热致物理交联温敏性纳米水凝胶的合成及凝胶化机理的研究

摘　要

热致物理交联纳米水凝胶可以随温度变化从流动性良好的溶液状态 (sol) 转变为不可流动的固态/半固态状态 (gel)，这种原位溶胶-凝胶 (sol-gel) 转变特性使其在药物输送和组织工程领域具有独特的应用前景。作为一类典型的温敏性水凝胶，聚 (*N*-异丙基丙烯酰胺) (PNIPAM) 在高于其相变温度 (Phase transition temperature，Tp，32～34 ℃) 时由于剧烈的相转变行为无法实现溶胶-凝胶转变。目前，基于 PNIPAM (PNIPAM-based) 组装的热致交联水凝胶可以通过引入官能团和设计结构实现溶胶-凝胶转变。然而，它们大多通过嵌段、接枝、无规聚合和互穿等方法制备，具有制备工艺复杂、容易引入高分子催化剂和链转移剂、合成成本较高、凝胶化浓度较高、需要额外的添加剂或温度响应性变差等缺点。由于 PNIPAM-based 纳米水凝胶体系通常需要在疏水性和亲水性之间取得微妙的平衡才能实现溶胶-凝胶转变，因此，开发一种合成步骤简单、临界凝胶化浓度较低且不添加额外的盐或其他添加剂的方法制备 PNIPAM-based 热致物理交联纳米水凝胶对推进其在生物领域的实际应用具有一定的意义和挑战性。

本论文采用乳液沉淀聚合法，以 *N*-异丙基丙烯酰胺 (NIPAM) 为基本温度响应型单体，引入不同的疏水性单体制备 PNIPAM-based 热致物理交联纳米水凝胶。具体内容如下：

(1) 利用乳液沉淀聚合法，将疏水性单体 *N*-苯乙基丙烯酰胺 (PEAA)、*N*-苯基丙烯酰胺 (PAA) 和 *N*-环己基丙烯酰胺 (CHAA) 分别与 NIPAM

共聚，得到 P(NIPAM-co-PEAA) (PNPE)、P(NIPAM-co-PAA) (PNPA) 和 P(NIPAM-co-CHAA) (PNCH) 温敏性共聚纳米水凝胶。通过动态光散射 (DLS)、流变学、变温 ^{1}H NMR 和变温 FT-IR 对 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶进行表征。结果表明，三种纳米水凝胶具有缓慢的相转变行为，这种缓慢的相变行为避免了纳米水凝胶的剧烈收缩、崩塌和宏观相分离行为，使纳米水凝胶在相变温度以上保持相互接触，发生相分离前可以相互缠结，建立物理疏水域作为交联点“撑起”水凝胶网络，从而实现热诱导的溶胶-凝胶转变。而缓慢的相转变行为与引入凝胶网络中侧链的 N-苯基、N-苯乙基和 N-环己基密切相关，大分子链发生收缩或旋转时，侧链基团带来的空间位阻和疏水效应阻碍其运动，在一定程度上防止了颗粒受热后的瞬间收缩。侧基的空间位阻和疏水作用不同，N-苯基 > N-苯乙基 > N-环己基，PNPA 纳米水凝胶较 PNPE 和 PNCH 纳米水凝胶具有更低的凝胶化温度和更缓慢的相转变行为。

(2) 变温 ^{1}H NMR、变温 FT-IR 光谱、微扰相关移动窗口 (PCMW) 和二维红外相关光谱 (2Dcos) 表明，PNPE、PNPA、PNCH 和 PNIPAM 纳米水凝胶具有相同的基团受温度扰动脱水顺序。随着温度升高，纳米水凝胶中的氢键最敏感，C=O···D-O-D 氢键中的水分子脱离，形成新氢键 (C=O···D-N)。当疏水性增强时，侧链上的-CH_3 基团脱水，并形成疏水缔合作用，随后是主链上的-CH_2 基团脱水。此外，三种纳米水凝胶均具有良好的可注射性能和生物相容性，这表明 PNPE、PNPA、PNCH 纳米水凝胶能用于生物医学领域，在组织工程、药物负载等需要低毒性和良好生物相容性要求的领域具有广阔的应用前景。

关键词：*N*-异丙基丙烯酰胺；温度响应性纳米水凝胶；凝胶化；相变机理；

SYNTHESIS AND MECHANISTIC STUDIES OF PHYSICAL CROSSLINKED THERMOGELABLE NANOGELS

ABSTRACT

Physical crosslinked thermogelable nanogels can rapidly change from a well-fluidized solution (sol) to a nonflowable solid/semisolid state (gel) with changes in temperature, and this in situ sol-gel transition characteristic makes them have unique application prospects in the field of drug delivery and tissue engineering. As a typical thermosensitive hydrogel, pure poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) is unable to achieve the sol-gel transition due to the violent phase transition behavior above the phase transition temperature (Tp, 32～34 ℃). At present, the majority of PNIPAM-based thermogelable nanogels are focused on block, grafted or branched polymers, which undergo a complex preparation process, use macromolecular catalysts and initiators that increase the cost of synthesis, may affect the purity of the polymers and increase the toxicity. Random or interpenetrated polymers require a high polymer concentration or additional salts, and may reduce the temperature responsiveness. Since PNIPAM-based nanogels usually need to strike a delicate balance between hydrophobicity and hydrophilicity to achieve a sol-gel transition, it is meaningful but challenging to develop a method to prepare PNIPAM-based thermogelable nanogels with simple synthesis steps, a low critical gelation concentration and no additional salt or other additives to promote their practical applications in the biological field.

In this paper, PNIPAM-based thermogelable nanogels were prepared by emulsion precipitation polymerization using N-isopropylacrylamide (NIPAM) as the basic temperature-responsive monomer and introducing different hydrophobic monomers. The details are as follows:

(1) Hydrophobic monomers *N*-phenylethylacrylamide (PEAA), *N*-phenylacrylamide (PAA) and *N*-cyclohexylacrylamide (CHAA) were copolymerized with NIPAM by emulsion precipitation polymerization to obtain P(NIPAM-co-PEAA) (PNPE), P(NIPAM-co-PAA) (PNPA) and P(NIPAM-co-CHAA) (PNCH) thermosensitive nanogels. PNPE, PNPA and PNCH nanogels were investigated by dynamic light scattering (DLS), rheology, variable temperature ^{1}H NMR and variable temperature FT-IR. The results showed that the three kinds of nanogels have slow phase transition behavior, which avoided the violent shrinkage, collapse and macroscopic phase separation behavior of the nanogels so that the nanogels remained in contact with each other above the Tp and could entangle with each other before phase separation occurred. The physical crosslinking hydrophobic area was established as the cross-linking point to “prop up” the hydrogel network, thus achieving a thermal sol-gel transition. The slow phase transition behavior was attributed to the introduction of side chains N-phenyl, N-phenylethyl and N-cyclohexyl in the gel network. The existence of hydrophobic groups brought large steric hindrance and hydrophobic interactions, which increased the rigidity of the molecular chain. When the macromolecular chain rotated or shrank around this rigid group, the

motion of the chain segment was hindered by the large steric hindrance, which prevented the instantaneous shrinkage of the particles after heating to a certain extent. Due to the difference in steric hindrance and hydrophobicity caused by side groups, N-phenyl > N-phenylethyl > N-cyclohexyl, PNPA nanogels have a lower gelation temperature and slower phase transition behavior than PNPE and PNCH nanogels.

(2) Variable temperature ^{1}H NMR and FT-IR spectra, perturbation correlation moving window (PCMW) and two-dimensional correlation spectroscopy (2Dcos) indicated that PNPE, PNPA, PNCH and PNIPAM nanogels have the same dehydration order caused by temperature disturbance. With an increase in temperature around the phase transition, the C=O···D-O-D hydrogen bonds of the nanogels were the most sensitive to dehydration, forming new hydrogen bonds of C=O···D-N. Furthermore, as hydrophobicity increased, the -CH_3 groups in the side chain dehydrated and formed hydrophobic associations, followed by the-CH_2 group on the main chain. In addition, the three kinds of nanogels have good injectability and biocompatibility, which indicated that PNPE, PNPA and PNCH nanogels can be used in biomedical fields and have broad application prospects in tissue engineering, drug loading and other fields requiring low toxicity and good biocompatibility.

KEY WORDS： *N*-isopropylacrylamide; Thermoresponsive nanogels; Gelation; Phase transition mechanism.

