导作用。值得注意的是, CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶比 CS/ γ -PGA 水凝胶释放的 MB 更多。如图 2-7d 所示, 随着 pH 值的增加, 释放量增加了约 22.5%。这表明 β -Ala 可以有效地抵消图 2-9 中 pH 值升高引起的药物释放减少, 在创面敷料领域, 对克服细菌感染引起的创面 pH 值升高具有重要意义。

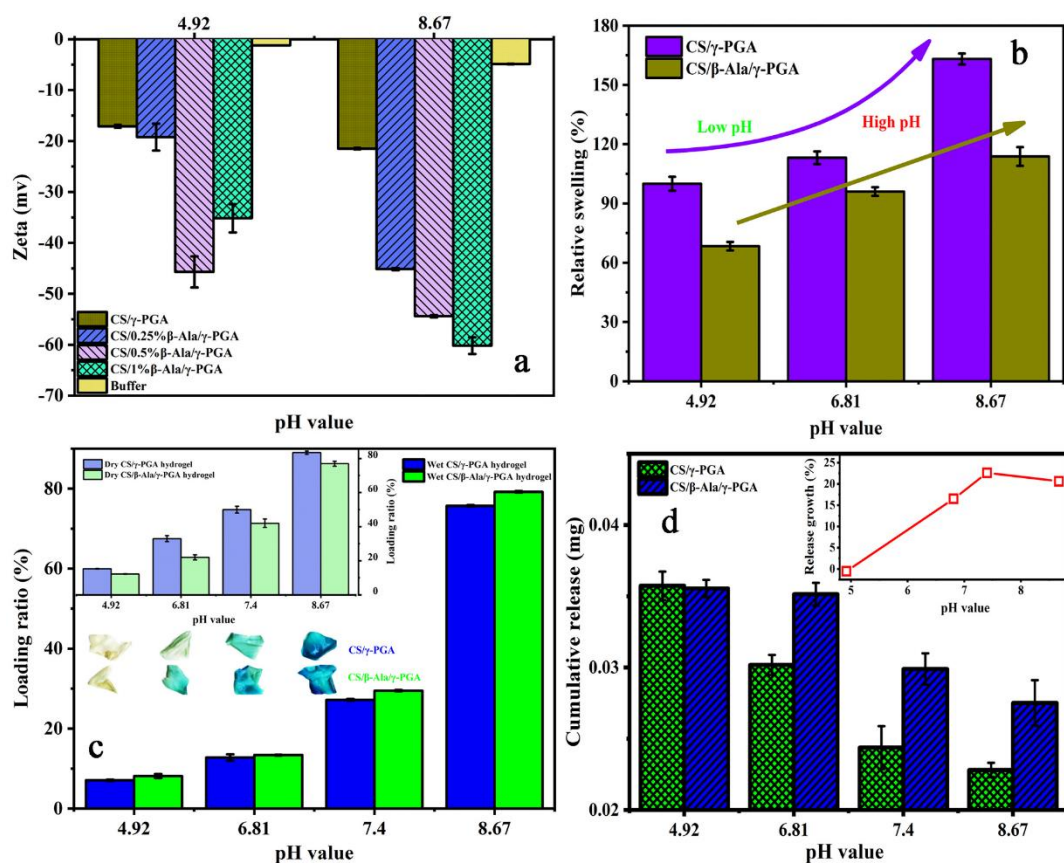


图 2-7 pH 值对 CS/ γ -PGA 和 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶 Zeta (a)、相对溶胀 (b)、加载比 (c) 和累积释放量 (d) 的影响

Figure 2-7 Effect of pH on the Zeta(a), relative swelling(b), loading ratio(c) and cumulative release(d) of the hydrogels of CS/ γ - PGA and CS/ β - Ala/ γ - PGA

为了进一步研究 pH 变化对水凝胶释放过程的影响, 采用 Higuchi 模型^[128]、扩散-松弛模型^[129]和扩散-溶解模型^[130]拟合 CS/ γ -PGA 和 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶

释放 MB 的过程。公式 (2-13)、(2-14) 和 (2-15) 分别为 Higuchi 模型、扩散-松弛模型和扩散-溶解模型。

$$\frac{M_t}{M_m} = k_1 t^{\frac{1}{2}} \quad (2-13)$$

$$\frac{M_t}{M_m} = k_1 t^{\frac{1}{2}} + k_2 t \quad (2-14)$$

$$\frac{M_t}{M_m} = k_1 t^{\frac{1}{2}} + k_2 t + k_3 t^2 + k_4 t^3 \quad (2-15)$$

式中, M_t 和 M_m 分别为在定义时间(t)内释放的 MB 量和 MB 总量。 k_1 、 k_2 、 k_3 、 k_4 为速率常数。

Higuchi 模型常用于拟合不变骨架网络的释放过程。为了进一步研究水凝胶网松弛对释放行为的影响, 通过在 Higuchi 模型中加入一个新的一阶参数 (t), 构建了扩散-松弛模型。过度膨胀会导致水凝胶溶解^[131]。通过在扩散-松弛模型中引入二次项 (t^2) 和三次项 (t^3) 来估计水凝胶的解离, 构建了扩散-溶解模型。如图 2-8 所示, 通过对比 R 方值, 在任意 pH 值下, 扩散-松弛和扩散-溶解模型都比 Higuchi 模型更符合水凝胶的释放过程, 说明水凝胶在释放过程中发生了溶胀和解离。结构稳定性可能取决于 pH 值的变化。如图 2-8a-c 所示, 通过三种模型的拟合结果可以发现, CS/ γ -PGA 和 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶在 pH 为 4.92 时具有相似的释放过程。但随着 pH 值的增大, 水凝胶的最大释放量减小, 且差异越来越明显。如图 2-8d-i 所示, 随着 pH 值的升高, CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶比 CS/ γ -PGA 水凝胶释放 BAC 的速度更快。

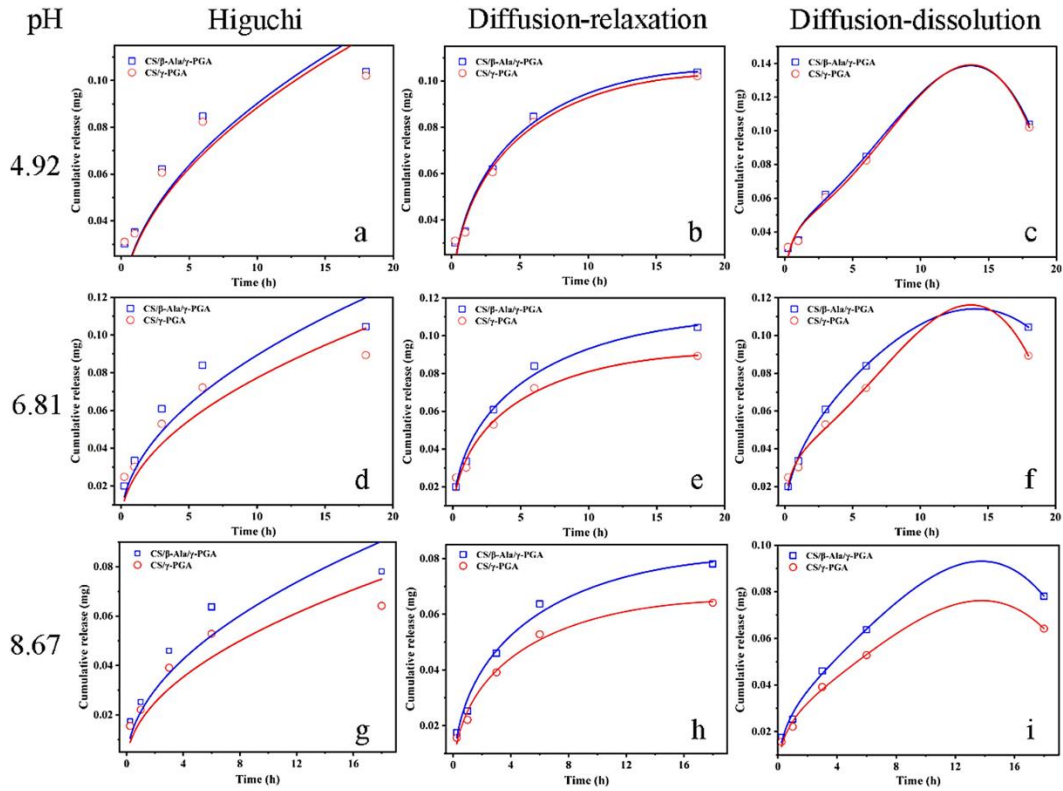


图 2-8 建立 CS/γ-PGA 和 CS/β-Ala/γ-PGA 水凝胶在不同 pH 溶液中释放 MB 的 Higuchi、扩散-弛豫和扩散-溶解模型

Figure 2-8 Higuchi, diffusion-relaxation and diffusion-dissolution models for the hydrogels of CS/γ-PGA and CS/β-Ala/γ-PGA to release MB in the solutions with different pH values

如图 2-9 所示，推测水凝胶的 BAC 释放受静电相互作用、β-Ala 的缓冲作用和载体介导转运等因素的影响。1) 静电相互作用：在低 pH 值下，大量的氢离子增强了水凝胶网络的静电相互作用，从而抑制了水凝胶网络的膨胀和解离。因此，两种水凝胶具有相似的结构，以支持相似的释放过程。随着 pH 值的增加，CS 分子上的正电荷被许多 OH⁻中和，特别是当 pH 值超过 7.0 时，CS 与 γ-PGA 之间的静电相互作用转化为氢键，从而增强了 CS/γ-PGA 和 CS/β-Ala/γ-PGA 水凝胶的溶胀能力从而解离。同时，负电荷的增多增强了水凝胶对 MB 的静电吸引力，抑制了其释放能力。由此可见，静电吸引对水凝胶释放能力的影响大于溶胀行为。2) 缓冲作用：pH 为 4.9 时，与 β-Ala 的 pI 6.0 相差甚远，缓冲作用减弱，缩小了两种水凝胶之间释放能力的差距。pH 增大，β-Ala 的缓冲作用增强，使两者之间的差距扩大。3) 载体介导的转运：随着 pH 值超过 6.0，原来稳定的网络结构开始膨胀解离，β-Ala 作为交联桥，所含负电荷越来越多。在膨胀

解离的网络结构中，带负电的 β -Ala 很容易与带正电的 BAC 结合，形成许多电中性配合物。在 BAC 浓度差的驱动下，配合物很容易游出网络。随着 pH 值的升高， β -Ala 在 CS/ γ -PGA 骨架中作为载体而非桥梁运输 BAC 的作用越来越大。

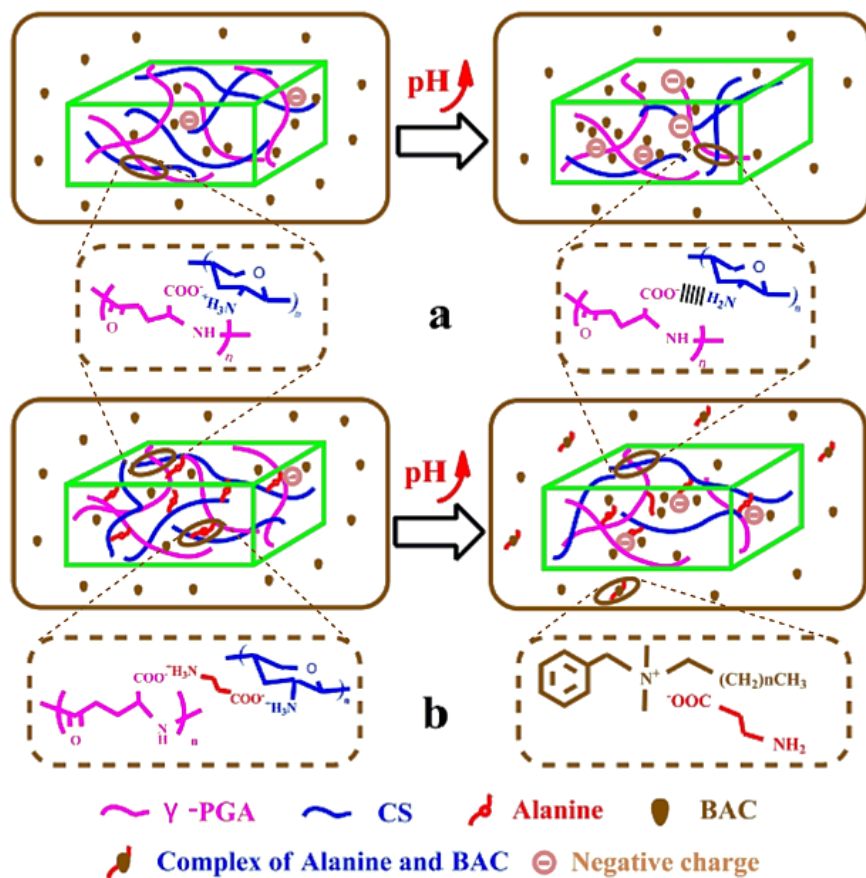


图 2-9 pH 变化对 CS/ γ -PGA 水凝胶 (a) 和 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶 (b) BAC 释放的影响

Figure 2-9 Effect of pH variation on BAC release of CS/ γ -PGA hydrogel (a) and CS/ β -Ala/ γ -PGA hydrogel (b)

2.5 本章小结

CS/ γ -PGA 静电作用水凝胶交联度低，导致其机械强度差，溶胀性能偏大，为了提高 CS/ γ -PGA 水凝胶的交联度，引入两性小分子 AA，改善水凝胶网络自组装。具体小结如下：

(1) AA 能显著提高 CS/ γ -PGA 水凝胶的交联性和力学性能，AA 链长和浓度对其影响较大。其中，0.5% β -Ala 可使水凝胶的孔隙率降低 70%，水溶性降低 52%，溶胀性降低 30%，弹性模量提高 2.2 倍，应力提高 2.08 倍，保水性提

高 1.53 倍。水凝胶的孔隙率与弹性模量呈正相关，而与交联度呈负相关。

(2) 研究了 pH 对水凝胶装载和释放 BAC 的影响。 β -Ala 增强了水凝胶在 BAC 装载和释放过程中的 pH 响应性，随着 pH 值的增大，CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶对 BAC 的装载率不断增大，且 0.5% β -Ala 使其在碱性环境下的释放最大增加了 1.25 倍，表明 β -Ala 对 pH 变化有良好的缓冲作用，同时作为运输载体加速 BAC 的释放，有潜力用于碱性环境伤口敷料。

第3章 CS/HA 水凝胶结构与性能关系调控

3.1 前言

水凝胶的功能特性源于其微观结构，聚合物重复单元的化学结构和官能团控制着水凝胶的大部分化学性质，而更大尺度的特征，如网络尺寸、微观孔隙和整体聚合物浓度主要影响水凝胶的强度和溶质传输等物理性质^[132]。目前，水凝胶结构性能关系调控的常用方法包括网络交联调控、多尺度调控和组分调控等。水凝胶结构的多样性产生了广泛的化学和物理性质，但阻碍了结构-性能关系的全面分析。膨胀聚合物网络模型旨在从根本上将水凝胶结构与物理性质（如膨胀、刚度和溶质传输）联系起来。RICHBURG N^[10]等讨论了如何协调膨胀聚合物网络模型，以根据水凝胶的膨胀行为预测刚度和溶质扩散率，获得目标物理特性水凝胶。特别是当水凝胶由越来越稀有或昂贵的材料合成时，如DNA^[133]，生物活性肽序列^[134]或定制的合成聚合物^[135]，这种对物理性能进行的先验性预测将变得越来越有价值。

