

基于功能化聚磷酸酯嵌段共聚物的微凝胶和水凝胶的制备与表征^{*}

肖 燕 何金林 陶云锋 张明祖 胡 健 倪沛红^{**}

(苏州大学材料与化学化工学部 江苏省先进功能高分子材料设计及应用重点实验室 苏州 215123)

摘 要 首先利用聚乙二醇单甲醚(MePEG)作为引发剂前体,对含有炔基的环状磷酸酯单体 2-炔丁基-2-氧代-1,3,2-二氧磷杂环戊烷(BYP)进行开环聚合,制备两嵌段共聚物 MePEG-*b*-PBYP. 随后,采用巯基-炔(Thiol-yne)点击化学反应对 PBYP 的炔基进行修饰,分别获得侧链含氨基($-\text{NH}_2$)、羧基($-\text{COOH}$)和磺酸钠($-\text{SO}_3\text{Na}$)的聚磷酸酯嵌段共聚物,在水相中形成聚电解质. 通过 NMR 和 GPC 对产物的结构和组成进行表征. MTT 测试表明,两嵌段共聚物具有较好的生物相容性. 进一步将带有不同电荷的聚电解质溶液混合,利用静电作用制备微凝胶. 通过 DLS、TEM 及 SEM 等测试对聚合物的溶液行为及微凝胶的形貌进行表征. 为增强凝胶体系的物理交联作用,将 α -环糊精(α -CD)引入体系,诱导形成水凝胶. 利用 SEM 对水凝胶的形貌进行表征, XRD 分析水凝胶的包结络合作用,并利用流变仪测试水凝胶的凝胶化时间. 该水凝胶以其良好的生物相容性、生物可降解性和一定的机械强度等性能,有望作为可注射型凝胶材料,在药物控释和组织工程等领域具有潜在的应用.

关键词 聚磷酸酯, 巯基-炔点击化学反应, 微凝胶, 水凝胶, α -环糊精

水凝胶是一种具有三维网络结构的功能高分子材料,由于其良好的亲水性和生物相容性,在药物缓释载体、组织工程和酶的固定化载体等生物医学领域具有广泛的应用^[1,2]. 根据交联方式不同可分为化学交联水凝胶和物理交联水凝胶^[3]. 化学交联水凝胶一般是由分子链之间的化学键交联形成;而物理交联水凝胶则是通过分子链间的缠结,或者其他相互作用形成,例如:静电作用、氢键、配位键、疏水作用、超分子包结络合等^[4~8]. 另一方面,环糊精是一类内腔疏水、外缘亲水的环状低聚糖,可以作为主体分子包结多种客体分子,如金刚烷、偶氮苯、聚乙二醇等. 利用环糊精与客体分子的包结络合作用,可以制备各种物理交联的超分子水凝胶^[4,9~12].

点击化学反应由于具有反应条件温和、快速高效、选择性高、操作简单等优点,已被广泛应用于材料表面修饰、拓扑结构聚合物的合成、生物医用高分子等领域^[13~15]. 巯基-炔反应是点击化学反应的一种,它不易受氧气和水的影响,无需添加金属催化剂,可以直接在紫外光照或热引发下产

生自由基来引发反应,为高分子材料的后修饰与改性,尤其是涉及生物材料体系的反应提供了有力的手段,具有广阔的应用前景^[16~18].

聚磷酸酯是一类以磷酸酯键为主链的高分子,由于其分子结构与核酸和磷壁酸等相似,因此,它们具有良好的生物相容性,并在生理条件下可以发生降解,降解产物主要是磷酸盐和脂肪族二元醇,不会产生酸性降解产物,可避免体内局部组织发生炎症等副作用^[19]. 此外,由于其主链上的磷原子为正五价,可以很方便地设计合成含有多种功能基团的环状磷酸酯单体,进而获得具有不同结构和性能的聚磷酸酯,应用于药物释放、基因载体和组织工程等领域^[20~24]. 目前,已有一些文献报道,利用紫外光照或热引发自由基聚合的方法,构建基于聚磷酸酯的化学交联水凝胶^[25~28]. 本文将开环聚合和巯基-炔点击化学反应相结合,合成了具有不同功能基团的聚磷酸酯电解质,然后通过静电相互作用制备物理交联微凝胶,并进一步将 α -CD 引入体系,通过超分子包结络合作用诱导形成水凝胶,对其相关性能进行

^{*} 2013-05-15 收稿,2013-07-15 修稿;国家自然科学基金(基金号 21074078, 20974074)、江苏省基础研究计划(自然科学基金)滚动项目(基金号 BK2011045)、江苏高校优势学科建设工程项目(项目号 YX10900112)和江苏省 2012 年普通高校研究生科研创新计划项目(项目号 CXLX12_0789)资助.

^{**} 通讯作者, E-mail: phni@suda.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2014.13177

研究.

