

·研究简报·

通过麦克加成反应形成的三臂聚乙二醇丙烯酸酯 可注射水凝胶的制备与表征^{*}

侯丹丹¹ 郝彤² 叶霖¹ 张爱英¹ 王常勇² 冯增国^{1**}

(¹北京理工大学材料科学与技术学院 北京 100081) (²中国军事医学科学院组织工程实验室 北京 100850)

摘 要 通过麦克加成反应在磷酸盐缓冲溶液中制备出一种基于三臂聚乙二醇丙烯酸酯的能快速固化的可注射水凝胶. 采用倒置法测定了体系的凝胶化时间. 通过红外, DMA, 溶胀, 降解等一系列测试, 研究了该水凝胶的结构和物理化学性能. 观察到通过控制前体溶液的浓度, 可以控制凝胶的成胶时间和所形成凝胶的溶胀率. 同时表明该水凝胶具备可注射性和可降解性. 细胞毒性评价显示, 该水凝胶浸提液无毒性, 符合生物材料的安全评价标准. 由于麦克加成反应可在人体生理条件 (pH 7.4, 37℃) 下快速进行, 并且不需要任何引发剂、催化剂和有机溶剂, 因此该反应非常适合应用于生物医用材料领域.

关键词 麦克加成反应, 可注射水凝胶, 生物医用材料

麦克加成反应是亲核试剂与 α, β -不饱和羰基等化合物之间发生的加成反应. 以巯基作为亲核试剂的麦克加成反应可在人体生理温度与 pH 条件下快速进行, 具有高度的化学选择性并且不产生任何有害的毒副产物, 是医用可注射材料最为理想的化学交联反应^[1,2]. 近年来, 国外多个课题组都在尝试将麦克加成反应应用于生物医用材料领域, 如采用丙烯酸酯封端的低分子量聚乙二醇交联巯基修饰的天然高分子作为组织工程支架和药物释放载体等^[3-10], 得到了令人鼓舞的研究结果. 然而, 目前为止, 国内在这方面相关研究工作的报道并不多^[11].

鉴于麦克加成反应在可注射水凝胶制备中所具有的优势, 本文以分子量为 16900 的三臂聚乙二醇为研究对象, 经端基丙烯酸酯化后与二硫代苏糖醇进行麦克加成反应, 制备了一种可原位快速交联的可注射水凝胶. 采用倒置法测定了该水凝胶的凝胶化时间. 通过红外、动态粘弹谱等测试手段对制备的凝胶进行了表征, 同时研究了这种水凝胶在水中的溶胀和降解行为. 并采用 L-929 细胞, 通过细胞增殖度法测试了该水凝胶的细胞毒性. 结果显示, 麦克加成反应作为一种快速交联方法非常适合于医用可注射水凝胶材料的制备.

1 主要原料

1,1,1-三羟基乙烷为核的三臂聚乙二醇, 河南黎明化工研究院提供, $M_n = 16900$; 丙烯酰氯, Aldrich 公司; 二硫代苏糖醇 (DTT), Merck 公司. 二氯甲烷, 三乙胺, 甲苯, 无水乙醚均为分析纯, 北京化工厂. 氯化钙, 分析纯, 山东省环宇金属氢化物有限公司. pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 按文献^[11]自制.

2 三臂聚乙二醇丙烯酸酯的合成

在二氯甲烷和三乙胺中加入适量氯化钙浸泡过夜, 用前蒸馏. 量取一定量的甲苯加入聚乙二醇中, 在装有分水器的烧瓶中蒸去一部分甲苯, 以除去聚乙二醇中的水分. 待除水后的聚乙二醇甲苯混合物冷却至室温后, 再加入一定量的二氯甲烷至溶液澄清, 然后加入定量的三乙胺和丙烯酰氯, 用锡纸包住反应器以避免光. 反应在冰盐浴下连续反应 24 h. 整个反应过程在氮气保护下进行.

