

## Nghiên cứu điều chế hydrogel nhạy nhiệt trên cơ sở copolyme ghép chitosan-pluronic F127 định hướng ứng dụng trong chữa lành vết thương

Nguyễn Thị Bích Trâm<sup>1</sup>, Đặng Thị Lệ Hằng<sup>2</sup>, Lê Thị Thu Thắm<sup>1</sup>, Nguyễn Đại Hải<sup>2</sup>,  
Nguyễn Cửu Khoa<sup>2</sup>, Trần Ngọc Quyên<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Tự nhiên, Đại học Thủ Dầu Một, Thành phố Thủ Dầu Một, Tỉnh Bình Dương

<sup>2</sup>Phòng Vật liệu Hóa dược, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng,  
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đền Toà soạn 29-10-2015; Chấp nhận đăng 25-10-2016

### Abstract

In recent years, injectable chitosan-based hydrogels have been widely studied towards biomedical applications because of their potential performance in drug/cell delivery and tissue regeneration. In this study, a temperature-sensitive bio-hydrogel based on chitosan and pluronic was synthesized. The structure of copolymer was characterized by IR and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. The sol-gel phase transition behavior of hydrogel was rheology method. The *in vitro* experiments showed that, the solutions of chitosan-pluronic F127 were changed to gel stage to gel stage when the temperature increased from 25 °C to 40 °C. The result is a prerequisite for the interesting studies of this complex hydrogel.

**Keywords.** Thermosensitive hydrogel, chitosan, pluronic, wound healing.

### 1. MỞ ĐẦU

Thuật ngữ hydrogel đã được biết đến cách đây hơn 100 năm. Tuy nhiên, nghiên cứu ứng dụng hydrogel trong lĩnh vực sinh học thì chỉ mới được bắt đầu từ năm 1960 và kể từ đó đến nay rất nhiều các bài báo khoa học đã được công bố trên các tạp chí khoa học [1]. Trong những năm đầu thế kỷ XXI, các nhà khoa học tạo ra các loại “hydrogel thông minh” như là công cụ cho sự tiến bộ trong ngành khoa học và đặc biệt là mở ra con đường mới cho việc nghiên cứu “ hệ dẫn thuốc”. Hydrogel trên cơ sở các vật liệu thiên nhiên ngày càng nhận được sự quan tâm và có tiềm năng trong việc kiểm soát sự phân phối các hoạt chất mang tính sinh học trong lĩnh vực tái tạo mô, da hoặc xương, ... [2]. Một loạt các nghiên cứu về hydrogel trên cơ sở chitosan cho nhiều triển vọng không chỉ ứng dụng màng hydrogel trị bỏng, nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy hiệu quả vượt trội của chúng khi ứng dụng trong chữa lành vết thương, tái tạo sụn, thận nhân tạo, mang thuốc, ... [3-7]. Đặc biệt, trong cấu trúc hoá học, chitosan có các nhóm amin tích điện dương nên có thể tương tác với các nhóm tích điện âm, chính điều này hình thành đặc tính kết dính của nó [8, 9].

Pluronic là một copolyme không độc hại ưa

nước, được sử dụng rộng rãi như một tá dược để làm tăng tính ổn định và độ hòa tan của thuốc (được FDA công nhận). Do pluronic có cấu trúc PEO-PPO-PEO, trong đó PEO là phần ưa nước, PPO là phần kỵ nước nên khi gia tăng nhiệt độ PEO có xu hướng ngậm nước tạo thành một lớp vỏ bọc cho thành PPO bị mất nước dẫn đến sự hình thành hình cầu micelle [10]. Điều này giải thích cho khả năng hoạt động bề mặt của pluronic. Tuy nhiên, việc sử dụng pluronic mang thuốc dường như không được khả thi vì tính không ổn định của các micelle khi có sự thay đổi của nồng độ và nhiệt độ môi trường. Do đó, việc kết hợp chitosan và pluronic có thể sẽ giải quyết vấn đề hạn chế khi sử dụng pluronic riêng lẻ và khống chế quá trình nhả chậm của các hoạt chất có tác dụng chữa bệnh từ các hệ hydrogel nhạy nhiệt [11].

Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tổng hợp hệ hydrogel nhạy nhiệt trên cơ sở chitosan và pluronic F127 thông qua liên kết hóa học của nhóm amine trên chitosan và nhóm cacbonat của Pluronic-*p*-nitrophenyl cacbonat (sản phẩm hoạt hóa của Pluronic với *p*-nitrophenyl cloroformat (NPC)). Hệ pluronic-chitosan tạo thành được xác định thông qua phổ IR, NMR. Tính chất nhạy nhiệt của hệ được xác định dựa vào nhiệt độ khi tạo gel và nhiệt độ khi ở dạng dung dịch bằng

phương pháp đo lưu biến học.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Nguyên liệu

Chitosan (MW~300,000 g/mol, 95 % axetyl hoá), Pluronic (F127), (Mw: 12.500 g/mol, Acros Organics), *p*-nitrophenyl cloroformat (NPC) (Mw: 201,56 g/mol, BASF Corp), THF (Tetrahydrofuran), dimetylformamid (DMF), 3-Amino-1-propanol (99 %) (Acros Organic), dietyl ete (Acros Organic), HCl 0,1 %.

### 2.2. Quy trình tổng hợp

#### 2.2.1. Tổng hợp NPC-F127-NPC

15 gam pluronic F127 được làm khan và tan chảy ở nhiệt độ 80 °C. Sau đó 0,5 gam NPC (2,4 mmol) được thêm vào và khuấy liên tục 5 giờ trong môi trường khí N<sub>2</sub> ở nhiệt độ 80°C. Hạ nhiệt độ phản ứng, tiếp tục thêm 40 ml THF vào và khuấy ở nhiệt độ phòng. Dung dịch phản ứng được rửa 2 lần với diethyl ether lạnh. Lọc rửa kết tủa, loại bỏ dung môi thu được sản phẩm pluronic F127 hoạt hóa NPC có dạng bột màu trắng mịn (hình 1). Cấu trúc NPC-F127-NPC sau hoạt hóa được xác định bằng phổ IR và <sup>1</sup>H-NMR (NMR, Bruker AC 500 MHz spectrometer).

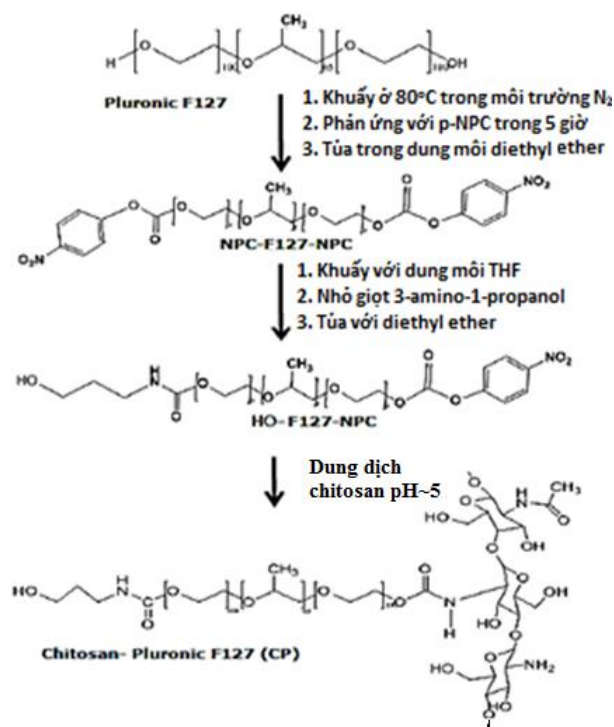
#### 2.2.2. Tổng hợp NPC-F127-OH

92 μl 3-amino-1-propanol (1,2 mmol) hòa tan trong 50 ml THF được cho từ từ vào dung dịch của 15 gam NPC-F127-NPC hòa tan trong 50 ml THF và khuấy đều trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung dịch sau phản ứng được kết tủa trong dietyl ete. Lọc rửa kết tủa, loại bỏ dung môi thu được sản phẩm có dạng bột màu trắng mịn. Cấu trúc NPC-F127-OH sau khi gắn với 3-amino-1-propanol được xác định bằng phổ <sup>1</sup>H-NMR.

