http://pmse.scu.edu.cn

原位交联聚乙二醇基水凝胶的制备及其在药物缓释领域的应用

刘文坤[1]，孙利民[2]，王小兵[1]，秦子昊[3]，于明艳[1]，张冬梅[1]

(1.山东省食品药品检验研究院 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室 国家药品监督管理局胶类产品质量评价重点实验室 产业技术基础公共服务平台，山东 济南 250101；2.山东省食品药品审评查验中心，山东 济南 250013；3.山东师范大学 化学化工与材料科学学院，山东 济南 250014)

摘要：文中通过原位交联构建了一类医用聚乙二醇水凝胶。首先合成了亲电试剂端丁二酰亚胺四臂聚乙二醇(4-arm-PEG-Mal)和亲核试剂端巯基四臂聚乙二醇(4-arm-PEG-SH)，然后通过二者间亲核-亲电反应原位交联制备了不同固含量的水凝胶(GH-n)，通过冷冻干燥得到对应的干胶(DGH-n)。结果表明，GH-n成凝胶速度快，常温混合10~20 s即可交联成胶，提高了应用的便利性。GH-n的溶胀率随着固含量的增加而升高，平衡溶胀率在112%~234%，压缩强度随固含量的增加而增大，固含量为15%的GH-15的压缩强度和压缩形变分别为299.3 kPa和86.8%。同时，GH-n表现出良好的降解性能，其降解时间可通过调节固含量进行精确控制，从而可有效控制药物缓释时间(1~3周)。通过MTT法对水凝胶的细胞毒性进行了评价，其细胞存活率均大于95%，体现出优异的细胞相容性。因此，该水凝胶在药物缓释载体和注射凝胶等医用领域具有较高的应用潜力。

关键词：水凝胶；四臂聚乙二醇；可降解；药物缓释

中图分类号：TQ427.2+6　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1000-7555(2025)08-0138-11

水凝胶是一种由水性基质和交联聚合物构成的具有三维网络结构的材料，在水性介质或生理液中溶胀时仍能保持结构完整性。这种高含水量赋予了水凝胶良好的生物相容性、亲水性及与人类软组织相似的力学性能，使其在组织工程、伤口敷料及分子载体等医学领域得以广泛应用[1~3]。水凝胶的孔隙结构可通过调控交联密度优化，实现药物的有效负载和释放，减少药物剂量和频率，降低不良反应，提高治疗效果。此外，研究人员还通过引入特殊功能团开发出刺激响应型水凝胶，使药物的缓控释放可以通过改变介质或环境条件来实现[4,5]。

生物相容性是评估水凝胶能否在生物体内应用的一个关键指标。良好的生物相容性意味着水凝胶不会引发显著的免疫或组织排斥反应，减少治疗中的并发症和风险[6]。此外，水凝胶的可降解性确保了其在完成治疗任务后能够逐步降解成小分子，从而吸收或代谢出体外，避免了二次手术去除的必要性[7]。然而，不合适的降解速率会对治疗效果产生负面影响，降解太快会增加囊肿形成的风险，降解太慢则会抑制组织生长[8]。因此，通过精细调整水凝胶的化学组成和物理特性，实现高生物相容性和适宜的降解速率，能够提升药物传递的效果，并为临床实践提供创新的解决方案和治疗选择。

聚乙二醇(PEG)作为一种多功能的生物医用材料，已在医学研究和临床应用中展现出了广泛的优势[9,10]。首先，PEG具有良好的生物相容性和生物惰性，减少了由材料本身引起的不良反应；其次，PEG的相对分子质量可调控和结构多样性允许通过化学修饰来调节其降解速率和药物释放速率，以满足不同临床需求[11]。此外，PEG还可以作为多功能交联

doi: 10.16865/j.cnki.1000-7555.2025.0154
收稿日期：2024-08-08
基金项目：山东省重点研发计划(2022TZXD004)；泰山产业领军人才工程专项(TSCX202306076)；济南市“新高校20条”资助项目(20233052)
通讯联系人：张冬梅，主要从事生物制品及药物缓释载体的研究，E-mail: sdjnzdm2022@163.com

剂,用于构建水凝胶和组织工程支架,提供细胞黏附位点,促进组织再生和修复[12]。尽管PEG的高度可控性和多功能性使其在生物医学领域的应用迅速扩展,但纯PEG水凝胶往往缺乏足够的力学性能。因此,利用活性末端基团的PEG来制备混合水凝胶以改善其性能成为研究热点。近年来,虽然有越来越多的研究报道利用多臂PEG(或其衍生物)形成更多交联点来获得优良的力学性能[13,14],但如何方便快捷地制备PEG水凝胶仍然是亟待解决的难题之一。

鉴于此,本文首先以四臂聚乙二醇(4-arm-PEG-OH)为原料合成了亲电试剂端丁二酰亚胺四臂聚乙二醇(4-arm-PEG-Mal)和亲核试剂端巯基四臂聚乙二醇(4-arm-PEG-SH)。随后,将其分别配置成PBS溶液,经双联注射器混合喷出,原位快速固化成水凝胶,并冷冻干燥得到相应干胶。研究了固含量对水凝胶(或干胶)固化时间、热性能、力学性能、溶胀性能、降解性能、药物缓释性能等的影响,并对通过细胞毒、细胞状态和溶血对水凝胶的生物相容性进行了初步评价。此研究可为医用PEG基水凝胶的设计、制备和应用提供新的视角和方法。

1　实验部分

1.1　原料与试剂

4-arm-PEG-OH ($\overline{M}_n$=1×10^4): Sigma-Aldrich试剂,85 ℃真空除水3.5 h;戊二酸酐(GA, 99%)、对甲苯磺酰氯(PTSC, 99%)、4-二甲氨基吡啶(DMAP, 95%)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS,95%)、硫脲(THU, 99%)、三乙胺(TEA,99%)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC, 97%): Macklin生化科技公司;头孢西酮钠(CFD):99.5%,山东天铭药业有限公司;新鲜兔血:赛克赛斯生物科技有限公司;其它试剂均为分析纯。