目录

摘要 . . . . . **I**

ABSTRACT . . . . . **III**

1 绪论 **1**

1.1 引言 1

1.2 刺激响应性纳米水凝胶概述 2

1.2.1 温度响应性纳米水凝胶 2

1.2.2 磁响应性纳米水凝胶 3

1.2.3 光响应性纳米水凝胶 4

1.2.4 pH 响应性纳米水凝胶 5

1.2.5 多重响应性纳米水凝胶 6

1.3 聚 *N*-异丙基丙烯酰胺纳米水凝胶概述 7

1.3.1 PNIPAM 纳米水凝胶的单体结构及相变行为 7

1.3.2 PNIPAM-based 纳米水凝胶的制备方法 8

1.3.3 PNIPAM-based 纳米水凝胶的结构分类 9

1.4 热致交联纳米水凝胶概述 10

1.4.1 热致交联纳米水凝胶的定义及分类 11

1.4.2 热致交联纳米水凝胶的交联机制 13

1.4.3 热致交联纳米水凝胶的体外质量评价 15

1.4.4 PNIPAM-based 热致交联纳米水凝胶的研究进展及应用 16

1.5 本课题的提出 17

1.5.1 研究目的及意义 18

1.5.2 主要研究内容 19

2 温敏性共聚纳米水凝胶的制备及溶胶-凝胶转变条件探究 **20**

2.1 引言 20

2.2 实验试剂及实验仪器 21

2.2.1 实验试剂 21

2.2.2 实验仪器 21

2.3 疏水性单体的合成及表征 22

2.3.1 疏水性单体的合成 22

2.3.2 疏水性单体的表征 23

2.4 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶的制备 23

2.4.1 不同单体配比的 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶的制备 23

2.4.2 不同乳化剂用量的 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶的制备 24

2.4.3 不同交联剂含量的 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶的制备 24

2.5 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的制备 25
2.5.1 不同单体配比的 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的制备 25
2.5.2 不同乳化剂用量的 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的制备 25
2.5.3 不同交联剂含量的 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的制备 26
2.6 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶的制备 26
2.6.1 不同单体配比的 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶的制备 26
2.6.2 不同乳化剂用量的 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶的制备 27
2.6.3 不同交联剂含量的 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶的制备 27
2.7 纳米水凝胶的表征方法 28
2.7.1 傅里叶变换衰减全反射红外光谱 (ATR-FTIR) 表征 28
2.7.2 透射电镜 (TEM) 表征 28
2.7.3 粒径及分散性表征 28
2.7.4 临界凝胶化温度和浓度表征 29
2.8 结果与讨论 29
2.8.1 疏水性单体的结构表征 29
2.8.2 纳米水凝胶的傅里叶变换红外 (FTIR) 表征 31
2.8.3 纳米水凝胶的形貌表征 32
2.8.4 单体配比对纳米水凝胶粒径及凝胶化的影响 33
2.8.5 乳化剂用量对纳米水凝胶粒径及凝胶化的影响 34
2.8.6 交联剂用量对纳米水凝胶粒径及凝胶化的影响 35
2.9 本章小结 36

3 温敏性共聚纳米水凝胶的溶胶-凝胶转变机理探究 38
3.1 引言 38
3.2 实验试剂及实验仪器 39
3.2.1 实验试剂 39
3.2.2 实验仪器 39
3.3 纳米水凝胶的表征方法 39
3.3.1 温度响应性表征 39
3.3.2 变温 ^{1}H NMR 表征 39
3.3.3 变温红外 (FTIR) 表征 40
3.3.4 微扰相关移动窗口 (PCMW) 表征 40
3.3.5 二维相关光谱 (2Dcos) 表征 40
3.4 结果与讨论 40
3.4.1 纳米水凝胶的温度响应性表征 40
3.4.2 纳米水凝胶的变温 ^{1}H NMR 表征 42
3.4.3 纳米水凝胶的变温红外 (FTIR) 表征 45
3.4.4 二维红外光谱探究 P(NIPA-co-PEAA) 和 P(NIPA-co-PAA) 纳米水凝胶的相变行为 49
3.5 本章小结 53

4 温敏性共聚纳米水凝胶的凝胶化性能及生物应用 55
4.1 引言 55
4.2 实验试剂及实验仪器 56
4.2.1 实验试剂 56
4.2.2 实验仪器 56
4.3 纳米水凝胶的表征方法 56
4.3.1 脱水量表征 56
4.3.2 流变性能表征 57
4.3.3 体外细胞实验 57
4.4 结果与讨论 59
4.4.1 纳米水凝胶的流变表征 59
4.4.2 纳米水凝胶的脱水量表征 67
4.4.3 纳米水凝胶的可注射性能表征 68
4.4.4 纳米水凝胶的体外细胞毒性表征 69
4.5 本章小结 70

5 总结与展望 72

参考文献 75

攻读硕士期间发表论文及学术成果情况 83

致谢 84

第一章　绪论

1.1　引言

纳米水凝胶是一类独特的具有亲水性和自我支撑能力的三维粘弹性网络材料。自上世纪六十年代首次实际应用以来，它们已经被应用于各个领域，具有不同的特性。例如，由于具有高含水量和高分子柔性[1]，水凝胶被认为是具有仿生和生物功能特性的三维 (3D) 仿生网络，同时具有高溶胀性和机械可调整性，可以吸收大量的生物液，与某些生物结构 (天然细胞外基质 ECM) 相似，并提供与活组织相似的条件，因此水凝胶具有天然的细胞相容性和生物相容性，使其能够模仿生物组织的物理、电和化学功能[2]，用作组织工程的模板[3]、细胞培养的底物[4]以及药物和蛋白质输送的载体[5]，在骨和软骨再生、靶向给药、组织工程、人工肌肉、软机器人、再生医学、生物传感器、伤口损伤和炎症等方面具有广泛的应用[6-9]。

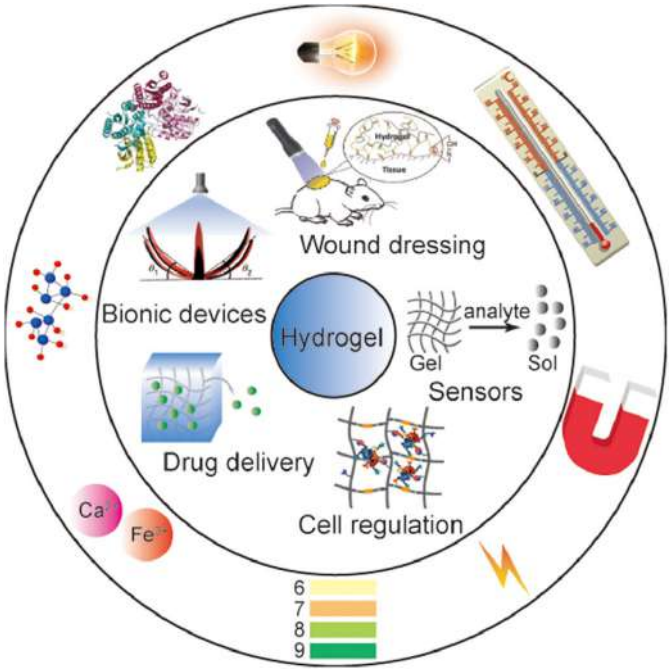


图 1.1: 刺激响应型水凝胶及其应用。源自文献[6]

水凝胶按其来源可分为天然和人工合成两类。为满足特殊用途，人们利用不同的材料和制备方法构造出一种比天然水凝胶更好的新型水凝胶，即聚合物水凝胶。聚合物水凝胶是一种具有或不具有交联剂的弹性/非弹性聚合物链的 3D 复杂网络[10]，这种保湿的 3D 聚合物网络能够吸收水份，防止结构坍塌，具有重要的研究意义。智能/刺激响应型水凝胶是水凝胶领域中最重要的一类，由于其生理状态下的多功能性，刺激响应型水凝胶在近几十年来一直受到人们的关注。它的刺激响应性表现为：在生物微环境中的单个或多个刺激条件作用下发生自身

化学/物理性质 (溶胀性、生化特性、强度、渗透性、机械性、粘弹性和疏水/亲水性等) 不同程度的改变。这些不同的生物刺激包括光[11]、温度[12]、pH[13-14]、离子强度[15]、磁场[16-17]、电场[18]、化学和生物触发剂[19]、酶浓度[20]、盐浓度[21]、氧化还原物种[22]、活性氧物种 (ROS)[23]和葡萄糖水平[24]等。由于刺激响应型纳米水凝胶的凝胶结构、功能性组分、响应性类别等具有高度可设计性，智能/刺激响应型水凝胶在仿生器件、再生医学、传感、药物输送、组织工程、伤口愈合等领域具有广泛的应用前景[6](图 1.1)。

由于具有独特的亲水/疏水结构，*N*-异丙基丙烯酰胺 (NIPAM)[25]成为一种典型的温度响应性功能单体，它的均聚物聚 (*N*-异丙基丙烯酰胺) (PNIPAM) 是一种典型的热敏聚合物, 在相变温度 (Phase transition temperature, Tp≈32 ℃[26]) 下，PNIPAM 纳米水凝胶发生可溶性到不溶性状态转变，该 Tp 靠近人体生理温度并且高度可调，NIPAM 被选用为构建各种智能/刺激响应型水凝胶的基本功能单体。基于 PNIPAM 纳米水凝胶，结合实际应用的需要，通过引入特定的功能单体、合理地设计结构，能够制备出不同响应性能、不同结构和功能的“目标”纳米水凝胶。纳米水凝胶的高可塑造性使其在智能材料领域具有广阔的应用前景。为此，结合本课题的研究方向，本论文绪论部分着重介绍与智能/刺激响应型水凝胶相关的知识与背景，分别从响应性纳米水凝胶的分类、组成和结构、PNIPAM-based 纳米水凝胶的研究进展及其在热致交联水凝胶领域、生物医学领域的相关应用展开阐述。

1.2 刺激响应性纳米水凝胶概述

智能/刺激响应性水凝胶的特点是能够随着外界条件的改变而改变水凝胶基质的某些特性或功能，这类智能材料经过巧妙设计，能够响应各种类型的刺激而改变其结构。本章介绍了几种常见的响应刺激性水凝胶。