1 实验部分

1.1 原料与仪器

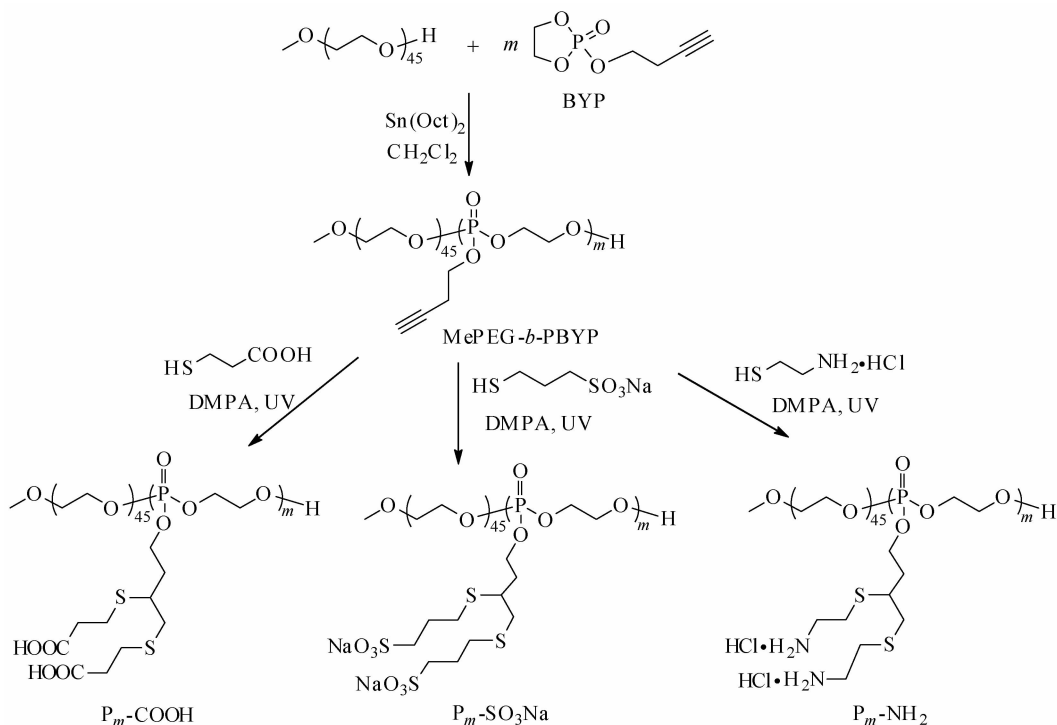
环状磷酸酯单体 2-炔丁基-2-氧代-1, 3, 2-二氧磷杂环戊烷 (BYP) 参照文献[29]方法合成. 辛酸亚锡 ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, 95%, Sigma) 经减压蒸馏后使用. 聚乙二醇单甲醚 (MePEG, M_n ca. 2000, Fluka) 通过与甲苯共沸除水, 密闭保存于氮气中备用. 安息香双甲醚 (DMPA, 98%, TCI)、3-巯基丙酸 (MPA, 99%, Acros)、半胱胺盐酸盐 (MEA, 98%, Acros)、3-巯基-1-丙烷磺酸钠 (MPS, 90%, Acros) 和 α -环糊精 (α -CD, 98%, TCI) 直接使用. 二氯甲烷 (CH_2Cl_2 , 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司) 通过 CaH_2 干燥后回流收集使用.

采用核磁共振波谱仪 (INOVA-400, Varian) 表征聚合物的化学结构, 以氘代氯仿 (CDCl_3) 或者重水 (D_2O) 为溶剂. 凝胶渗透色谱仪 (Waters 1515) 测试聚合物的分子量和分子量分布, 以单分散的线形聚苯乙烯为标样, 含有 0.05 mol L^{-1} LiBr 的 DMF 为流动相, 流速为 1.0 mL min^{-1} , 测定温度为 40°C . 激光粒度分析仪 (Zetasizer Nano ZS, Malvern) 测定聚合物及微凝胶溶液的粒径和

zeta 电位. 用酶标仪 (Bio-Rad 680) 测试细胞在 570 nm 处的吸光度, 通过 MTT 法评价聚合物的生物相容性. 采用透射电镜 (TECNAI G²20, FEI) 观察混合前聚合物在水溶液中的自组装粒子形态及混合后微凝胶的形貌, 扫描电镜 (S-4700, Hitachi) 观察微凝胶及水凝胶的外观形貌. X 射线衍射分析 (XRD) 在 X 射线多晶粉末衍射仪 (X'Pert Pro) 上进行, 采用 $\text{Cu K}\alpha$ 射线源 ($\lambda = 0.154 \text{ nm}$), 扫描角度范围为 $5^\circ \sim 30^\circ$, 提供的电流和电压分别是 40 mA 和 40 kV , 所有样品均经冷冻干燥后测试. 采用哈克流变仪 (RS 6000, Thermo) 测试凝胶的模量和凝胶化时间, 转子 (PP20H) 直径为 20 mm , 平行板间距 0.1 mm . 先在频率 1 Hz 和温度 25°C 下进行应力扫描 (范围 $0.01 \sim 250 \text{ Pa}$), 以确定线性黏弹区; 然后在频率 1 Hz 、应力 10 Pa 和温度 25°C 条件下进行时间扫描.

1.2 MePEG-*b*-PBYP 两嵌段共聚物的合成

以 $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ 为催化剂, MePEG 为大分子引发剂, 引发环状磷酸酯单体 BYP 进行开环聚合, 制备两嵌段共聚物 MePEG-*b*-PBYP, 合成路线如示意图 1 所示. 典型的合成方法是: 在氩气保护的氛围中, 取 MePEG (200 mg , 0.1 mmol) 和 BYP (70 mg , 4



Scheme 1 Synthesis routes of MePEG-*b*-PBYP diblock copolymer, and modified polyelectrolytes *via* thiol-yne reaction (designated as $\text{P}_m\text{-COOH}$, $\text{P}_m\text{-SO}_3\text{Na}$ and $\text{P}_m\text{-NH}_2$, respectively)

mmol)溶解在预先加有 6 mL 无水 CH_2Cl_2 的支管瓶中,加入 $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (20 mg,0.05 mmol),用氩气充放气 3 次,在 40 ℃ 油浴中反应 5 h. 反应结束后,将反应液浓缩,用冰乙醚/甲醇 (10/1, V/V) 混合溶剂沉淀 3 次,最后真空干燥 24 h,得到无色透明的黏稠状样品,转化率约为 88%.

1.3 嵌段共聚物的侧基功能化修饰

通过巯基-炔点击化学反应,在紫外光照下对 MePEG-*b*-PBYP 两嵌段共聚物进行侧基修饰. 将 MePEG-*b*-PBYP (1 mmol 炔基) 溶解在 3 mL DMF 中,加入适量巯基小分子试剂 (4 mmol 巯基) 和光引发剂 DMPA (0.3 mmol),待充分搅拌溶解完全之后,在 365 nm 紫外光照下反应 2 h. 反应结束后,将反应液装在透析袋中 (MWCO 5000) 用二次蒸馏水透析 12 h,经冷冻干燥得到无色黏稠状样品. 如示意图 1 所示,分别采用 3-巯基丙酸 (MPA)、3-巯基-1-丙烷磺酸钠 (MPS) 和半胱胺盐酸盐 (MEA) 对 PBYP 链段侧基中的炔基进行修饰,将 3 种修饰后的聚合物分别简写为 $\text{P}_m\text{-COOH}$ 、 $\text{P}_m\text{-SO}_3\text{Na}$ 和 $\text{P}_m\text{-NH}_2$. 其中,下标 *m* 表示 BYP 的结构单元数.

