

学校编码： 10384

分类号____密级____

学 号： 20520131151662

UDC____

厦 门 大 学

理 学 硕 士 学 位 论 文

葡萄糖响应性微凝胶的设计合成
与性能研究

Synthesis and Performance of
Glucose-Responsive Microgels

叶婷

指导教师姓名： 吴伟泰教授

专业名称： 高分子化学与物理

论文提交日期： 2016年4月

论文答辩时间： 2016年5月

学位授予日期：

答辩委员会主席： _____

评 阅 人： _____

2016年4月

Synthesis and Performance of Glucose-Responsive Microgels

By

Ting Ye

Supervised By

Prof. Weitai Wu

Department of Chemistry

Xiamen University

April, 2016

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要 I

英文摘要 II

第一章 绪论 1

1.1 高分子凝胶的概述 1

1.1.1 高分子凝胶的定义及性质 1

1.1.2 高分子凝胶的分类 2

1.1.3 高分子凝胶的应用 7

1.2 葡萄糖响应性微凝胶的概述 10

1.2.1 葡萄糖响应性微凝胶的研究意义 10

1.2.2 葡萄糖响应性（微）凝胶的研究现状 11

1.3 本文的研究意义及内容 15

参考文献 18

第二章 Ag@poly(3-VAPBA-co-DMAEA)杂化微凝胶的设计合成与
葡萄糖响应性研究 23

2.1 引言 23

2.2 实验部分 25

2.2.1 主要试剂 25

2.2.2 实验步骤 25

2.2.3 激光光散射（LLS）的使用 26

2.2.4 微凝胶葡萄糖响应的光学性质表征 27

2.2.5 人造泪液和尿液中葡萄糖的光学检测 27

2.2.6 其它仪器表征 28

2.3 结果与讨论.....	29
2.3.1 微凝胶的合成.....	29
2.3.2 微凝胶的 pH 响应性.....	32
2.3.3 微凝胶的葡萄糖响应性检测.....	33
2.3.4 微凝胶用于人造泪液及尿液中葡萄糖的检测.....	38
2.4 本章小结.....	39
参考文献.....	40
第三章 ConA@poly(NIPAM)微凝胶的设计合成与性能研究.....	43
3.1 引言.....	43
3.2 实验部分.....	45
3.2.1 主要试剂.....	45
3.2.2 实验步骤.....	46
3.2.3 动态激光光散射 (DLS) 的使用.....	46
3.2.4 吸附实验.....	46
3.2.5 体外胰岛素预装载及释放实验.....	47
3.2.6 体外细胞毒性实验.....	48
3.2.7 其它仪器表征.....	49
3.3 结果与讨论.....	49
3.3.1 微凝胶的合成.....	49
3.3.2 微凝胶的葡萄糖响应性检测.....	52
3.3.3 微凝胶的选择性测试.....	55
3.3.4 体外胰岛素控制释放实验.....	57
3.3.5 体外细胞毒性实验.....	58
3.4 本章小结.....	59
参考文献.....	60
第四章 apo-GOx@poly(NIPAM)微凝胶的设计合成与性能研究.....	62

4.1 引言.....	62
4.2 实验部分.....	63
4.2.1 主要试剂.....	63
4.2.2 实验步骤.....	64
4.2.3 激光光散射（LLS）的使用.....	64
4.2.4 吸附实验.....	65
4.2.5 体外胰岛素预装载及释放实验.....	66
4.2.6 体外细胞毒性实验.....	66
4.2.7 动物实验.....	67
4.2.8 其它仪器表征.....	68
4.3 结果与讨论.....	68
4.3.1 微凝胶的合成.....	68
4.3.2 微凝胶的葡萄糖响应性检测.....	71
4.3.3 微凝胶的选择性测试.....	74
4.3.4 体外胰岛素控制释放实验.....	76
4.3.5 细胞和动物实验.....	78
4.4 本章小结.....	80
参考文献.....	81
全文总结	83
在学期间发表的文章	85
致 谢.....	86