反应结束后将反应混合物通过三氧化二铝粉末过滤, 并用大量二氯甲烷冲洗, 然后将澄清滤液加入碳酸氢钠搅拌 1 h, 过滤除去碳酸氢钠, 旋转蒸发除去大部分二氯甲烷, 再加入大量无水乙醚沉淀、抽滤、得到白色粉末. 将得到的产物放入真空干燥箱中干燥至恒重, 收率为 97% 左右. ¹H-NMR ($CDCl_3$, δ): 3.600 (512H, PEG 主链上 H 原

^{*} 2007-10-15 收稿, 2007-12-14 修稿. 国家自然科学基金 (基金号 20374008 和 20674006) 资助项目; ^{**} 通讯联系人,

E-mail: sainfeng@bit.edu.cn

子), 4.318 (t, 2H, CH₂CH₂OCOCH = CH₂), 5.831 ~ 5.857 (dd, 1H, CH₂ = CHCOO), 6.157 ~ 6.184 (dd, 1H, CH₂ = CHCOO) and 6.403 ~ 6.446 (dd, 1H, CH₂ = CHCOO). 根据核磁计算出反应的取代度高达 99%^[9,10].

3 水凝胶的制备

将等量的三臂聚乙二醇丙烯酸酯前体用 PBS 分别配置成 100, 200, 300 和 400 g/L 的溶液. 再按照大分子单体中双键和巯基 1:1 的比例加入定量

的二硫代苏糖醇, 将反应混合物进行超声充分搅拌. 然后倒入带盖的玻璃瓶中, 置于 37℃ 水浴中. 通过倒置小瓶的方法测定凝胶化时间, 每 30 s 倒立小瓶一次. 当把样品置于恒温水浴中开始计时, 将直至反应混合物不再流动时所用的时间定义为凝胶化时间. 所有样品均在 20 min 内顺利成胶. 为使反应进行充分, 所有样品均在 37℃ 水浴中反应 30 min. 该水凝胶前体的制备和迈克尔加成反应过程如图 1 所示.

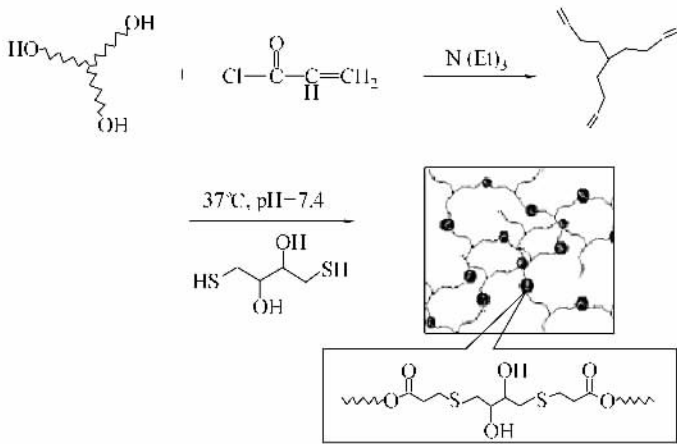


Fig. 1 Schematic illustration of Michael-type addition reaction crosslinking process

为了表述方便, 用 PD-*n* 表示通过迈克尔加成反应制备得到的水凝胶. 这里, P 代表三臂聚乙二醇丙烯酸酯, D 代表二硫代苏糖醇, *n* 代表前体溶液的浓度 (g/L), 分别为 100, 200, 300 和 400.

4 表征

IR 测试采用日本岛津公司的 IRPrestige-21 型红外光谱仪测的; ¹H-NMR 用 Bruker ARX 400 核磁仪测定, 以 CDCl₃ 作溶剂, 四甲基硅烷为内标; DMA 分析采用美国流变科学公司的 V 型粘弹谱仪, 采用压缩模式, 应变设为 1%, 恒温 37℃ 测定水凝胶溶胀平衡状态的粘弹谱.

5 凝胶质量分数测定

取一定质量的凝胶, 在 70℃ 时真空干燥 24 h 至恒重, 称重为 *m*₁, 然后用氯仿反复抽提一天, 再干燥至恒重, 称重为 *m*₂, 凝胶质量分数 (*W*_g) 用式 (1) 计.

$$W_g = (m_2/m_1) \times 100\% \tag{1}$$

6 溶胀实验

将上述抽提干燥后的凝胶, 放入缓冲溶液 PBS 中 (37℃), 每隔一定时间取出, 用滤纸仔细吸去表面水后称重为 *m*₃, 溶胀比 (*R*_w) 利用式 (2)

计算.

$$R_w = (m_3 - m_2)/m_2 \times 100\% \tag{2}$$

7 降解实验

将一定量干燥至恒重 (*m*₄) 的干胶放入装有缓冲溶液 PBS (pH = 7.4) 的锥形瓶中, 置于 37℃ 的恒温水浴摇床中, 每隔一定时间取出, 70℃ 真空干燥至恒重 (*m*₅), 则失重率 *W*_L 按式 (3) 计算.

$$W_L = (m_4 - m_5)/m_4 \times 100\% \tag{3}$$

8 细胞毒性实验

采用细胞增殖度法. 选取的细胞株为 L-929 细胞 (小鼠成纤维细胞). 培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基.