1.4 细胞毒性测试

将 L929 成纤维细胞置于含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 ℃ 和 5% CO_2 (相对湿度为 90%) 的培养箱中培养,定期更换培养液. 选择处在生长活跃期的细胞接种于每

孔含有 100 μL RPMI-1640 培养基的 96 孔板中,培养 24 h 后,将一系列不同浓度的聚合物水溶液加入到孔板中,继续培养 48 h. 接着加入 25 μL MTT 试剂 (5 mg mL^{-1} 的 PBS 溶液),继续培养 4 h 后,加入 100 μL DMSO 溶解紫色甲瓚结晶,用酶标仪 (Bio-Rad 680) 测量 570 nm 下对应的吸光度. 细胞存活率的计算方法为:细胞存活率 (cell viability) (%) = $[\text{A}]_{\text{test}}/[\text{A}]_{\text{control}} \times 100$, 其中, $[\text{A}]_{\text{test}}$ 为在聚合物存在下测得的吸光度, $[\text{A}]_{\text{control}}$ 为不含聚合物的情况下测得的吸光度. 每个样品测试 3 次,取其平均值.

1.5 微凝胶的制备

将 $\text{P}_m\text{-COOH}$ 、 $\text{P}_m\text{-SO}_3\text{Na}$ 和 $\text{P}_m\text{-NH}_2$ 分别配成 2 mg mL^{-1} 水溶液,磁力搅拌 12 h 使其完全溶解. 取等体积的 $\text{P}_m\text{-COOH}$ 和 $\text{P}_m\text{-NH}_2$ 溶液混合并搅拌 24 h 得到微凝胶 MGel-1;取等体积的 $\text{P}_m\text{-SO}_3\text{Na}$ 和 $\text{P}_m\text{-NH}_2$ 溶液混合并搅拌 24 h 得到微凝胶 MGel-2. 表 1 列出了微凝胶的组成.

1.6 α -CD 诱导的水凝胶的制备

参考文献 [30] 方法,将 20 mg $\text{P}_m\text{-NH}_2$ 和 20 mg $\text{P}_m\text{-COOH}$ 与 0.4 mL 超纯水混合,磁力搅拌 12 h,接着加入 60 mg α -CD,继续搅拌 12 h,得到水凝胶 HGel-1;取 20 mg $\text{P}_m\text{-NH}_2$ 和 20 mg $\text{P}_m\text{-SO}_3\text{Na}$,与上述方法相同,制备水凝胶 HGel-2. 表 1 列出 2 种水凝胶的组成.

Table 1 Composition and sample numbers of the microgels and hydrogels

Sample No.	$\text{P}_{57}\text{-COOH}$ (mg)	$\text{P}_{57}\text{-NH}_2$ (mg)	$\text{P}_{57}\text{-SO}_3\text{Na}$ (mg)	Milli-Q water (mL)	α -CD (mg)
MGel-1	10	10	—	5 + 5	—
MGel-2	—	10	10	5 + 5	—
Sample No.	$\text{P}_{38}\text{-COOH}$ (mg)	$\text{P}_{38}\text{-NH}_2$ (mg)	$\text{P}_{38}\text{-SO}_3\text{Na}$ (mg)	Milli-Q water (mL)	α -CD (mg)
HGel-1	20	20	—	0.4	60
HGel-2	—	20	20	0.4	60

2 结果与讨论

2.1 MePEG-*b*-PBYP 的合成与表征

以 MePEG 的羟基引发环状磷酸酯单体 BYP 开环聚合,得到两嵌段共聚物 MePEG-*b*-PBYP. 通过核磁共振波谱 (^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 及 ^{31}P -NMR) 对聚合物的结构进行表征. 图 1 (A) 是 MePEG-*b*-PBYP₅₇ 的 ^1H -NMR 谱图. 相应质子峰的归属如下: 在 $\delta = 3.62$ (peak e) 处为 MePEG 链段中的亚甲基质子 [$-\text{CH}_2\text{CH}_2-$] 的化学位移. 在 $\delta = 4.30$ (peak a)、 $\delta = 4.16$ (peak b)、 $\delta = 2.62$ (peak

c) 和 $\delta = 2.10$ (peak d) 分别归属为 PBYP 链段中的 [$-\text{P}(=\text{O})-\text{OCH}_2-\text{CH}_2\text{O}-$], [$-\text{P}(=\text{O})-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$], [$-\text{P}(=\text{O})-\text{OCH}_2-\text{C}\text{H}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$] 和 [$-\text{P}(=\text{O})-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$] 特征质子的化学位移. 通过公式 (1) 计算共聚物中 PBYP 链段的聚合度 (N_{BYP})

$$\frac{A_e}{A_{a+b}} = \frac{4 \times N_{\text{PEG}}}{6 \times N_{\text{BYP}}} \quad (1)$$

式中 A_e 和 A_{a+b} 分别为 $\delta = 3.62$ 和 $\delta = 4.1 \sim 4.4$ 的化学位移的峰面积积分值; N_{PEG} 表示 MePEG 中 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 的结构单元数,即 45. 通过公式

(2) 计算嵌段共聚物 MePEG-*b*-PBYP 的分子量 ($M_{n,NMR}$):

$$M_{n,NMR} = 2000 + M_{BYP} \times N_{BYP} \quad (2)$$

式中 2000 为 MePEG 的分子量, M_{BYP} 为 BYP 的分子量, N_{BYP} 为 PBYP 链段的聚合度. 图 1 (B) 和图 1 (C) 分别为 MePEG-*b*-PBYP₅₇ 的 ¹³C-NMR 和 ³¹P-NMR 谱图, 从图中都可以找到相应原子的化学位移. 此外, 与 BYP 单体的 ³¹P-NMR 谱图对比, 可以发现, 采用 MePEG 开环聚合 BYP, 形成的 PBYP 链段中磷原子的化学位移发生了明显变化, 由此进一步证实 MePEG 可以对 BYP 单体开环聚合, 获得两嵌段共聚物 MePEG-*b*-PBYP₅₇.

通过 GPC 测试得到两嵌段共聚物的分子量及分子量分布 (PDI), 如图 2 所示, MePEG-*b*-PBYP₅₇ 的 GPC 流出时间比 MePEG 的流出时间短, 说明成功合成了两嵌段共聚物. 表 2 列出了大分子引发剂 MePEG 及含有不同 PBYP 链段长度的两嵌段共聚物的分子量及分子量分布. 以单分散聚苯乙烯为标样, GPC 测试给出相对分子量值, 其分子量分布有一定参考价值. 所合成的 MePEG-*b*-PBYP 的 PDI 为 1.18 ~ 1.26, 证明这类开环聚合反应具有一定的可控性.