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Polymer Gels.....	1
1.1.1 Definition and Properties of Polymer Gels.....	1
1.1.2 Classification of Polymer Gels	2
1.1.3 Application of Polymer Gels.....	7
1.2 Glucose Responsiveness Microgels.....	10
1.2.1 Significance of Glucose Responsiveness Microgels.....	10
1.2.2 Current Research Status of Glucose Responsiveness Microgels.....	11
1.3 Significance of Research and Main Contents	15
Reference	18
Chapter 2 Synthesis and Glucose Responsiveness of Ag@p(3-VAPBA-co-DMAEA) Hybrid Microgels.....	23
2.1 Introduction.....	23
2.2 Experiments	25
2.2.1 Reagents.....	25
2.2.2 Experimental Procedure.....	25
2.2.3 LLS Studies.....	26
2.2.4 Glucose-Reponsive PL Properties of Microgels.....	27
2.2.5 Optical Detection of Glucose in Artificial Tear Fluid and Urine	27

2.2.6 Other Characterization	28
2.3 Results and Discussion	29
2.3.1 Synthesis of Microgels.....	29
2.3.2 pH Responsive Volume Phase Transition of Microgels.....	32
2.3.3 Glucose Responsive Volume Phase Transition of Microgels.....	33
2.3.4 Detection of Glucose in Artificial Tear Fluid and Urine.....	38
2.4 Summary	39
References.....	40
Chapter 3 Synthesis and Performance of ConA@poly(NIPAM)	
Microgels.....	43
3.1 Introduction.....	43
3.2 Experiments	45
3.2.1 Reagents.....	45
3.2.2 Experimental Procedure.....	46
3.2.3 DLS Studies	46
3.2.4 Adsorption Experiments.....	46
3.2.5 In Vitro Insulin Uploading and Release Experiments.....	47
3.2.6 In Vitro Cytotoxicity	48
3.2.7 Other Characterization	49
3.3 Results and Discussion	49
3.3.1 Synthesis of Microgels.....	49
3.3.2 Glucose Responsive Volume Phase Transition of Microgels.....	52
3.3.3 Anti-Interference Test of Microgels	55
3.3.4 In Vitro Insulin Uploading and Release.....	57
3.3.5 In Vitro Cytotoxicity	58
3.4 Summary	59
References.....	60

Chapter 4 Synthesis and Performance of apo-GOx@poly(NIPAM)

Microgels.....62

4.1 Introduction..... 62

4.2 Experiments 63

 4.2.1 Reagents..... 63

 4.2.2 Experimental Procedure..... 64

 4.2.3 LLS Studies..... 64

 4.2.4 Adsorption Experiments..... 65

 4.2.5 In Vitro Insulin Uploading and Release Experiments..... 66

 4.2.6 In Vitro Cytotoxicity 66

 4.2.7 In Vivo Studies..... 67

 4.2.8 Other Characterization 68

4.3 Results and Discussion 68

 4.3.1 Synthesis of Microgels..... 68

 4.3.2 Glucose Responsive of Microgels 71

 4.3.3 Anti-Interference Test of Microgels..... 74

 4.3.4 In Vitro Insulin Uploading and Release Experiments..... 76

 4.3.5 In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Studies 78

4.4 Summary 80

References..... 81

Summary of the Thesis.....83

Publications85

Acknowledgements86

摘要

糖尿病 (diabetes) 是一种以高血糖为特征的代谢性疾病, 在全球范围内的患病率高达 8.3% 以上, 已成为严重威胁人类健康的疾病之一。

目前糖尿病的治疗手段主要是注射胰岛素及饮食控制, 但是注射的胰岛素能到达肝脏(正常生理学作用部位)的量仅有不到 20%, 并且胰岛素在体内易失活, 因此难以准确控制注射的胰岛素剂量。若加大胰岛素剂量并频繁给药, 又可能会使体内的胰岛素过剩, 从而导致低血糖、胰岛素抗性及其他副作用。因此, 开发一种可由体内血糖水平作为开关来调控胰岛素释放的体系尤为重要。