控制网络的自组装可以改善水凝胶的多种性能，水凝胶的结构和性能密切相关，然而，系统性研究水凝胶结构与性能关系的报道较少，结构与性能关系复杂，为此，本章以静电作用 CS/HA 水凝胶为研究对象，通过创新制备工艺（分离沉淀和上清），调控 HA 基质含量，使用不同浓度 NaOH 浸泡处理，引入不同含量 Lys 等手段以获得多种水凝胶结构，相较于 CS/ γ -PGA 水凝胶，CS/HA 水凝胶的溶胀行为具有更加敏感的响应性，故以溶胀行为连接其微观结构和宏观性能，分析结构与性能之间的变化关系，得出的结构与性能关系变化规律可推动定制化水凝胶的开发与利用，也为水凝胶的结构性能调控提供了技术和理论参考。

3.2 实验材料与仪器

3.2.1 材料与试剂

表 3-1 主要材料与试剂

Table 3-1 Main materials and reagents

名称	级别	生产厂家
壳聚糖	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
透明质酸钠	95%纯度（食品级）	新疆阜丰生物科技有限公司
丙氨酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
氨基丁酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
谷氨酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
赖氨酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
天冬氨酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
精氨酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
组氨酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
冰醋酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司

3.2.2 仪器

表 3-2 主要实验仪器

Table 3-2 Main instruments

仪器	型号	生产厂家
酶催化平行反应器	T&J-EnzyR 0.15L*3	迪必尔生物工程有限公司
质构仪	TexturePro CT	美国布鲁克公司
超纯水机	LD-DI-15V	上海硕鼎水处理设备公司
集热式恒温加热磁力搅拌器	DF-101SZ	河南省巩义市予华仪器有限责任公司
电子天平	TA-214	上海海康电子仪器厂
电冰箱	BCD-230WB	松下电器有限公司
pH 计	PHS-25	上海仪电科学仪器公司
移液枪	20P、220P、100P	法国 GILSO 公司
隔水式恒温培养箱	GHP-9080	常州普天仪器制造公司
电热恒温鼓风干燥箱	GZX-GF101	上海贺德实验设备公司
真空冷冻干燥机	SJIA-10N	宁波市双嘉仪器有限公司
扫描电子显微镜	S-4800	日本日立公司
傅里叶变换红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
X-射线衍射仪	D8Advance	德国布鲁克公司
光学接触角仪器	SL250	美国科诺有限公司

3.3 实验方法

3.3.1 水凝胶制备

本章水凝胶的制备工艺具有原创性，具体如下。

3.3.1.1 水凝胶前驱液制备

首先，在酶催化平行反应器中，将 0.64 g HA 在温度为 45°C，转速为 500 rpm 的条件下完全溶解在 60 mL 去离子水中，随后加入 0.96 g CS，继续搅拌 10 min，使 CS 均匀分散，然后，以 40 mL/h 的速度向反应器中滴加 20 mL 4% 冰醋酸溶液，在 45°C，转速为 500 rpm 的条件下继续搅拌 30 min，得到的溶液定义为水凝胶前驱液。

3.3.1.2 制备工艺

方法一：取 20 mL 上述水凝胶前驱液缓慢倒入一次性培养皿（ $\Phi=9$ cm）中，45 °C 烘箱中干燥成膜。将干燥后的膜完全浸没在 40 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液中，2 h 后将膜取出，用去离子水冲洗，直至淋洗液 pH 不变，将得到的膜命名为初级 CS/HA 水凝胶，即 primary CS/HA 水凝胶，简写为 pr-CS/HA 水凝胶。

方法二：取 40 mL 上述水凝胶前驱液于一个小烧杯中，室温下静置 2 h，发生明显分层，上层为白色悬浊液，下层为白色小颗粒沉淀，采用倾倒法将两者尽可能分离，得到约 30 mL 悬浊液，10 mL 沉淀液。向 10 mL 沉淀液中加入 10 mL 去离子水，置于恒温加热磁力搅拌器，45°C，500 rpm 条件下搅拌 10 min，使沉淀均匀分散在去离子水中，将其缓慢倒入一次性培养皿（ $\Phi=9$ cm）中，45°C 烘箱中干燥成膜。将干燥后的膜完全浸没在 40 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液中，2 h 后将膜取出，用去离子水冲洗，直至淋洗液 pH 不变，将得到的膜命名为 CS/HA 水凝胶。

3.3.1.3 不同比例 CS/HA 水凝胶制备

参考 3.3.1.2 方法二中的工艺，固定水凝胶前驱液的总体积和总溶质质量，仅改变 CS 和 HA 的比例，20%HA 含量的 CS/HA 水凝胶命名为 CS/0.2HA，以此类推。

3.3.1.4 不同 Lys 占比的 CS/Lys /HA 水凝胶制备

参考 3.3.1.2 方法二中的工艺，固定水凝胶前驱液的总体积和总溶质质量，

固定 CS:HA 的比例为 3:2 不变, 通过改变 Lys 占总溶质的比例, 制备出 Lys 占比为 5%、10%、20%和 30%的四种 CS/Lys/HA 水凝胶。5%Lys 含量的水凝胶命名为 CS/0.05Lys/HA, 以此类推。

3.3.1.5 不同 NaOH 浓度处理的 CS/HA 水凝胶制备

参考 3.3.1.2 方法二中的工艺, 固定水凝胶前驱液的总体积和总溶质质量, 维持 CS:HA 的比例为 3:2, 唯一的区别是形成干燥的膜之后, 选择性浸泡在 40 mL 的 0.05~1.3 M 的 NaOH 溶液中。0.1 M NaOH 处理的 CS/HA 水凝胶命名为 0.1M CS/HA, 以此类推。

3.3.2 水凝胶结构表征

同 2.3.10

3.3.3 机械性能

同 2.3.5

3.3.4 溶胀性能

同 2.3.7

3.3.5 水蒸气透过率

将水凝胶样品烘干, 裁剪成直径为 1.5 cm 的圆形薄片后, 密封在直径为 1.3 cm 的 10 mL 玻璃试管口, 试管中装有 0.2 g 无水氯化钙粉末, 置于温度为 37°C, 相对湿度为 70%的恒温培养箱中, 连续 7 天测定试管重量变化。水蒸气透过率 (Water Vapor Transmission Rate, WVTR) 用公式 3-1 来计算:

$$WVTR = \frac{\Delta m}{\Delta t \times A} \quad (3-1)$$

3.3.6 水溶解性

同 2.3.7

3.4 结果与分析

3.4.1 基质比例的影响

3.4.1.1 结构变化

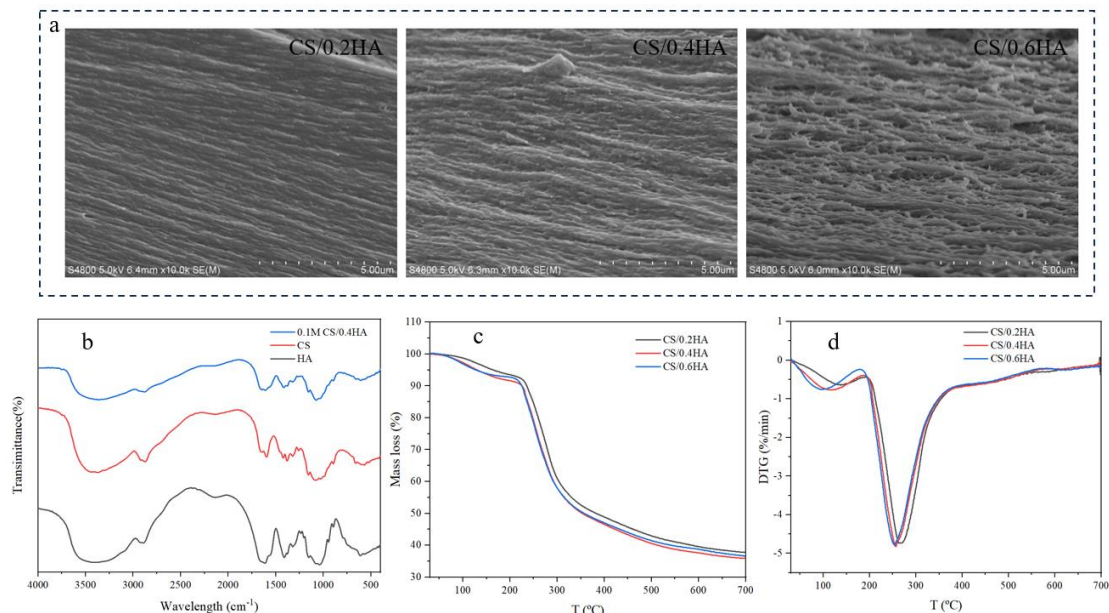


图 3-1 水凝胶的 SEM (a), FTIR (b), TGA (c) 和 DTG (d)

Figure 3-1 SEM (a), FTIR (b), TGA (c) and DTG (d) of hydrogels

由图 3-1a 可知, CS/HA 水凝胶具有孔隙彼此相连的微孔结构, 孔径随透明质酸钠含量的增多而增大, 这种差异是由于交联密度造成的, HA 含量的增多导致凝胶内部的作用力减弱从而使水凝胶的交联密度降低, 使其孔径逐渐增大。CS/HA 水凝胶的微孔结构和孔径可调性为其作为药物载体提供了可能性。测定 CS、HA 粉末和 0.1 M NaOH 处理的 CS/0.4HA 水凝胶的红外图谱, 如图 3-1b 所示, CS/HA 水凝胶在 3677 cm⁻¹ 至 3000 cm⁻¹ 处钝而宽的吸收峰为-OH 和-NH₂ 的伸缩振动吸收峰, 其中, 位于 900 cm⁻¹ 至 1171 cm⁻¹ 附近的峰表示着复合体系存在糖类结构。CS 在 2874 cm⁻¹ 处为残糖基上的甲基或次甲基的 C-H 的伸缩振动吸收峰, 1650 cm⁻¹ 处为吸收酰氨 I 谱带, 1598 cm⁻¹ 处为氨基的弯曲振动峰^[136]。HA 在 1612 cm⁻¹ 及 1409 cm⁻¹ 左右的峰为羧基的反对称及对称伸缩振动峰, CS/HA 水凝胶在 1598 cm⁻¹ 处的强吸收峰消失, 说明 CS 的氨基与 HA 的羧基基团发生了静电相互作用^[137]。利用热重分析研究不同水凝胶的热稳定性, 如图 3-1c 和 d 所示, 随着 HA 含量的提高, 水凝胶的热稳定性呈下降趋势。大分子的

降解过程经过脱水、解聚和分解等步骤，225℃ 以下的第一次分解主要是游离水的去除，225-325℃ 的第二次分解是糖苷键的随机断裂，300-700℃ 的最后分解是糖环结构的分解^[138]。

3.4.1.2 性能变化

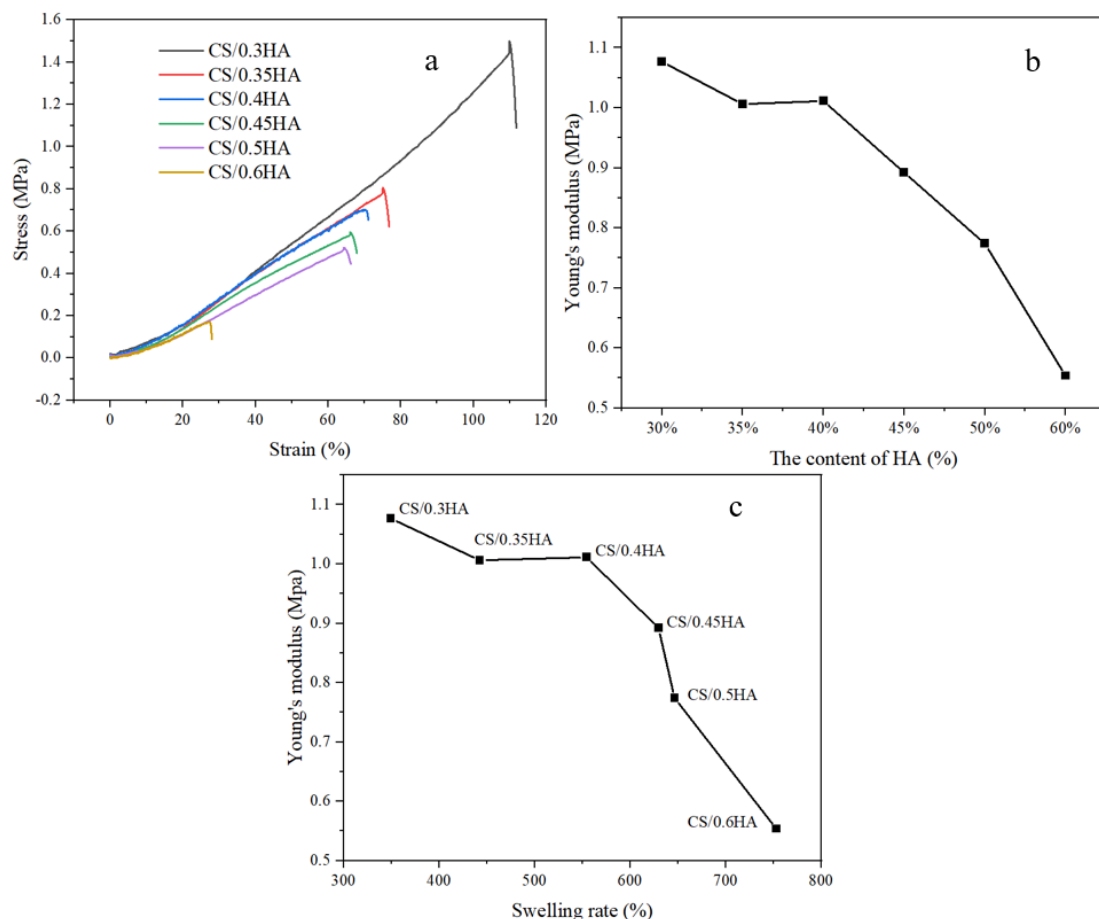


图 3-2 不同 HA 含量的 CS/HA 水凝胶的应力应变曲线 (a)，杨氏模量 (b) 和溶胀率和杨氏模量关系 (c)

Figure 3-2 Stress strain curve (a), Young's modulus (b) and relationship between swelling ratio and Young's modulus (c) of CS/HA hydrogels with different HA content

如图 3-2a 和 b 所示，随着 HA 含量的增加，CS/HA 水凝胶的机械性能降低，应力和应变均不断下降，杨氏模量也呈明显的下降趋势，30%HA 水凝胶的杨氏模量可以达到 1.07N/mm²，而 60%HA 水凝胶的杨氏模量只有 0.31 N/mm²。这可能是由于随着 HA 在体系中占比增加，即 H⁺的含量增多，H⁺的大量存在，会破坏羧基和氨基之间的离子键，降低交联作用，机械性能呈下降趋势。3-2c 显示 CS/HA 水凝胶溶胀率和杨氏模量呈反比关系，随着 HA 所占比例的增加，水凝