2.2 侧链功能化修饰的两嵌段共聚物的合成与表征

将两嵌段共聚物 MePEG-*b*-PBYP 分别与 3 种巯基小分子试剂 (3-巯基丙酸、3-巯基-1-丙烷磺酸钠和半胱胺盐酸盐) 混合, 在 365 nm 紫外光照下发生巯基-炔加成反应, 实现聚磷酸酯链段的功能化修饰. 用 ¹H-NMR 对功能化修饰的两嵌段共聚物进行表征, 如图 3 所示. 与图 1 (A) 对比, 可以观察到修饰后的产物 (P_m -COOH、 P_m -SO₃Na 和 P_m -NH₂) 在 $\delta = 2.62$ 处的化学位移峰消失. 这是由

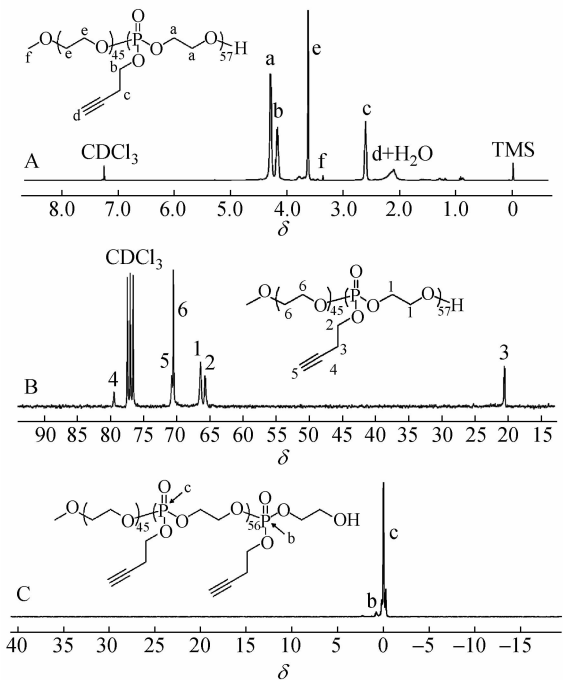


Fig. 1 NMR spectra of MePEG-*b*-PBYP₅₇ diblock copolymer: (A) ¹H-NMR, (B) ¹³C-NMR and (C) ³¹P-NMR (solvent: CDCl₃)

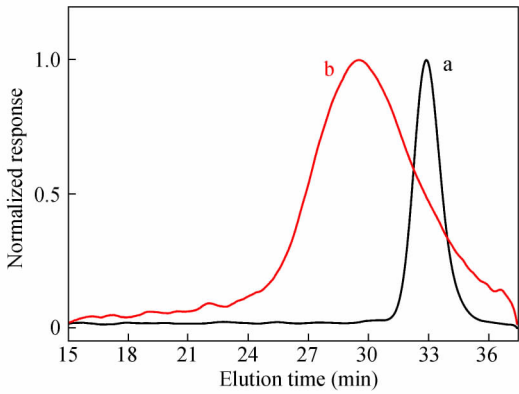


Fig. 2 GPC curves for (a) MePEG and (b) MePEG-*b*-PBYP₅₇

Table 2 The compositions, number-average molecular weights and molecular weight distributions of various polymers						
Samples ^a	$[M]_0/[I]_0$ ^b	Conv. (%)	$M_{n,theor.}$	$M_{n,NMR}$ ^c	$M_{n,GPC}$ ^d	PDI ^d
MePEG	—	—	2000	—	8300	1.03
MePEG- <i>b</i> -PBYP ₅₉	56	78	9700	12400	12900	1.23
MePEG- <i>b</i> -PBYP ₅₇	54	88	10400	12000	13900	1.26
MePEG- <i>b</i> -PBYP ₅₃	43	89	8700	11330	9400	1.19
MePEG- <i>b</i> -PBYP ₃₈	40	86	8100	8700	11700	1.25
MePEG- <i>b</i> -PBYP ₂₇	36	85	7400	6800	9400	1.18
MePEG- <i>b</i> -PBYP ₂₅	30	85	6500	6400	9900	1.20

^a The degrees of polymerization are calculated on the basis of ¹H-NMR analysis in CDCl₃ as described in Eq. (1); ^b $[M]_0$ and $[I]_0$ represent the initial molar concentrations of monomer BYP and the initiator MePEG, respectively; ^c Calculated on the basis of ¹H-NMR analysis in CDCl₃ as described in Eq. (2); ^d Determined by GPC in DMF with 0.05 mol L⁻¹ LiBr, using polystyrene as standard.

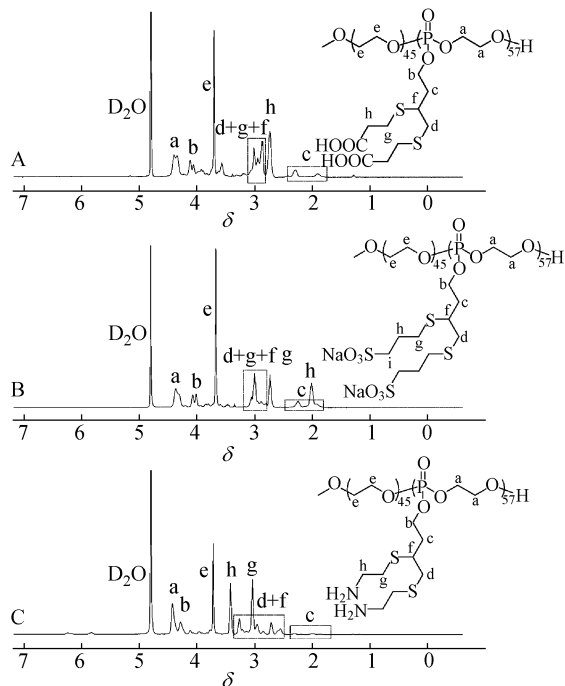


Fig. 3 ^1H -NMR spectra of functional diblock copolymers derived from MePEG-*b*-PBYP₅₇: (A) P₅₇-COOH, (B) P₅₇-SO₃Na and (C) P₅₇-NH₂ (solvent: D₂O)

于 PBYP 的炔基与巯基小分子发生反应后,改变了 $[-\text{P}(=\text{O})-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}]$, 中亚甲基质子 (peak c) 的化学环境而引起的. 此外, 从图 3 中可以观察到归属于与各种巯基试剂相关分子结构中的质子的化学位移.