浸提液制备是按 10 mL/cm² 的标准, 将表面积为 1 cm² 的水凝胶干胶薄片分别加入不同体积的培养液中, 37℃ 下保持 24 h. 制备出 2 倍、1 倍、0.4 倍标准浓度的 3 种浸提液. 阳性对照组用实验室胶皮管, 按 10 mL/cm² 加入培养液制备浸提液.

在 96 孔培养板上接种 L-929 细胞, 细胞浓度 1 × 10³ 个/cm², 每孔加入 0.1 mL. 放入 5% CO₂、37℃ 孵箱内培养 24 h 后取出, 加入浸提液 0.1 mL/

孔,使孔内最终浓度分别达到 1 倍、0.5 倍、0.2 倍标准浓度,每种浓度的浸提液加 6 孔 空白对照组加入 0.1 mL 培养液,重新放入孵箱内,分别于 24、48、72、96 h 取出一块培养板,加入噻唑蓝(MTT),20 μ L/孔,4 h 后加 DMSO 150 μ L/孔,震荡 10 min,用酶标仪检测,记录吸光值(OD 值).按 6 级毒性分级法(详见表 1),计算相对增殖度(RGR)及毒级.

按以下公式计算相对增殖度:

$$\text{RGR} = (\text{各实验组吸光度平均值} / \text{空白对照组吸光度平均值}) \times 100\%$$

(4)

Table 1 The relationship between cell proliferation rate and cytotoxicity grade

Relative growth rate (%)	Cytotoxicity grade
≥ 100	0
75 ~ 99	1
50 ~ 74	2
25 ~ 49	3
1 ~ 24	4
0	5

9 水凝胶的制备

在 37℃ 水浴中,将三臂聚乙二醇丙烯酸酯的 PBS(pH = 7.4) 溶液与二硫代苏糖醇混合后,当初始浓度较高时,很快便发生凝胶化现象,生成无色透明的水凝胶,凝胶化前后的物态变化如图 2 所示.在较低的浓度范围内,体系初始粘度低,凝胶化时间较长,适于注射.本实验采用倒置玻璃瓶观察液体是否流动的方法,测定不同浓度的前体溶液所需要的凝胶化时间,具体结果列于表 2 中.随前体溶液浓度的增加,单位体积中可反应的基团数目增加,此时二硫代苏糖醇更容易通过迈克尔加成反应将双键连接起来,从而使成胶速度加快、凝胶化时间缩短,形成不溶不熔的三维凝胶网络结构.同时使凝胶的强度增加.

为了进一步了解丙烯酸酯中双键与巯基反应进行的程度,本文测定了不同浓度的三臂聚乙二醇丙烯酸酯溶液形成的水凝胶的凝胶分数,结果如表 2 所示.从中可以看出,溶液浓度对凝胶分数并没有很大的影响.这充分说明聚乙二醇丙烯酸酯与二硫代苏糖醇发生的加成反应不仅反应速率快,而且转化率也高.通过调整反应物浓度不仅可以起到改善凝胶力学强度的目的,而且也可方便地调节体系的“适用期”,是制备医用可注射水凝胶理想的化学交联反应.这些特点为通过改变前

体分子的结构研究可注射水凝胶材料结构与性能间关系创作了有利条件.