#### 2.2.3. Tổng hợp copolymer ghép Chitosan- Pluronic F127

0,25 gam chitosan hoà tan trong môi trường dung dịch pH ~ 3, khuấy đều trong 24 giờ, sau đó điều chỉnh pH về 5,0. NPC-F127-OH (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 2,5, 3,75 và 5 gam) hoà tan trong nước cất ở nhiệt độ 4 °C. Dung dịch NPC- F127- OH được cho vào dung dịch chitosan lạnh và khuấy trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng sau đó được thấm tách 1 tuần với màng cellulose (14000 Mw cut-off) trong môi trường nước cất lạnh trước khi đông khô mẫu. Sản

phẩm chitosan-pluronic F127 thu được đem đo phổ <sup>1</sup>H-NMR để xác định cấu trúc, xác định phần trăm copolymer ghép.



Hình 1: Quy trình tổng hợp chitosan – pluronic F127 copolymer

#### 2.2.4. Đánh giá đặc tính nhạy nhiệt của copolymer

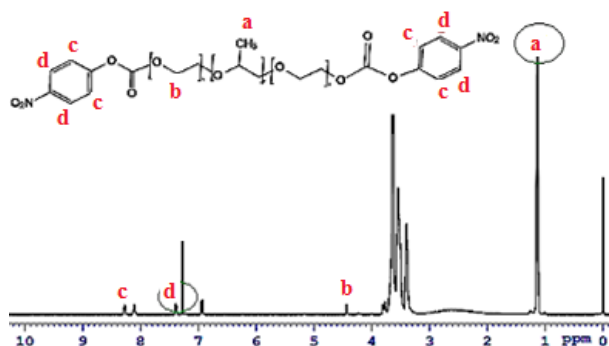
Copolymer ghép được hoà tan hoàn toàn trong nước cất (5, 8, 10, 12, 15 và 20 % w/v) để khảo sát đặc tính nhạy nhiệt. Đánh giá khả năng nhạy nhiệt của copolymer ghép bằng phương pháp khảo sát sự chảy của chitosan-pluronic F127 hydrogel ở các nhiệt độ: 4, 25, 30, 37 và 40 °C. Khả năng nhạy nhiệt của chitosan-pluronic F127 hydrogel khi có sự thay đổi của nhiệt độ được xác định thông qua phép đo lưu biến (HAAKE RheoStress 6000). Phương pháp đo biến dạng dao động theo nhiệt độ này được sử dụng có thể cho biết chính xác nhiệt độ chuyển pha của hydrogel.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Tổng hợp NPC-F127-NPC

Phổ <sup>1</sup>H NMR (hình 2) cho sự hình thành NPC-F127-NPC thông qua các pic cộng hưởng từ tại 1,08 ppm (-CH<sub>3</sub>, pic a), 3,62 ppm (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, thuộc chuỗi PPO), đặc biệt là tín hiệu tại 4,42 ppm (-CH<sub>2</sub>-O-NPC thuộc chuỗi PEO), tín hiệu này chỉ xuất hiện khi Pluronic được hoạt hóa. Ngoài ra các tín hiệu pic tại 7,38 ppm (-CH-, pic d) và 8,22 ppm (-CH-, pic c)

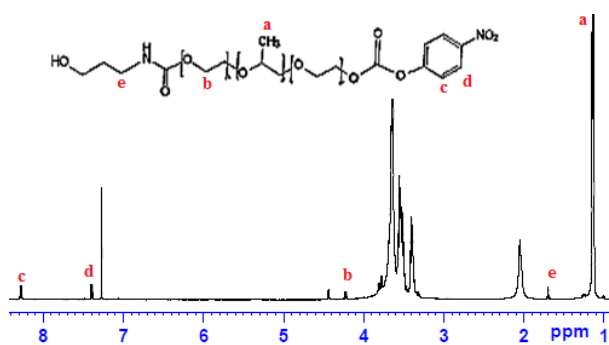
chứng tỏ sự có mặt của proton ở vị trí c, d trên vòng benzen của NPC. Kết quả tính độ hoạt hóa bằng phổ  $^1\text{H-NMR}$  cho thấy pluronic được hoạt hoá thành công ở hai đầu hydroxyl bằng NPC với hiệu suất là 97 % [12, 13].