2.3 细胞毒性测试

PEG 是经过美国食品和药品管理局 (FDA) 认证的一种具有低毒性并可以应用于生物医学领域的亲水性材料, 近年来的研究结果表明聚磷酸酯同样具有良好的生物相容性. 因此, 本文采用 MTT 法测定两嵌段共聚物和 3 种功能化修饰的聚合物对 L929 成纤维细胞的毒性. 如图 4 所示, 无论两嵌段共聚物 MePEG-*b*-PBYP₅₇, 还是功能化修饰的聚合物 (P_m-COOH、P_m-SO₃Na 和 P_m-NH₂) 对 L929 成纤维细胞的毒性均较小, 细胞的存活率保持在 90% 以上, 说明这些聚合物均具有较好的生物相容性.

2.4 聚合物的自组装行为研究

MePEG-*b*-PBYP 是一种两亲性嵌段共聚物, 在水溶液中可以自组装, 经功能化修饰的 3 种聚合物由于带有各种 pH 响应性基团, 因而在水溶液也可以发生自组装. 表 3 列出了各种聚合物自组装成胶束的粒径和 zeta 电位值, 从中可以看

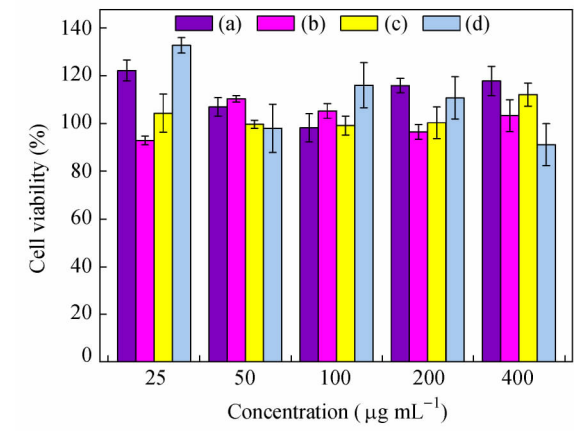


Fig. 4 Cell viability study against L929 fibroblast cells incubated with (a) MePEG-*b*-PBYP₅₇, and the functional diblock copolymers for (b) P₅₇-COOH, (c) P₅₇-SO₃Na and (d) P₅₇-NH₂

出它们的差别. 如图 5 (a) 所示, MePEG-*b*-PBYP₅₇ 在超纯水中形成粒径约 65 nm 的球形胶束; 经过巯基丙酸修饰之后, 得到 P₅₇-COOH, 其自组装的胶束形态如图 5 (b) 所示. 图 5 (c) 和图 5 (d) 分别是 P₅₇-SO₃Na 和 P₅₇-NH₂ 在超纯水中自组装形成的粒子形态. TEM 照片中胶束粒径明显小于相应的 DLS 测试结果. 这主要有两个原因, 首先由于 BYP 链段经过巯基丙酸修饰, 亲水性增加, 在水相中亲水链段呈现舒张状态, 因此粒径增大; 其次 TEM 测试是在样品干燥状态下进行的, 因此, 从 TEM 中看到的粒径结果比 DLS 测得的粒径小.

Table 3 DLS results of various particles in Milli-Q water			
Samples	D_z (nm)	Size PDI	Zeta-potential (mV)
MePEG- <i>b</i> -PBYP ₅₇	52 ± 1	0.209	-28.7 ± 0.9
P ₅₇ -COOH	158 ± 3	0.084	-49.8 ± 3.0
P ₅₇ -NH ₂	178 ± 0	0.277	3.7 ± 0.1
P ₅₇ -SO ₃ Na	170 ± 2	0.268	-42.5 ± 2.1
MGel-1	133 ± 4	0.234	-11.2 ± 0.3
MGel-2	122 ± 2	0.277	-9.6 ± 4.0

2.5 微凝胶的制备及性质研究

带有相反电荷的聚电解质之间可通过静电相互作用制备物理交联凝胶^[6]. 从表 3 中所列微凝胶 MGel-1 和 MGel-2 的粒径数据可以看出, 微凝胶的粒径均小于单独的聚合物在溶液中的胶束粒径, 这可能是由于带有正电荷的 P_m-NH₂ 与带负电荷 P_m-COOH 或 P_m-SO₃Na 链段之间产生静电相互作用, 使分子链相互吸引并靠近, 从而导致粒径变小. 图 6 (a) 和 6 (b) 为两种微凝胶粒子的 TEM 照片.

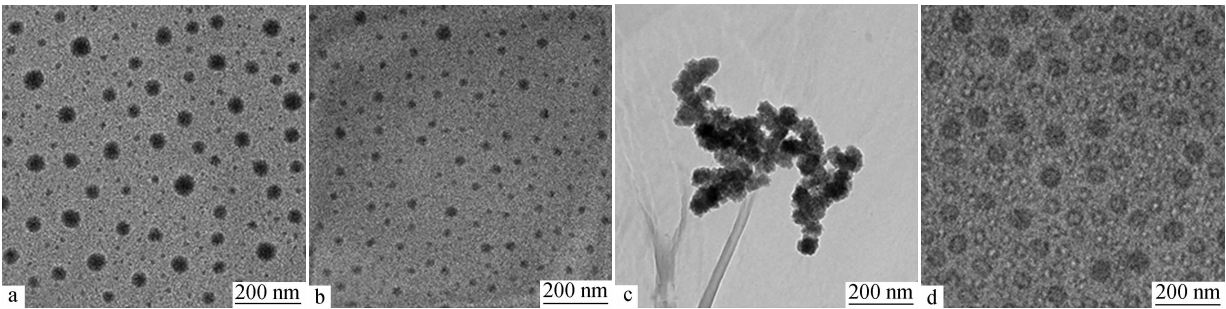


Fig. 5 TEM images of various particles self-assembled from (a) MePEG-*b*-PBYP₅₇, (b) P₅₇-COOH, (c) P₅₇-SO₃Na and (d) P₅₇-NH₂. The concentrations of polymers in Milli-Q water were 2 mg mL⁻¹.