1.2　实验过程

1.2.1　4-Arm-PEG-Mal的合成:按照文献报道的Mal-PEG-Mal合成的方法合成4-arm-PEG-Mal[15], 如Fig.1(a)所示。将1.0 mmol 4-arm-PEG-OH,12.0 mmol GA和12.0 mmol TEA溶解于100 mL甲苯中。油浴升温至110 ℃,回流反应24 h。减压旋蒸(~60 ℃)浓缩至约20 mL,用100 mL的冰乙醚(0~5 ℃)沉降,抽滤,得淡黄色粗产品。将所得粗品溶于25 mL二氯甲烷中,5倍体积冰乙醚沉降2次,抽滤,常温真空干燥至恒量,得白色粉末状羧基封端四臂聚乙二醇(4-arm-PEG-GA),产率为80.2%。将0.8 mmol 4-arm-PEG-GA和14.8 mmol NHS溶于80 mL二氯甲烷中,常温搅拌下缓慢滴加20 mL EDC (14.8 mmol)的二氯甲烷溶液。常温搅拌反应24 h后抽滤,滤液旋蒸(~25 ℃)浓缩至20 mL左右,100 mL冰乙醚沉降。同样方法沉降2次,常温真空干燥至恒量,得白色粉末状4-arm-PEG-Mal, 产率为83.7%。

1.2.2　4-Arm-PEG-SH的合成:将1.0 mmol 4-arm-PEG-OH,20.0 mmol PTSC和20.0 mmol TEA溶解于100 mL二氯甲烷中,室温搅拌反应24 h。用饱和氯化铵溶液洗涤3次,有机层用硫酸钠充分干燥。干燥后的溶液旋蒸浓缩至约20 mL,100 mL冰乙醚沉降,抽滤,得粗产品。粗品继续用同样的方法沉降纯化2次,常温真空干燥至恒量,得白色粉末状甲苯磺酰酯封端四臂聚乙二醇(4-arm-PEG-OTs),产率为84.0%。1.0 mmol 4-Arm-PEG-OTs和24.0 mmol THU溶于100 mL去离子水中,氮气气氛中100 ℃搅拌反应24 h。冷却至~40 ℃,向体系中缓慢滴加100 mL氢氧化钠溶液(5.6 mol/L),升温至100 ℃继续反应3 h。反应完毕,反应液冷却至常温,搅拌下缓慢滴入2.0 mol/L稀盐酸至溶液pH=3左右。然后用二氯甲烷萃取3次,用量分别为30 mL,25 mL和20 mL,有机层用无水硫酸钠干燥。干燥后的溶液浓缩至20 mL左右,100 mL冰乙醚沉降。同样方法沉降2次,常温真空干燥至恒量,得到白色粉状固体4-arm-PEG-SH纯品,产率为84.6%。合成方程式见Fig.1(b)。

1.2.3　PEG水凝胶的制备:PEG基可降解水凝胶制备反应过程和交联示意图分别见Fig.1(c)和Fig.1(d)。将4-arm-PEG-Mal和4-arm-PEG-SH按照基团摩尔比n(—Mal):n(—SH)=1:1分别溶于PBS (pH=7.4)中,然后分别置于双联注射器中,喷出,静置得到固含量分别为5%,10%和15%的PEG基可降解水凝胶,命名为GH-n (n为固含量),将水凝胶冷冻干燥,得对应干胶,命名为DGH-n。

1.3　测试与表征

1.3.1　结构表征:^{1}H-NMR谱图使用AVANCEII400MHz型核磁共振仪(Bruker)测得,$CDCl_3$为溶剂。采用

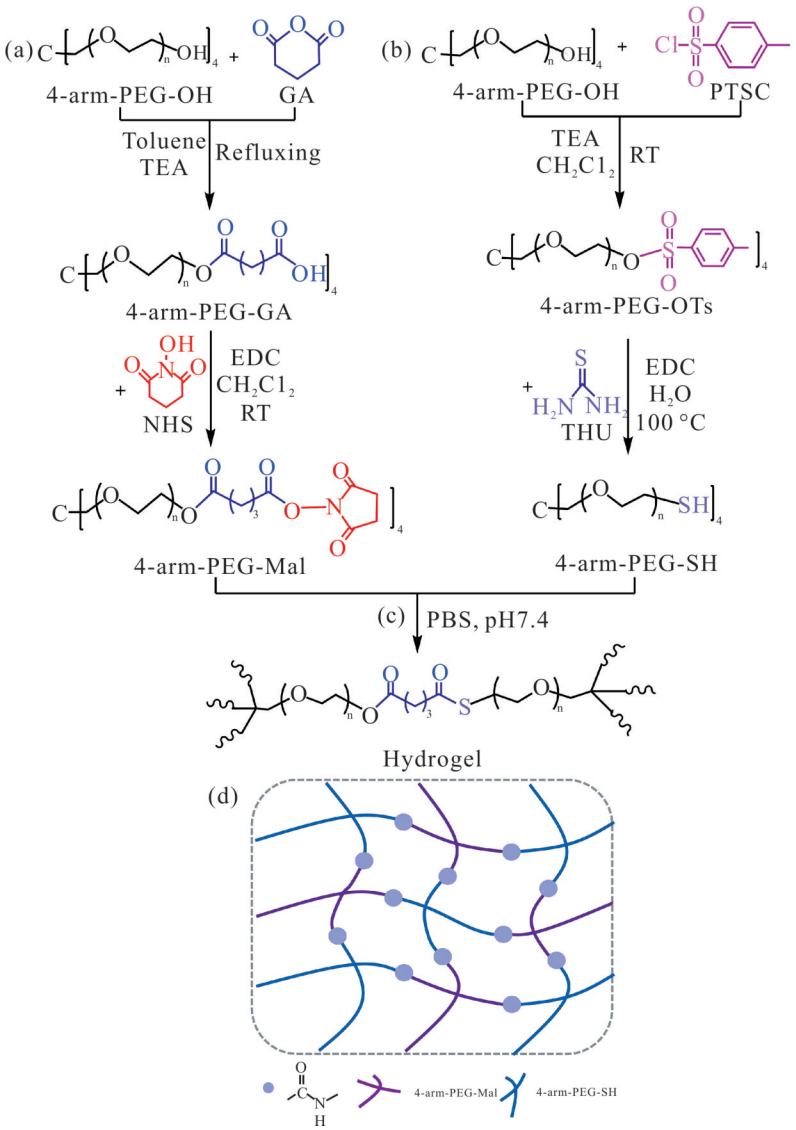


Fig. 1 Synthesis of (a) 4-arm-PEG-Mal, (b) synthesis of 4-arm-PEG-SH, (c) preparation of hydrogel DH-n, and (d) crosslinking mechanism of hydrogel