胶的溶胀率随之增加，杨氏模量随之下降。

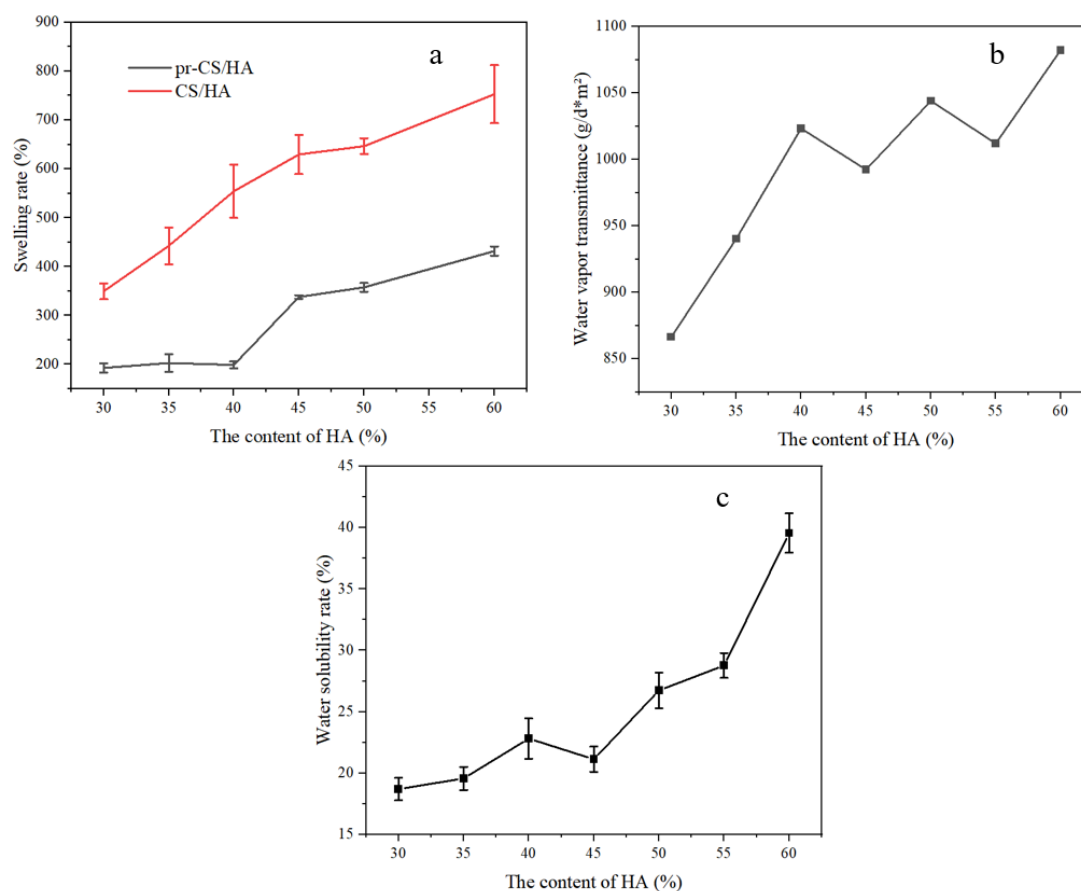


图 3-3 不同 HA 含量的 pr-CS/HA 和 CS/HA 水凝胶的溶胀率 (a)，CS/HA 水凝胶的水蒸气透过率 (b) 和水溶解率 (c)

Figure 3-3 Swelling rate (a) of pr CS/HA and CS/HA hydrogels, water vapor transmittance (b) and water solubility (c) of CS/HA hydrogels with different HA content

如图 3-3a 所示，相同 HA 含量的 CS/HA 水凝胶的溶胀率均远大于 pr-CS/HA 水凝胶，较大的溶胀率有利于结构和性能关系研究，故在本章中选取 CS/HA 水凝胶为研究对象。HA 具有高亲水性，故溶胀率会随着 HA 含量的增加而增加。湿性敷料自 1615 年问世以来便广泛用于创口护理，相对于传统敷料具有显著优势，已被广泛应用于临床和战地医疗领域。水蒸气透过率是湿性敷料最基本的性能指标之一。如图 3-3b 所示，随着 HA 含量的增加，CS/HA 水凝胶的水蒸气透过率整体呈现上升趋势，这是因为 HA 分子具有较高的亲水性和较松散的结构，能够促进水分子的通过。如图 3-3c 所示，当 HA 含量升高时，CS/HA 水凝胶的水溶解率随之升高，这是因为 HA 分子具有较松散的结构和较高的亲水性，使其不易形成交联结构，降低复合膜的稳定性，使易于溶解。

3.4.2 NaOH 的影响

3.4.2.1 结构变化

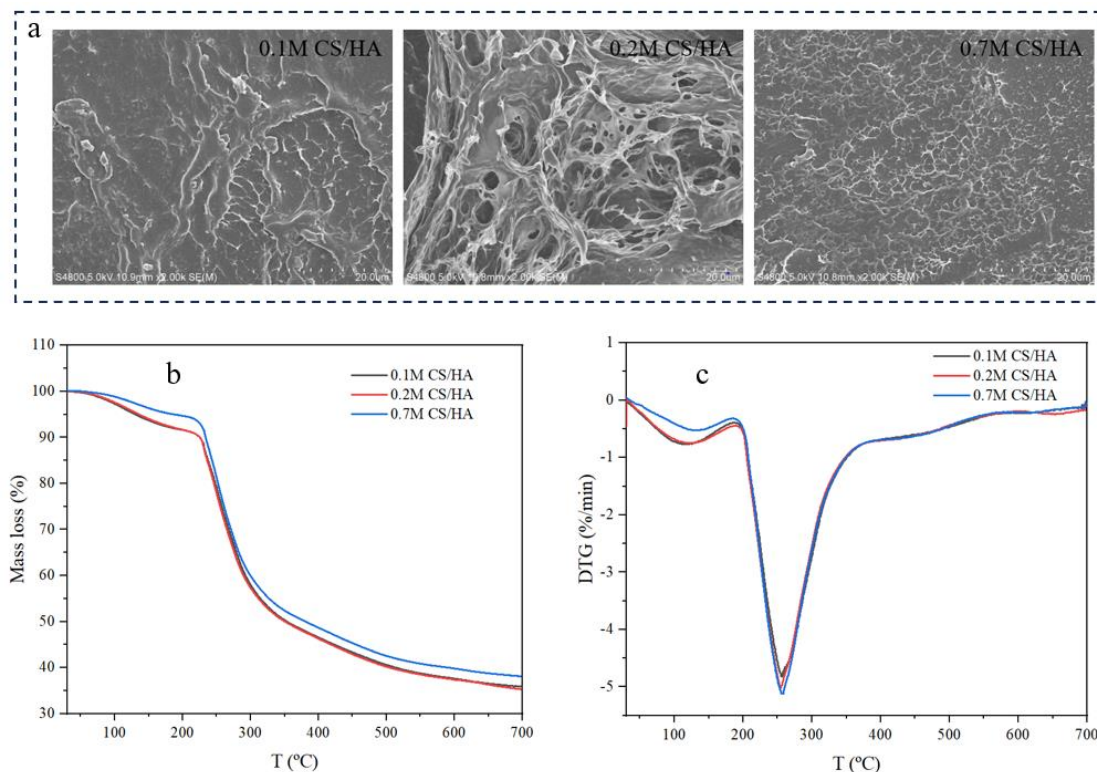


图 3-4 不同 NaOH 浓度处理 CS/HA 水凝胶的 SEM (a), TGA (b) 和 DTG (c)

Figure 3-4 SEM (a), TGA (b) and DTG (c) of CS/HA hydrogels treated with different NaOH concentrations

通常认为, 碱处理可去除多孔网络中的杂质, 并增加分子链之间的相互作用, 故使用不同浓度 NaOH 调控水凝胶的结构和性能。如图 3-4a 所示, CS/HA 水凝胶具有孔隙彼此相连的微孔结构, 孔径随 NaOH 浓度的增大而减小, 这种差异是由交联密度造成的, NaOH 浓度的增大导致凝胶内部的作用力增强从而使水凝胶的交联密度增加, 形成致密的三维网状结构, 孔径逐渐缩小, 孔隙分布逐渐变密^[139]。利用热重分析研究不同水凝胶的热稳定性, 如图 3-4b 和 c 所示, 随着 NaOH 浓度的提高, 水凝胶的热稳定性呈上升趋势。这可能是因为 NaOH 浓度越高, OH⁻越多, 在水凝胶的离子交换位点发生反应, 改变水凝胶内部的离子平衡, 这种离子交换可能导致水凝胶结构的改变, 聚合物链之间的相互作用加强, 从而提高水凝胶的热稳定性。

3.4.2.2 性能变化

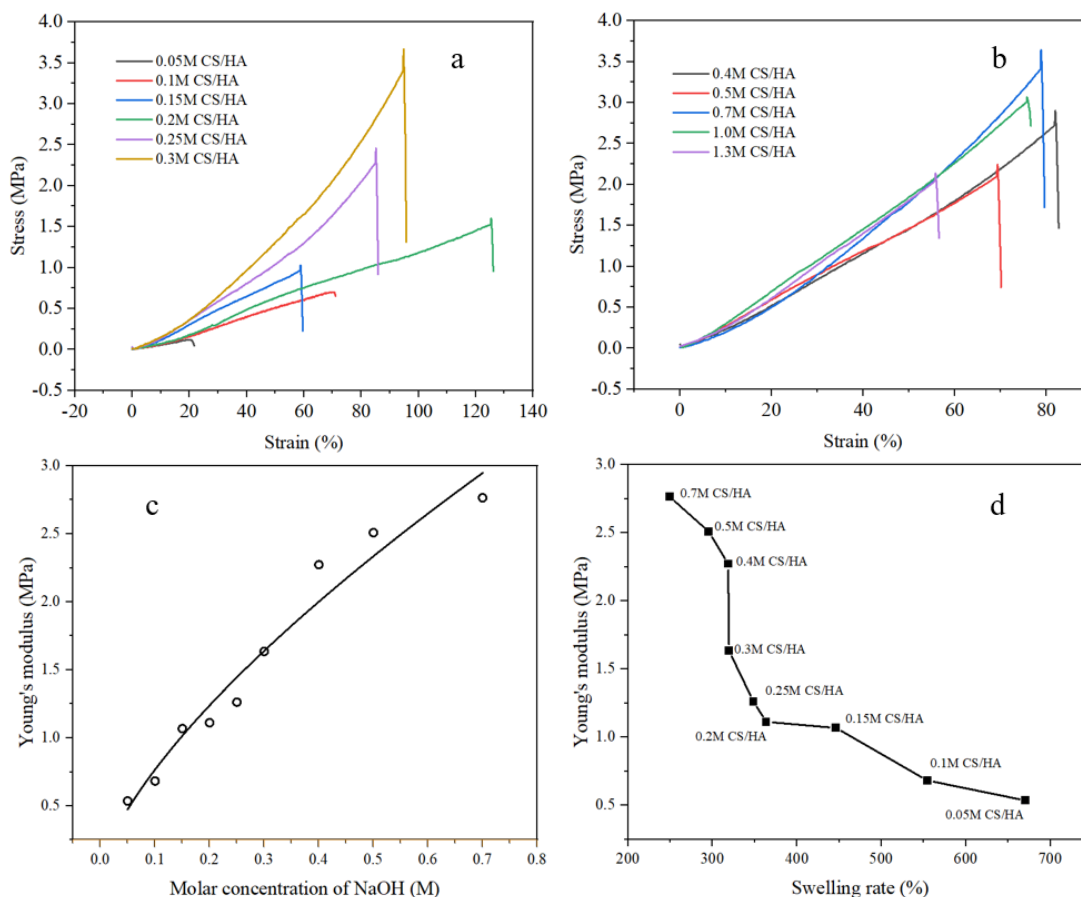


图 3-5 不同 NaOH 浓度处理 CS/HA 水凝胶的应力应变曲线 (a 和 b), 杨氏模量 (c) 和溶胀率和杨氏模量关系 (d)

Figure 3-5 Stress strain curves (a and b), Young's modulus (c) and relationship between swelling ratio and Young's modulus (d) of CS/HA hydrogels treated with different NaOH concentrations

如图 3-5a、b 和 c 所示, CS/HA 水凝胶的应力和杨氏模量随着 NaOH 浓度 (0.05~0.7 M) 的升高而增大, NaOH 溶液的浓度越高, 水凝胶的杨氏模量也会越大。这可能是因为碱处理去除了多孔网络中的杂质且与氢键和范德华力的存在相关的缠结数量增多^[140]。NaOH 的加入与水凝胶中的残留的冰醋酸反应生成醋酸钠, 其溶解性好, 在洗涤过程中会被洗去。此外, 经一定浓度碱处理后, CS 和 HA 相互交错并缠绕在一起, 聚合物链之间的相互作用加强, 故机械性能增强。如图 3-5d 所示, 随着 NaOH 浓度的升高, 水凝胶的杨氏模量逐渐提升, 而溶胀率呈逐渐下降的趋势, 二者呈反比例关系。

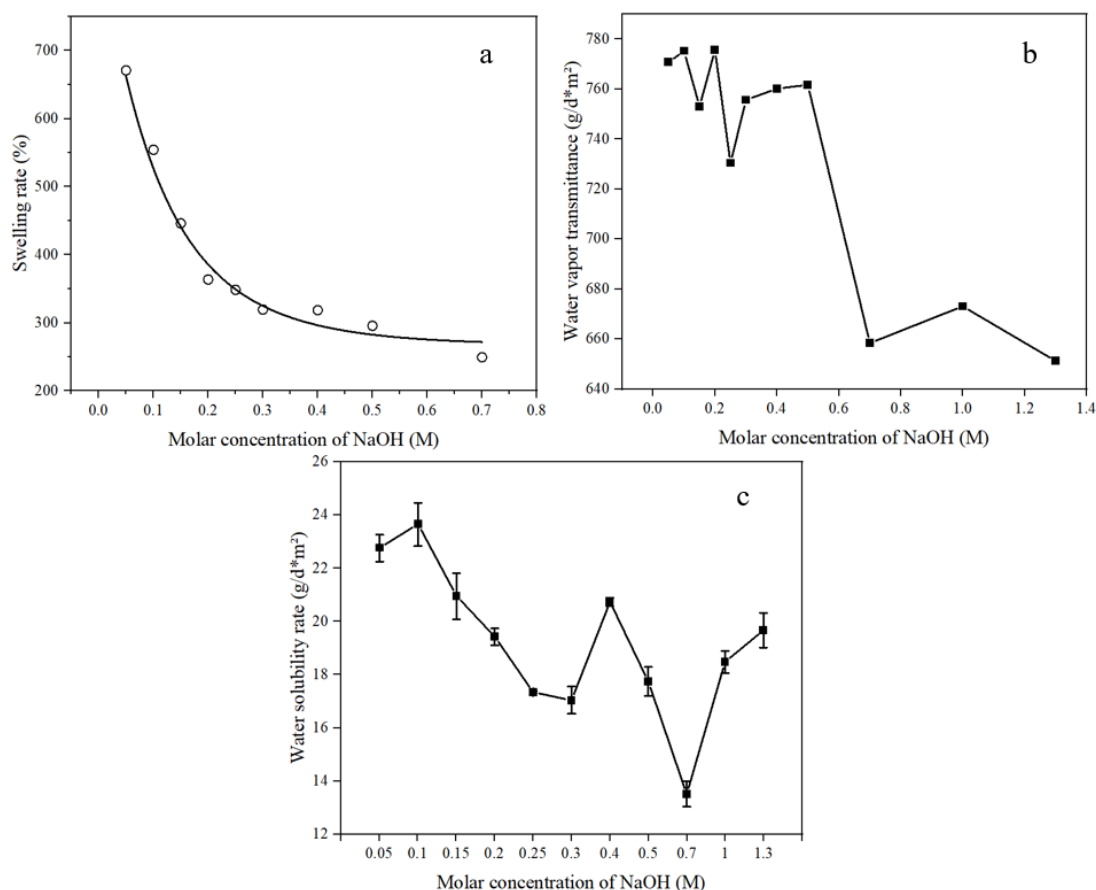


图 3-6 不同 NaOH 浓度处理 CS/HA 水凝胶的溶胀率 (a)，水蒸气透过率 (b) 和水溶解率 (c)