1.2.1 温度响应性纳米水凝胶

温度响应性纳米水凝胶是一类能对温度变化做出响应 (结构和力学发生变化) 的智能材料，这种温度响应性通常是由水凝胶中含有的热响应聚合物造成的。根据聚合物的行为，主要有两种热响应聚合物，包括低临界溶解温度 (Lower critical solution temperature, LCST) 或高临界溶解温度 (Upper critical solution temperature, UCST)。对于具有 LCST 的聚合物，聚合物对温度变化的依赖程度是非线性的，当温度高于 LCST 时，聚合物与溶剂发生相分离，而当温度低于 LCST 时，聚合物会向均一相转变；与之相反，具有 UCST 的聚合物纳米水凝胶，当温度低于 UCST 时，聚合物不溶于溶剂出现相分离，而在温度高于 UCST 时，聚合物容易还原到均一相。典型的 LCST 型水凝胶以 NIPAM[27]、*N,N′*-二乙基丙烯酰

胺 (DEA)[28]、*N*-乙烯基己内酰胺 (VCA)[29]等为单体；典型的 UCST 型水凝胶是基于 *N,N′*-二甲基丙烯酰胺 (AAm) 和丙烯酸 (AAc) 的组合[30]。图 1.2 展示了部分 LCST 和 UCST 型水凝胶的主要成分及在水中的相变温度 Tp。

Polymer	Phase transition temperature in aqueous solution
LCST behaviour:	
Poly(N-isopropylacrylamide)	30–34 °C
Poly(N,N-diethylacrylamide)	32–34 °C
Poly(methyl vinyl ether)	37 °C
Poly(N-vinylcaprolactam)	30–50 °C
Block copolymer of poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide)s	20–85 °C
Poly(pentapeptide) of elastin	28–30 °C
UCST behaviour:	
Polyacrylamide and polyacrylic acid IPN	25 °C

图 1.2: 常见的 LCST 和 UCST 型水凝胶聚合物及其相变温度。源自文献[31]

1.2.2 磁响应性纳米水凝胶

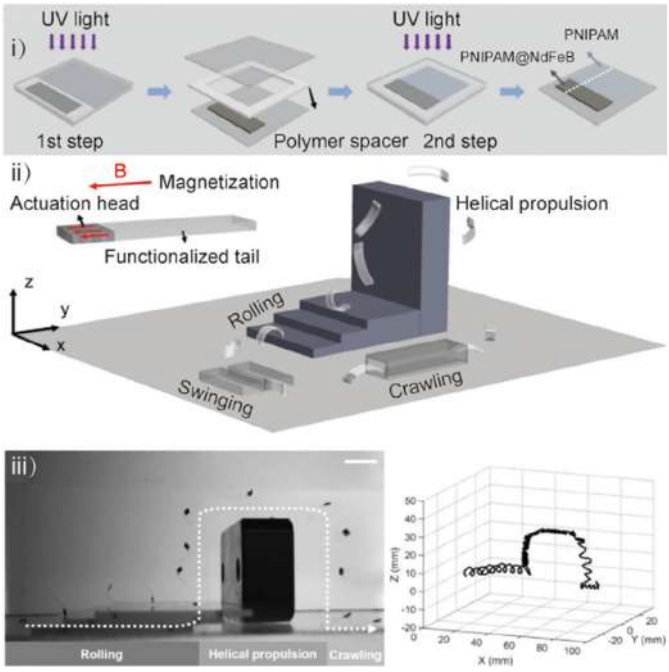


图 1.3: (i) 基于水凝胶的毫微米机器人的制备示意图；(ii) 磁场响应性水凝胶薄膜的多种运动模式；(iii) 跨越障碍物的多模式运动的照片和视觉运动轨迹。源自文献[6]

磁响应性纳米水凝胶是由高分子聚合物材料和具有磁响应特性的功能组分组成的复合凝胶。目前应用较广的磁性材料包括金属氧化物如 Fe_3O_4、γ-Fe_2O_3

和铁氧体如 $CoFe_2O_4$ 等。磁响应性纳米水凝胶能在狭窄区域内进行非侵入性精细操作的应用中显示出独特的优势。因此，它能响应磁场或电信号的变化易于分离，并发生结构变形或机械位移，在离子吸附、仿生和软机器人材料、靶向药物递送以及生物医学工程领域等许多方面具有广阔的应用前景[32-34]。

Xuemin Du 等人[35]报告了一个头部嵌入钕铁硼微粒，尾部为可逆温响应性水凝胶 (PNIPAM) 的磁场响应性毫米级机器人 (iRobot)。如图 1.3 (A) 所示，iRobot 表现出可调节的的多种运动模式，包括可控和可变形的水中爬行、摆动、滚动。由于精心设计的不对称柔软结构，iRobot 在水中实现了出色的螺旋推进，为智能仿生机器人提供了指导原则。这种智能机器人直接在材料内实现控制、驱动和传感，在生物医学和环境领域等具有良好的应用前景。

1.2.3 光响应性纳米水凝胶

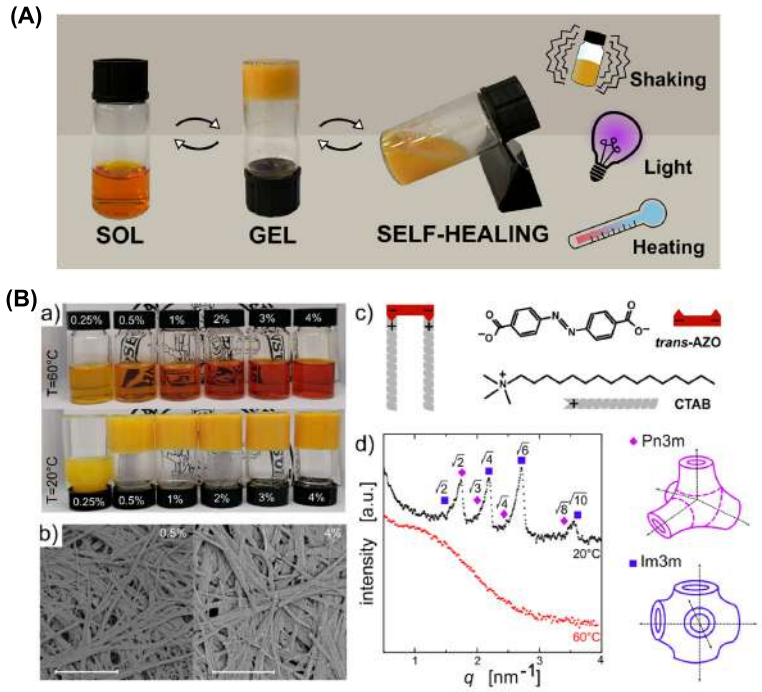


图 1.4: (A) 偶氮苯基超分子水凝胶的光响应和自愈合行为；(B) (a) 偶氮苯基超分子水凝胶的宏观示意图, (b) SEM 纤维状纳米结构, (c) 化学结构和自组装示意图和 (d) SAXS 谱。源自文献[36]

由于光信号的非侵入性、高分辨率性和低污染等特点，将光信号转换为多种功能的光响应性水凝胶受到了学者们广泛的关注。将光敏基团以共价或非共价的形式能复合成可控光响应性纳米水凝胶。最常用的光敏性基团包括偶氮苯、二芳基乙烯、光可逆二聚基团 (如香豆素、蒽等) 以及耐光性基团等。Martina Salzano de Luna 等人[36]利用偶氮苯-4,4′-二羧酸 (AZO) 和十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)

自组装制备双组分偶氮苯基超分子水凝胶 (图 1.4)。AZO 部分的光诱导异构化为凝胶提供了光响应性，AZO 分子的完全可逆的反式异构化赋予了水凝胶在紫外光 (Gel-to-Sol) 和可见光 (Sol-Gel) 照射下发生可逆转变的能力。CTAB/AZO 水凝胶具有优异的自愈合性能和多响应性，对未来开发机械振动、紫外/可见光暴露传感器具有重要的意义。

1.2.4 pH 响应性纳米水凝胶

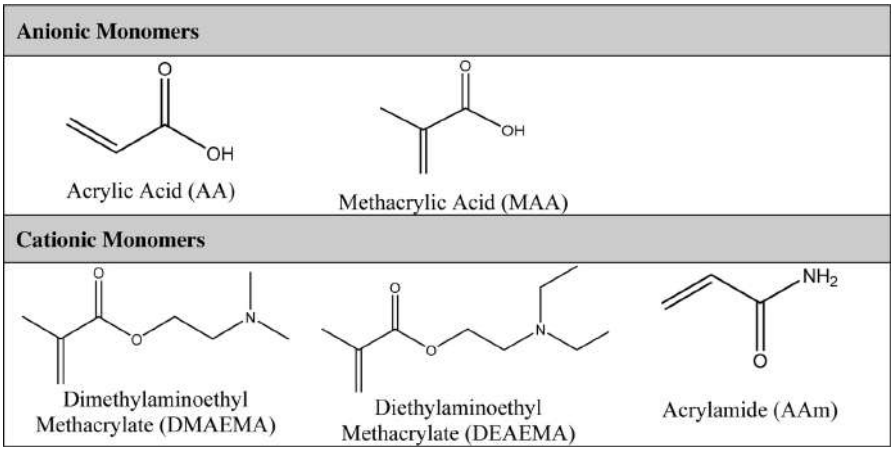


图 1.5: 常见的阴离子、阳离子 pH 响应性单体结构。源自文献[37]