Hình 2: Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của pluronic-NPC

### 3.2. Tổng hợp NPC-F127-OH

Để ngăn sự hình thành F127-dime do nhóm NPC rất dễ dàng bị thay thế, 1 lượng thích hợp 3-amino-1-propanol được sử dụng để thế một đầu NPC trên mạch của Pluronic đã được hoạt hoá. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  (hình 3) cho thấy sản phẩm thế một phần NPC của pluronic hoạt hóa. Ngoài những pic cộng hưởng đặc trưng cho các proton trên NPC-F127-NPC thì ta còn thấy có tín hiệu pic cộng hưởng ở vị trí 4.42 ppm thể hiện proton H (pic d) trên dây PEO ở vị trí liên kết với nhóm ( $-\text{CH}_2-\text{O-NPC}$ ) chuyển một phần đáng kể về 4.2 ppm (pic e).

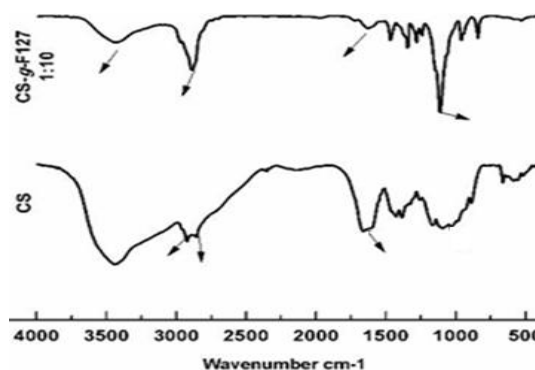


Hình 3: Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của NPC-F127-OH

### 3.3. Kết quả phản ứng tổng hợp chitosan-pluronic F127

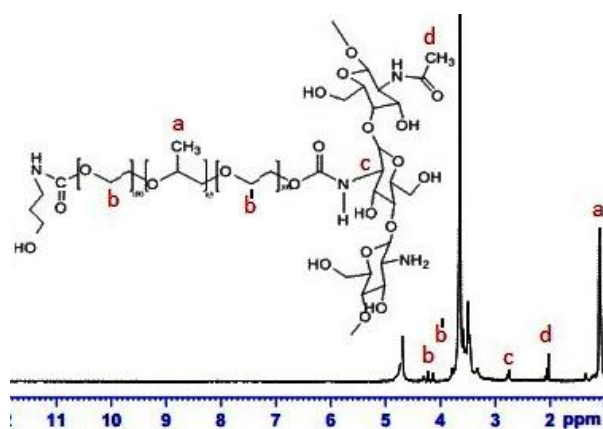
Phương pháp tổng hợp pluronic-chitosan dựa trên phản ứng tạo liên kết uretan giữa nhóm  $-\text{NH}_2$  ở chitosan và cacbonat của pluronic-NPC. Phổ FTIR của chitosan xuất hiện 2 pic thể hiện dao động nối ở số sóng  $1642$  và  $1664\text{ cm}^{-1}$  thể hiện cho nhóm amine và amide (hình 3). Các pic tại  $2884\text{ cm}^{-1}$ , và  $1112\text{ cm}^{-1}$  lần lượt thể hiện các nhóm  $\text{CH}_2$ , và  $\text{C-O}$ ,

điều này chứng tỏ sự hiện diện của pluronic có trong mẫu.