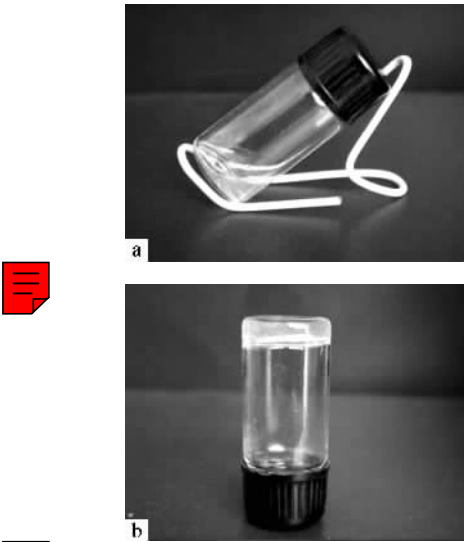


Fig. 2 The photograph of the precursor solution before (a) and after (b) crosslinking via Michael-type addition reaction with DTT

Table 2 Gelation time and gel fraction of different concentrations of precursor solutions

No.	P:D ^a (mol:mol)	Concentration of precursor solution (g/L)	Gelation time (min)	Gel fraction (%)
PD-400	1:1	400	3	92
PD-300	1:1	300	4.5	94
PD-200	1:1	200	9.5	96
PD-100	1:1	100	19	93

^a P:D is feed molar ratio of acrylate to thiol group.

10 水凝胶的 IR 分析

对所合成的上述三臂聚乙二醇丙烯酸酯及制备的水凝胶进行了红外光谱分析.图 3 是该三臂聚乙二醇丙烯酸酯粉末样品和 PD-200 干胶片的红外谱图.由于端基浓度过低,在预聚物中几乎观察不到不饱和 C—H 的伸缩振动峰.在 2882 cm^{-1} 处的宽峰属于亚甲基的对称和不对称伸缩振动,1734 cm^{-1} 处是羰基的特征吸收峰.1636 和 1112 cm^{-1} 处分别为双键 C=O 和 C—O 键的伸缩振动峰.由图可以看出,发生交联反应后,1636 cm^{-1} 处双键的伸缩振动消失,这是因为巯基进攻双键发生麦克加成反应双键打开生成了三维网络结构所致.

11 溶胀实验

图 4 是干胶在 PBS 中的溶胀动力学曲线.从图中可以看出,不同浓度的前体溶液所形成的水凝胶都能够快速达到溶胀平衡,并且所需时间也

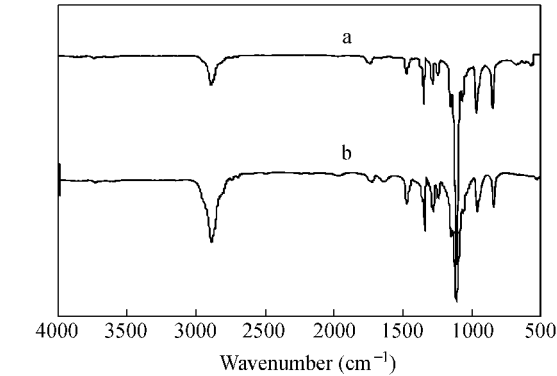


图 3 FTIR spectra of PD-200 (a) and end-acrylated 3-arm PEG (b)

大致相同. 浓度愈低,形成的凝胶在 PBS 中的平衡溶胀率越大.这是由于前体溶液的浓度越低,分子链在水中的形态越为舒展,形成的凝胶网络尺寸越大.而随着溶液浓度的增大,分子链更容易缠绕在一起,同时使交联点密度增加,导致溶胀率下降.因此,通过控制前体溶液的浓度可调节凝胶的溶胀率,进而控制网络尺寸,这样就有可能制备出与大分子药物尺寸相匹配、用于其控制释放的水凝胶.

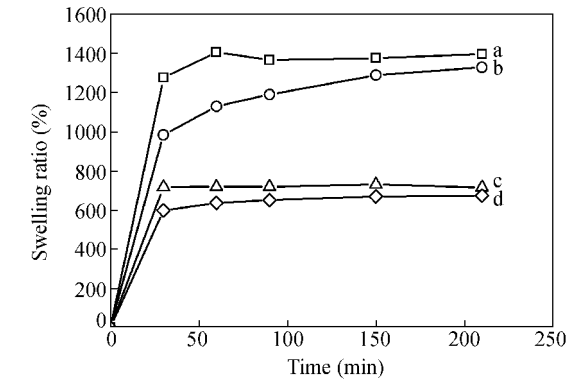


图 4 Swelling behaviors of gels made from different concentrations of precursor solutions with DDT
a) PD-100 ; b) PD-200 ; c) PD-300 ; d) PD-400