ALPHAII型红外光谱仪(Bruker)获得干胶的FT-IR谱图。

1.3.2 形貌表征：干胶于液氮中脆断，表面喷金后通过SEM(SU-8010, Hitachi)观测其显微形貌。

1.3.3 热性能分析：干胶的热稳定性采用2050型TGA (Universal)测定，升温速率为20 ℃/min。热转变性能采用2910型DSC (TA)测定，升温速率设定为10 ℃/min。

1.3.4 溶胀性能测定：通过样品吸水率测试其溶胀性能。将水凝胶样品切割为圆柱形(直径为15 mm，高为5 mm)的圆柱，称量(m_0)。将样品浸泡在37 ℃的去离子水中，每隔一段时间将样品取出，用滤纸吸干样品表面水分，称量(m_b)，吸水溶胀率(SR)按照公式SR =(m_b－m_0)/ m_0计算。

1.3.5 压缩性能测试：水凝胶样品切割成圆柱体(直径为15 mm，高为10 mm)，使用CT3型质构仪(Brookfield)的TA10A探头，对圆柱形水凝胶样品进行压缩测试，获得应力-应变曲线。压缩速率设定为0.01 mm/s，测试在室温进行。

1.3.6 降解性测定：凝胶的降解性能通过样品在PBS溶液(pH7.4)中浸泡的失重率来表示。将达到溶胀平衡的样品放入浸湿的茶包中，称量为m_a，然后浸泡于PBS中，密封放置于生化培养箱，温度设置为(37 ± 0.1) ℃。每隔一段时间取出茶包，沥干样品表

面水分,称量为m_n。降解失重率(WLR)按公式WLR=(m_a−m_n)/m_a计算。

1.3.7 *药物缓释性能测定*:以CFD为缓释药物研究载药水凝胶在PBS (pH 7.4)中的药物缓释行为。向原料溶液中加入CFD后再通过双联注射器混合喷出得载药水凝胶,将含有10 mg CFD的圆柱形载药水凝胶(直径为15 mm,高为10 mm)浸入10 mL PBS中,放置于37 ℃的恒温箱中。在预定的时间间隔内取出1 mL上清液,加入新鲜PBS稀释到10 mL,用UV-vis测量在205 nm处的吸光度。先通过标准曲线计算出药物释放的百分比,再根据式(1)计算药物累积释放率(CDR)

$$CDR = \frac{c_n v_n v_{10}}{v_1\left(w_c - \frac{c_{n-1}\times v_{n-1}\times v_{10}}{v_1}\right)} \quad (1)$$

式中:c_n和v_n——分别为第n次定容液中CFD的浓度和溶剂体积;v_{10}——浸泡水凝胶的PBS体积,10 mL;v_1——取出上清液的体积,1 mL;w_c——水凝胶中的CFD的总含量。

1.3.8 *细胞毒和细胞形态分析*:将水凝胶切割为直径为15 mm,高度为2 mm的圆柱型,置于75%乙醇溶液中浸泡30 min,取出后用PBS冲洗3次,然后在紫外灯下照射30 min灭菌。无菌水凝胶放入24孔板中,加入1.0 mL培养基,然后注入培养好的小鼠成纤维细胞(L929,~10^4个/孔)。将多孔板放进培养箱内培养(5%CO_2, 37 ℃)。72 h后,取出多孔板,用倒置荧光显微镜(XPS-15C, 上海巴拓仪器)观测细胞在水凝胶表面的生长形态。

1.3.9 *细胞存活率测定*:采用MTT法测定细胞的存活率。灭菌后的样品浸入含有10% PBS的2.5 mL DMEM培养基中。在(37±0.5) °C浸提24 h后,过滤提取液(0.22 μm)并用2.5 mL新鲜培养基稀释。将稀释的溶液(100 μL)转移到含有L929细胞 (~10^5个/孔)的24孔板中,将细胞与正常培养基作为对照培养。培养72 h后(37 °C, 5% CO_2),通过MTT法测定细胞存活率。在570 nm处通过24孔板读取器获得光密度值(OD),细胞存活率(CSR) 按公式CSR=(A_s−A_b)/(A_c−A_b)计算,式中A_s,A_b和A_c分别是样品组、空白组和对照组的吸光度。CSR ≥ 75% (0 或1 级)视为具有优异的细胞相容性。

培养72 h后,吸出培养液,每孔加入250 μL Calcein AM/PI检测工作液,避光培养30 min (5% CO_2,37 ℃)后,在倒置荧光显微镜下观察细胞活/死状态 (Calcein AM为绿色荧光,E_x/E_m = 494/517 nm;PI为红色荧光,E_x/E_m = 535/617 nm)。

2　结果与讨论

2.1　^{1}H-NMR分析

Fig.2为4-arm-PEG-OH,4-arm-PEG-SH和4-arm-PEG-Mal的^{1}H-NMR谱图。从4-arm-PEG-OH (Fig.2(a))谱图中可以看出无杂质峰的存在,纯度较高,并且质子峰的分布和位置均符合预期结构。通过重复单元—O—CH_2—CH_2—(δ3.42~3.80)的峰面积与C—CH_2—O (δ3.38)的峰面积比值计算出相对分子质量约为10.2×10^3, 与理论相对分子质量基本一致[16]。4-arm-PEG-SH的^{1}H-NMR见Fig.2(b)。其质子峰位置如图中标注,峰的分裂和峰面积之比符合预期,可证实其化学结构符合预期。需要注意的是,—SH中的氢质子具有一定的活性,积分不准确,因此端基取代度可用巯基相连的亚甲基(峰c)与4-arm-PEG核心的亚甲基(峰a)质子峰的积分面积之比获得,计算得端基取代度为S_c:S_a = 2.18:2.62 = 83.2%。其它未见杂质峰,可见该产物具有很高的纯度。4-arm-PEG-SG的^{1}H-NMR见Fig.2(c),其质子峰位置如图中标注,可知其结构符合预期。考虑到产物中水质子峰(δ2.5~3.0)的影响,以GA中间的亚甲基质子(峰e)的积分面积来计算取代度最准确。端基总取代度为S_c:S_a = 0.92:1.02 = 90.2%。同时,谱图上峰g与峰e面积之比约为2:1,表明产品中不存在残留的NHS。