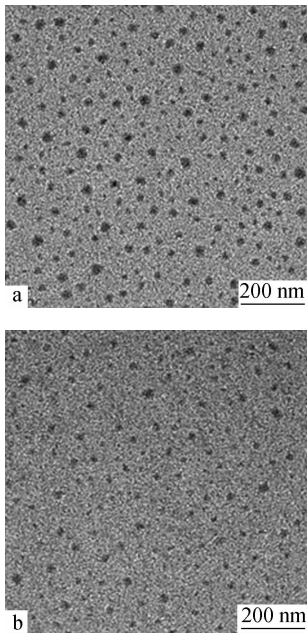


Fig. 6 TEM images of (a) MGel-1 and (b) MGel-2

采用 SEM 对微凝胶的微观形貌作进一步的分析,从图 7(a)可以观察到 P₅₇-NH₂与 P₅₇-COOH 通过静电作用复合形成微凝胶 MGel-1,呈球形粒子状.图 7(b)为 P₅₇-NH₂与 P₅₇-SO₃Na 形成的微凝胶 MGel-2.

2.6 α-CD 诱导的水凝胶的制备与表征

通过静电相互作用制备微凝胶,向体系中加入 α-CD 后,α-CD 与 MePEG 链段发生包络络合作用,增加体系的物理交联点,在静电相互作用与包络络合的协同作用下,诱导形成超分子水凝胶.图 8(a)为 SEM 观察到的 P₃₈-NH₂与 P₃₈-COOH 在 α-CD 诱导下所形成的水凝胶 HGel-1 经冷冻干燥处理后的表面形貌图.从图中可以观察到,水凝胶经过冷冻干燥后形成多孔结构.采用同样方法制备 P₃₈-NH₂与 P₃₈-SO₃Na 形成的水凝胶 HGel-2,如图 8(b)所示,同样可以观察到孔状结构.

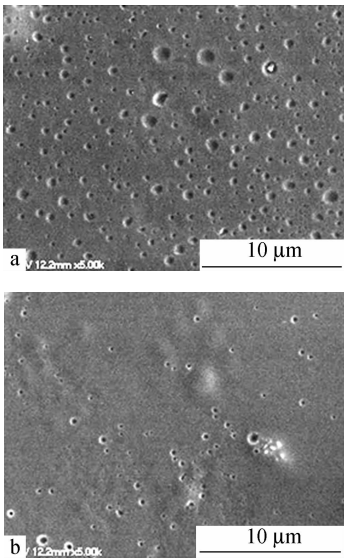


Fig. 7 SEM images of (a) MGel-1 and (b) MGel-2

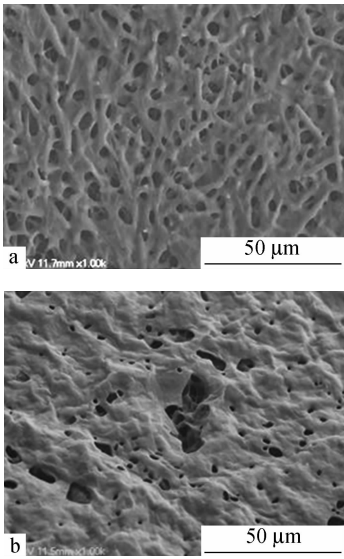


Fig. 8 SEM images of (a) HGel-1 and (b) HGel-2 after lyophilization

为了进一步验证凝胶中 α-CD 与 MePEG 发生了包络络合作用,通过 XRD 方法分别对冷冻干

干燥处理的水凝胶样品、 α -CD/MePEG 络合物、 α -CD 和 MePEG 进行测试. 如图 9 所示, (a) 和 (b) 分别为 α -CD 与 MePEG 的 X 射线衍射谱图, (c) 为 α -CD/MePEG 络合物的 X 射线衍射谱图. 其中, 在 $2\theta = 19.9^\circ$ 和 22.6° 处新出现的衍射峰是 α -CD 与 MePEG 的包结络合物的特征衍射峰. 根据文献报道, α -CD 与 PEG 形成的包结物为管状结构^[30-32]. 图 9 (d) 和 9 (e) 分别为 HGel-1 和 HGel-2 样品的 X 射线衍射谱图, 二者均在 $2\theta = 19.6^\circ$ 和 22.4° 处出现 2 个衍射峰, 这与 α -CD 和 MePEG 所形成包合物的衍射峰极为相似, 说明水凝胶中的确存在包结络合作用. 根据以上分析, 可以对微凝胶和水凝胶形成的机理作出推断: 带相反电荷的聚电解质链段之间发生静电相互作用形成微凝胶; 在加入 α -CD 后, 可与 MePEG 链段产生包结络合作用, 增加了体系的物理交联度, 诱导形成超分子水凝胶, 如示意图 2 所示.

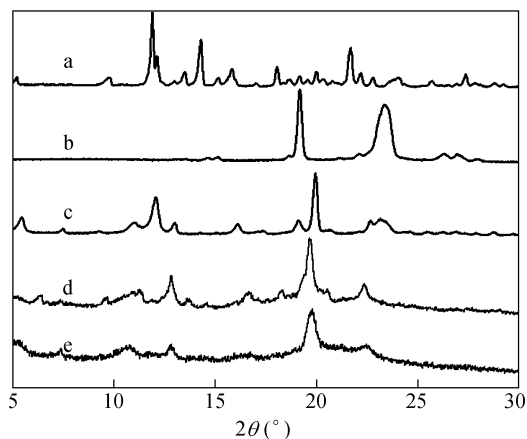


Fig. 9 XRD patterns of (a) α -CD, (b) MePEG, (c) α -CD/MePEG complex, (d) HGel-1 and (e) HGel-2