Figure 3-6 Swelling rate (a), water vapor transmittance (b) and water solubility (c) of CS/HA hydrogels treated with different NaOH concentrations

如图 3-6a 所示，随着 NaOH 浓度的增加，CS/HA 水凝胶的溶胀率呈逐渐下降趋势。NaOH 浓度的增加强化了水凝胶内部交联结构，使交联密度增加，形成更加致密的交联网络，阻碍了水分子的进入^[141]。如图 3-6b 所示，NaOH 浓度对 CS/HA 水凝胶的水蒸气透过率有重要影响，随着 NaOH 浓度逐渐增加，水蒸气透过率整体呈下降趋势，这种变化主要源于交联密度的调整，NaOH 浓度增加强化了水凝胶的内部交联结构，使交联密度增加，孔隙分布变得更加紧密，水蒸气的透过率下降。如图 3-6c 所示，随着 NaOH 浓度的升高，水溶解率整体呈先降后增趋势，当 NaOH 浓度达到 0.4 M 时水溶解率升高，之后又不断下降，当 NaOH 浓度达到 0.7 M 时发生突降，水溶解率最低，后又有所上升。这主要是因为：当 NaOH 浓度较低时，交联点之间的线形度较大，水凝胶的三维网络结构较为疏松，孔径较大，故水溶解率较高，随着 NaOH 浓度增加，水凝胶中

多余的 H^+ 被中和, 使 $-OH$ 去质子化, 增强了网络中的氢键作用, 使凝胶内部结构更加密集, 从而导致水溶解率的下降。特别地, 当 $NaOH$ 浓度 $0.4 M$ 时, 水凝胶中大量的 $-COOH$ 被 OH^- 离子化成为 $-COO^-$, 凝胶内部网络链得到了扩展, 表现出较强的水溶性。由于原材料中含有杂质, 高浓度 $NaOH$ 会去除多孔网络中的杂质, 使凝胶内部氢键、范德华力等作用力联系更为紧密, 使得水凝胶的溶解性减弱, 此外, 高浓度碱处理会改变水分子间氢键的对称性, 导致 Na^+ 靠近可极化氢键附近, 这使得氢键的非对称性增加, 导致凝胶内部作用力减弱, 水溶解性增强。

3.4.3 Lys 的作用

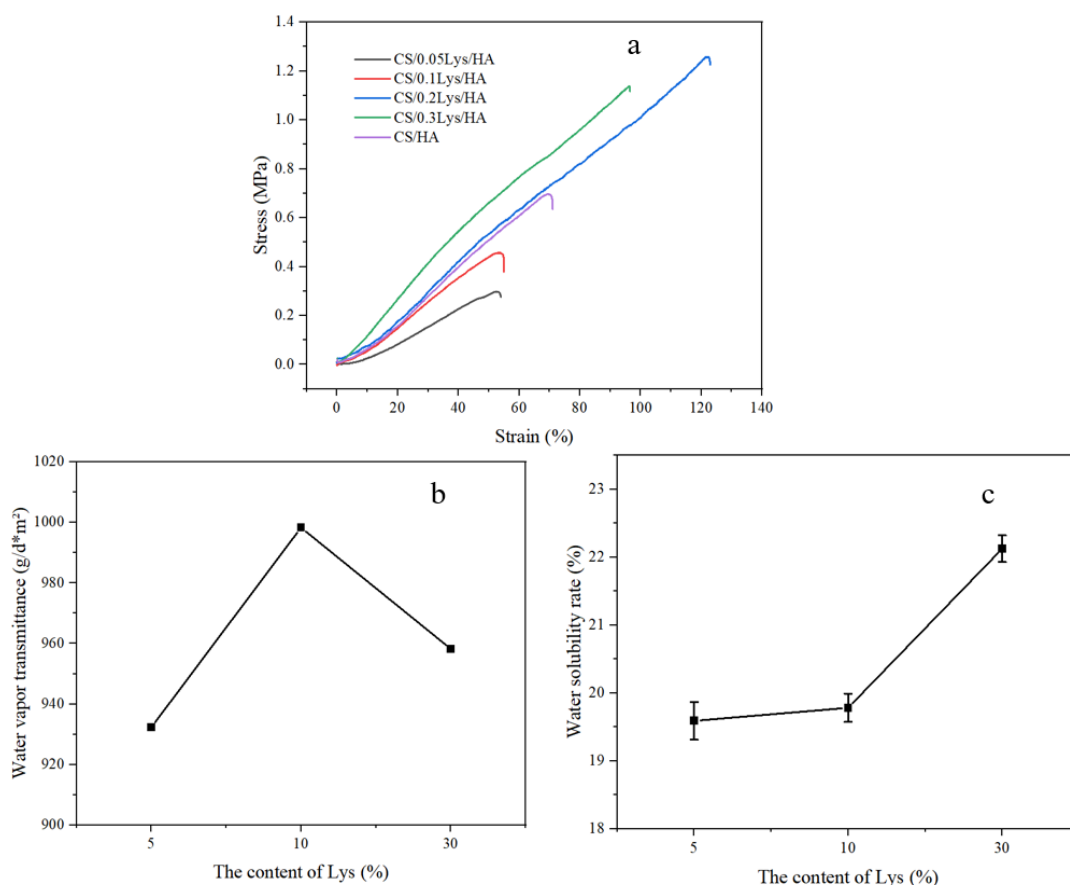


图 3-7 不同 Lys 含量的水凝胶应力应变曲线 (a)、水蒸气透过率 (b) 和水溶解率 (c)

Figure 3-7 Stress strain curve (a), water vapor transmittance (b) and water solubility (c) of hydrogels with different Lys content

如图 3-7a 所示, 可以看出当 Lys 占比等于 20% 时, CS/Lys/HA 水凝胶的机械性能明显优于 CS/HA 水凝胶。CS/0.2Lys/HA 水凝胶断裂伸长率为 120.91%,

拉伸强度为 1.29 MPa，而 CS/HA 水凝胶的断裂伸长率为 70.4%，拉伸强度为 0.7MPa。Lys 是一种具有较大侧链的氨基酸，其结构中含有羧基和氨基，可以与 CS 和 HA 的氨基和羧基发生静电相互作用，形成更紧密的交联结构，这种交联结构能够提高复合膜的强度和韧性。如图 3-7b 所示，当 Lys 含量从 5%提高到 30%时，水凝胶的水蒸气透过率先增加后减小，这是因为低含量 Lys 可以提高复合膜的亲水性和孔隙度，使水分子更容易通过复合膜，在中等含量 Lys 的情况下复合膜的孔隙度和亲水性达到最优化状态，能够最大限度地促进水分子的通过，高含量 Lys 会导致复合膜内部交联结构的增强，从而限制水分子的通过。如图 3-7c 所示，随着 Lys 含量的提高，水凝胶的水溶解率随之提高，这是因为较低含量 Lys 能充分地与其他组分形成交联，结构相对较稳定，不易溶解，当 Lys 浓度升高时，交联不充分，且能够最大限度地促进水分子的通过，从而使水凝胶的溶解增大。

3.5 本章小结

CS/HA 水凝胶的结构和性能可被多种因素调控，通过创新工艺制备 CS/HA 水凝胶，开发调控方法，得出了 CS/HA 水凝胶结构和性能关系的一般规律，可根据实际需求定制化制备相应水凝胶，有利于推动 CS/HA 水凝胶的实际应用。具体小结如下：

（1）随着 HA 含量的提高，CS/HA 水凝胶孔径变大，机械性能下降，溶胀性能上升，杨氏模量和溶胀性能呈反比关系，同时，水蒸气透过率和水溶解率整体呈上升趋势。

（2）随着 NaOH 浓度的增加，CS/HA 水凝胶孔径变小，机械性能上升，溶胀性能下降，杨氏模量和溶胀性能呈反比关系，同时，水蒸气透过率和水溶解率整体呈下降趋势。

（3）在 CS/HA 水凝胶中引入 Lys，随着 Lys 含量的提高，机械性能和水蒸气透过率先下降后上升，水溶解率呈上升趋势。

第 4 章 主客体渗透交联制备高韧性 CS/AA/HA 水凝胶

4.1 前言

以 CS 和 HA 为主要基质的水凝胶材料广泛应用于生物医药、食品和化妆品等领域，但因 CS 和 HA 的多分散性（Molecular weight distributions, MWD）及 CS/HA 体系的异质性阻碍了 CS/HA 水凝胶材料稳定有序组装，制约其结构与性能开发，导致其韧性和机械强度低下，实际应用严重受限^[142-144]。目前，对多分散性和异质性的调控研究大都集中的分子量相对可控的合成聚合物方面，尤其是嵌段共聚物（Block copolymer, BCP），如精确调控聚合物链的尺寸分布^[145]，窄化聚合物分子量分布范围，构建以成核嵌段结晶为核心的 BCP 多步合成路线^[146]。但是，CS 和 HA 等天然聚合物，需要通过多重分离纯化才能降低 MWD，会大幅增加分离纯化成本，不利于较宽 MWD 的 CS 和 HA 的大规模应用。因此，阐明 CS/HA 体系 MWD 与 CS/HA 水凝胶结构性能之间的变化规律，基于 MWD 调控实现 CS/HA 水凝胶的稳定有序组装，是本章需要解决的关键问题。

通过制备适当粒径的客体小分子聚集体（黏合剂，Adhesive）和结构相对规整的 CS/HA 主体大分子聚集体（模块，Block），来控制天然基质的 MWD。另一方面，高聚物的韧性和刚性主要来自于聚合物链的结晶和缠结，结晶和缠结与交联情况关系密切^[147]，交联组装过程和工艺密切相关。因此，我们推测以结构相对规则的 CS/HA Block 为主体模块（主体，Host），以适量 Adhesive 为客体缠结促进剂（客体，Guest），通过客体渗透主体的方式，可以形成具有高缠结的 CS/HA 水凝胶主客体复合物（Host-Guest Complexes, HGC），理论上能大幅提升水凝胶的韧性。

4.2 实验材料与仪器

4.2.1 材料与试剂

表 4-1 主要材料与试剂

Table 4-1 Main materials and reagents

名称	级别	生产厂家
壳聚糖	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
透明质酸钠	95%纯度（食品级）	新疆阜丰生物科技有限公司
氨基丁酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
谷氨酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
赖氨酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
精氨酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
冰醋酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
氯化钠	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
乙酸钠	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
柠檬酸钠	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
单宁酸	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司

4.2.2 仪器

表 4-2 主要实验仪器

Table 4-2 Main instruments

仪器	型号	生产厂家
酶催化平行反应器	T&J-EnzyR 0.15L*3	迪必尔生物工程有限公司
质构仪	TexturePro CT	美国布鲁克公司
超纯水机	LD-DI-15V	上海硕鼎水处理设备公司
集热式恒温加热磁力搅拌器	DF-101SZ	河南省巩义予华仪器有限责任公司
电子天平	TA-214	上海海康电子仪器厂
pH 计	PHS-25	上海仪电科学仪器公司
移液枪	20P、220P、100P	法国 GILSO 公司
隔水式恒温培养箱	GHP-9080	常州普天仪器制造公司
电热恒温鼓风干燥箱	GZX-GF101	上海贺德实验设备公司
真空冷冻干燥机	SJIA-10N	宁波市双嘉仪器有限公司
扫描电子显微镜	S-4800	日本日立公司
激光粒度仪	90PlusPALS	美国布鲁克海文仪器公司
差示扫描量热仪	DSC25	美国 TA 仪器沃特斯公司
傅里叶变换红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
X-射线衍射仪	D8Advance	德国布鲁克公司
光学接触角仪器	SL250	美国科诺有限公司

4.3 实验方法

4.3.1 水凝胶的制备

本章主要制备了四大类水凝胶，分别为：UB、WB、WBA 和 UBA，表 4-3 为其命名规则。

表 4-3 水凝胶命名规则

Table 4-3 Hydrogel naming rule

序号	名称	Block 是否洗涤	Adhesive 是否添加
1	UB	否	否
2	WB	是	否
3	WBA	是	是
4	UBA	否	是

4.3.1.1 I-CS/HA 水凝胶制备

用酶催化平行反应器将 1.12 g HA 在温度为 45℃，转速为 500 rpm 的条件下完全溶解在 105 mL 去离子水中，随后加入 1.68 g CS 使其均匀分散。在 45℃，转速为 500 rpm 的条件下，向 CS/HA 溶液中加入 35 mL 4% 冰醋酸溶液。将上述溶液定义为水凝胶前驱液，取 20 mL 置于一个一次性培养皿中，于 45℃ 水平烘干，烘干后用 100 mL 去离子水浸泡，使充分溶胀，将其命名为初始 CS/HA 水凝胶，即 initial CS/HA 水凝胶，简称为 I-CS/HA 水凝胶。

4.3.1.2 UB 水凝胶制备

(1) Block 制备：用酶催化平行反应器将 1.12 g HA 在温度为 45℃，转速为 500 rpm 的条件下完全溶解在 105 mL 去离子水中，随后加入 1.68 g CS 搅拌 5 min 使 CS 均匀分散。在 45℃，转速为 500 rpm 的条件下，向 CS/HA 溶液中加入 35 mL 4% 冰醋酸溶液。将上述溶液定义为水凝胶前驱液，将其转移至烧杯中，静置 24 h，分离上层悬浊液和下层沉淀液备用，此时，未被洗涤的大分子聚集体 Block 分布在沉淀液中，小分子聚集体分布在悬浊液中。

(2) 烘干、溶胀：将未洗涤的 Block 置于一个一次性培养皿中，于 45℃ 水平烘干，烘干后用 100 mL 去离子水浸泡 2 h，使充分溶胀，即为 UB 水凝胶。

4.3.1.3 WB 水凝胶制备

(1) 同 4.3.1.2 (1)。

(2) Block 洗涤：将 500 mL 去离子水加入到沉淀液中，用玻璃棒搅拌均匀，静置 24 h，去除上层溶液，即为洗涤后的 Block。

(3) 烘干、溶胀：将洗涤后的 Block 置于一个一次性培养皿中，于 45°C 水平烘干，烘干后用 100 mL 去离子水浸泡 2 h，使充分溶胀，即为 WB 水凝胶。

4.3.1.4 WBA 水凝胶制备

(1) 同 4.3.1.3 (1) 和 (2)。

(2) Adhesive 的制备和命名：上述每份 Block 中 Adhesive 的添加体积固定为 24ml。仅举一例说明制备方法和命名规则，将 3 mL 浓度为 1% 的 CS 溶液加到 21 mL 浓度为 1% 的 Arg 溶液中，得到的产物即为 Adhesive，命名为 Aac1-7。表 4-4 为不同 Adhesive 的命名。

表 4-4 黏合剂命名规则

Table 4-4 Adhesives naming rule

序号	名称	组分	浓度 (%)	AA/CS 比例
1	Aac1-7	Arg、CS	1	7/1
2	Aac2-7		2	7/1
3	Aac3-7		3	7/1
4	Aac2-3		2	3/1
5	Aac2-19/5		2	19/5
6	Aac2-5	Lys、HA	2	5/1
7	Alh1-1		1	1
8	Alc1-1		1	1/1
9	Alc1-3	Lys、CS	1	3/1
10	Alc2-3		2	3/1
11	Aγc1-3	γ-GABA、CS	1	3/1
12	Agc1-3	Glu、CS	1	3/1
13	All	Lys	1	无

(3) Adhesive 添加：将洗涤后的 Block 转移到酶催化平行反应器中，温度设为 45°C，转速设为 500 rpm，先搅拌 5 min，然后加入 24 mL Adhesive 溶液，将得到的溶液转移至烧杯中，静置 2h，去除上层清液，即得到 WBA 水凝胶前驱液。