本论文通过合理设计, 发展了三类葡萄糖响应性微凝胶。主要研究内容如下:

(1) 合成了 Ag@聚(3-丙烯酰胺苯硼酸-co-2-二甲氨基丙烯酸乙酯) (Ag@poly(3-VAPBA-co-DMAEA)) 杂化微凝胶。此前报道的掺杂了染料分子或无机纳米颗粒的苯硼酸微凝胶, 在葡萄糖浓度增大时溶胀, 荧光淬灭, 表现为“turn off”的检测模式, 不利于生理学高浓度葡萄糖的检测。我们通过简单地改变单体比率, 得到了表现为“turn on”检测模式的微凝胶, 即在葡萄糖浓度增大时, 微凝胶收缩, 荧光增强。有望实现生理学高浓度葡萄糖的检测。

(2) 合成了伴刀豆球蛋白 A@聚异丙基丙烯酰胺 (ConA@poly(NIPAM)) 微凝胶。此前报道的以 ConA 为葡萄糖响应基元的凝胶多为宏观凝胶, 难以实现快速检测; 而且 ConA 是未固定的, 易发生不可逆聚合, 体系不稳定。我们将 ConA 固定到聚合物网络中, 合成了网络半互穿结构的微凝胶。该微凝胶具有较好的稳定性, 可快速检测葡萄糖, 并实现了胰岛素在体外的控制释放。

(3) 合成了去辅基的葡萄糖氧化酶@聚异丙基丙烯酰胺 (apo-GOx@poly(NIPAM)) 微凝胶。GOx 可以特异性识别葡萄糖, 但是 GOx 中的辅酶因子会氧化葡萄糖, 难以进行葡萄糖的连续检测。我们首次尝试只将 GOx 中具有识别能力的 apo-GOx 包裹到微凝胶中, 实现了对葡萄糖快速、高选择性的检测, 并尝试在小鼠体内进行了胰岛素的控制释放。

关键词: 葡萄糖检测; 胰岛素释放; 微凝胶。

Abstract

Diabetes is a kind of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, its rapidly increasing worldwide prevalence has been recognized as a serious global health threat.

Current standard care for diabetic patients requires subsequent self-injection of insulin. It is reported that only approximately 20% of insulin reaches the liver following the insulin injection. Excess insulin in the body can lead to hypoglycemia, insulin resistance, and other unwanted side effects. Thus developing a new class of insulin delivery systems that can modulate the insulin release rate by responding to glucose concentrations is of vital importance.

Herein, we demonstrate three new types of glucose-responsive microgels.

(1) In early studies, the pPBA microgels coupled with organic dyes or inorganic nanoparticles will swell when the glucose concentration is increase, resulting in the quenching of the optical properties. This signaling manner is called “turn-off” manner, which is difficult to detect with confidence at biologically high glucose concentrations. In this work, we prepare a class of Ag@p(3-VAPBA-co-DMAEA) hybrid microgels, and demonstrate that the signaling manner can be tailored from “turn-off” to “turn-on” by simply varying the feeding ratio of monomers.

(2) We develop a novel class of ConA@poly(NIPAM) microgels, which can undergo a reversible and rapid volume phase transition in response to the glucose concentration and can enable a self-regulated strategy for insulin delivery.

(3) We develop a class of apo-GOx@poly(NIPAM) microgels, which can undergo highly selective, reversible and rapid volume phase transition in response to the glucose and enable a glucose-gated strategy for insulin delivery.

Keywords: Detection of Glucose; Self-Regulated Strategy for Insulin Delivery; Microgels.