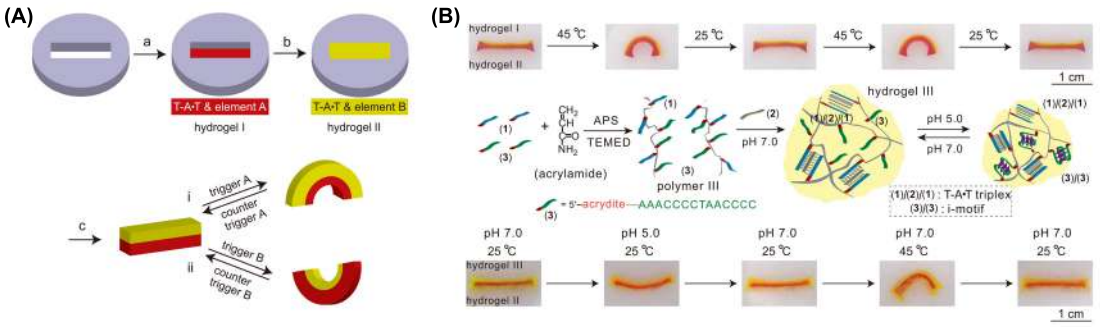


图 1.6: (A) 在模具中制备双层水凝胶的示意图；(B) T-A·T 三联体和 i-基序交联的 pH 响应性水凝胶的制备。PH/温度触发的双层水凝胶的弯曲行为，其顶部为 pH 响应性水凝胶，底部为温度响应性 NIPAM 水凝胶。源自文献[38]

pH 响应性纳米水凝胶是指纳米水凝胶能随外界 pH 扰动，自身物理或化学性质发生变化的一类响应性水凝胶。当 pH 响应性纳米水凝胶置于特定 pH 环境时，响应基团发生电离，水凝胶由于固定电荷的积累产生静电斥力，水凝胶发生溶胀/去溶胀行为。图 1.5 列出了常见的 pH 响应性单体。由于发生病变或组织受到破坏，肿瘤组织和伤口环境等细胞外 pH 低于正常组织和血浆，这使得特异性 pH 响应性纳米水凝胶用于癌症治疗和伤口敷料的药物输送成为可能。Yuwei Hu 等人[38]制备了一种 pH 响应性 DNA 两层水凝胶系统，在一层中引入 i-基序作为交

联剂和 pH 敏感单元交联 (图 1.6)。在酸性条件下 (pH=5)，富含胞嘧啶的 DNA 链组装成 i-基序结构，水凝胶层受到触发式应力会导致线性混合结构发生弯曲，通过反触发去除应力可以恢复原来的线性双层水凝胶；在中性条件下 (pH=7)，i-基序结构解体，形成硬度较低的水凝胶层。这种设计展示了 pH 响应性 DNA 水凝胶在致动器、传感和药物输送方面具有广阔的应用前景。

1.2.5 多重响应性纳米水凝胶

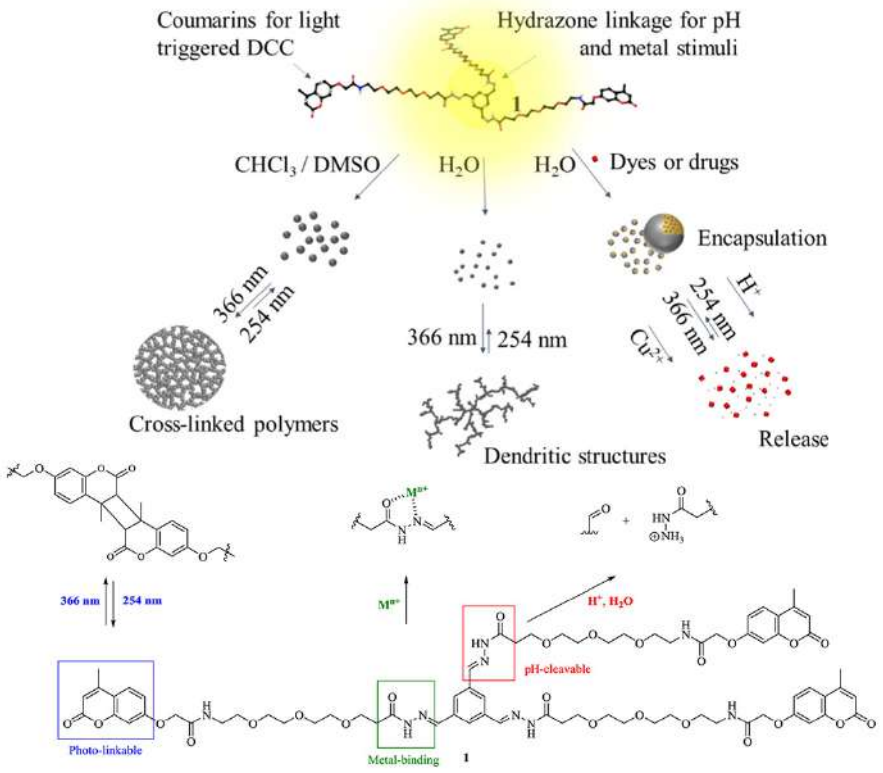


图 1.7: 基于非共价键和动态共价键的多刺激响应性超分子聚合物的设计思路。源自文献[39]

考虑到复杂的生理微环境，双重或多重响应水凝胶能够同时或分步响应两种或两种以上的刺激，具有比单响应型水凝胶更广阔的应用前景。Joydev Hatai 等人[39]经过精心设计，报道了一种多响应超分子水凝胶系统 (图 1.7)。在这个体系中，疏水性和 π-π 相互作用是主要的交联驱动力。此外，暴露在光下时动态共价键的形成导致球形纳米粒子和超分子网络组件之间可以进行形态的可逆转换，通过共价和非共价相互作用对光、pH 和金属离子的响应形成了一个超分子水凝胶网络。

1.3 聚 *N*-异丙基丙烯酰胺纳米水凝胶概述

自 1956 年，PNIPAM 首次被合成以来，PNIPAM 纳米水凝胶受到学者们越来越多的研究。由于其在接近人体生理温度时具有优异的温度响应性，且该温度高度可调，可以对 PNIPAM 结构进行合理的设计，能够制备不同响应性、不同结构和不同功能的“目标”纳米水凝胶，PNIPAM 成为智能材料领域最常见的功能性纳米水凝胶之一。

1.3.1 PNIPAM 纳米水凝胶的单体结构及相变行为

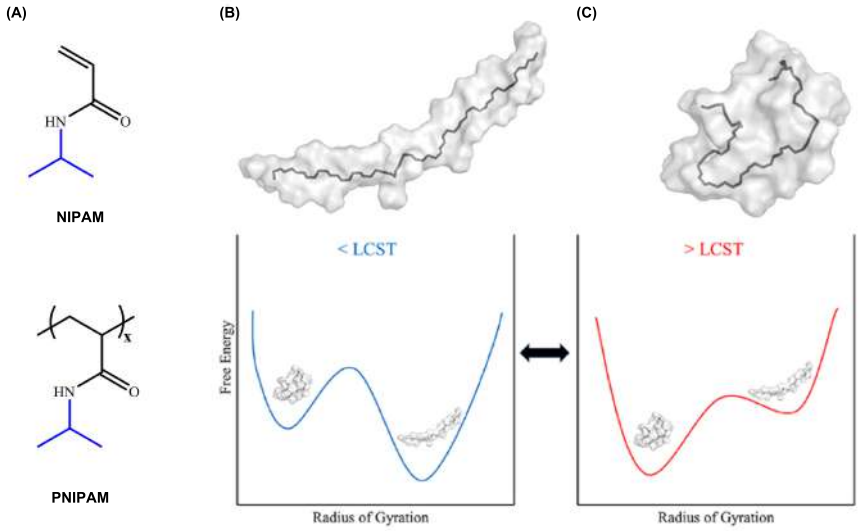


图 1.8: (A) NIPAM 和 PNIPAM 聚合物结构示意图；PNIPAM (B) 无规线圈和 (C) 球状构象。这两个有代表性的结构是从动力学模拟中随机挑选出来的，PNIPAM 结构在低于 LCST 的温度下保持无规线圈构象，在高于 LCST 的温度下观察到自发的线圈-球体转变。源自文献[40]

图 1.8 (A) 给出了 NIPAM 和 PNIPAM 的结构式。PNIPAM 会在水中引起体积相变，其临界溶液温度 (LCST) 约为 32℃，在低于 LCST 下显示亲水性, 凝胶将膨胀，而在高于 LCST 的温度下显示疏水性，凝胶将收缩。该相变过程可从热力学角度解释，Maren Podewitz 等人[40]利用原子分子动力学和超动力学模拟相结合的模拟方法估算了 PNIPAM 的转变热力学 (图 1.8 (B))。在 200～360 K 的较宽温度范围内，研究了 30-mer PNIPAM 的构象和自由能，观察到了从球状结构到无规卷曲结构的转变。在 LCST 以下，无规线团代表全局能量最小，热力学上比球状系统低 21 ± 9 kJ/mol；两者之间的势垒为 49 ± 14 kJ/mol。相反，在 LCST 以上，球状系统比无规线团的热力学能低约 21 ± 8 kJ/mol，两者间势垒为 17 ± 10 kJ/mol。