2.2　FT-IR分析

Fig.3为4-arm-PEG-Mal,4-arm-PEG-SH和DGH-5 (DGH-n具有相同的交联度,其FT-IR图谱基本一样)的FT-IR谱图。在原料和干胶的谱图均出现了PEG链段的—CH_2— (2876 cm^{-1})和醚C—O—C (1106 cm^{-1})的吸收特征峰[11],这是因为4-arm-PEG-Mal和4-arm-PEG-SH之间的交联仅发生在端基处,并未影响PEG链段的结构。4-arm-PEG-Mal端羰基

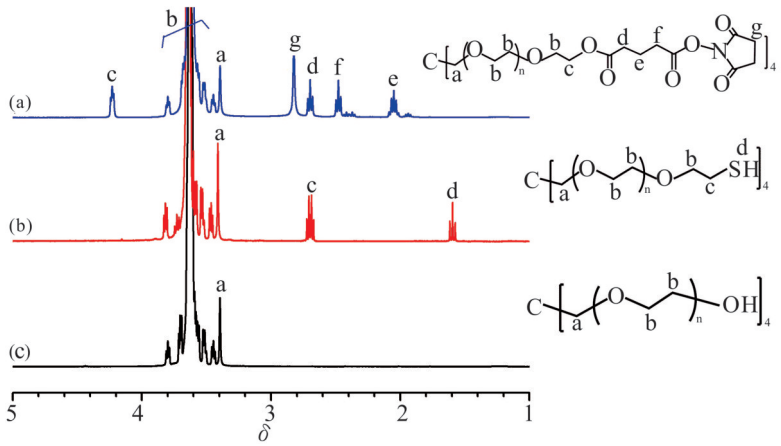


Fig. 2 ^{1}H-NMR spectra for (a) 4-arm-PEG-OH, (b) 4-arm-PEG-SH and (c) 4-arm-PEG-Mal

吸收峰(1738 cm^{-1}，Fig.3(a))和4-arm-PEG-SH的端巯基吸收峰(2520 cm^{-1}，Fig.3(b))在干胶DGH-5的谱图(Fig.3(c))上消失，同时在1597 cm^{-1}处出现明显的硫酯键(—S—CO—)的特征吸收峰。上述分析表明，4-arm-PEG-SG与4-arm-PEG-SH之间发生了反应，生成了硫酯键。

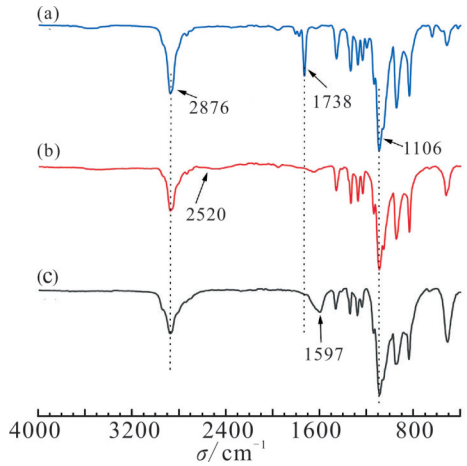


Fig. 3 FT-IR spectra for (a) 4-arm-PEG-Mal, (b) 4-arm-PEG-SH and (c) DGH-5

2.3 水凝胶固化时间

4-arm-PEG-Mal和4-arm-PEG-SH分别属于亲电、亲核试剂，因此二者之间在常温就具有很快的反应速度，溶液-凝胶的转变会在短时间内发生。若将2种溶液直接混合，会导致混合不均匀，影响水凝胶的成型，故使用带混液头的双联注射器来保证2种原料的充分接触，以形成均匀的水凝胶。此处以GH-15水凝胶成型为例，流程见Fig.4，将4-arm-PEG-Mal和4-arm-PEG-SH分别溶解在PBS中配成均匀的溶液，再将溶液分别加入双联注射器(Fig.4(a))的2个注射器中，经混液头混合成雾状喷出(Fig.4(b))。10 s后略微倾斜表面皿，观察到此时混合液已经变得非常黏稠，基本不再流动(Fig.4(c))；30 s后观察到水凝胶已基本成型，可用镊子夹起(Fig.4(d))。相比于光交联固化[17]，原位固化水凝胶具有更好的可控性和生物相容性，避免了光敏剂引起的细胞毒性，制备时间更短，交联均匀性更高，适用范围更广。

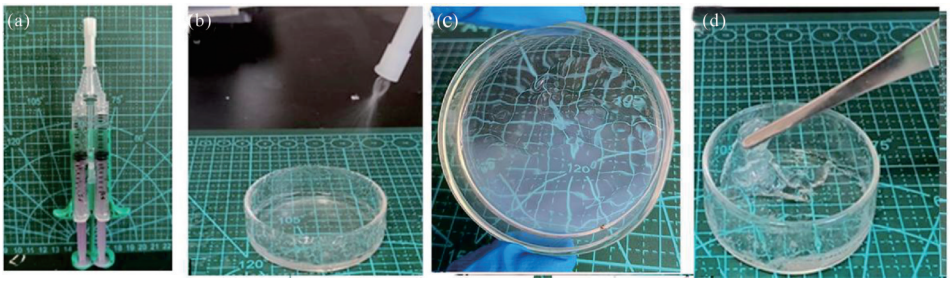


Fig. 4 Preparation process of hydrogel GH-15: (a) double-barreled syringe; (b) mixed ejection; (c) sol-gel transition (10 s); (d) formation of hydrogels (30 s)

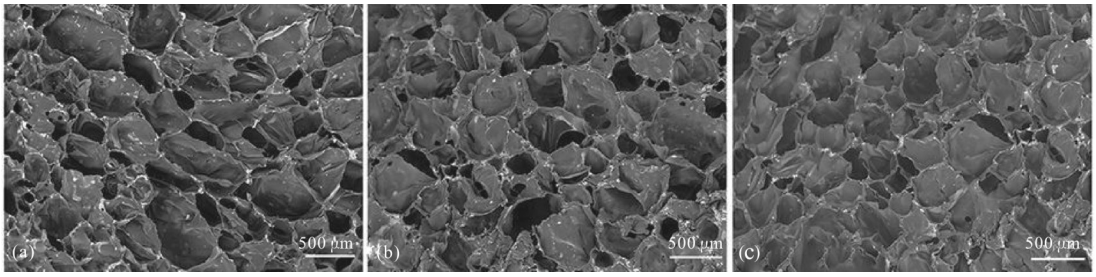


Fig. 5 SEM photos of (a) DGH-5, (b) DGH-10 and (c) DGH-15

Tab. 1 Characteristic values of DGH-n, 4-arm-PEG-Mal and 4-arm-PEG-SH obtained from TGA curves