(4) 烘干溶胀：将 WBA 水凝胶前驱液置于一个一次性培养皿中，于 45°C 水平烘干，烘干后用 100 mL 去离子水浸泡 2 h，使充分溶胀，即为 WBA 水凝胶。

4.3.1.5 UBA 水凝胶制备

省略洗涤步骤，其余同 4.3.1.4

4.3.2 机械性能检测

同 2.3.5

4.3.3 溶胀性能检测

同 2.3.7

4.3.4 亲水性检测

同 2.3.8

4.3.5 水凝胶表征

4.3.5.1 动态光散射（DLS）

采用激光纳米粒径仪（NanoBrook 90PlusPALS，美国）测定 Adhesive 的粒径大小和分布。

4.3.5.2 Zeta 电位

采用激光纳米粒径仪（NanoBrook 90PlusPALS，美国）测定 Adhesive 的电位。

4.3.5.3 扫描电镜（SEM）

同 2.3.10.1

4.3.5.4 红外（FTIR）

同 2.3.10.2

4.3.5.5 X 射线衍射（XRD）

同 2.3.10.3

4.3.5.6 小角 X 射线散射（SAXS）

采用小角 X 射线散射仪（Anton paar Saxsess MC2，奥地利）测定 SAXS。

4.3.5.7 热重

同 2.3.10.4

4.4 结果与分析

4.4.1 分离沉淀的影响

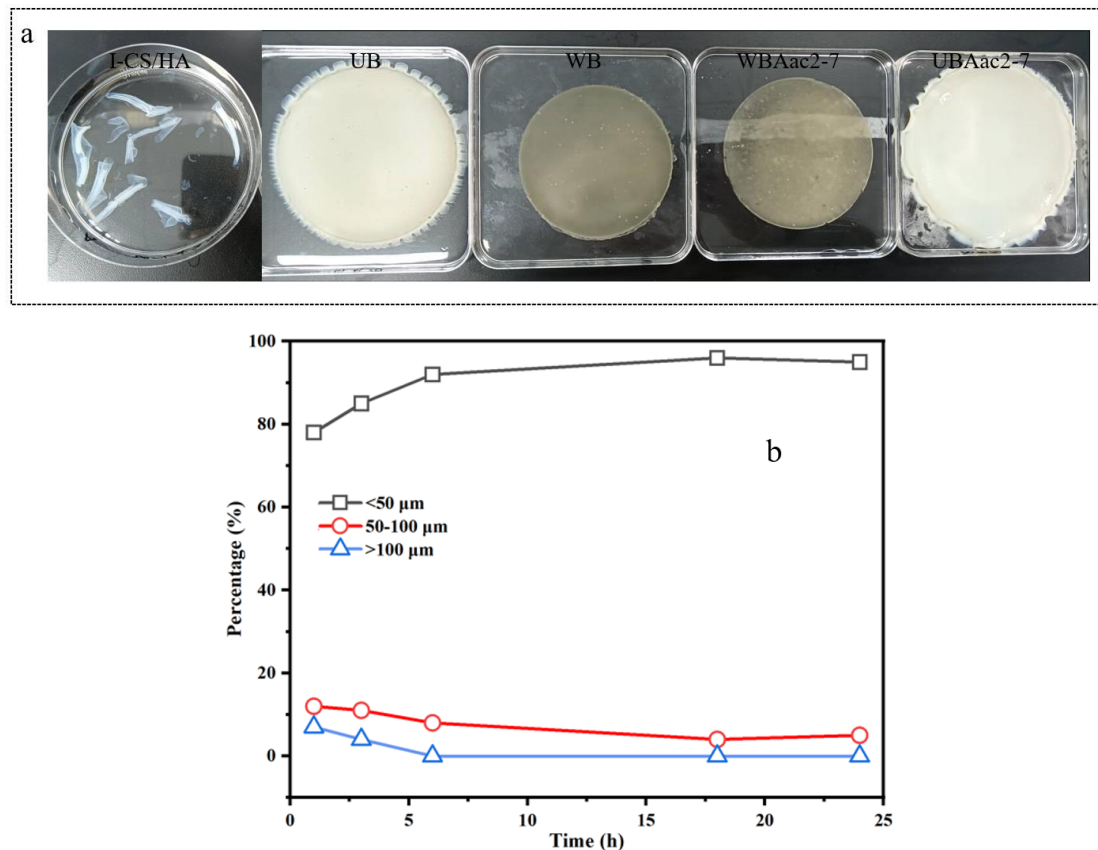


图 4-1 不同水凝胶的实物图 (a) 和悬浊液粒径尺寸分布随静置时间的变化 (b)

Figure 4-1 Pictures of different hydrogels (a) and variation of suspension particle size distribution with settling time (b)

如图 4-1a 所示，分别展示了 I-CS/HA、UB、WB、WBAac2-7 和 UBAac2-7 水凝胶的实物图。I-CS/HA 水凝胶机械性能微弱，在水凝胶中溶胀后裂解成小碎片。如图 4-1b 所示，悬浊液中的粒子粒径分布受沉淀时间影响，随着沉降时间的增长，较大的粒子发生沉降，悬浊液中的粒子逐渐变小，分布逐渐集中，18h 时，沉降基本稳定，悬浊液中的粒径大小可通过静置时间调控。

4.4.2 Adhesive 的影响

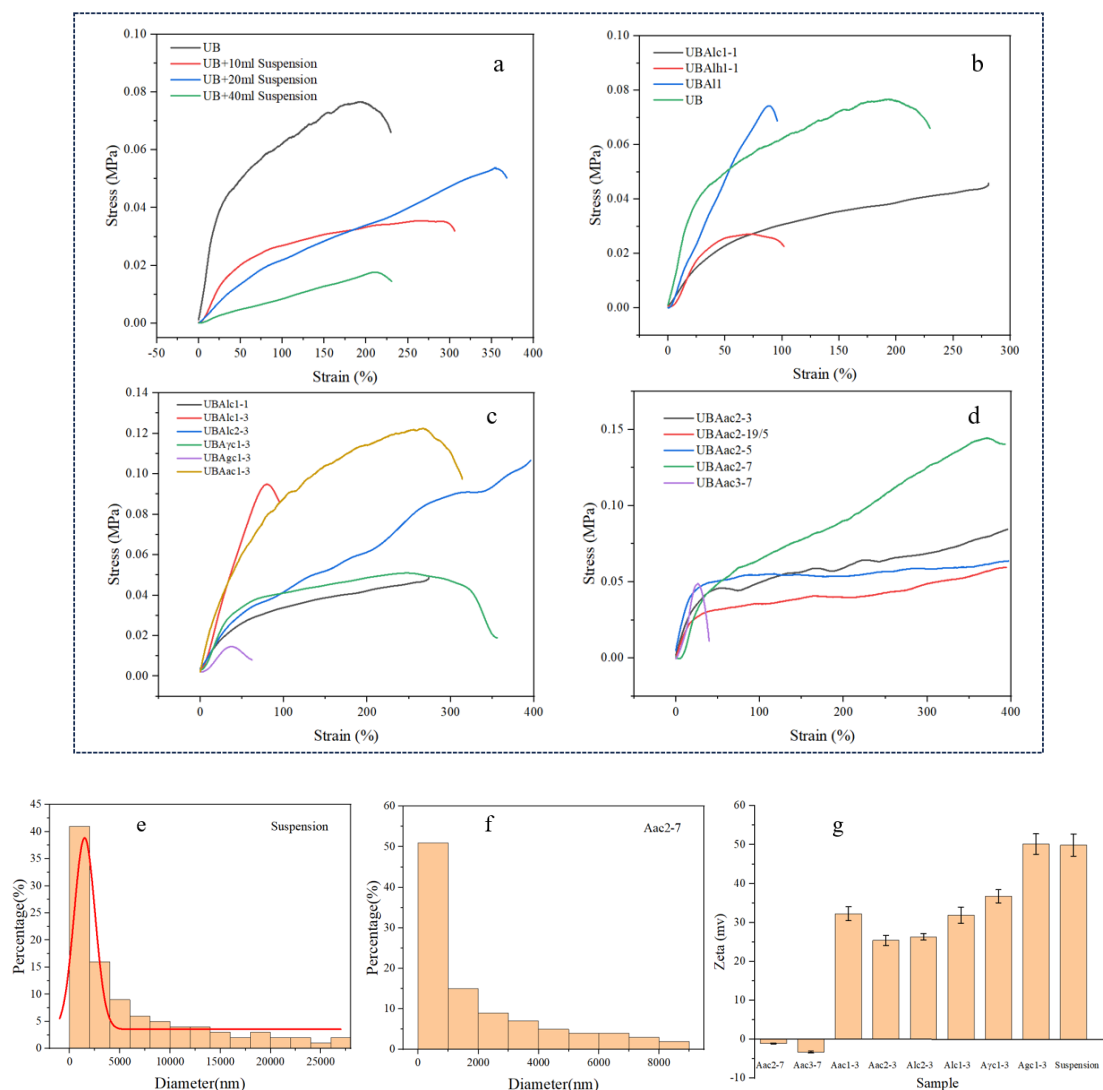


图 4-2 不同水凝胶应力应变曲线 (a-d)、悬浊液粒径尺寸分布 (e)、Aac2-7 粒径尺寸分布 (f) 和不同 Adhesive 的 Zeta 电位 (g)

Figure 4-2 Stress-strain curves of different hydrogels (a-d), particle size distribution of suspension (e), size distribution of Aac2-7 (f) and Zeta potential of different Adhesive(g)

如图 4-2a 所示, 添加不同体积悬浊液, 水凝胶的拉伸性能均有所提升, 据此推断适量悬浊液起着增强缠结的黏合作用, CS/HA 拉伸性能的提升具有重要价值, 因此, 重新设计不同的 Adhesive 试图替代原始悬浊液。如图 4-2b 所示, 设计 3 种不同的 Adhesive, 其中, Alc1-1 溶液提高了水凝胶的拉伸性能, 因此, 后续优化 CS/AA 的比例、浓度及 AA 的种类, 由图 4-2c-d 可知, Aac2-7 溶液提

升水凝胶的应力应变效果最佳。如图 4-2e-f 所示，水凝胶前驱液静置 24 h 后，取上层悬浊液进行 DLS 测定，结果显示，0-5000nm 尺寸范围，粒子占比 66%，5000-27000nm 占比 34%，粒径偏大，分布宽，Aac2-7 溶液中粒子在 0-2500nm 范围占比 75%，2500-8500nm 占比 25%，粒径偏小，分布窄。悬浊液和 Aac2-7 溶液均为微米级别的混合粒子。Zeta 电位的正值表示表面具有正电荷或负离子浓度较低的情况，而负值表示表面具有负电荷或正离子浓度较低的情况。较高的正值或负值可能表明样品的分散稳定性较好，而接近零的 Zeta 电位可能意味着样品容易发生聚集或沉降^[148]。如图 4-2g 所示，Aac2-7 的 Zeta 值偏低，可逐渐与 Block 渗透交联，较低的值可能有利于形成均匀的结构，其余样品的 Zeta 电位绝对值偏高，可迅速与 Block 表层发生交联，不利于形成均匀的结构。由于静置作用得到的沉淀中含有少量难以分离的悬浊液粒子，因此后续采用去离子水清洗静置得到的沉淀，探究水洗的影响。

4.4.3 水洗的影响

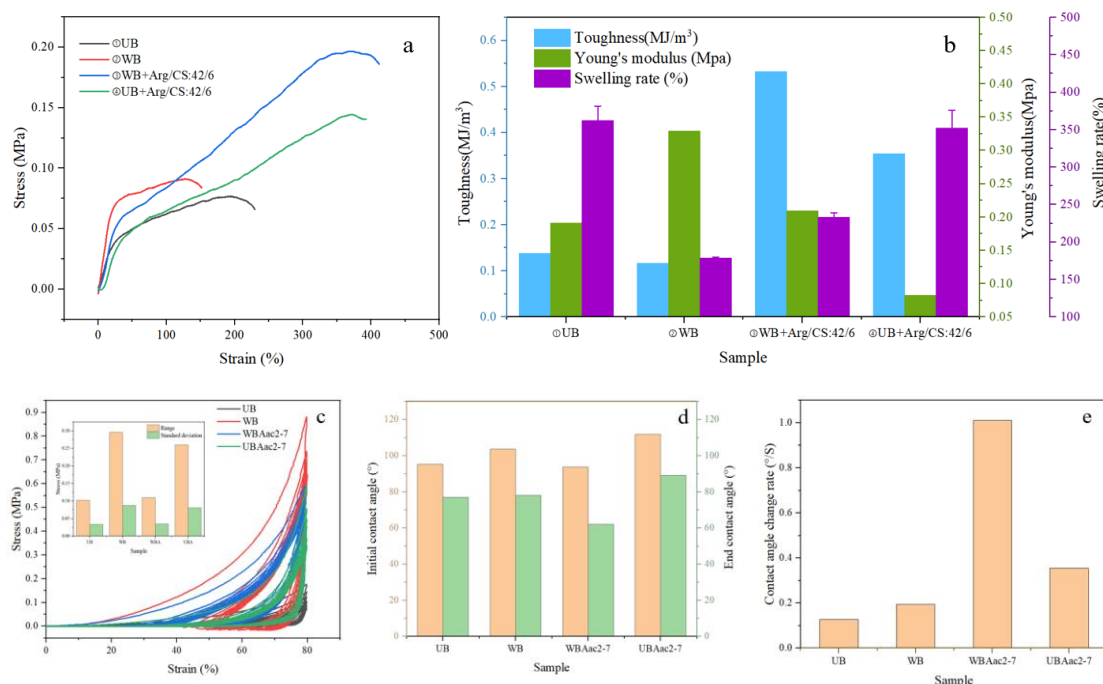


图 4-3 不同样品的机械和溶胀性能 (a-b)、循环压缩性能 (c) 和接触角和接触角变化速率 (d-e)

Figure 4-3 Mechanical and swelling properties (a-b), cyclic compression performance (c), and contact angle and contact angle change rate (d-e) of different samples

如图 4-3a 所示, Aac2-7 提高了水凝胶的拉伸能力, 水洗提高了应力。WBAac2-7 的应力和应变最高, 相较于 UB 水凝胶, 其韧性提高 3.9 倍, 应力提高 2.6 倍, 断裂伸长率提高 1.9 倍。这是因为水洗后的 Block 更容易吸纳、扩散分子量较小的 Adhesive, 形成分布相对均匀的非晶拓扑缠结, 故水凝胶韧性被进一步提升^[149]。另一方面, 由图 4-3b 可知, 水洗降低了水凝胶的溶胀率, 水洗后 Aac2-7 的引入又提高了水凝胶的溶胀率, 这一定程度上证明了 Aac2-7 和悬浊液的相似性。如图 4-3c 所示, 水洗和 Adhesive 的作用增强了水凝胶的压缩和恢复性能, 进一步证明了结晶和链缠结程度的增加。Adhesive 添加过程实质上是 Block 拓扑结构被调控的过程, 这一定程度上证明了主客体渗透交联推测的合理性。如图 4-3d-e 所示, 可以看出水凝胶最终均呈亲水性, 这是因为水凝胶中的高分子聚合物具有较大的孔隙结构或多孔性, 能够容纳水分子并与之相互作用。这种高度吸水性使得水凝胶能够迅速吸收周围的水分, 并保持其亲水。WBAac2-7 水凝胶的亲水性最佳, 这可能是其表面存在微观多级结构, 表面能较低^[150], 使得水分子能够更容易地渗入, 表现为高亲水性。