从分子结构角度出发，PNIPAM 水凝胶中同时含有疏水性异丙基基团 (蓝色)

和亲水性酰胺 (-NHCO-) 基团。在较低温度下，聚合物链上的亲水基团与 H_2O 结合形成氢键，链段伸展，亲水性显著。随着温度的升高，氢键逐渐断裂，与 H_2O 的相互作用力减弱。与此同时，聚合物链中疏水基团之间的相互作用加强，分子链段蜷曲收缩并挤压内部水分子，链段开始收缩成球状结构[26]，实现由无规链段到疏水性小球的转变。

1.3.2 PNIPAM-based 纳米水凝胶的制备方法

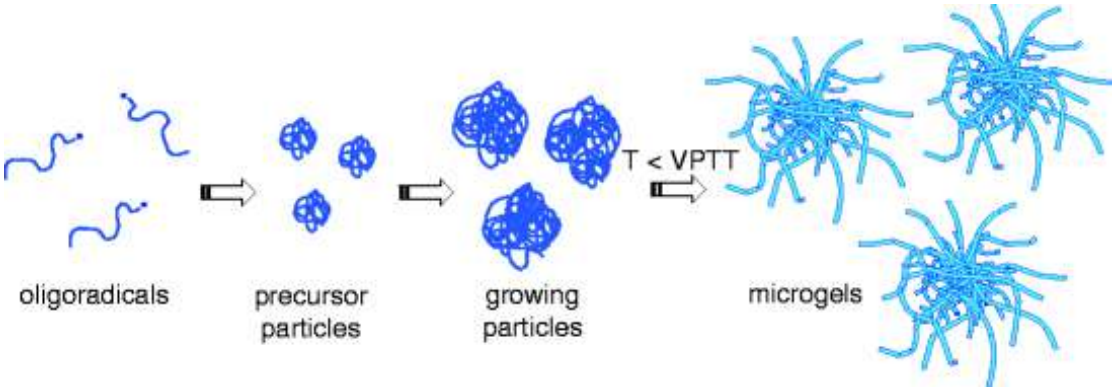


图 1.9: 沉淀聚合法制备微凝胶。源自文献[41]

PNIPAM-based 纳米水凝胶的合成方法一般分为沉淀聚合法、乳液聚合法、微乳液聚合法、分散聚合法和悬浮聚合法等。另外，还有一些其他方法，例如光刻法、自组装法或微流体等。由于本文所述的纳米水凝胶均基于乳液聚合技术大类范畴，通过沉淀聚合法 (Precipitation polymerization) 制备，因此，本小节只着重介绍沉淀聚合法，其它聚合方法于与本研究无直接关系，不做过多介绍。

在温敏微凝胶制备中，沉淀聚合法是最常用的技术。聚合方法主要是利用反应单体在反应介质 (例如水) 和它们形成凝胶粒子后的溶解度的差异。如图 1.9 所示，沉淀聚合制备纳米水凝胶过程包括：齐聚自由基链 (Oligoradical Chain) 的形成 → 高分子链坍塌缠结成热力学不稳定的先驱粒子 (Precursor Particle)→ 链段聚集生长 (Growing Particle)→ 形成稳定的微凝胶 (Microgels)。沉淀聚合制备水性凝胶具有很多优点，例如可以得到粒径分布很窄的纳米凝胶 (100 nm 到 3μm)；可以调控反应单体用量、引发剂或表面活性剂用量等控制纳米凝胶粒径大小；能够很容易地引入其它功能性单体赋予凝胶多功能性和多响应性。然而，沉淀聚合方法也具有一定的局限性，例如聚合温度较高，只能使用耐热材料，生物大分子无法掺入到纳米凝胶中；不使用稳定剂的话，很难制备粒径小于 50 nm 的微凝胶。因此，在制备小粒径 PNIPAM-based 纳米凝胶的情况下，必须在聚合过程的早期阶段有效地稳定不断增长的前驱体颗粒。引发剂残基引入到聚合物链中不足以稳定前驱体粒子。在这种情况下，添加表面活性剂就能稳定前驱体粒子，通过聚

集将链增长降低，导致微凝胶尺寸减小[41]。本文所述的纳米水凝胶均采用沉淀聚合法并加入一定的表面活性剂制备。

1.3.3 PNIPAM-based 纳米水凝胶的结构分类

通过不同的合成方法，人们能够获得具有不同结构和定制属性的 PNIPAM-based 纳米水凝胶，如图 1.10 所示。根据本文的研究内容，主要介绍了无规共聚型纳米水凝胶的特点。

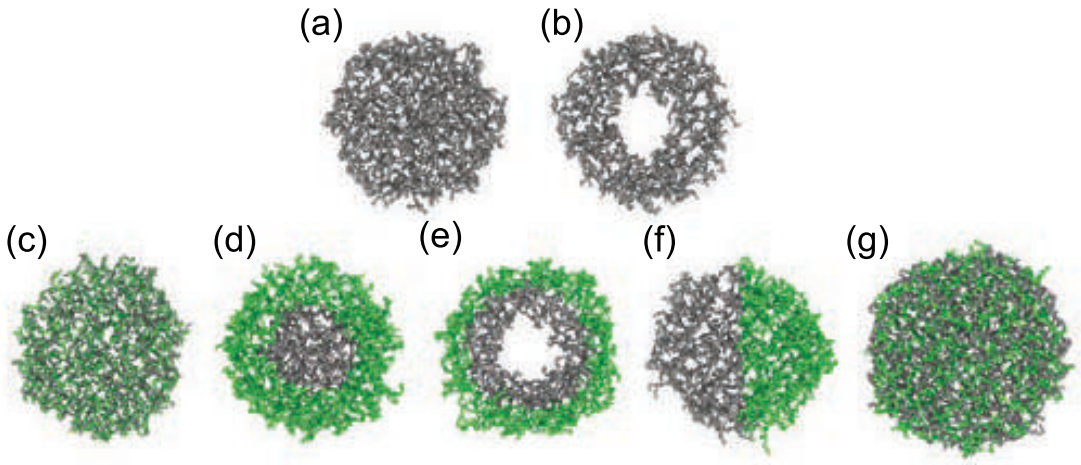


图 1.10: 常见的刺激响应型微凝胶结构有：(a) 单一组分微凝胶、(b) 中空微凝胶、(c) 无规共聚物微凝胶、(d) 核/壳微凝胶、(e) 多层核/壳微凝胶、(f) 两面结构微凝胶和 (g) 互穿网络微凝胶。源自文献[42]

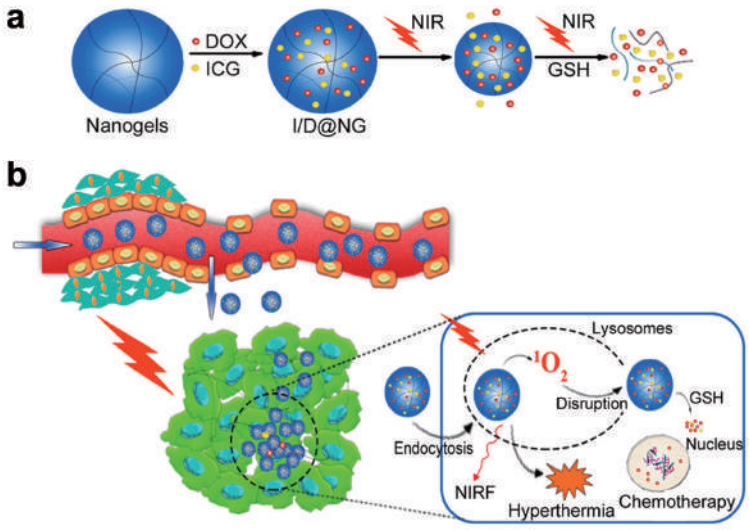


图 1.11: I/D@NG 纳米凝胶用于协同热化疗癌症的示意图。(a) I/D@NG 的表征；(b) I/D@NG 的 NIR 光诱导体内传输处理。源自文献[43]

PNIPAM-based 纳米水凝胶的 LCST 可以通过疏水和亲水单体之间的平衡改

变：添加亲水共聚单体可以提高热响应性聚合物的 LCST，而疏水共聚单体则具有相反的效果，LCST 向较低的温度移动。这种共聚方法得到的即为无规共聚型纳米水凝胶 (图 1.10 (c))。而且通过引入其他功能性单体，能够赋予水凝胶更多的刺激响应性。例如 Fuying Li 等人[43]基于 NIPAM 单体，引入亲水性的甲基烯丙基胺 (MAA) 和甲基丙烯酸磺基甜菜碱 (SBMA)，负载近红外 (NIR) 染料吲哚菁绿 (ICG) 和抗癌药物阿霉素 (DOX)，通过含二硫键的 *N,N′*-双 (丙烯酰基) 胱胺作为交联剂交联后得到两亲性且具有温度和氧化还原双重响应性的纳米凝胶 (I/D@NG)，如图 1.11 所示。纳米凝胶改善了近红外光诱导 ICG 的光热效应，局部加热导致促进药物释放的凝胶颗粒崩塌，粒径减小。同时，谷胱甘肽 (GSH) 对二硫化物交联剂的额外降解进一步诱导药物释放，纳米凝胶发挥了热化学疗法的协同作用，而且其光热效应有助于克服化学治疗剂的一系列体内生理障碍，产生优异的抗肿瘤作用。