Samples	$T_{5\%}$/℃	T_1/℃	T_2/℃	W_r/%
4-arm-PEG-Mal	295.4	303.5	412.6	1.6
4-arm-PEG-SH	348.8		410.6	1.0
DGH-5	361.4	313.5	418.2	4.6
DGH-10	361.8	313.7	419.7	5.4
DGH-15	360.3	314.3	420.1	7.2

$T_{5\%}$: decomposition temperature at 5% mass loss; T_n: maximum decomposition temperature at stage n; W_r: residual mass at test endpoint

2.4　微观形貌

干胶DGH-n的SEM照片如Fig.5所示。可以看出，3种固含量不同的干胶均呈现出蜂窝状结构。随着固含量的增加，三者的内部孔径逐渐减小(DGH-5 < DGH-10< DGH-15)，但总体上孔径变化不大。这种密集的孔洞结构有利于干胶内部与水分更加充分接触，将水分储存在孔径中。另外，在受到外力时，交联网络会对外力进行分散缓冲，保护干胶形状不被破坏，增强了水凝胶的力学性能。因此，DGH-n干胶样品呈现出的微观结构预示着其有着良好的吸水率和优秀的力学性能。

2.5　TGA分析

Fig.6 为 4- arm- PEG- Mal，4- arm- PEG- SH 和DGH-n干胶的TGA曲线，其相应的热分解特征值见Tab.1。DGH-n的TGA曲线基本重合，表明其具有相同的热稳定性，这证实固含量对DHG-n的热稳定性基本没有影响，故此处以DGH-15样品为代表进行分析。4-arm-PEG-Mal和4-arm-PEG-SH的失重率达到5% 时的温度($T_{5\%}$)分别为295.4 ℃和348.8 ℃，而DGH-15的$T_{5\%}$为360.3 ℃，明显高于原料。这是因为交联反应限制了PEG软段的流动，使其所需的分解温度有所提高。在测试结束时(600 ℃)，4-arm-PEG-Mal和4-arm-PEG-SH的残留质量(W_r)均在5% 以下，基本分解完全；而DGH-n的W_r约为5%，表明在高温阶段也具有较高的热稳定性。DGH-n的热分解分为2个阶段：第1阶段的最大分解温度(T_1)约为313 ℃，应为其组成部分4-arm-PEG-Mal中酯键的热分解；第2阶段的T_2为420 ℃左右，应为凝胶中PEG链段醚键的热分解[18]，因此，在该阶段干胶损失大部分质量。整体而言，交联提高了凝胶的热稳定性，其$T_{5\%}$皆在200 ℃以上，因此，干胶可以进行高温灭菌。

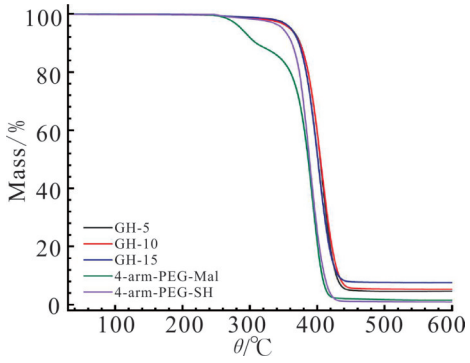


Fig. 6 TGA curves of DGH-n, 4-arm-PEG-Mal and 4-arm-PEG-SH

2.6　DSC分析

4-arm-PEG-Mal，4-arm-PEG-SH和干胶DGH-n

的DSC曲线如Fig.7所示，从曲线中所得DSC特征值见Tab.2。原料4-arm-PEG-Mal和4-arm-PEG-SH的玻璃化转变温度(T_g)在-50 ℃左右，这归因于PEG链段柔性较高的醚键C—O—C，与文献报道的一致[19]。所有DGH-n的T_g出现在-33 ℃左右，相差不大，这表明交联改变了分子的空间结构，形成的交联网络降低了分子链的自由运动，T_g相对原料有所提高。但GH-n的T_g仍远低于室温，这保证了水凝胶在使用温度下能够保持良好的弹性。另外，4-arm-PEG-Mal，4-arm-PEG-SH在41 ℃左右出现1个吸热峰(T_m)，属于PEG链段的晶体熔融峰；而干胶DGH-n的T_m因交联而高于前两者，出现在48 ℃左右。DGH-n熔融峰焓变值(ΔH_m)略低于原料，这是因为交联在一定程度上限制了链段的有序排列，降低了其结晶度。

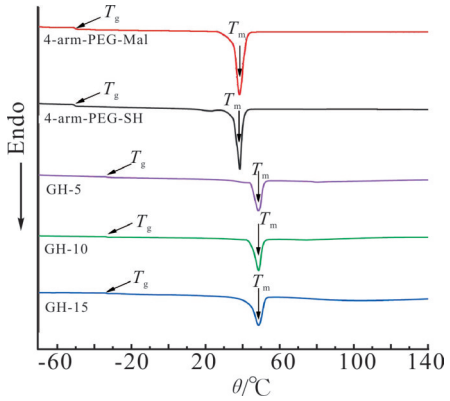


Fig. 7 DSC curves of 4-arm-PEG-Mal, 4-arm-PEG-SH and DGH-n

Tab. 2 Characteristic values of 4-arm-PEG-Mal, 4-arm-PEG-SH, and DGH-n obtained from DSC curves

Samples	T_g/℃	T_m/℃	ΔH_m/(J·g^{-1})
4-arm-PEG-Mal	-49.6	41.7	28. 07
4-arm-PEG-SH	-50.1	42.4	27.72
DGH-5	-32.1	48.6	18. 98
DGH-10	-32.5	48.7	18.62
DGH-15	-32.8	48.7	17.87