4.4.4 表征分析

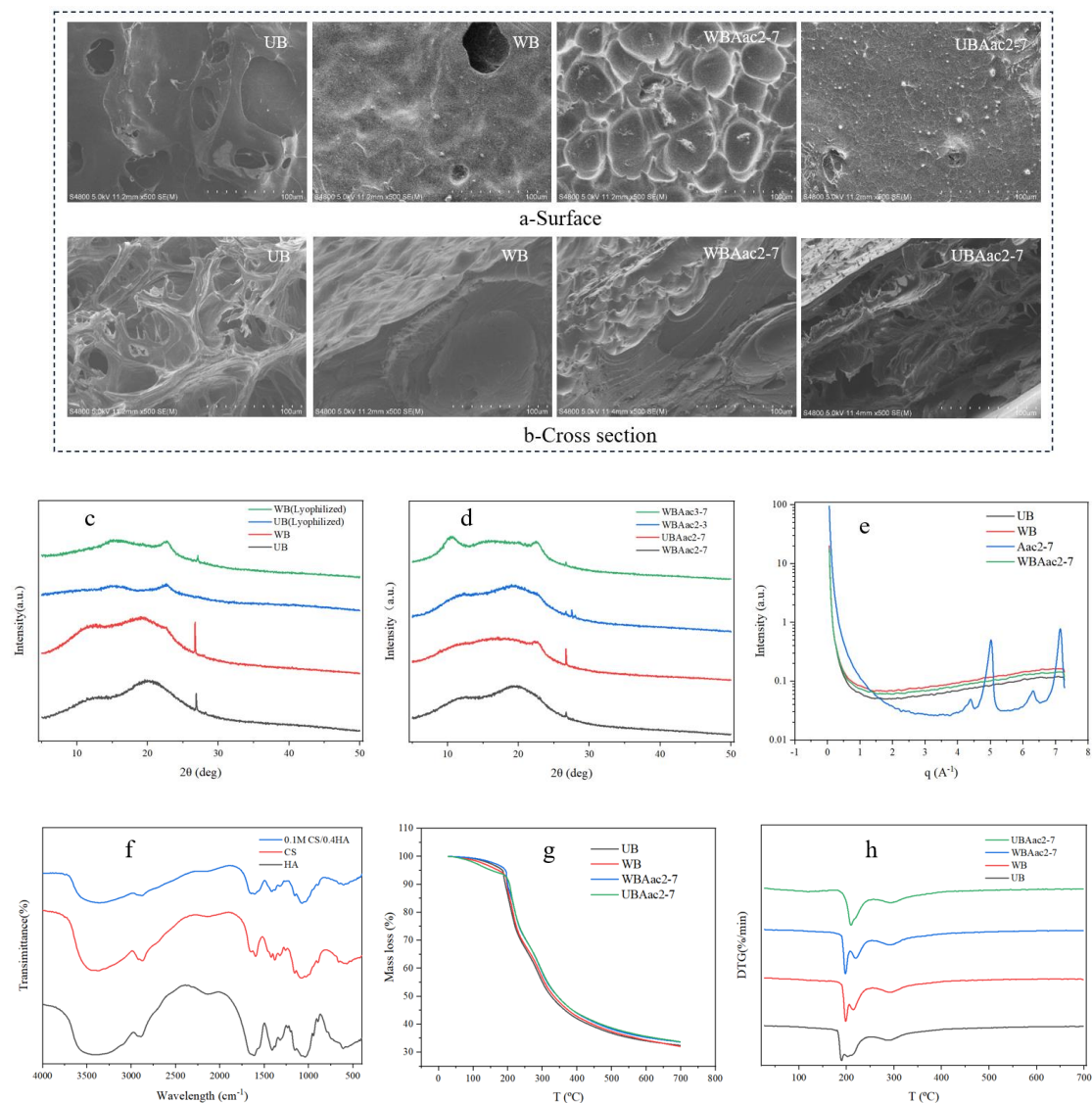


图 4-4 不同水凝胶样品的 SEM (a-b)、XRD (c-d)、SAXS (e)、FTIR (f)、TGA (g) 和 DTG (h)

Figure 4-4 SEM(a-b), XRD(c-d), SAXS(e), FTIR(f), TGA(g), and DTG(h) of different hydrogels samples

如图 4-4a 和 b 所示, 观察样品 UB、WB、WBAac2-7 和 UBAac2-7 截面可知, 在烘干作用下^[151]Block 发生重排, 水洗使水凝胶自组装成紧密的层状结构, 未水洗得到的水凝胶结构较为松散, 符合溶胀结果。观察样品表面可知, 相较于 WB, UB 表面更光滑, 这可能是因为 UB 中含有未洗去的微米粒子交联吸附在 Block 上, 形成较为光滑的表面。Aac2-7 溶液可调节网络结构, 形成新的突

刺状结晶^[152]，这种结构可提高水凝胶的拉伸性能，相较于 WBAac2-7，UBAac2-7 的刺状结晶数量较少，形状更为尖锐，可能的原因是 Aac2-7 和未洗去的微米粒子之间发生交联作用^[153]。如图 4-4c-d 所示，除了 UB(Lyophilized)，其余样品在 26° 左右均出现一个尖锐的峰，峰越尖锐，峰强度越高，样品结晶度越高^[154]。对比样品 UB 和 WB、UB(Lyophilized)和 WB(Lyophilized)，水洗和烘干可提高结晶度，符合电镜图像。Aac2-7 的引入降低了结晶度，样品 UBAac2-7 中，Aac2-7 和未洗去的微米粒子之间发生交联作用，故样品 UBAac2-7 的结晶度大于样品 WBAac2-7。如图 4-4e 所示，不同样品的小角 X 射线散射图谱发生偏移，说明样品之间存在结构差异和形态差异^[155]。UB 水凝胶显示出最宽的峰，说明其具有最大的粒径。WB 水凝胶显示出最窄的峰，说明其具有最小的粒径，WBAac2-7 水凝胶的粒径介于两者之间。如图 4-4f 所示，在 3250 cm^{-1} 至 3750 cm^{-1} 处的宽峰是-NH 的振动峰与-OH 的伸缩振动峰形成的多重吸收峰，反映出不同样品中氨基和羟基之间存在强弱不同的分子间和分子内氢键^[159]。 1637.5 cm^{-1} 处为羧酸类 C=O 的伸缩振动以及胺类 N-H 键的弯曲振动吸收峰^[156]，位于 900 cm^{-1} 至 1171 cm^{-1} 附近的峰表示着复合体系中存在着糖类结构^[157]。此外，在 $1000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ 的指纹区有很大的差异，证明 Adhesive 的添加和水洗作用在水凝胶的自组装中起着重要的作用。热重分析是研究样品的组成、热稳定性以及热分解情况的重要手段。热分解过程主要分为三个阶段， 100°C - 185°C 为第一个失重阶段，主要是水凝胶网络结构内残留的自由水的挥发。 180°C - 400°C 为第二个失重阶段，主要包括水凝胶内部结合水的蒸发以及糖苷键的随机断裂。 $400\text{-}700^\circ\text{C}$ 为第三个失重阶段，主要为基质内部糖环的解聚和多糖结构的分解^[158]。如图 4-4 所示 g，TGA 曲线中可以看出第二阶段的失重比率不同样品的差距较大，这反应出不同结构的热稳定性不同。DTG 曲线能更好的分析材料的热分解过程，如图 4-7h 所示，对比样品 UB 和 WB，WB 的热稳定性高；对比样品 WBAac2-7 和 UBAac2-7，UBAac2-7 的热稳定性高。

4.5 本章小结

天然聚合物的多分散性和异质性对其结晶、交联和链缠结等有着复杂的影响，结晶的形成提供了有序的结构框架，增强相邻分子链间的相互作用，增加

交联点。聚合物链之间的交联会促进链缠结，链缠结提供了分子链间复杂的相互作用网络。具体小节如下：

（1）沉淀作用：实现了大分子 CS/HA 聚集体和悬浊液中的小分子聚集体的分离重排，消除多余小分子对 Block 后续结晶过程的干扰，为后续水凝胶的组装提供更多的交联位点。

（2）Adhesive 作用：优化 Adhesive 的研究中发现，适量 Adhesive 渗透交联 Block 拓扑结构，进一步提升水凝胶韧性。

（3）水洗作用：水洗可以洗涤去除 Block 结构中残留的小分子，并使其亲水基团重排，使结构更为规整，易于和 Adhesive 发生渗透交联，显著提升水凝胶的机械性能。

第 5 章 总结与展望

5.1 总结

针对阴阳离子静电作用水凝胶机械强度低、韧性差、pH 响应性不易调控、功能活性不足、溶胀性能和机械性能不平衡、结构和性能缺乏系统研究等问题，本文通过在水凝胶中引入 AA 发挥桥接、pH 调控和运输载体作用，提高了水凝胶的机械强度和功能活性；通过创新制备工艺（分离沉淀和上清），调控基质比例，引入不同含量 Lys，使用不同浓度 NaOH 浸泡处理等手段以获得多种 CS/HA 水凝胶结构，检测其微观结构和宏观性能，分析结构与性能之间的变化规律；通过制备适当粒径的客体小分子聚集体和结构相对规整的 CS/HA 主体大分子聚集体，来控制天然基质的 MWD，提出主客体渗透交联策略，大幅提升了 CS/HA 水凝胶的拉伸性能。总结如下：

（1）在 CS/ γ -PGA 水凝胶中引入 AA，通过改变网络的自组装来改善水凝胶的多种性能，这种改善与链长和 AA 浓度密切相关，其中，0.5% β -Ala 在提高水凝胶的交联度以及结构稳定性、机械强度和保水性等其他行为方面的作用最强。重要的是， β -Ala 改变了水凝胶的 pH 响应行为，使得 β -Ala 连接的水凝胶在碱性环境下比不含 AA 的水凝胶释放更多的 BAC，使 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶更适合作为碱性伤口敷料。

（2）以静电作用 CS/HA 水凝胶为研究对象，通过分离水凝胶前驱液的上清和沉淀，获得了高溶胀 CS/HA 水凝胶，调控 CS/HA 水凝胶基质比例，使用不同浓度 NaOH 浸泡处理，引入不同含量 Lys，获得多种水凝胶结构，以溶胀行为连接其微观结构和宏观性能，系统分析 CS/HA 水凝胶结构与性能的变化规律。随着 HA 含量增加，CS/HA 水凝胶孔径变大，溶胀率上升，机械性能下降；NaOH 作用与 HA 作用则相反；随着 Lys 含量的提高，机械性能先下降后上升，同时，杨氏模量和溶胀率均呈反比关系，为水凝胶的结构性能调控提供了技术和理论参考。

（3）以结构相对规则的 CS/HA 大分子聚集体为主体模块，以适量小分子聚集体为客体缠结促进剂，通过客体渗透主体的方式，形成具有高缠结的

CS/HA 水凝胶，韧性提高 3.9 倍，应力提高 2.6 倍，断裂伸长率提高 1.9 倍。静置分层 CS/HA 水凝胶前驱液，实现了大分子 CS/HA 聚集体和悬浊液中的小分子聚集体的分离重排，消除多余小分子对 Block 后续结晶过程的干扰，也为后续水凝胶的组装提供更多的交联位点；去离子水洗涤 CS/HA Block 可显著改变其机械性能，洗涤进一步去除了 Block 中的小分子聚集体，提升了 CS/HA Block 的规整程度，使其孔径结构更加分明；设计不同的 Adhesive 进一步提升了 CS/HA 水凝胶的韧性，证明了 Adhesive 调节链缠结的作用。主客体渗透交联策略可显著改善天然聚合物复合材料的结构性能，为天然高聚物的稳定有序组装提供新的见解。

5.2 展望

本文以 CS 基水凝胶网络为平台，采用多种策略调控水凝胶的结构，如 AA 介导调控、基质比例调节、NaOH 溶液浸泡和主客体渗透交联等，提高了水凝胶的多种性能，丰富了水凝胶结构性能调控方法，提供了水凝胶网络结构性能调控理论参考，有利于推动水凝胶的实际应用。但由于时间等因素限制，论文还有以下局限和不足，为此，未来将从以下几个方面进一步开展工作：

（1）利用其它天然聚合物大分子水凝胶平台验证 AA 的桥接、pH 调控和运输载体作用，NaOH 溶液浸泡对结构的影响方向，主客体渗透交联增韧策略，提高研究结果的普适性。

（2）对更适合用于碱性伤口敷料的 CS/ β -Ala/ γ -PGA 水凝胶开展组织学实验，获取更贴近应用场景的数据，推动研究成果应用转化。

（3）在主客体渗透交联提高 CS/HA 水凝胶韧性的工作中，采用去离子水洗涤 Block 提高其规整度时，洗涤条件未优化，这是未来工作中不可忽视的一个重要调控因素。

（4）开发基于主客体渗透交联策略制备的 CS/HA 高韧水凝胶的实际应用，如用作皮肤贴在疤痕抑制上的应用。

参考文献

- [1] DALY A C, RILEY L, SEGURA T, etc. Hydrogel microparticles for biomedical applications [J]. Nature Reviews Materials, 2020, 5(1): 20-43.
- [2] HU W, WANG Z, XIAO Y, etc. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels [J]. Biomaterials science, 2019, 7(3): 843-855.
- [3] VARAPRASAD K, RAGHAVENDRA G M, JAYARAMUDU T, etc. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications [J]. Materials Science and Engineering: C, 2017, 79: 958-971.
- [4] SHARMA S, TIWARI S. A review on biomacromolecular hydrogel classification and its applications [J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 162: 737-747.
- [5] MADDUMA-BANDARAGE U S, MADIHALLY S V. Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2021, 138(19): 50376.
- [6] BASU A, KUNDURU K R, DOPPALAPUDI S, etc. Poly (lactic acid) based hydrogels [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016, 107: 192-205.
- [7] BARREA L, DI SOMMA C, MUSCOGIURI G, etc. Nutrition, inflammation and liver-spleen axis [J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2018, 58(18): 3141-3158.
- [8] FENG X, LUO Y, LI F, etc. Development of natural-drugs-based low-molecular-weight supramolecular gels [J]. Gels, 2021, 7(3): 105.
- [9] CHEN Y, YAN X, ZHAO J, etc. Preparation of the chitosan/poly(glutamic acid)/alginate polyelectrolyte complexing hydrogel and study on its drug releasing property [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 191: 8-16.
- [10] RICHBOURG N, WANCURA M, GILCHRIST A, etc. Precise control of synthetic hydrogel network structure via linear, independent synthesis-swelling relationships [J]. Science advances, 2021, 7(7): eabe3245.
- [11] 黄霁珺, 项拓, 梁刚强, 等. 交联壳聚糖水凝胶的分子结构差异与其控释性能关系 [J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 224-232.
- [12] 魏晓奇. 淀粉基水凝胶的结构性能与尿素缓释的关系研究与构建 [D]. 华南理工大学, 2020.