1.4 热致交联纳米水凝胶概述

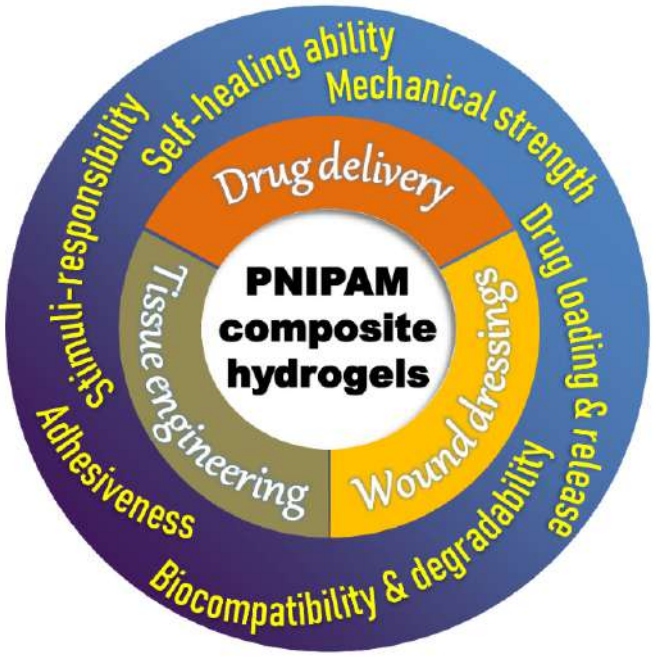


图 1.12: PNIPAM-based 复合水凝胶的应用领域以及复配可调节的性能。源自文献[44]

PNIPAM-based 温敏型水凝胶由于其优异的性能，在生物医药领域显示出巨大的应用潜力。然而，PNIPAM 凝胶在高于 LCST 的温度下会发生剧烈的体积收缩即相转变，这种塌陷导致大量水被排出, 这失去了水凝胶系统的许多益处，同时，它们也存在机械强度低、载药受限、生物可降解性差等缺点。利用 PNIPAM 与其它功能组分复配形成复合水凝胶是弥补上述缺陷的有效策略，具有较好的实用价值。基于 PNIPAM 的复合水凝胶在药物输送、组织工程和伤口敷料等领域

的应用研究，在设计适用的水凝胶系统时，生物相容性和生物降解性、载药和释药性能、机械强度、粘附性、刺激响应性和自愈能力等特性是对 PNIPAM-based 纳米水凝胶性能调节的重要考虑因素 (图 1.12)。

PNIPAM-based 纳米水凝胶在生物医学领域具有良好的应用前景，PNIPAM-based 纳米水凝胶也具有高度可塑性，高响应性，根据特定的应用，纳米水凝胶可以通过上述不同的方式加工调控结构，用以满足生物介质中的复杂情况，包括热致交联水凝胶 (遵循溶胶-凝胶转变)、胶体纳米凝胶和 3D 打印凝胶结构等。具有热致交联特性的原位/可注射纳米水凝胶在生物医学和医药领域的应用已引起了人们的广泛关注。因此，利用 PNIPAM 纳米水凝胶的温敏性和可塑性，实现可注射水凝胶成为基础研究和实际生物医学或药学应用中人们关注的焦点。

1.4.1 热致交联纳米水凝胶的定义及分类

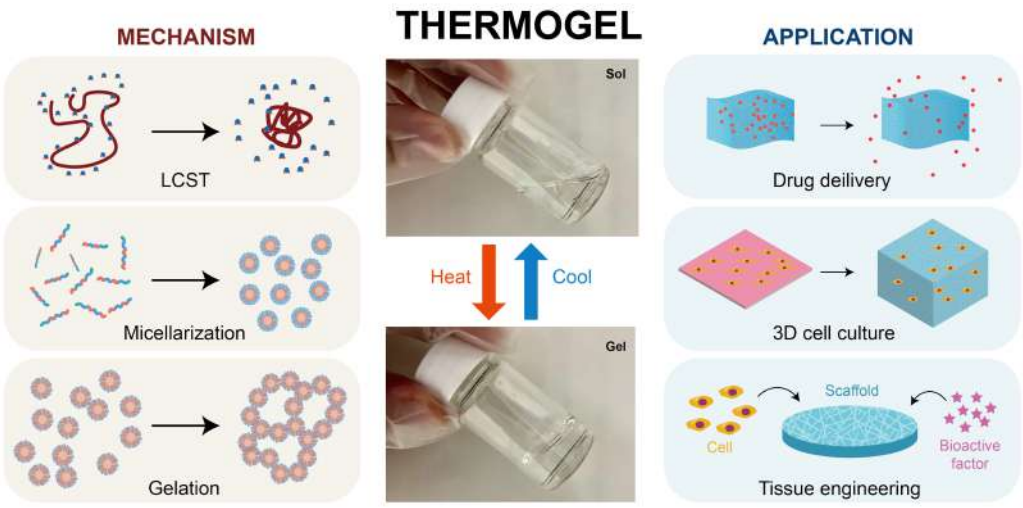


图 1.13: 热凝胶的凝胶特性及热凝胶系统在生物医学应用中的创新用途，包括药物输送、3D 细胞培养和组织工程等。源自文献[45]

热致交联纳米水凝胶 (Thermogelable nanogel) 是指在一定条件下能迅速从流动性良好的溶液状态转变为不可流动的固体/半固体状态的一类水凝胶。该过程即纳米水凝胶的原位溶胶-凝胶转变。温敏性热致交联水凝胶可以利用体温自发凝胶化，不需要任何额外触发机制，利用这一特点，利用温敏性热致交联纳米水凝胶在药物输送和组织工程等方面具有独特的应用前景。例如，用于靶向给药的可注射纳米水凝胶也属于热致交联水凝胶的范畴。可注射纳米水凝胶在给药前是流动的水溶液，生物活性分子或细胞可以在注射前简单地混合在一起，但一旦以最小的手术创伤 (通过针或导管的方式) 植入人体靶向部位后，在生理条件 (体温) 下就会迅速凝胶化，形成的凝胶便成为药物缓释的载体 (图 1.13)。根据交联作用，热致交联纳米水凝胶可分为物理交联水凝胶和化学交联水凝胶。