Hình 3: Phổ FTIR của chitosan (CS) và chitosan-pluronic F127

Cấu trúc của copolyme ghép chitosan-pluronic F127 được cũng được xác nhận qua pic của pluronic tại 1,0 và 3,4-3,7 ppm. Bên cạnh đó các methylene cuối mạch của pluronic cũng xuất hiện 2 pic ở 4,2-4,3 ppm thể hiện 2 nhóm thế khác nhau (trong đó có nhóm amine của chitosan) gắn vào pluronic. Nhóm axetyl của chitosan cũng thể hiện độ dịch chuyển hóa học ở 2 ppm (hình 4).



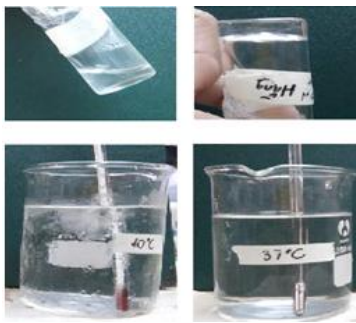
Hình 4: Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của copolyme ghép chitosan-pluronic F127

### 3.4. Khảo sát đặc tính nhạy nhiệt của copolyme ghép chitosan-pluronic F127

Như kết quả (bảng 1), mẫu F1 với tỷ lệ chitosan/pluronic F127 ở 1:1 không thể tạo gel. Khi tăng tỷ lệ pluronic F127 trong hệ copolyme lên, khả năng tạo gel được hình thành (hình 5).

Mẫu F7 và F8 có gel hình thành tốt ở nhiệt độ của cơ thể con người ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ ), tuy nhiên mẫu F8 với tỷ lệ chitosan/pluronic là 1:20 cho thấy gel có thể hình thành ở nhiệt độ  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Như vậy, nhiệt độ tạo gel càng thấp khi tăng hàm lượng pluronic F127.

Bên cạnh đó, khi giảm nhiệt độ, mẫu gel này cho thấy sự thoái biến bởi nhiệt. Đặc tính đảo ngược trạng thái sol-gel theo nhiệt độ môi trường của gel này cho thấy tiềm năng trong định hướng trong việc nghiên cứu lớp màng polyme sinh học. Kết quả khảo sát chuyển trạng thái sol-gel theo nồng độ và nhiệt độ (hình 6) cho thấy mẫu F7 có thể tạo gel ở nồng độ copolymer khá thấp (trên 10 %wt/v) tại khoảng nhiệt độ 32-37 °C.

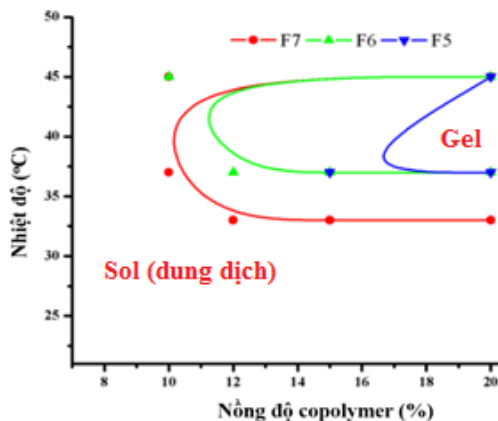


Hình 5: chuyển hóa sol-gel của dung dịch chitosan-pluronic ở 10 °C và 37 °C

Bảng 1: Khảo sát nhiệt độ tạo gel của copolymer ghép và khả năng chuyển đổi từ gel sang dung dịch và ngược lại

Mẫu	Chit.(g)	Plu.(g)	4 °C	25 °C	33 °C	37 °C	40 °C
F1	0,25	0,25	--	--	--	--	--
F2	0,25	0,5	--	--	--	-	+
F3	0,25	0,75	--	--	--	+	+
F4	0,25	1	--	--	--	+	+
F5	0,25	1,25	--	--	+	++	+
F6	0,25	2,5	--	--	++	++	++
F7	0,25	3,75	--	--	+++	+++	+++
F8	0,25	5	--	+	+++	+++	+++