-
- [13] LI Q, DUNN E, GRANDMAISON E, etc. Applications and properties of chitosan [M]. Applications of Chitan and Chitosan. CRC Press. 2020: 3-29.
 - [14] SAHEED I O, DA OH W, SUA H F B M. Chitosan modifications for adsorption of pollutants—A review [J]. Journal of hazardous materials, 2021, 408: 124889.
 - [15] KUMAR M R, MUZZARELLI R A, MUZZARELLI C, etc. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives [J]. Chemical reviews, 2004, 104(12): 6017-6084.
 - [16] WANG W, XUE C, MAO X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 4532-4546.
 - [17] PILLAI C K, PAUL W, SHARMA C P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation [J]. Progress in polymer science, 2009, 34(7): 641-678.
 - [18] NAGPAL K, SINGH S K, MISHRA D N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2010, 58(11): 1423-1430.
 - [19] WANG J J, ZENG Z W, XIAO R Z, etc. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers [J]. International journal of nanomedicine, 2011: 765-774.
 - [20] MADIHALLY S V, MATTHEW H W. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering [J]. Biomaterials, 1999, 20(12): 1133-1142.
 - [21] RINAUDO M. Chitin and chitosan: Properties and applications [J]. Progress in polymer science, 2006, 31(7): 603-632.
 - [22] NECHITA P. Applications of chitosan in wastewater treatment [J]. Biological activities and application of marine polysaccharides, 2017, 1: 209-228.
 - [23] EL HADRAMI A, ADAM L R, EL HADRAMI I, etc. Chitosan in plant protection [J]. Marine drugs, 2010, 8(4): 968-987.
 - [24] NARAYANAN A, DHAMODHARAN R. Super water-absorbing new material from chitosan, EDTA and urea [J]. Carbohydrate polymers, 2015, 134: 337-343.
 - [25] RAVISHANKAR K, DHAMODHARAN R. Advances in chitosan-based hydrogels: Evolution from covalently crosslinked systems to ionotropically crosslinked superabsorbents [J]. Reactive and Functional Polymers, 2020, 149:104517.

-
- [26] NAJAR I, DAS S. Poly-glutamic acid (PGA)-Structure, synthesis, genomic organization and its application: A Review [J]. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2015, 6(6): 2258.
 - [27] ZHANG Z, HE P, CAI D, etc. Genetic and metabolic engineering for poly- γ -glutamic acid production: current progress, challenges, and prospects [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(11): 208.
 - [28] TSAO C T, CHANG C H, LIN Y Y, etc. Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan- γ -poly(glutamic acid) polyelectrolyte complex hydrogel [J]. Carbohydrate Research, 2010, 345(12): 1774-1780.
 - [29] HO G H, HO T I, HSIEH K H, etc. γ -Polyglutamic acid produced by *Bacillus Subtilis* (Natto): Structural characteristics, chemical properties and biological functionalities [J]. Journal of the Chinese Chemical Society, 2006, 53(6): 1363-1384.
 - [30] GARANTZIOTIS S, SAVANI R C. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context [J]. Matrix Biology, 2019, 78: 1-10.
 - [31] VALACHOVÁ K, VOLPI N, STERN R, etc. Hyaluronan in medical practice [J]. Current medicinal chemistry, 2016, 23(31): 3607-3617.
 - [32] NAKKA K, HACHMER S, MOKHTARI Z, etc. JMJD3 activated hyaluronan synthesis drives muscle regeneration in an inflammatory environment [J]. Science, 2022, 377(6606): 666-669.
 - [33] DICKER K T, GURSKI L A, PRADHAN-BHATT S, etc. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions [J]. Acta biomaterialia, 2014, 10(4): 1558-1570.
 - [34] ZHU W, MOW V C, ROSENBERG L C, etc. Determination of kinetic changes of aggrecan-hyaluronan interactions in solution from its rheological properties [J]. Journal of biomechanics, 1994, 27(5): 571-579.
 - [35] YANG X, WANG B, PENG D, etc. Hyaluronic Acid-Based Injectable Hydrogels for Wound Dressing and Localized Tumor Therapy: A Review [J]. Advanced NanoBiomed Research, 2022, 2(12): 2200124.
 - [36] LUO Z, WANG Y, LI J, etc. Tailoring Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications [J]. Advanced Functional Materials, 2023, 33(49):2306554.

-
- [37] ZHANG S, DONG J, PAN R, etc. Structures, properties, and bioengineering applications of alginates and hyaluronic acid [J]. *Polymers*, 2023, 15(9): 2149.
 - [38] ROY S, SINGHA N R. Polymeric nanocomposite membranes for next generation pervaporation process: Strategies, challenges and future prospects [J]. *Membranes*, 2017, 7(3): 53.
 - [39] DINU M V, PŘÁDNÝ M, DRĂGAN E S, etc. Morphological and swelling properties of porous hydrogels based on poly (hydroxyethyl methacrylate) and chitosan modulated by ice-templating process and porogen leaching [J]. *Journal of Polymer Research*, 2013, 20: 1-10.
 - [40] DRAGAN E S, DINU M V. Advances in porous chitosan-based composite hydrogels: Synthesis and applications [J]. *Reactive and Functional Polymers*, 2020, 146: 104372.
 - [41] DRAGAN E S, GHIORGHITA C A, DINU M V, etc. Fabrication of self-antibacterial chitosan/oxidized starch polyelectrolyte complex sponges for controlled delivery of curcumin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 135: 108147.
 - [42] ADNAN N, GHAZALI S, JAMARI S. Utilization of NaHCO₃ as foam additive in synthesis of superporous hydrogels [J]. *Materials Today: Proceedings*, 2019, 17: 995-1000.
 - [43] MEMIC A, COLOMBANI T, EGGERMONT L J, etc. Latest advances in cryogel technology for biomedical applications [J]. *Advanced Therapeutics*, 2019, 2(4): 1800114.
 - [44] DINU M, LAZAR M, GHIORGHITA C-A, etc. Multicomponent hydrogels for controlled drug release and delivery [J]. 2023.
 - [45] OKAY O. Polymeric Cryogels: Macroporous gels with remarkable properties [M]. Springer, 2014.
 - [46] JOUKHDAR H, SEIFERT A, JÜNGST T, etc. Ice templating soft matter: fundamental principles and fabrication approaches to tailor pore structure and morphology and their biomedical applications [J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(34): 2100091.
 - [47] OZMEN M M, DINU M V, OKAY O. Preparation of macroporous poly (acrylamide) hydrogels in DMSO/water mixture at subzero temperatures [J]. *Polymer Bulletin*, 2008, 60: 169-180.
 - [48] DINU M V, GRADINARU A C, LAZAR M M, etc. Physically cross-linked chitosan/dextrin cryogels entrapping *Thymus vulgaris* essential oil with enhanced mechanical, antioxidant and antifungal properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 184: 898-908.

-
- [49] SHIEKH P A, ANDRABI S M, SINGH A, etc. Designing cryogels through cryostructuring of polymeric matrices for biomedical applications [J]. *European Polymer Journal*, 2021, 144: 110234.
 - [50] SAQIB M N, KHALED B, LIU F, etc. Hydrogel beads for designing future foods: Structures, mechanisms, applications, and challenges [J]. *Food Hydrocolloids for Health*, 2022, 2: 100073.
 - [51] SUN J, CHENG Y, ZHANG T, etc. Microencapsulation of carvacrol by complex coacervation of walnut meal protein isolate and gum Arabic: Preparation, characterization and bio-functional activity [J]. *Foods*, 2022, 11(21): 3382.
 - [52] TIMILSENA Y P, AKANBI T O, KHALID N, etc. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2019, 121: 1276-1286.
 - [53] GHOSH T, DAS T, PURWAR R. Review of electrospun hydrogel nanofiber system: Synthesis, Properties and Applications [J]. *Polymer Engineering & Science*, 2021, 61(7): 1887-1911.
 - [54] KHOSHNOUDI-NIA S, SHARIF N, JAFARI S M. Loading of phenolic compounds into electrospun nanofibers and electrosprayed nanoparticles [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 95: 59-74.
 - [55] GHIORGHITA C-A, PLATON I-V, LAZAR M M, etc. Trends in polysaccharide-based hydrogels and their role in enhancing the bioavailability and bioactivity of phytochemicals [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2024, 334:122033.
 - [56] FU J, YANG F, GUO Z. The chitosan hydrogels: from structure to function [J]. *New Journal of Chemistry*, 2018, 42(21): 17162-17180.
 - [57] EBHODAGHE S O. A short review on chitosan and gelatin-based hydrogel composite polymers for wound healing [J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2022, 33(12): 1595-1622.
 - [58] LIN Y, XU J, DONG Y, etc. Drug-free and non-crosslinked chitosan/hyaluronic acid hybrid hydrogel for synergistic healing of infected diabetic wounds [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 314: 120962.

-
- [59] BARROSO N, GUARESTI O, PÉREZ-ÁLVAREZ L, etc. Self-healable hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte complex hydrogels and multilayers [J]. *European Polymer Journal*, 2019, 120: 109268.
 - [60] MAIZ-FERNÁNDEZ S, PÉREZ-ÁLVAREZ L, SILVÁN U, etc. Dynamic and self-healable chitosan/hyaluronic acid-based in situ-forming hydrogels [J]. *Gels*, 2022, 8(8): 477.
 - [61] LIU Y, HU J, XIAO Z, etc. Dynamic behavior of tough polyelectrolyte complex hydrogels from chitosan and sodium hyaluronate [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 288: 119403.
 - [62] CROISIER F, JÉRÔME C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering [J]. *European polymer journal*, 2013, 49(4): 780-792.
 - [63] LIU L, GAO Q, LU X, etc. In situ forming hydrogels based on chitosan for drug delivery and tissue regeneration [J]. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 11(6): 673-683.
 - [64] LIU L, TANG X, WANG Y, etc. Smart gelation of chitosan solution in the presence of NaHCO₃ for injectable drug delivery system [J]. *International journal of pharmaceutics*, 2011, 414(1-2): 6-15.
 - [65] CHENITE A, CHAPUT C, WANG D, etc. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(21): 2155-2161.
 - [66] SUPPER S, ANTON N, SEIDEL N, etc. Rheological study of chitosan/polyol-phosphate systems: Influence of the polyol part on the thermo-induced gelation mechanism [J]. *Langmuir*, 2013, 29(32): 10229-10237.
 - [67] CHUNG H J, PARK T G. Self-assembled and nanostructured hydrogels for drug delivery and tissue engineering [J]. *Nano Today*, 2009, 4(5): 429-437.
 - [68] WEBSTER A, HALLING M D, GRANT D M. Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative [J]. *Carbohydrate Research*, 2007, 342(9): 1189-1201.
 - [69] KACZMAREK B, SIONKOWSKA A, KOZLOWSKA J, etc. New composite materials prepared by calcium phosphate precipitation in chitosan/collagen/hyaluronic acid sponge cross-linked by EDC/NHS [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2018, 107: 247-253.
 - [70] GUIBAL E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review [J]. *Separation and purification technology*, 2004, 38(1): 43-74.

-
- [71] NIE J, WANG Z, HU Q. Chitosan Hydrogel Structure Modulated by Metal Ions [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1):36005.
 - [72] RASOOL A, ATA S, ISLAM A. Stimuli responsive biopolymer (chitosan) based blend hydrogels for wound healing application [J]. Carbohydrate polymers, 2019, 203: 423-429.
 - [73] LIU Y, LIN S-H, CHUANG W-T, etc. Biomimetic strain-stiffening in chitosan self-healing hydrogels [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2022, 14(14): 16032-16046.
 - [74] JI D, KIM J. Recent strategies for strengthening and stiffening tough hydrogels [J]. Advanced NanoBiomed Research, 2021, 1(8): 2100026.
 - [75] CHEN Q, CHEN H, ZHU L, etc. Fundamentals of double network hydrogels [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2015, 3(18): 3654-3676.
 - [76] LAS HERAS K, IGARTUA M, SANTOS-VIZCAINO E, etc. Chronic wounds: Current status, available strategies and emerging therapeutic solutions [J]. Journal of controlled release, 2020, 328: 532-550.
 - [77] LEAPER D, ASSADIAN O, EDMISTON C E. Approach to chronic wound infections [J]. British Journal of Dermatology, 2015, 173(2): 351-358.
 - [78] SUN B K, SIPRASHVILI Z, KHAVARI P A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds [J]. Science, 2014, 346(6212): 941-945.
 - [79] LIANG Y, HE J, GUO B. Functional hydrogels as wound dressing to enhance wound healing [J]. ACS nano, 2021, 15(8): 12687-12722.
 - [80] WANG S Y, KIM H, KWAK G, etc. Development of biocompatible HA hydrogels embedded with a new synthetic peptide promoting cellular migration for advanced wound care management [J]. Advanced science, 2018, 5(11): 1800852.
 - [81] ZHAO W, LI Y, ZHANG X, etc. Photo-responsive supramolecular hyaluronic acid hydrogels for accelerated wound healing [J]. Journal of controlled release, 2020, 323: 24-35.
 - [82] JIANG T, WANG T, LI T, etc. Enhanced transdermal drug delivery by transfersome-embedded oligopeptide hydrogel for topical chemotherapy of melanoma [J]. ACS nano, 2018, 12(10): 9693-9701.
 - [83] DENG Z, YU R, GUO B. Stimuli-responsive conductive hydrogels: design, properties, and applications [J]. Materials Chemistry Frontiers, 2021, 5(5): 2092-2123.

-
- [84] ONO S, IMAI R, IDA Y, etc. Increased wound pH as an indicator of local wound infection in second degree burns [J]. *Burns*, 2015, 41(4): 820-824.
- [85] LIU X, DOU G, LI Z, etc. Hybrid biomaterial initiates refractory wound healing via inducing transiently heightened inflammatory responses [J]. *Advanced Science*, 2022, 9(21): 2105650.
- [86] LIU H, WANG C, LI C, etc. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing [J]. *RSC advances*, 2018, 8(14): 7533-7549.
- [87] MARTINS A F, PEREIRA A G, FAJARDO A R, etc. Characterization of polyelectrolytes complexes based on N, N, N-trimethyl chitosan/heparin prepared at different pH conditions [J]. *Carbohydrate polymers*, 2011, 86(3): 1266-1272.
- [88] WANG J, CHEN X-Y, ZHAO Y, etc. pH-switchable antimicrobial nanofiber networks of hydrogel eradicate biofilm and rescue stalled healing in chronic wounds [J]. *Acs Nano*, 2019, 13(10): 11686-11697.
- [89] MITRA R N, DAS D, ROY S, etc. Structure and properties of low molecular weight amphiphilic peptide hydrogelators [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, 111(51): 14107-14113.
- [90] KAMATA H, AKAGI Y, KAYASUGA-KARIYA Y, etc. “Nonswellable” hydrogel without mechanical hysteresis [J]. *Science*, 2014, 343(6173): 873-875.
- [91] REN D-X, CHEN P-C, ZHENG P, etc. pH/redox dual response nanoparticles with poly- γ -glutamic acid for enhanced intracellular drug delivery [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, 577: 412-420.
- [92] CHAKRABORTY P, GAZIT E. Amino Acid Based Self-assembled Nanostructures: Complex Structures from Remarkably Simple Building Blocks [J]. *ChemNanoMat*, 2018, 4(8): 730-740.
- [93] KAMPF G, KAMPF G. Benzalkonium chloride [J]. *Antiseptic Stewardship: Biocide Resistance and Clinical Implications*, 2018: 259-370.
- [94] AUTHORITY E F S, CARRASCO CABRERA L, MEDINA PASTOR P. The 2020 European Union report on pesticide residues in food [J]. *EFSA Journal*, 2022, 20(3): e07215.
- [95] 王梦梦. 基于多重非共价交联的 CS/ γ -PGA 骨架网络水凝胶结构与性能的调控研究 [D]. 安徽工程大学, 2022.