2.7 溶胀性能

水凝胶GH-n样品在去离子水中的SR随时间的变化曲线如Fig.8所示。可以观察到，GH-5样品在20 min左右最先达到溶胀平衡，平衡溶胀率(ESR)约为112.5%；而GH-10和GH-15到达溶胀平衡的时间分别在50 min和70 min左右，ESR出现明显的提高，分别为156.4%和234.3%。这表明水凝胶的固含量同时影响水凝胶的溶胀速率和ESR，归因于凝胶中的PEG软段具有亲水性，可以与水分子以氢键的形式结合，而固含量增加意味着PEG含量增加，导致水凝胶较慢的溶胀速率和较大的ESR。在PEG和明胶原位固化的水凝胶上也发现类似的溶胀性能[20]。此处以GH-15为例，通过Fig.9可以直观地看出水凝胶溶胀前后的状态变化，圆柱形凝胶样品初始直径约为15 mm (Fig.9(a))，在37 ℃去离子中溶胀12 h后，直径增加至31 mm (Fig.9(b))，同时样品变得更加透明、柔软。

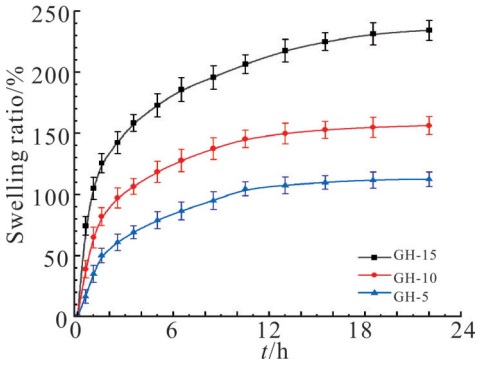


Fig. 8 Swelling ratio of GH-n hydrogels in water at 37 ℃ (n=3)

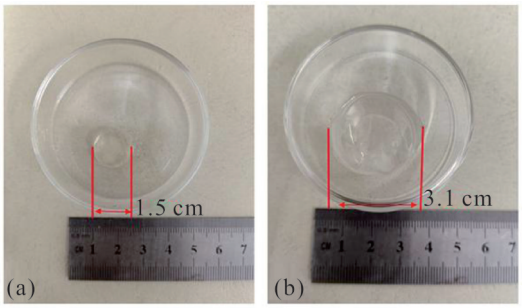


Fig. 9 Top view of (a) original and (b) swelled hydrogel GH-15 (12 h, in water, 37 ℃)

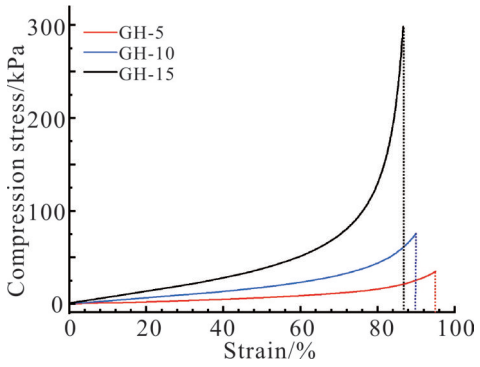


Fig. 10 Compressive stress-strain curves of GH-n hydrogels

2.8 压缩性能

力学性能很大程度上决定了水凝胶性能的优

劣。水凝胶能够应用于实际的前提是其能承受一定的压力而不被破坏,高承压能力的水凝胶能拓宽其应用范围。以压缩性能测试探究GH-n水凝胶的力学性能,设置以恒定速率下压至水凝胶被破坏为止,其压缩应力-应变曲线见Fig.10。可以明显观察到,GH-n展现出相似趋势的应力-应变曲线:初始时压缩强度随压缩形变缓慢增加;即将达到临界点时压缩强度(σ)快速增加,直至水凝胶破裂。随着固含量的增加,样品的压缩强度(σ_m)快速增加,而压缩形变(ε_m)逐渐降低。其中固含量最高的GH-15的σ_m和ε_m分别为299.32 kPa和86.8%。这是因为随着固含量的增加,水凝胶内部交联点位增多,在对抗外界压力时能消耗更多能量,具有较高的σ_m,同时交联点的增多限制了链的自由运动,从而脆性增加,ε_m降低。因此,GH-n的压缩性能可通过固含量进行调节,以用于不同的医学领域。

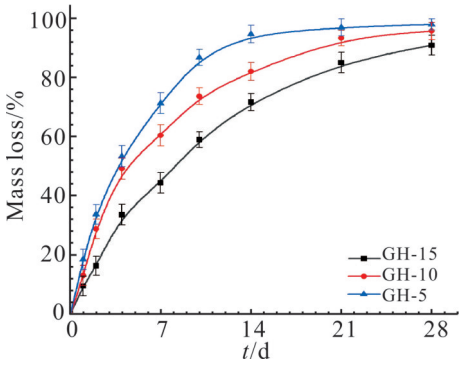


Fig. 11 Mass loss curves of GH-n against degradation time in PBS (pH=7.4) at 37 ℃ (n=3)

2.9 体外降解性能

可降解性是水凝胶作为药物载体的必要条件。GH-n的体外降解性能通过其在PBS (pH 7.4,37 ℃)中的质量-时间损失曲线来体现,如Fig.11所示。降解1周时,样品GH-5,GH-10和GH-15的质量损失分别达到70.15%,60.16%和44.25%, 基本降解了各自质量的一半。降解2周时,GH-5的质量损失达到94.29%, 基本完全降解;而GH-10和GH-15降解质量达到90%以上则分别需要3周和5周的时间。从上述分析可知,GH-n的降解速率主要受到固含量的影响。固含量增大,三维网络结构的交联位点增多,水凝胶内分子链的流动性变差,使得降解时间延后。因此,该水凝胶的降解时间可通过调节固含量在2~5周来进行控制。

2.10 药物缓释性能

Fig.12为不同固含量的水凝胶GH-n在体温PBS (pH=7.4)中的CFD随时间的释放曲线。GH-n表现出突释和缓释2个释放阶段。在缓释初期,附着在水凝胶表面的CFD分子会突释到缓冲液中,伴随着水凝胶的降解和渗透压作用,大部分药物快速释放。随着时间的推移,GH-n的释放进入持续缓释阶段,此时主要是水凝胶的降解速率影响CFD的释放速率,药物持续缓慢地释放进溶液中,直至完全释放。具体来看,GH-5在第1周可释放80%的药物,而GH-10和GH-15要达到近似释放量则分别需要2周和3周的时间,能够实现延缓CFD释放的效果。因此,可以通过调整凝胶的固含量来控制其降解速率,进而控制药物释放时间,达到缓释目的。