第一章 绪论

1.1 高分子凝胶的概述

1.1.1 高分子凝胶的定义及性质

高分子凝胶(以下简称凝胶)普遍存在于我们的日常生活中。食品中的果冻、豆腐、肉类等,用品中的隐形眼镜、高吸水性树脂、农用薄膜等,甚至生物体中的角膜、皮肤、肌肉等都是凝胶。在大多数的高分子教科书中,凝胶的定义是^[1]:“交联的体型聚合物网络中包含溶剂或者单体、低聚物时为凝胶状态,称作凝胶”。

凝胶具有三维交联的网络结构^[2],在溶剂中只溶胀不溶解。凝胶吸收溶剂而膨胀,排出溶剂而收缩,直至达到热力学平衡状态,即溶胀平衡。溶胀平衡点主要由凝胶和溶剂的相互作用决定。在凝胶溶胀的过程中,一方面溶剂渗透进入聚合物网络使其体积膨胀;另一方面聚合物的体积膨胀将会导致聚合物的分子链向三维空间伸展,产生的应力会使聚合物网络发生弹性收缩。这两种作用力相互抗衡,达到凝胶的溶胀平衡。

利用 Flory-Huggins 的理论^[3]可以定量解释凝胶的溶胀行为。若将凝胶的渗透压设为 0,则可得凝胶平衡状态的溶胀比公式:

$$\tau = 1 - \frac{\Delta F}{kT} \approx -\frac{\omega}{N\varphi^2} \left[(2f+1) \left(\frac{\varphi}{\varphi_0} \right) - 2 \left(\frac{\varphi}{\varphi_0} \right)^{\frac{1}{3}} \right] + 1 + \frac{2}{\varphi} + \frac{2 \ln(1-\varphi)}{\varphi^2}$$

式中: τ 为对比温度, ω 为 1 摩尔溶剂中高分子链的数目, N 为阿伏伽德罗常数, k 为玻尔兹曼常数, T 为绝对温度, φ 为高分子网络的体积分数, φ_0 为处于无规线团状态的高分子链的网络体积分数, ΔF 为由高分子网络与溶剂的相互作用引起的自由能变化, f 为交联点之间的每根高分子链电离的抗衡离子数。溶胀度为 φ 的倒数。

由此可见,影响凝胶溶胀平衡的主要因素有以下四种:高分子与溶液的相互作用、高分子网络和液体的混合熵、交联点之间的高分子橡胶弹力及高分子网络的抗衡离子。

随着温度和溶剂组成等外界条件的连续变化,在某一点,凝胶的平衡溶胀度(体积)会因环境条件的微小变化而发生很大的、不连续的变化(突变),我们

将这一现象定义为凝胶的体积相转变。这一现象最早是由 Tanaka^[4]等在研究丙烯酰胺凝胶的过程中发现的。凝胶的体积相转变受内因和外因的共同影响：内因主要有范德华力、疏水作用、氢键及离子间相互作用（如图 1-1 所示）^[5]；外因主要有环境的 pH 值、温度、离子强度、电场以及环境中所含有的其他化学物质，据此可以实现凝胶的智能化。