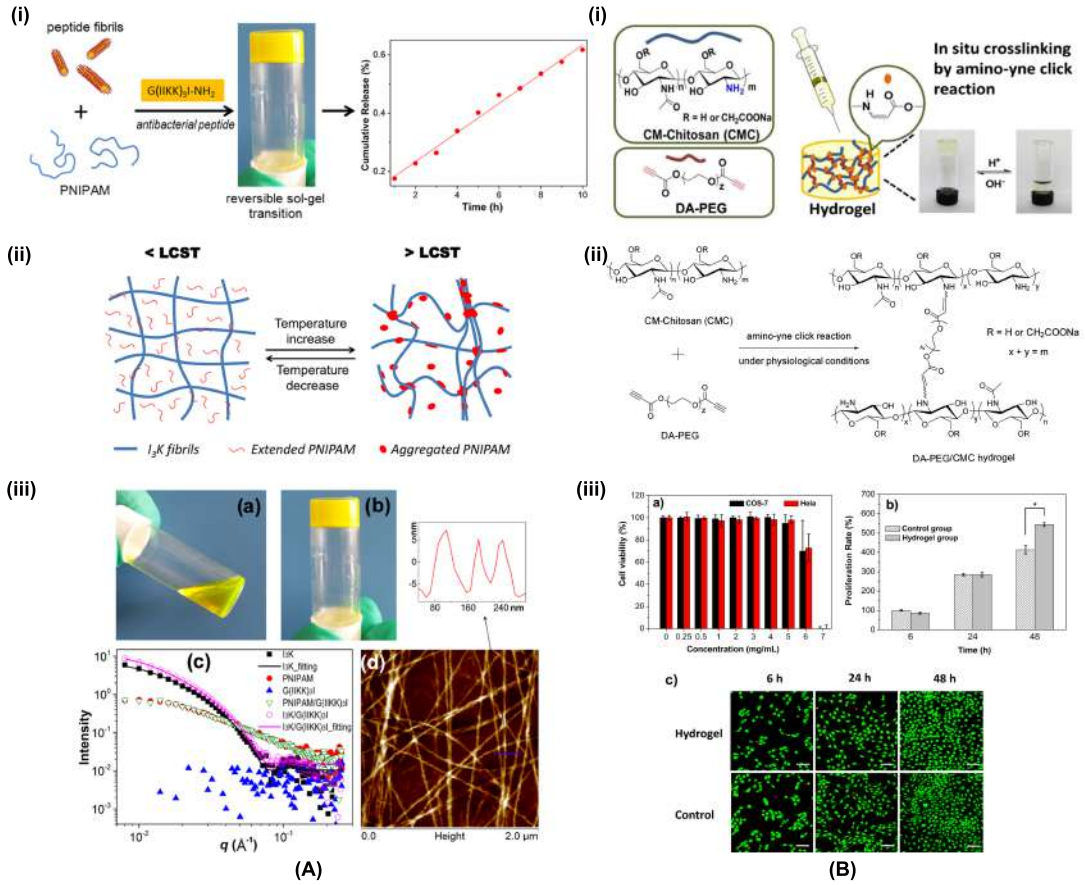


图 1.14: (A) (i) 可逆温敏肽 −PNIPAM 水凝胶的 $G(IIKK)_3I\text{-}NH_2$ 抗菌肽控释作用；(ii) 温度低于或高于 PNIPAM LCST 时 I_3K/PNIPAM 网络状态示意图；(iii) I_3K/PNIPAM 与 FITC-$G(IIKK)_3I\text{-}NH_2$ 混合溶液的溶胶-凝胶转变照片、SANS 散射曲线和 AFM 图像。源自文献[46] (B) (i) 羧甲基壳聚糖 (CMC) 与聚乙二醇二丙酸酯 (DA-PEG) 在温和条件下通过原位 Amino−Yne 点击反应形成 pH 响应性可注射水凝胶；(ii) 羧甲基壳聚糖与 DA-PEG 交联合成 DA-PEG/CMC 水凝胶；(iii) DA-PEG/CMC 的体外细胞毒性实验。源自文献[47]

热致物理交联纳米水凝胶是指由各种物理相互作用连接在一起的网络。物理交联水凝胶最大的特点是可逆性，物理凝胶化能避免某些化学凝胶中残留引发剂或单体的生物相容性问题，而且还能赋予材料可逆性、自愈性和刺激响应性等。例如 Meiwen Cao 等人[46]将 PNIPAM 加入到由短肽 I_3K 纳米纤维自组装而成的纤维纳米结构中，成功制备可逆热响应性溶胶-凝胶多肽水凝胶体系 (图 1.14 (A))。在 LCST 以上时，坍塌的 PNIPAM 分子形成物理交联，连接不同的多肽纳米纤维，冻结它们的运动并形成固化的 3D 网络，这种物理驱动的机制实现了溶胶和凝胶状态之间的可逆切换。同时，在溶胶相温度较低时将 $G(IIKK)_3I\text{-}NH_2$ 抗菌肽加入溶液，然后升高温度至 33 ℃ 以上凝胶化，可以方便地将抗菌肽包埋在水凝胶中，从而对 $G(IIKK)_3I\text{-}NH_2$ 抗菌肽具有持续、可控的线性释放，在微创药物输送或组织工程领域有较好的应用前景。

热致化学交联纳米水凝胶通常是指由组分之间的化学反应引起的原位聚合反应制备的网络。与物理交联不同，该过程是不可逆的。例如，Jiachang Huang等人[47]报道了一种在生理条件下不使用任何引发剂或催化剂，如图 1.14 (B) 所示，通过水溶性羧甲基壳聚糖 (CMC) 的氨基与聚乙二醇二丙酸酯 (DA-PEG) 的炔基之间简单且自发的 Amino−Yne 点击反应成功制备可注射可降解水凝胶 (DA-PEG/CMC)。Amino−Yne 点击反应对酸刺激敏感导致 DA-PEG/CMC 在 pH 诱导下能发生可逆的溶胶-凝胶转变，其凝胶时间、力学性能和降解速率可以通过 DA-PEG 和 CMC 的投料比和聚合物浓度调节。同时，DA-PEG/CMC 具有 pH 可控的药物释放行为和良好的细胞和组织相容性，在组织工程和其他生物医学领域具有潜在的应用前景。

1.4.2 热致交联纳米水凝胶的交联机制

热致交联纳米水凝胶的溶胶-凝胶化转变可以通过不同的驱动力形成，可以通过直接改变基材的物理化学性质或直接加速交联过程实现凝胶化，也可以通过刺激载体释放活性物质或交联物质从而引发凝胶化过程。根据交联相互作用，本文从物理交联机制和化学交联机制两方面简单介绍。

热致交联纳米水凝胶物理交联机制包含离子交联、氢键、疏水相互作用、主客体相互作用、π-π 堆叠交互作用等。与化学键相比，这些物理相互作用相对较弱，因此能实现可逆的溶胶-凝胶转变。离子交联水凝胶的原理之一是将可电离聚合物与反离子混合。这种离子交联可能是通过改变温度、pH 或离子浓度而引起的，通过调节聚合物或反离子的浓度，可以进一步通过聚合物的分子量和水凝胶的交联密度来控制水凝胶的机械性能。例如海藻酸盐，在加入阳离子供体氯化钙 ($CaCl_2$)，可以使藻酸盐中大量的有效羧基发生交联，形成水凝胶，它的力学性能可以通过增加基质中钙离子的含量而得到改善。另一种离子交联水凝胶的原理是两种带相反电荷的聚电解质结合在一起。两种电荷性质相反的聚电解质对凝胶剂浓度、温度、环境 pH 等十分敏感，在溶液中直接混合时具有强烈的离子相互作用，产生大聚集体的凝胶。

具有动态性的氢键也是制备热致交联纳米水凝胶的一种合适的交联策略，同时还可以赋予水凝胶热塑性、可再加工性和自愈合性能等。但是，水合作用可能会导致聚合物链段之间的氢键解离，氢键交联在高温下容易断裂，在水中的耐水性很差。

两亲性聚合物能够通过疏水缔合作用作为物理交联点形成水凝胶。两亲性聚合物的合成方式包括嵌段、无规共聚，或者用疏水侧基修饰亲水性大分子等。热凝胶性两亲嵌段共聚物根据嵌段数目通常可以分为双嵌段、三嵌段和多嵌段 (ABA 型、BAB 型、ABC 型和 BAC 型，其中 A 代表亲水嵌段，B 和 C 代表疏水

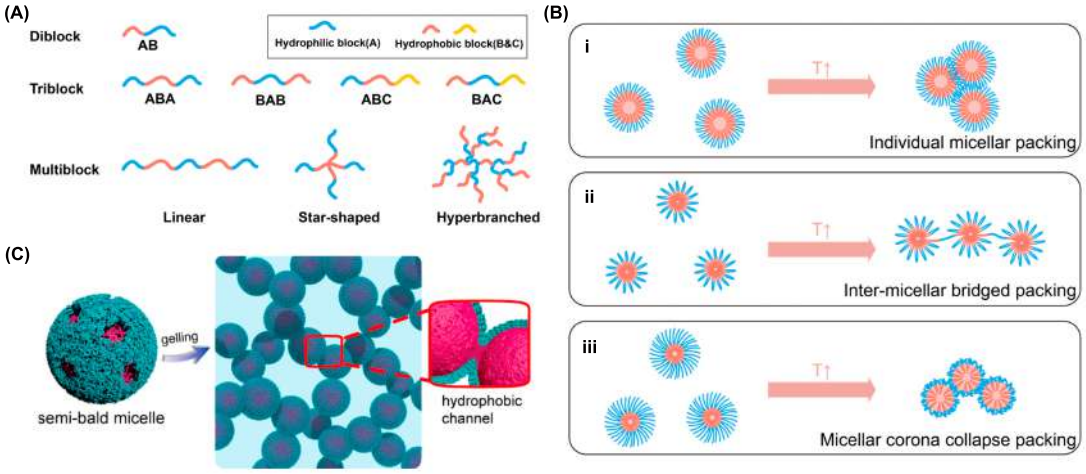


图 1.15: (A) 热凝胶共聚物的聚合物构型；(B) 不同热凝胶共聚物的胶束聚集类型：(i) 单独胶束堆积，(ii) 胶束间桥联堆积，(iii) 胶束电晕塌陷堆积；源自文献[45] (C) PEG/PLGA 热凝胶的 Semi-bald 模型。源自文献[48]

嵌段)，如图 1.15 (A) 所示。

只要热凝胶聚合物溶液达到临界胶束浓度 (从单体转变为胶束的最低浓度，CMC) 和临界胶束温度 (从单体转变为胶束的最低温度，CMT)，两亲性聚合物在水溶液中发生热力学上有利的独特自组装行为，即胶束化。在胶束形成后，其稳定性一般与共聚物的疏水性直接相关[49]，嵌段越疏水，胶束的疏水性越强，疏水核的积累越密集，胶束稳定性越高；同时，亲水段和疏水段的比例也很重要，亲水链段将疏水核包裹越好，胶束越稳定；另外，胶束间存在着链交换行为，嵌段长度和共聚物构型会影响胶束动力学和热力学，这都是影响胶束稳定性的重要因素。胶束化是两亲性热凝胶的基本自组装行为，热凝胶聚合物的最终胶凝机制归因于更宏观的热响应自组装行为，即胶束的聚集 (图 1.15 (B))。当临界凝胶浓度 (从胶束转化为水凝胶所需的最低浓度，CGC) 和临界凝胶温度 (从胶束转化为水凝胶所需的最低温度，CGT) 达到时，胶束开始紧密堆积在一起，形成三维网络，多孔网络结构将水包裹在内部，并且可以观察到溶胶到凝胶的转变。不同类型的热凝胶聚合物胶束的堆积略有不同，低分子量的二嵌段共聚物和 ABA 三嵌段共聚物一般发生单独的胶束堆积，如图 1.15 (B) i 所示，当温度升高时，疏水作用驱使胶束相互聚集，亲水部分的缠绕形成物理交联；BAB、BAC 三嵌段和多嵌段共聚物可能发生胶束间桥联堆积，如图 1.15 (B) ii 所示，聚合物链的疏水链段连接到两个或更多胶束上，在热凝胶中产生更强的缔合；PNIPAM 等 LCST 相对较低的共聚物上可能发生胶束 corona 堆积，如图 1.15 (B) iii 所示，塌陷的电晕胶束之间相互碰撞纠缠，导致快速聚集。两亲共聚物的胶束化现象很常见，但两亲共聚物的热凝胶化比较少见，其凝胶化机理受到聚合物分子量和链段结构组成等因素的严格限制，对于具有长亲水部分的两亲共聚物，松散的电晕堆积