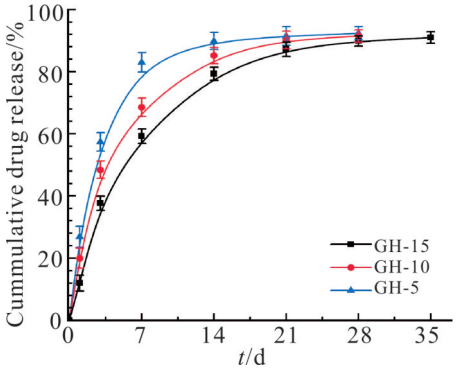


Fig. 12 Drug release curves from GH-n hydrogels in PBS (pH=7.4) at 37 ℃ (n=3)

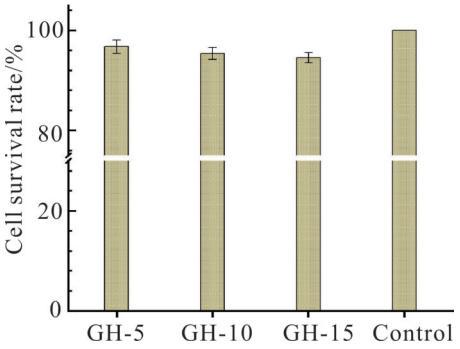


Fig. 13 Cell survival rate in GH- n hydrogel extracts by MTT (37 ℃, 72 h, n=3)

2.11 细胞相容性和存活状态

细胞相容性是测试材料生物相容性的首要手段[16]。采用L929细胞为测试细胞,通过细胞黏附水凝胶表面、Live/Dead细胞活性试验和MTT实验分析,来评价GH-n水凝胶的细胞相容性。Fig.13为水凝胶GH-n 72 h后的细胞存活率。虽然CSR值随着

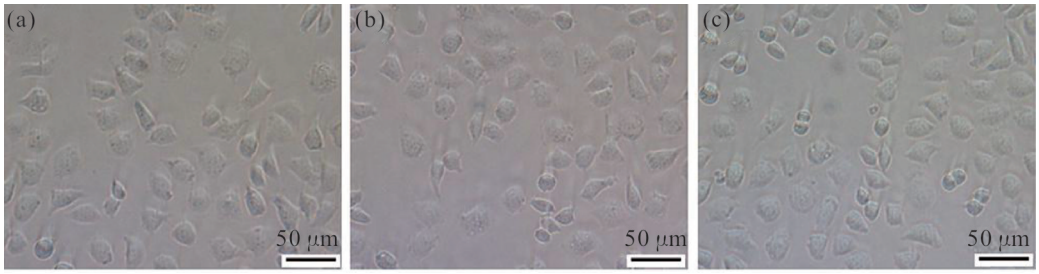


Fig. 14 Cell morphologies on (a) GH-5, (b) GH-10 and (c) GH-15 hydrogel surface (37 ℃, 72 h)

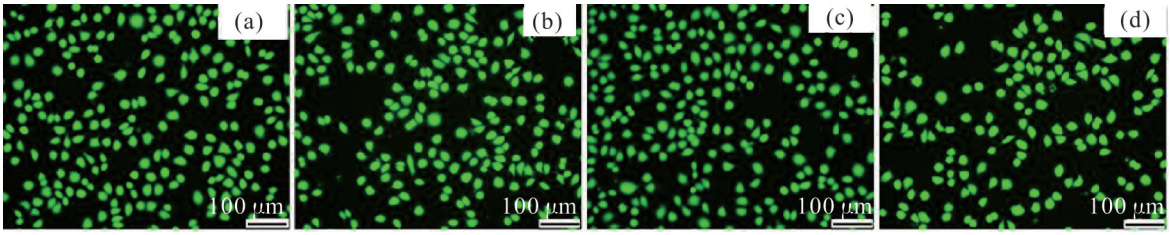


Fig. 15 Live/dead cells in (a) control, (b) GH-5, (c) GH-10 and (d) GH-15 extracts (37 ℃, 72 h)

固含量的增加略微降低，但均大于95%，细胞毒性为I级，表明水凝胶对细胞基本无毒，符合体内材料的要求。Fig.14为L929细胞在GH-n表面培养72 h后的光学图像。水凝胶表面黏附了较多的细胞，并且细胞都呈现出完全铺展的形态，表明材料对细胞良好的相容性[21]。对使用GH-n浸提液培养的L929细胞进行了Live/Dead细胞活性试验，显微照片如Fig.15所示。可以观察到，培养72 h后，绝大部分细胞保持活力，几乎没有死细胞。通过以上实验测试，证明GH-n水凝胶对细胞毒性很小，可以作为生物医用材料。

3 结论

本文首先合成了亲电试剂4-arm-PEG-Mal和亲核试剂4-arm-PEG-SH，然后二者之间进行亲核-亲电的原位交联制备了不同固含量的聚乙二醇基水凝胶(GH-n),，通过冷冻干燥得到相应干胶(DGH-n)。对活性PEG、干胶和水凝胶进行了结构表征和性能研究，结果表明，GH-n成凝胶速度快，常温10~20 s即可交联成胶；溶胀率随着固含量的增加而升高，SWR为112%~234%；压缩强度随固含量的增加而增大，固含量为15%的GH-15的σ_m和ε_m分别为299.3 kPa和86.8%。降解失重分析表明GH-n具有可降解性，药物缓释效果主要受降解速率的影响，缓释时间可达3周。通过MTT法对水凝胶的细胞毒性进行了评价，其细胞存活率均大于95%，体现出优异的细胞相容性。该水凝胶作为药物缓释载体和注射凝胶等医用材料领域展现出潜在的应用前景。

参考文献：

[1] 边甜甜, 李聪慧, 王增明, 等. 医用水凝胶力学性能的研究进展[J]. 化学通报, 2024, 87(7):814-820.
Bian T, Li C H, Wang Z M, *et al*. Research progress in mechanical properties of medical hydrogels[J]. Chemistry, 2024, 87(7): 814-820.