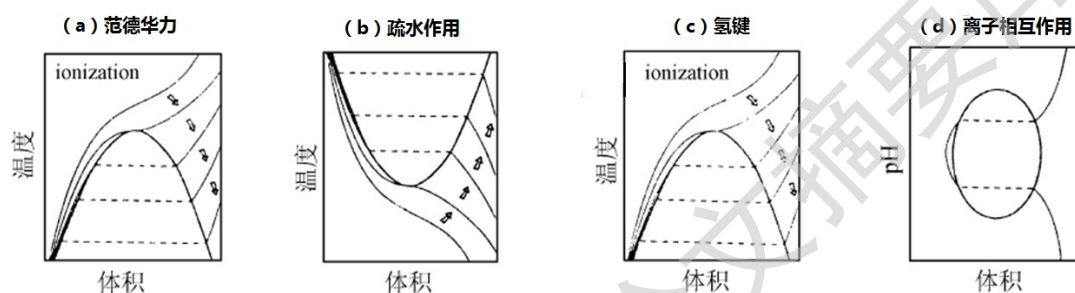


图 1-1 四种影响凝胶体积相转变的分子间作用力^[5]。

1.1.2 高分子凝胶的分类

根据不同的分类标准，凝胶有不同的分类方法。根据来源可以将凝胶划分为天然凝胶和合成凝胶两个大类。天然凝胶主要是由透明质酸盐、胶原明胶、纤维蛋白等天然物质形成的，常见的天然凝胶有多聚糖、琼脂、蛋白质等；合成凝胶顾名思义便是通过人工合成而制得的凝胶，其合成材料主要有乙烯醇、丙烯酸、丙烯酰胺等，常见的合成凝胶有隐形眼镜、芳香剂等。

根据介质的状态可以将凝胶分为干凝胶（气凝胶）和液凝胶。其中，液体介质又可分为水和有机溶剂两大类，分别对应水凝胶和有机凝胶。大部分的合成凝胶和几乎所有的天然凝胶都是水凝胶，因此，我们通常将水凝胶简称为凝胶。

根据交联方式可以将凝胶分为物理交联的凝胶和化学交联的凝胶两大类（如图 1-2 所示）^[6]。靠高分子链的非共价键吸引力，例如配位作用、氢键、疏水作用及离子作用等形成的凝胶称为物理交联的凝胶；通过加入交联剂使高分子链间形成共价键而制得的凝胶称为化学交联的凝胶。大多数合成凝胶都属于化学交联的凝胶，与物理交联的凝胶相比，化学交联的凝胶具有更稳定的网络结构。

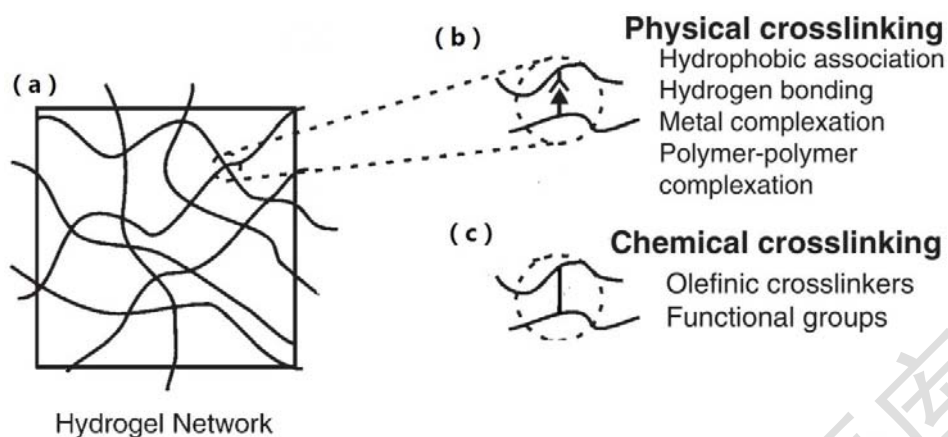


图 1-2 (a) 凝胶结构的示意图；(b) 物理交联的凝胶网络；(c) 化学交联的凝胶网络^[6]。

根据尺寸可以将凝胶分为宏观凝胶、微凝胶（一百纳米到微米级别）和纳米凝胶（小于一百纳米）。但是，由于历史的原因，通常我们习惯将尺寸在几纳米到几微米的凝胶统称为微凝胶。微凝胶通常是由线性分子内交联而成的；而宏观凝胶在极端情况下可以看成是所有高分子都交联起来形成的一个巨大的溶胀体，一般情况下宏观凝胶的交联点分布是不均匀的（如图 1-3 所示）。