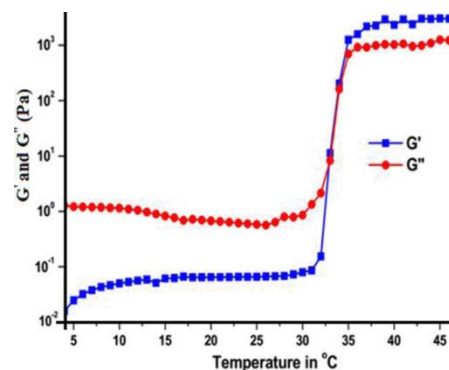
(---: không có khả năng tạo gel; +: tạo gel yếu; ++: tạo gel khá tuy nhiên gel chưa đặc lại hoàn toàn; +++: tạo gel tốt, gel đông đặc không chảy khi đặt nghiêng).



Hình 6: Đồ thị thể hiện sự tương quan của nồng độ copolymer (% wt/v) và nhiệt độ

Để có kết luận chính xác về quá trình chuyển

pha của chitosan-pluronic F127 hydrogel, phương pháp đo lưu biến học bằng cách đo sự thay đổi của modul tích  $G'$  và modul thoát  $G''$  theo nhiệt độ dao động từ 4 °C đến 45 °C với tần số và biên độ cố định. Như số liệu thể hiện ở hình 7, ở tần số không đổi là 1Hz, giá trị  $G'$  tăng dần, điều này có nghĩa là khi nhiệt độ tăng lên, các liên kết hydro trong mạch chitosan-pluronic F127 bị phá vỡ và hệ bị hỗn loạn cấu trúc mạch ngang hệ quả là giá trị  $G'$  tăng dần. Mặt khác giá trị  $G'$  tăng dần còn cho thấy độ cứng của vật liệu cũng tăng dần hay có thể nói hệ chitosan-pluronic F127 cho phép truyền ứng suất hiệu quả trong trạng thái nghỉ. Mặt khác giá trị  $G''$  trong khoảng nhiệt độ từ 4 °C đến dưới 30 °C có xu hướng giảm dần biểu thị cho sự chảy nhớt và độ linh động của phân tử giảm dần. Nguyên nhân có thể do mạch sườn chitosan làm giảm lớp hydrat hóa bao quanh các phân tử pluronic trong dung dịch nước, làm phân tán chúng và kết quả là độ tan của copolymer giảm dần [14]. Thêm vào đó, ở gần nhiệt độ tạo gel, giá trị  $G''$  tăng lên nhanh chóng, năng lượng của hệ thoát ra càng nhiều, sự chảy nhớt và độ linh động càng tăng nên các chuỗi kỵ nước trên pluronic F127 có xu hướng quy tụ lại tạo thành các mắt xích trong mạng lưới liên kết, tạo thành hệ hỗn loạn. Tại nhiệt độ gel được hình thành, năng lượng của hệ mất đi cao nhất tức là giá trị  $G''$  đã chạm ngưỡng tối đa. Ở nhiệt độ thấp giá trị  $G'' \gg G'$  dẫn đến góc  $45^\circ < \delta < 90^\circ$  hay giá trị  $\tan \delta \gg 1$ , điều này có nghĩa vật liệu đang ở trạng thái dung dịch đàn hồi nhớt hay ở trạng thái lỏng. Bắt đầu từ 30 °C, cả hai giá trị cùng đồng thời tăng và tại điểm 35 °C hai giá trị này gần như bằng nhau ( $G' = 501.992$  Pa và  $G'' = 502.125$ ). Như vậy, điểm gel của chitosan-pluronic F127 (nồng độ 15 %) được ghép ở tỷ lệ 1:15 được xác định tại 35 °C, điểm này rất thích hợp cho các ứng dụng y sinh sau này vì nhiệt độ cơ thể con người bình thường dao động khoảng 37 °C. Hệ hydrogel trên có thể phù hợp cho việc phát triển một hệ chất mang thuốc trong chữa lành vết thương ngoại-nội mô.