12 水凝胶的粘弹性

如图 5 所示,浓度为 200 g/L 的三臂聚乙二醇丙烯酸酯前体与 DTT 发生交联制成的水凝胶的储存模量不仅高,而且大于损耗模量,两者相差一个数量级.这说明在外力作用下,水凝胶主要发生弹性形变,较少发生摩擦损耗.结合前面的凝胶分

数测试结果,可以证明水凝胶有较完整的三维网络结构.从图中还可以看出,随着频率的变化,损耗模量基本没有变化,储存模量在大部分频率范

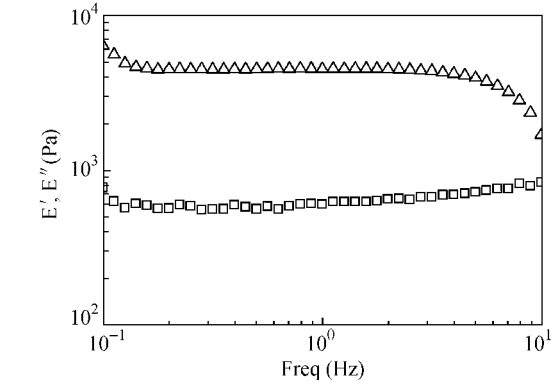


图 5 DMA spectra of hydrogel PD-200
△ E' Storage moduli ; □ E'' Loss moduli

13 降解实验

不同浓度前体溶液形成的水凝胶的体外降解情况如图 6 所示.水凝胶在开始阶段的降解速度很慢,随着时间的增加,由较小浓度前体溶液形成的水凝胶的降解速度明显加快,到 15 天时,PD-100 已降解了 80%,而 PD-400 才降解了约 30%.这是由于前体溶液的浓度越稀,所形成的水凝胶在 PBS 溶液中的平衡溶胀率越大,整个网络也更加舒展,水凝胶分子结构中的酯键在这种状态下也更易暴露出来而被水解,从而使得整个凝胶网络得以降解.

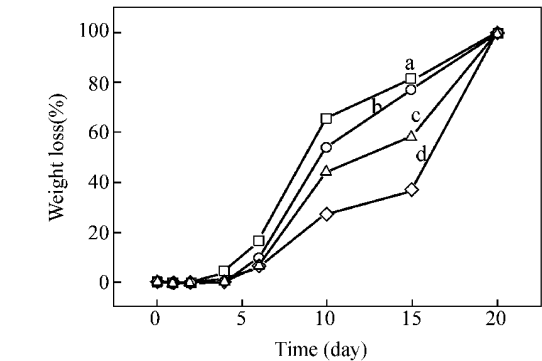


图 6 Degradation curves of hydrogels made from different concentrations of precursor solutions with DDT
a) PD-100 ; b) PD-200 ; c) PD-300 ; d) PD-400

但是到了 20 天时,所有凝胶网络均全部消失,降解产物溶解在 PBS 溶液中,这大概是由于酯键在一定时间内全部水解导致的.这充分说明,三臂聚乙二醇丙烯酸酯与 DTT 通过通过麦克加成反应所形成的水凝胶是可降解的.虽然聚乙

二醇本身是不可降解的,但当分子量不大于 3×10^4 时是可溶于水,并能够通过肾脏顺利地排除体外^[12].另从可能产生的降解产物分析来看,无论是三臂聚乙二醇,还是二硫代苏糖醇与丙烯酸的加成产物,都不带有电荷,将是生物相容的^[10].

14 水凝胶的细胞毒性实验

不同时间点的 MTT 检测数据见表 3,按公式(4)计算出的细胞相对增殖度及毒性评级结果见表 4.

Table 3 OD value of MTT of cells cultured in hydrogels at different times

Tested groups	OD value			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Blank	0.154	0.376	0.658	1.013
1 × Standard concentration	0.124	0.369	0.602	0.902
0.5 × Standard concentration	0.140	0.357	0.633	1.004
0.2 × Standard concentration	0.136	0.330	0.649	0.985
Control	0.006	0.003	0.004	0.004

Table 4 Relative growth rate of cells and cytotoxicity grade at different times

Tested group	24 h		48 h		72 h		96 h	
	RGR	Cytotoxicity grade	RGR	Cytotoxicity grade	RGR	Cytotoxicity grade	RGR	Cytotoxicity grade
1 × Standard concentration	80.5	1	98.1	1	91.5	1	89.0	1
0.5 × Standard concentration	90.9	1	94.9	1	96.2	1	99.1	1
0.2 × Standard concentration	88.3	1	87.8	1	98.6	1	94.6	1
Control	3.9	4	0.8	5	0.6	5	0.4	5

通过细胞增殖度计算及毒性评级结果可以看出,在 24、48、72 和 96 h 时间点检测由麦克加成所制备水凝胶材料的不同浓度的浸体液,其细胞毒性均为 1 级,符合生物材料的安全评价标准.