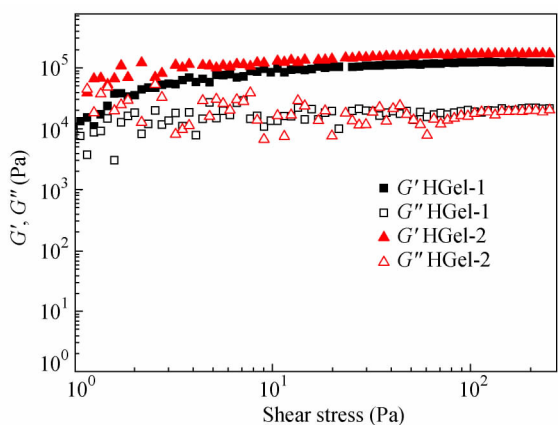
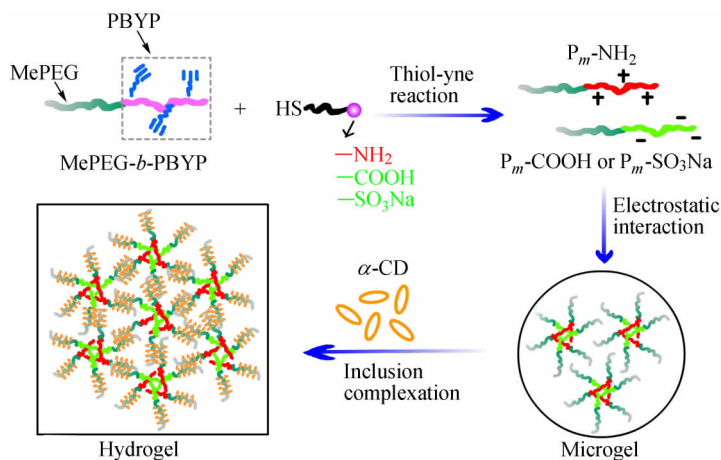


Fig. 10 Evolution of the storage modulus (G') and loss modulus (G'') for hydrogels as a function of shear stress

采用流变仪对水凝胶的黏弹性进行测试. 图 10 是 HGel-1 和 HGel-2 的振荡应力扫描曲线. 由图中可知, 在应力 $1 \sim 250$ Pa 范围内, 2 种凝胶的存储模量(G')均大于损耗模量(G''), 即弹性模量大于黏性模量, 表现为典型的凝胶态. 进一步通过流变仪对凝胶形成的动力学进行研究. 测试前, 将 20 mg P_{38} -COOH、20 mg P_{38} -NH₂ 与 0.4 mL 超纯水混合均匀, 通过旋涡振荡仪振荡 2 min, 向溶液中加入 60 mg α -CD, 再次通过旋涡振荡仪振荡 2 min, 然后将样品加载到流变仪的样品台中进行时间扫描. 图 11 给出了 2 种水凝胶体系凝胶化动力学曲线, 从图 11 (a) 可以观察到, HGel-1 在初始阶段, G' 比 G'' 小, 说明体系在开始阶段没有形成交联网状结构. 随着时间的增加, G' 和 G'' 都逐渐增大, 在 1805 s 时, G' 等于 G'' , 即达到该体系的凝胶点, 随后 G' 的增加速率大于 G'' 的增加速率, 并最终趋于稳定, 说明此时体系的交联度达到最大值, 形成稳定的物理交联水凝胶. 同样将 P_{38} -NH₂、 P_{38} -



Scheme 2 A proposed mechanism for the formation of microgels and hydrogels

SO_3Na 及 $\alpha\text{-CD}$ 按上述操作步骤得到 HGel-2 水凝胶体系,动力学测试结果显示,在扫描时间为

1578 s 左右形成凝胶。

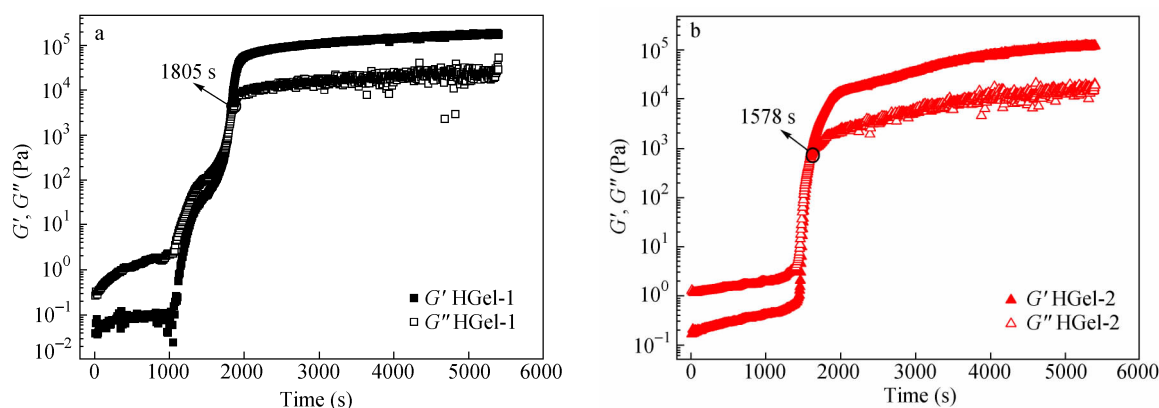


Fig. 11 Dynamic rheological test of the hydrogels for (a) HGel-1 and (b) HGel-2 ($f = 1.0$ Hz; stress = 10 Pa)

3 结论

通过开环聚合法合成侧链含有炔基的生物可降解型聚磷酸酯嵌段共聚物,经巯基-炔点击化学反应,分别与 3 种巯基小分子试剂作用,成功制备了侧链含有不同功能基团的聚合物.通过核磁共振波谱验证了产物的化学结构,并利用 GPC 表征聚合物的分子量及分子量分布.粒径和 zeta 电位测试以及 TEM 表征的结果表明,功能化聚磷酸酯

嵌段共聚物可以在水相中自组装形成胶束,混合带有相反电荷的聚合物能够形成微凝胶.将 α -环糊精引入到微凝胶体系,可以形成物理水凝胶,并通过 SEM 可以观察到凝胶形貌.流变测试结果表明,2 种水凝胶 HGel-1 和 HGel-2 的凝胶化时间分别为 1805 s 和 1578 s,并且形成的水凝胶具有一定的机械强度,能够作为可注射型水凝胶,在药物控释和组织工程等领域具有潜在的应用。