Hình 7: Đồ thị biểu diễn sự thay đổi của  $G'$  và  $G''$  trong dao động nhiệt với tần số và biên độ không đổi của mẫu F7 nồng độ 15 % wt/v

## 4. KẾT LUẬN

Copolymer chitosan-pluronic F127 nhạy nhiệt đã được tổng hợp thành công trên cơ sở copolymer pluronic nhạy nhiệt ghép vào chitosan và thông qua chất hoạt hóa NPC. Quá trình khảo sát nhiệt *in vitro* cho thấy hydrogel có thể chuyển từ trạng thái sol sang gel ở khoảng nhiệt từ 25-40 °C, đây là khoảng nhiệt độ lý tưởng cho các thử nghiệm để ứng dụng hydrogel trong lĩnh vực y sinh. Kết quả thử nghiệm bước đầu cho thấy hydrogel nhạy nhiệt trên cơ sở chitosan có thể ứng dụng trong xử lý vết thương bỏng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. A. Aimetti, A. J. Machen, and K. S. Anseth. *Poly (ethylene glycol) hydrogels formed by thiol-ene photopolymerization for enzyme-responsive protein delivery*, *Biomaterials*, **30(30)**, 6048-6054 (2009).
2. H. Y. Zhou, Y. P. Zhang, W. F. Zhang, X. G. Chen. *Biocompatibility and characteristics of injectable chitosan-based thermosensitive hydrogel for drug delivery*, *Carbohydrate polymers*, **83(4)**, 1643-1651 (2011).
3. R. Riva, H. Ragelle, A. des Rieux, N. Duhem, C. Jérôme, V. Pr at. *Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering*, in *Chitosan for biomaterials II*, Springer, 19-44 (2011).
4. M. Prabakaran. *Review paper: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery*, *Journal of Biomaterials Applications*, **23(1)**, 5-36 (2008).
5. A. Anitha, N. Deepa, K. Chennazhi, S. Nair, H. Tamura, and R. Jayakumar. *Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications*, *Carbohydrate Polymers*, **83(1)**, 66-73 (2011).
6. H. -R. Lin, K. Sung, and W. -J. Vong. *In situ gelling of alginate/pluronic solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine*, *Biomacromolecules*, **5(6)**, 2358-2365 (2004).
7. G. Di Colo, Y. Zambito, S. Buralassi, I. Nardini, and M. Saettone. *Effect of chitosan and of N-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin*, *International Journal of Pharmaceutics*, **273(1)**, 37-44 (2004).
8. L. Li, L. H. Lim, Q. Wang, and S. P. Jiang. *Thermoreversible micellization and gelation of a blend of pluronic polymers*, *Polymer*, **49(7)**, 1952-1960 (2008).
9. D. S. Jones, M. L. Bruschi, O. de Freitas, M. P. D. Gremi o, E. H. G. Lara, and G. P. Andrews. *Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity*, *International journal of pharmaceutics*, **372(1)**, 49-58 (2009).
10. J. H. Choi, Y. K. Joung, J. W. Bae, J. W. Choi, T. N. Quyen, and K. D. Park. *Self-assembled nanogel of pluronic-conjugated heparin as a versatile drug nanocarrier*, *Macromolecular research*, **19(2)**, 180-188 (2011).
11. A. El-Kamel. *In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate*, *International Journal of Pharmaceutics*, **241(1)**, 47-55 (2002).
12. D. H. Nguyen, N. Q. Tran, C. K. Nguyen. *Tetronic-grafted chitosan hydrogel as an injectable and biocompatible scaffold for biomedical applications*, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **24(14)**, 1636-1648 (2013).
13. N. Q. Tran, Y. K. Joung, E. Lih, K. M. Park, and K. D. Park. *RGD-conjugated in situ forming hydrogels as cell-adhesive injectable scaffolds*, *Macromolecular research*, **19(3)**, 300-306 (2011).
14. H. H. Winter and F. Chambon. *Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point*, *Journal of Rheology (1978-present)*, **30(2)**, 367-382 (1986).

Liên hệ: **Trần Ngọc Quynh**

Phòng Vật liệu Hóa dược, Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng  
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam  
Số 1, Mạc Đĩnh Chi, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh  
E-mail: tnquyen@iams.vast.vn.