综上所述,通过与二硫代苏糖醇发生麦克加成反应,在人体生理温度和 pH 条件下制备了一种以三臂聚乙二醇丙烯酸酯为骨架的水凝胶.该

水凝胶可原位形成,反应过程温和、生物相容.通过控制前体溶液的浓度,可以控制凝胶的成胶时间,以及所形成的凝胶的溶胀率.测试结果显示,这种水凝胶具备可注射性和可降解性,可应用于多种不同注射体系,是一种大有希望的可注射生物医用材料.

REFERENCES

1 Mather B D,Viswanathan K,Miller K M,Long T E. Progress in Polymer Science,2006,31 487 ~ 531

2 Lutolf M P,Hubbell J A. Biomacromolecules,2003,4 713 ~ 722

3 Mironov V,Kasyanov V,Shu X Z,Eisenberg C,Eisenberg L,Gonda S,Trusk T,Markwald R R,Prestwich G D. Biomaterials,2005,26 7628 ~ 7635

4 Shu X Z,Liu Y C,Palumbo F S,Luo Y,Prestwich G D. Biomaterials,2004,25 1339 ~ 1348

5 Cai S S,Liu Y C,Shu X Z,Prestwich G D. Biomaterials,2005,26 6054 ~ 6067

6 Lutolf M P,Hubbell J A. Biomacromolecules,2003,4 713 ~ 722

7 Lutolf M P,Raeber G P,Zisch A H,Tirelli N,Hubbell J A. Adv Mater,2003,15 888 ~ 892

8 Metters A,Hubbell J A. Biomacromolecules,2005,6 290 ~ 301

9 Elbert D L,Pratt A B,Lutolf M P,Halstenberg S,Hubbell J A. J Controlled Release,2001,76 11 ~ 25

10 Wetering P,Metters A T,Schoenmakers R G,Hubbell J A. J Controlled Release,2005,102 619 ~ 627

11 Xu Ning(许宁),Wang Rui(王睿),Du Fusheng(杜福胜),Li Zichen(李子臣). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报),2007,28 1791 ~ 1795

12 Veronese F M,Pasut G. Drug Discovery Today,2005,10 1451 ~ 1458

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF INJECTABLE HYDROGELS
MADE *via* MICHAEL-TYPE ADDITION REACTION OF DITHIOTHREITOL
WITH 3-ARM ACRYLOYL END-CAPPED PEG

HOU Dandan¹, HAO Tong², YE Lin¹, ZHANG Aiyong¹, WANG Changyong², FENG Zengguo¹

(¹ School of Materials Science and Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

(² Laboratory for Tissue Engineering, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850)

Abstract A 3-Arm PEG ($M_n = 16900$) was first reacted with acryloyl chloride to give rise to an acryloyl end-capped macromer. Afterthen, a kind of injectable hydrogels was prepared *via* Michael-type addition reaction of dithiothreitol with this macromer. The gelation time was visually determined when the mixture did not flow by inverting the vials. The hydrogel structure was characterized by using FTIR and DMA analyses as well as swelling and degradation tests. It was found that robust and transparent hydrogels were quickly formed in situ with high gel fractions. DMA measurements confirmed that the hydrogels hold intact 3D network structure. The gelation time and swelling ratio are adjustable by changing the concentration of macromer solution in PBS due to the fact that the number of reactive acrylates in unit volume is increased with the concentration of precursor solution making them more easily to be linked with DTT to form hydrogel networks. The results revealed this kind of hydrogels is injectable and degradable. Meanwhile, MTT evaluation also showed the good cell-compatibility for this kind of hydrogel material. As Michael-type addition can be smoothly carried out at physiological temperature and pH in the absence of any sensitizer or catalyst, and the reactants involved are all biocompatible, the as-prepared hydrogels have the potential to be used in the area of biomedical materials.

Keywords Michael-type addition reaction, Hydrogels, Biomedical materials