REFERENCES

- Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. *Adv Drug Delivery Rev*, 2008, 60(15):1638 ~ 1649
- Hoffman A S. *Adv Drug Delivery Rev*, 2012, 64:18 ~ 23
- Hennink W E, van Nostrum C F. *Adv Drug Delivery Rev*, 2012, 64:223 ~ 236
- Liao X J, Chen G S, Jiang M. *Polym Chem*, 2013, 4(6):1733 ~ 1745
- Wang X, Zhang L B, Wang L, Sun J Q, Shen J C. *Langmuir*, 2010, 26(11):8187 ~ 8194
- Lemmers M, Sprakel J, Voets I K, van der Gucht J, Cohen Stuart M A C. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(4):708 ~ 711
- Schütz C A, Juillerat-Jeanneret L, Käuper P, Wandrey C. *Biomacromolecules*, 2011, 12(11):4153 ~ 4161
- Sun J Y, Zhao X H, Illeperuma W R K, Chaudhuri O, Oh K H, Mooney D J, Vlassak J J, Suo Z G. *Nature*, 2012, 489(7414):133 ~ 136
- Liao X J, Chen G S, Liu X X, Chen W X, Chen F, Jiang M. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(26):4409 ~ 4413
- Chen G S, Jiang M. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(5):2254 ~ 2266
- Tamesue S, Takashima Y, Yamaguchi H, Shinkai S, Harada A. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(41):7461 ~ 7464
- Hashidzume A, Harada A. *Polym Chem*, 2011, 2(10):2146 ~ 2154
- Kolb H C, Finn M G, Sharpless K B. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40:2004 ~ 2021
- Iha R K, Wooley K L, Nyström A M, Burke D J, Kade M J, Hawker C J. *Chem Rev*, 2009, 109:5620 ~ 5686
- Hu Jian(胡健), He Jinlin(何金林), Zhang Mingzu(张明祖), Ni Peihong(倪沛红). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2013, (3):300 ~ 319
- Chan J W, Zhou H, Hoyle C E, Lowe A B. *Chem Mater*, 2009, 21(8):1579 ~ 1585
- Lowe A B, Hoyle C E, Bowman C N. *J Mater Chem*, 2010, 20(23):4745 ~ 4750
- Hoogenboom R. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49(20):3415 ~ 3417

- 19 Heller J, Hoffman A S. Drug delivery system. In: Ratner B D, Hoffman A S, Schoen F J, Lemons J E, ed. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed. San Diego: Elsevier, 2004. 628 ~ 648
- 20 Leong K W, Mao H Q, Zhuo R X. *Chinese J Polym Sci*, 1995, 13(4), 289 ~ 314
- 21 Zhao Z, Wang J, Mao H Q, Leong K W. *Adv Drug Delivery Rev*, 2003, 55(4), 483 ~ 499
- 22 Wang Y C, Yuan Y Y, Du J Z, Yang X Z, Wang J. *Macromol Biosci*, 2009, 9(12), 1154 ~ 1164
- 23 Zhou Y F, Huang W, Liu J Y, Zhu X Y, Yan D Y. *Adv Mater*, 2010, 22(41), 4567 ~ 4590
- 24 Shao H Y, Zhang M Z, He J L, Ni P H. *Polymer*, 2012, 53(14), 2854 ~ 2863
- 25 Iwasaki Y, Nakagawa C, Ohtomi M, Ishihara K, Akiyoshi K. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3), 1110 ~ 1115
- 26 Du J Z, Sun T M, Weng S Q, Chen X S, Wang J. *Biomacromolecules*, 2007, 8(11), 3375 ~ 3381
- 27 He J L, Ni P H, Wang S, Shao H Y, Zhang M Z, Zhu X L. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 2010, 48(9), 1919 ~ 1930
- 28 He J L, Zhang M Z, Ni P H. *Soft Matter*, 2012, 8(22), 6033 ~ 6038
- 29 Zhang S Y, Zou J, Zhang F W, Elsabahy M, Felder S E, Zhu J H, Pochan D J, Wooley K L. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(44), 18467 ~ 18474
- 30 Wei Hongliang(魏宏亮), Yu Huaqing(于怀清), Zhu Kaiqiang(朱凯强), Qian Lijun(钱立军), Zhang Aiyi(张爱英), Feng Zengguo(冯增国). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2006, (4), 581 ~ 587
- 31 Wu D Q, Wang T, Lu B, Xu X D, Cheng S X, Jiang X J, Zhang X Z, Zhuo R X. *Langmuir*, 2008, 24(18), 10306 ~ 10312
- 32 Tian Z C, Chen C, Allcock H R. *Macromolecules*, 2013, 46(7), 2715 ~ 2724

Preparation and Characterization of Microgels and Hydrogels Based on Functional Polyphosphoester Diblock Copolymers

Yan Xiao, Jin-lin He, Yun-feng Tao, Ming-zu Zhang, Jian Hu, Pei-hong Ni *

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Jiangsu Key Laboratory of Advanced
Functional Polymer Design and Application, Soochow University, Suzhou 215123)

Abstract A series of diblock copolymers MePEG-*b*-PBYP were firstly synthesized by the ring-opening polymerization of 2-(but-3-yn-1-yloxy)-2-oxo-1,3,2-dioxaphospholane (BYP) using polyethylene glycol monomethyl ether (MePEG) as the macroinitiator and Sn(Oct)₂ as catalyst. Subsequently, the alkyne groups on PBYP blocks were modified with three mercaptans by thiol-yne click reaction to yield polyphosphoester-based diblock copolymer with various pendant functional groups (—NH₂, —COOH and —SO₃Na). The molecular structures, molecular weights, and molecular weight distributions of the block copolymers were characterized by NMR and GPC analyses. MTT assay indicated that these block copolymers show relatively low cytotoxicity against L929 fibroblast cells. The microgels were prepared through electrostatic interaction between these oppositely-charged polyelectrolytes. The particle size, zeta potential and morphologies of the particles were also analyzed by DLS and TEM techniques. In order to enhance the physical crosslinking, α-cyclodextrin (α-CD) was added into the system to interact with PEG chain *via* inclusion complexation, resulting in the formation of stronger crosslinked hydrogels. SEM was utilized to observe the surface morphologies of microgels and hydrogels, XRD was used to analyze the inclusion complexation and rheology test was employed to monitor the gelation kinetics of the hydrogels. These biodegradable hydrogels with good biocompatibility and favorable mechanical properties provide a promising injectable material and have potential applications in the fields of controlled drug delivery and tissue engineering.

Keywords Polyphosphoester, Thiol-yne click reaction, Microgel, Hydrogel, α-CD