-
- [96] SABERIAN M, SEYEDJAFARI E, ZARGAR S J, etc. Fabrication and characterization of alginate/chitosan hydrogel combined with honey and aloe vera for wound dressing applications [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2021, 138(47): 51398.
 - [97] SUN L, SUN J, CHEN L, etc. Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material [J]. *Carbohydrate polymers*, 2017, 163: 81-91.
 - [98] LV Q, WU M, SHEN Y. Enhanced swelling ratio and water retention capacity for novel super-absorbent hydrogel [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, 583: 123972.
 - [99] MAITRA J, SHUKLA V K. Cross-linking in hydrogels-a review [J]. *Am J Polym Sci*, 2014, 4(2): 25-31.
 - [100] LIN P, ZHANG T, WANG X, etc. Freezing molecular orientation under stretch for high mechanical strength but anisotropic hydrogels [J]. *Small*, 2016, 12(32): 4386-4392.
 - [101] GONG J P. Why are double network hydrogels so tough? [J]. *Soft Matter*, 2010, 6(12): 2583-2590.
 - [102] WANG Y, ZHAO J, LIU C, etc. Influence of γ -aminobutyric acid on gelling properties of heat-induced whey protein gels [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 94: 287-293.
 - [103] JAYARAMUDU T, KO H-U, KIM H C, etc. Swelling behavior of polyacrylamide–cellulose nanocrystal hydrogels: swelling kinetics, temperature, and pH effects [J]. *Materials*, 2019, 12(13): 2080.
 - [104] GALLEGOS A, WU J. Charge regulation of natural amino acids in aqueous solutions [J]. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2020, 65(12): 5630-5642.
 - [105] PALANTÖKEN S, BETHKE K, ZIVANOVIC V, etc. Cellulose hydrogels physically crosslinked by glycine: Synthesis, characterization, thermal and mechanical properties [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2020, 137(7): 48380.
 - [106] CHEN M, SHEN Y, XU L, etc. Highly efficient and rapid adsorption of methylene blue dye onto vinyl hybrid silica nano-cross-linked nanocomposite hydrogel [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2021, 613: 126050.

-
- [107] TANAN W, PANICHPAKDEE J, SAENG SUWAN S. Novel biodegradable hydrogel based on natural polymers: Synthesis, characterization, swelling/reswelling and biodegradability [J]. *European Polymer Journal*, 2019, 112: 678-687.
 - [108] XU H, MATYSIAK S. Effect of pH on chitosan hydrogel polymer network structure [J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(53): 7373-7376.
 - [109] DE S K, ALURU N, JOHNSON B, etc. Equilibrium swelling and kinetics of pH-responsive hydrogels: Models, experiments, and simulations [J]. *Journal of Microelectromechanical systems*, 2002, 11(5): 544-555.
 - [110] TSAO C T, CHANG C H, LIN Y Y, etc. Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan- γ -poly (glutamic acid) polyelectrolyte complex hydrogel [J]. *Carbohydrate Research*, 2010, 345(12): 1774-1780.
 - [111] TSAO C T, CHANG C H, LIN Y Y, etc. Evaluation of chitosan/ γ -poly (glutamic acid) polyelectrolyte complex for wound dressing materials [J]. *Carbohydrate polymers*, 2011, 84(2): 812-819.
 - [112] YU Z, LIU W, HUO P. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of poly (γ -glutamic acid)/chitosan blends [J]. *Polymer Bulletin*, 2019, 76: 2163-2178.
 - [113] XU Q, CHEN C, ROSSWURM K, etc. A facile route to prepare cellulose-based films [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 149: 274-281.
 - [114] KIM U-J, LEE Y R, KANG T H, etc. Protein adsorption of dialdehyde cellulose-crosslinked chitosan with high amino group contents [J]. *Carbohydrate polymers*, 2017, 163: 34-42.
 - [115] WANG M, ZHANG E, YU C, etc. Dendrobium officinale enzyme changing the structure and behaviors of chitosan/ γ -poly (glutamic acid) hydrogel for potential skin care [J]. *Polymers*, 2022, 14(10): 2070.
 - [116] CHEN Y, YAN X, ZHAO J, etc. Preparation of the chitosan/poly (glutamic acid)/alginate polyelectrolyte complexing hydrogel and study on its drug releasing property [J]. *Carbohydrate polymers*, 2018, 191: 8-16.
 - [117] GEORGE J, RAMANA K, BAWA A. Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 48(1): 50-57.

-
- [118] GEA S, REYNOLDS C T, ROOHPOUR N, etc. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process [J]. *Bioresource technology*, 2011, 102(19): 9105-9110.
 - [119] CAI B, ZHONG T, CHEN P, etc. Preparation, characterization and in vitro release study of drug-loaded sodium carboxy-methylcellulose/chitosan composite sponge [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0206275.
 - [120] IKHUORIA E, OMOROGBE S, AGBONLAHOR O, etc. Spectral analysis of the chemical structure of carboxymethylated cellulose produced by green synthesis from coir fibre [J]. *Ciência & Tecnologia dos Materiais*, 2017, 29(2): 55-62.
 - [121] CORAZZARI I, NISTICÒ R, TURCI F, etc. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2015, 112: 1-9.
 - [122] SKRZYPCZAK D, MIKULA K, KOSSIŃSKA N, etc. Biodegradable hydrogel materials for water storage in agriculture-review of recent research [J]. *Desalination and Water Treatment*, 2020, 194: 324-332.
 - [123] HISADA M, TOMIZAWA Y, KAWASE Y. Removal kinetics of cationic azo-dye from aqueous solution by poly- γ -glutamic acid biosorbent: Contributions of adsorption and complexation/precipitation to Basic Orange 2 removal [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2019, 7(3): 103157.
 - [124] DING L, HUANG Y, CAI X, etc. Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 208: 133-141.
 - [125] WANG Y, LIU M, ZHAO L, etc. Interactions of γ -aminobutyric acid and whey proteins/caseins during fortified milk production [J]. *RSC advances*, 2015, 5(111): 91235-91245.
 - [126] EHRENHOFER A, ELSTNER M, WALLMERSPERGER T. Normalization of hydrogel swelling behavior for sensoric and actuatoric applications [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 255: 1343-1353.
 - [127] CHANG C, HE M, ZHOU J, etc. Swelling behaviors of pH-and salt-responsive cellulose-based hydrogels [J]. *Macromolecules*, 2011, 44(6): 1642-1648.

-
- [128] CACCAVO D, CASCONI S, LAMBERTI G, etc. Modeling the drug release from hydrogel-based matrices [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2015, 12(2): 474-483.
 - [129] PEPPAS N A, SAHLIN J J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation [J]. *International journal of pharmaceutics*, 1989, 57(2): 169-172.
 - [130] HARLAND R S, DUBERNET C, BENOÎT J-P, etc. A model of dissolution-controlled, diffusional drug release from non-swellable polymeric microspheres [J]. *Journal of Controlled Release*, 1988, 7(3): 207-215.
 - [131] RIBEIRO A M, FIGUEIRAS A, VEIGA F. Improvements in topical ocular drug delivery systems: hydrogels and contact lenses [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2015, 18(5): 683.
 - [132] AXPE IZA E, ORIVE ARROYO G, FRANZE K, etc. Towards brain-tissue-like biomaterials [J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3423.
 - [133] ENGLISH M A, SOENKSEN L R, GAYET R V, etc. Programmable CRISPR-responsive smart materials [J]. *Science*, 2019, 365(6455): 780-785.
 - [134] LI J, XING R, BAI S, etc. Recent advances of self-assembling peptide-based hydrogels for biomedical applications [J]. *Soft Matter*, 2019, 15(8): 1704-1715.
 - [135] MACDOUGALL L J, ANSETH K. Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly (ethylene glycol)-co-poly (α -hydroxy acid) diacrylate macromers [Z]. ACS Publications. 2020: 2295-2298
 - [136] CHANG A K T, FRIAS R R, ALVAREZ L V, etc. Comparative antibacterial activity of commercial chitosan and chitosan extracted from *Auricularia* sp [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019, 17: 189-195.
 - [137] LIN Y, XU J, DONG Y, etc. Drug-free and non-crosslinked chitosan/hyaluronic acid hybrid hydrogel for synergistic healing of infected diabetic wounds [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 314:120962.
 - [138] CHUYSINUAN P, THANYACHAROEN T, THONGCHAI K, etc. Preparation of chitosan/hydrolyzed collagen/hyaluronic acid based hydrogel composite with caffeic acid addition [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 1937-1943.

-
- [139] CHEN S-Q, MELDRUM O W, LIAO Q, etc. The influence of alkaline treatment on the mechanical and structural properties of bacterial cellulose [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 271:118431.
 - [140] SHAH I, JING L, FEI Z M, etc. A Review on Chemical Modification by using Sodium Hydroxide (NaOH) to Investigate the Mechanical Properties of Sisal, Coir and Hemp Fiber Reinforced Concrete Composites [J]. *Journal of Natural Fibers*, 2021, 19(13): 5133-5151.
 - [141] ZUO Z, ZHANG Y, ZHOU L, etc. Mechanical behaviors and probabilistic multiphase network model of polyvinyl alcohol hydrogel after being immersed in sodium hydroxide solution [J]. *RSC Advances*, 2021, 11(19): 11468-11480.
 - [142] GUTTMAN S, SAPIR Z, SCHULTZ M, etc. How faceted liquid droplets grow tails [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(3): 493-496.
 - [143] DENKOV N, TCHOLAKOVA S, LESOV I, etc. Self-shaping of oil droplets via the formation of intermediate rotator phases upon cooling [J]. *Nature*, 2015, 528(7582): 392-395.
 - [144] GIBAUD T, BARRY E, ZAKHARY M J, etc. Reconfigurable self-assembly through chiral control of interfacial tension [J]. *Nature*, 2012, 481(7381): 348-351.
 - [145] MATYJASZEWSKI K. Architecturally complex polymers with controlled heterogeneity [J]. *Science*, 2011, 333(6046): 1104-1105.
 - [146] SONG S, ZHOU H, MANNERS I, etc. Block copolymer self-assembly: Polydisperse corona-forming blocks leading to uniform morphologies [J]. *Chem*, 2021, 7(10): 2800-2821.
 - [147] KIM J, ZHANG G, SHI M, etc. Fracture, fatigue, and friction of polymers in which entanglements greatly outnumber cross-links [J]. *Science*, 2021, 374(6564): 212-216.
 - [148] LI H, LIANG X, SUN W, etc. Immunological evaluation of a recombinant vaccine delivered with an analogous hyaluronic acid chitosan nanoparticle-hydrogel against *Toxoplasma gondii* in mice [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 179: 106092.
 - [149] HEO E, HWANG W, KOO H B, etc. Precise and selective macroscopic assembly of a dual lock-and-key structured hydrogel [J]. *Materials Horizons*, 2024, 11(2): 428-441.
 - [150] GAO N, XIE W, XU L, etc. Characterization of a chlorine resistant and hydrophilic TiO₂/calcium alginate hydrogel filtration membrane used for protein purification maintaining protein structure [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253: 126367.

- [151] QIAN Q, YU S, LI C Y. Tuning Poly (l-lactic acid) Crystallization Pathways via Evaporative Crystallization on a Water Surface [J]. *Macromolecules*, 2023, 56(21): 8747-8753.
- [152] LI B, KAPPL M, HAN L, etc. Goosebumps-Inspired Microgel Patterns with Switchable Adhesion and Friction [J]. *Small*, 2019, 15(35): 1902376.
- [153] BONYI E, ONUK Z, CONSTANCE E, etc. Metal-assisted and microwave-accelerated evaporative crystallization: An approach to rapid crystallization of biomolecules [J]. *CrystEngComm*, 2016, 18(30): 5600-5610.
- [154] KONONOVA S V, KRUCHININA E V, PETROVA V A, etc. Pervaporation membranes of a simplex type with polyelectrolyte layers of chitosan and sodium hyaluronate [J]. *Carbohydrate polymers*, 2019, 209: 10-19.
- [155] LIN Y-J, CHUANG W-T, HSU S-H. Gelation mechanism and structural dynamics of chitosan self-healing hydrogels by in situ SAXS and coherent X-ray scattering [J]. *ACS Macro Letters*, 2019, 8(11): 1449-1455.
- [156] CASTRO C, GARGALLO L, LEIVA A, etc. Interactions in blends containing chitosan with functionalized polymers [J]. *Journal of applied polymer science*, 2005, 97(5): 1953-1960.
- [157] 温辉高, 易嘉琰, 肖瑶, 等. 壳聚糖季铵盐/氧化魔芋葡甘露聚糖水凝胶的制备及性能 [J]. *武汉大学学报 (理学版)*, 2017, 63(4): 305-311.
- [158] DO NASCIMENTO M H M, FERREIRA M, MALMONGE S M, etc. Evaluation of cell interaction with polymeric biomaterials based on hyaluronic acid and chitosan [J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2017, 28: 1-12.

在校期间发表论文、专利、获奖情况

论文情况:

- [1] **Hu Z**, Liu D, Wang M, etc. β -Alanine enhancing the crosslink of chitosan/poly-(γ -glutamic acid) hydrogel for a potential alkaline-adapted wound dressing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 231: 123157.
- [2] Liu D, Zang Y, **Hu Z**, etc. Synthesis of silicone hydrogel for soft contact lens (SCLs) and sustainable release of dexamethasone [J]. Reactive and Functional Polymers, 2023, 186: 105532.
- [3] Liu D, Han Z, **Hu Z**, etc. Comparative analysis of the transcriptome of *Bacillus subtilis natto* incubated in different substrates for nattokinase production[J]. Process biochemistry, 2023(Jun.):129.
- [4] Tong, J, Yu C, Wang Y, **Hu Z**, Han Z, Liu D, Li C, Nie G. Simultaneous use of two-step fermentation and in-situ addition of chitosan oligosaccharide improving bacterial cellulose pellicle in the synthesis and various behaviors [J]. Cellulose, 2024.

专利情况:

- [1] 聂光军, **胡紫微**, 岳文瑾, 等. 一种双菌株发酵功能风味型笋干及其制备方法[P], 发明专利, CN202210061574.4, 2023-09-19.

致谢

时光如流水般匆匆而过，三年的研究生生活如一幅多彩的画卷，在我心中翻飞、绽放，期间的各种经历历久弥新，让我思绪万千，在这段峥嵘岁月中，我不仅结识了良师益友，也体会到了科研精神与其重要意义。回首这段时光，心中充满感激。

衷心感谢我的导师聂光军教授，求学道路充满了未知与挑战，曾经有过很多疑问和迷茫，担心自己能否完成课题，是您通过不断的沟通与指导，帮我梳理问题，开拓思路，增强信心，我才能在科研的道路上坚定地前行，逐渐取得取得一些进展和成绩。您学识深邃、治学严谨，正是您的谆谆教诲和言传身教，让我不仅汲取了专业知识，更使我认识到自己的优缺点，受益匪浅，在人生的旅途上更好的磨砺成长。

研究的过程中也离不开很多其他老师的帮助，感谢在开题和中期检查中给予我切实意见的薛正莲老师、魏明老师、赵世光老师、王洲老师、戴清源老师、和李闯老师等，各位老师的指导让我的课题得以更加完善，同时感谢分析检测中心的黄晓东老师、尚老师、周鹏老师，在测试中给予的耐心帮助。

我也要感谢我的家人和朋友们，他们对我的支持让我在困难时刻坚持不懈。感谢父母给予我坚实的后盾，无尽的爱和支持，感谢弟弟的关心和理解，感谢王凯同学一直以来的陪伴与包容，感谢臧毅鹏师兄、梦梦师兄、锐锐师姐和丹丹师姐的带领和引导，感谢韩振兴同学在遇到问题时，一起讨论合作，感谢王雨师妹、童杰师弟、马若彤师妹和王汀师弟的共同协作和支持。

时光虽短，但这三年中，收获颇丰，这段珍贵的经历将永远铭刻在我心中，激励着我勇往直前，追逐理想的光辉。

最后，为作为论文评阅人的专家们献上真挚的感谢与祝福。

尚德敏学 唯实惟新