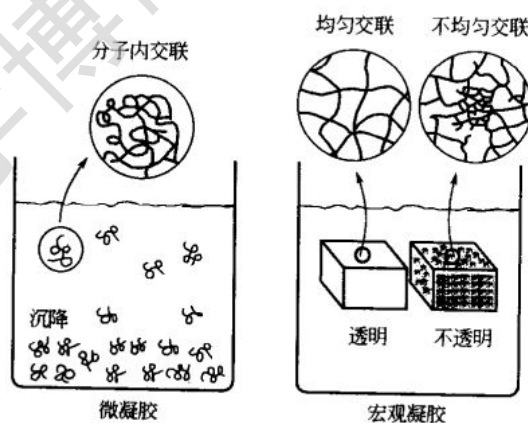


图 1-3 微凝胶与宏观凝胶的示意图^[1]。

从理论上讲，凝胶的许多物理性质都和其尺寸有关。其中，凝胶的溶胀速度便大大依赖于凝胶的尺寸。公式如下：

$$\tau = \frac{a_{\infty}^2}{\pi^2 D}$$

式中： τ 为松弛时间， a_{∞} 为凝胶的最终半径， D 为有效扩散系数。

根据上式可以看出, 凝胶的溶胀弛豫时间与凝胶最终半径的平方成正比。也就是说, 凝胶的尺寸越大, 其溶胀松弛响应时间也就越长。因此, 与宏观凝胶相比, 物质在微凝胶网络内部的扩散速度更快, 从而所需的响应时间更短。因此, 微凝胶的物质传输速度更快, 在物质检测、药物释放等领域^[7-15]较宏观凝胶更受欢迎。

根据对外界刺激是否有响应, 又可以将凝胶分为智能高分子凝胶与普通高分子凝胶。智能高分子凝胶, 也被称作刺激响应性高分子凝胶, 是一类能感知外界环境的变化, 并针对特定的外界刺激(例如温度、pH 值、光、电、磁、生物分子等)能做出一定响应的高分子凝胶^[13-15]。根据刺激信号的不同, 可将智能高分子凝胶分为温度响应性凝胶、pH 响应性凝胶、光响应性凝胶、压力响应性凝胶、电场响应性凝胶、磁场响应性凝胶和生物分子响应性凝胶等。

(1) 温度响应性凝胶

温度响应性凝胶的体积随环境温度的变化而变化, 通常存在一个临界温度。一般情况下, 温度响应性凝胶对温度的响应有两种类型^[15]: 一种是温度高于临界温度时, 凝胶为收缩状态, 低于临界温度时凝胶则为溶胀状态, 我们称这种凝胶为热缩温敏凝胶, 对应的临界温度称为最低临界溶解温度 (Lower Critical Solution Temperature, LCST); 另一种则与之相反, 温度高于临界温度时凝胶为溶胀状态, 低于临界温度时凝胶则为收缩状态, 我们称这种凝胶为热胀温敏凝胶, 对应的临界温度称为最高临界溶解温度 (Upper Critical Solution Temperature, UCST)。绝大多数温度响应性凝胶是热缩型温敏凝胶。

聚异丙基丙烯酰胺凝胶 (poly(*N*-isopropyl acrylamide), poly(NIPAM)) 是最典型的热缩型温敏凝胶, 其分子链上同时存在着亲水性的酰胺基和疏水性的异丙基。当温度变化时, 这些基团的疏水作用以及大分子链之间的氢键作用将发生变化, 从而导致凝胶结构也发生变化。当温度低于 LCST 时, 凝胶网络中亲水基团与水之间的氢键占主导作用, 表现出良好的水化现象, 凝胶处于溶胀状态; 当温度高于 LCST 时, 氢键减弱或断裂, 疏水基团的相互作用增强, 疏水相互作用远大于亲水作用, 体系自由能上升为正值, 凝胶处于收缩状态。通常情况下, 凝胶中所含疏水基团越多, LCST 越低, 所含亲水基团越多, LCST 越高。因此, 可以通过改变聚合物中亲/疏水基团的比例或者使用不同的单体聚合来改变凝胶的

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库