[2] Mohapatra S, Mirza M A, Hilles A R, *et al*. Biomedical application, patent repository, clinical trial and regulatory updates on hydrogel: an extensive review[J]. Gels, 2021, 7:207

[3] 黄巧雨, 孙争光, 张玉红, 等. 聚乙烯醇基复合水凝胶慢性伤口敷料研究进展[J]. 高分子材料科学与工程, 2024, 40(39): 173-181.
Huang Q Y, Sun Z G, Zhang Y H, *et al*. Progress on research of composited hydrogel dressings based on polyvinyl alcohol in chronic wound[J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2024, 40(39): 173-181.

[4] Bordbar K A, Gasik M. Smart hydrogels for advanced drug delivery systems[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23: 3665.

[5] Tian B, Liu J. Smart stimuli-responsive chitosan hydrogel for drug

delivery: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 30: 123902.

[6] Nasra S, Patel M, Shukla H, *et al*. Functional hydrogel- based wound dressings: a review on biocompatibility and therapeutic efficacy[J]. Life Sciences, 2023, 334: 122232.

[7] Bennett S L, Melanson D A, Torchiana D F, *et al*. Next-generation hydrogel films as tissue sealants and adhesion barriers[J]. Journal of Cardiac Surgery, 2003, 18: 494-499.

[8] Sargeant T D, Desai A P, Banerjee S, *et al*. An in situ forming collagen- PEG hydrogel for tissue regeneration[J]. Acta Biomaterialia, 2012, 8: 124-32.

[9] Karmakar G, Nahak P, Guha P, *et al*. Role of PEG 2000 in the surface modification and physicochemical characteristics of pyrazinamide loaded nanostructured lipid carriers[J]. Journal of Chemical Sciences, 2018,130: 42.

[10] Xu Q, Hou J, Rao J, *et al*. PEG modification enhances the in vivo stability of bioactive proteins immobilized on magnetic nanoparticles[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42: 1407-1418.

[11] Dabbaghi A, Ramazani A, Farshchi N, *et al*. Synthesis, physical and mechanical properties of amphiphilic hydrogels based on polycaprolactone and polyethylene glycol for bioapplications: a review[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2021, 101: 307-323.

[12] Guo H, Uehara Y, Matsuda T, *et al*. Surface charge dominated protein absorption on hydrogels[J]. Soft Matter, 2020,16: 1897-907.

[13] Richbourg N R, Peppas N A. Structurally decoupled stiffness and solute transport in multi-arm poly (ethylene glycol) hydrogels[J]. Biomaterials, 2023, 301: 122272.

[14] Ran R, Shi W, Gao Y, *et al*. Super- fast in situ formation of hydrogels based on multi-arm functional polyethylene glycols as endotamponade substitutes [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2021, 9: 9162-9173.

[15] Li F F, Liu H X, Zhang Y L, *et al*. ^{1}H-NMR determination of 1,3-dicyclohexylurea,glutaric acid and triethylamine in medical four-arm poly(ethylene glycol)- N- hydroxysuccinimideglutarate for better quality control[J]. Analytical Methods, 2019, 11: 6176.

[16] Yang B, Liu B, Gao Y, *et al*. PEG-crosslinked O-carboxymethyl chitosan films with degradability and antibacterial activity for food packaging[J]. Scientific Reports, 2024, 14: 10825.

[17] 候冰娜, 李进, 倪凯, 等. 光交联羧甲基壳聚糖水凝胶的制备及药物缓释性能研究[J]. 材料工程, 2020, 48(11): 76-84.
Hou B N, Li J, Ni K, *et al*. Preparation of photo- crosslinking carboxymethyl chitosan hydrogel for sustained drug release[J]. Journal of Materials Engineering, 2020, 48(11): 76-84.

[18] Yin S, Xia Y, Jia Q, *et al*. Preparation and properties of biomedical segmented polyurethanes based on poly(ether ester) and uniform- size diurethane diisocyanates[J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2017, 28: 119-138.

[19] Lee J H, Go A K, Oh S H, *et al*. Tissue anti-adhesion potential of ibuprofen- loaded PLLA – PEG diblock copolymer films[J]. Biomaterials, 2005, 26: 671-678.

[20] Zhao Z, Qin Z, Zhao T, *et al*. Crosslinked biodegradable hybrid hydrogels based on poly(ethylene glycol) and gelatin for drug controlled release[J]. Molecules, 2024, 29: 4952.

[21] Hao T, Niu G, Zhang H, *et al*. Enhanced hemocompatibility and antibacterial activity of biodegradable poly(ester- urethane) modified with quercetin and phosphorylcholine for durable blood-contacting applications[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2023, 11: 5846.

In Situ Formation of Poly(ethylene glycol)-Based Hydrogels and the Applications in Controlled Drug Release

Wenkun Liu[1], Limin Sun[2], Xiaobing Wang[1], Zihao Qin[3], Mingyan Yu[1], Dongmei Zhang[1]

(*1. Shandong Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Gelatin Products, Industrial Technology Foundation Public Service Platform, Jinan 250101, China; 2. Shandong Center for Food and Drug Evaluation & Inspection, Jinan 250013, China; 3. College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China*)

ABSTRACT: A type of medical poly(ethylene glycol)-based hydrogel was developed through in situ cross-linking. The electrophilic 4-arm-poly(ethylene glycol)-maleimide (4-arm-PEG-Mal) and nucleophilic 4-arm-poly (ethylene glycol)-thiol (4-arm-PEG-SH) were first synthesized. Then, the hydrogels (GH-n) with different solid contents were prepared by in situ crosslinking between 4-arm-PEG-Mal and 4-arm-PEG-SH. The corresponding dry gels DGH-n were obtained via freeze-drying. GH-n exhibits rapid gelation with gelation time of 10~20 s at room temperature, enhancing the convenience of applications. Equilibrium swelling ratios (112%~234%) and compression strength increase with the increase of solid content. GH-15 (solid content of 15%) achieves the maximum compression strength of 299.3 kPa and the maximum compression deformation of 86.8%. GH-n possesses good degradability, which could be controlled by adjusting the solid content. Drug release performance is mainly affected by degradation rate, and the sustained drug release could be controlled within one to three weeks. Cell viability of the hydrogels was evaluated by the MTT method, and the results demonstrate that the hydrogel has excellent cytocompatibility with a cell survival rate higher than 95%. Hence, the GH-n hydrogels hold high potential for medical applications in drug delivery carriers and injectable gels.

Keywords: hydrogel; 4-arm-poly(ethylene glycol); degradability; drug-controlled release