阻止胶束聚集，只形成粘性溶液胶束而不表现出热凝胶行为。随着荧光共振能量转移 (FRET) 成像和计算机模拟技术的进步，热凝胶胶束之间的交联点逐渐被人们熟知，Shuquan Cui 等人[48]就利用这两种方法对聚 (乙二醇)/聚 (乳酸-乙醇酸) (PEG/PLGA) 二嵌段共聚物胶束聚集过程进行研究。他们认为共聚物胶束的外部 PEG 亲水段会发生收缩并折叠在一起形成半秃模型，疏水核暴露在秃区作为交联点，秃区将相邻的胶束紧密连接起来，形成疏水通道，使得热凝胶可以在大量水中保持其形状 (图 1.15 (C))。

主客体相互作用形成的复杂结构也是一种原位形成的物理交联，有利于热致交联纳米水凝胶的设计，其可逆性使得水凝胶在药物释放和组织工程中有广泛的用途。π-π 堆叠交互作用是芳香族化合物的一种特殊空间排列，通常发生在相对 π 电子丰富的基团和 π 电子缺乏的基团之间，电子云从富含电子的一侧流动，增加了贫电子一侧的电子密度。有两种常见的堆叠模式，即平面到平面和边到平面，利用一些亲水的氨基酸，如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸等是实现水凝胶中 π-π 堆积的常用基团，π-π 堆积作用有益于凝胶化的形成。

热致交联纳米水凝胶的化学交联机制包含 Michael 加成、点击化学、酶反应、光引发交联等。Michael 加成反应是指亲电共轭体系 (电子受体) 与亲核负碳离子 (电子供体) 的共轭加成反应，该反应在温和的条件下具有很高的选择性，目前更多的是合成端基丰富的超支化接枝大分子来制备热致化学交联水凝胶。点击化学的特点是反应快速，主要有四种类型，即环加成反应、亲核开环反应、非碱羰基化学和碳-碳多键加成反应。点击化学通常由特定的小单元连接而成，具有高产率和高选择性，可以获得高度交联的区域[50]。但是，这些反应需要引发剂或催化剂，阻碍了它们的生物活性应用，开发环境友好的生物材料热致交联纳米水凝胶具有重要意义，如前文 Jiachang Huang 等人[47]报道的。酶交联是促进蛋白质基热致交联纳米水凝胶的另一种交联机制，酶催化的热致交联水凝胶可能表现出更好的力学性能。从植物和动物来源提取的各种酶，如辣根过氧化物酶 (HRP)、葡萄糖氧化酶 (GOX) 等已被用来催化凝胶体系中共价交联的形成。

1.4.3 热致交联纳米水凝胶的体外质量评价

热致交联纳米水凝胶的体外质量评价包括凝胶化温度、凝胶化时间、体外释放度和生物相容性等。凝胶化温度，即纳米水凝胶从溶液状态转变为凝胶状态所需的最低温度，是评价温敏性纳米水凝胶凝胶化性能的重要评价方法。通过测定水凝胶随温度改变的模量变化，流变学方法常用来评价纳米水凝胶的凝胶化温度。在低温下损耗模量 G'' 大于储能模量 G'，凝胶表现为流体状态；当温度升高时，G' 大于 G''，凝胶表现为固态凝胶状，发生溶胶-凝胶转变过程，G' 等于 G'' 时的温度即为凝胶化温度。凝胶化时间，即在凝胶化温度下纳米水凝胶从溶液状

态转变为凝胶状态所需的时间，同凝胶化温度一样，凝胶化时间的测量大多通过流变学方法测得，G' 等于 G'' 时的时间即为凝胶化时间。

热致交联纳米水凝胶可用于药物递送领域，药物的体外释放表明药物活性成分从原位形成的凝胶载体中释放并且接受介质的过程，释放动力学模型主要用来预测体内药物释放时间以及更好地理解药物的释放机制和精确与否，常用的拟合模型有零级模型、一级模型及 Higuchi 模型等，与释放的成分和条件密切相关。热致交联纳米水凝胶的生物相容性 (细胞毒性和刺激性) 是评价其安全性的重要参数，一种良好的可注射热致交联纳米水凝胶应该是可生物降解的、可逐渐溶解的和可生物吸收的，生物毒性较低且生物相容性良好。

1.4.4 PNIPAM-based 热致交联纳米水凝胶的研究进展及应用

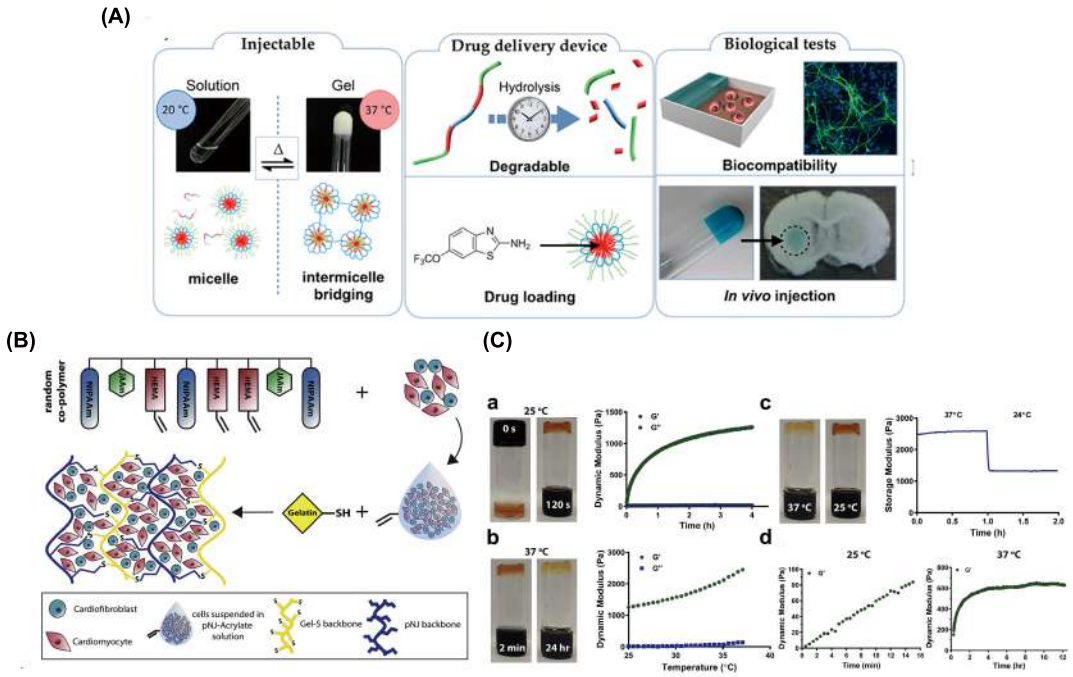


图 1.16: (A) PNIPAM-b-PLA-b-PEG-b-PLA-b-PNIPAM 五嵌段共聚物胶束与温度的关系。聚合物溶液在室温下呈单分散胶束，在生理温度下形成胶束间桥联。源自文献[51] (B) 微囊化 CMs 和 CFs 可注射 PNJ-明胶水凝胶制备工艺示意图；(C) 研究了 PNJ-Gelatin 水凝胶溶液在 (a) 室温 (25 °C，4 h)、升温速率 (0.5 °C/min) 和 (b) 持续加热 (37 °C，1h)，在 (c) 快速冷却过程中回到室温 (25 °C，1 h) 和 (d) 从 25 °C (制备温度) 到 37 °C (孵化温度)，PNJ-明胶杂化水凝胶的储能模量随温度变化的粘弹性行为。G'：储能模量，G''：损耗模量。源自文献[52]

PNIPAM 纳米水凝胶的 LCST 在 32～34 °C 之间，接近人体生理温度，对于人体生物医学领域是一种理想的热致交联材料。然而，纯 PNIPAM 纳米水凝胶由于凝胶粒子间的强静电排斥作用，保持高度稳定，在高于 LCST 时，PNIPAM 纳米

水凝胶粒径剧烈收缩，无法形成交联位点，同时分子间间距增加，浊度增加，粘度不发生明显改变，无法实现溶胶-凝胶转变。因此，NIPAM 常被用于功能性单体与其它单体结合构建 PNIPAM-based 热致交联纳米水凝胶。理想的 PNIPAM-based 热致交联纳米水凝胶应具有以下特点：(a) 为了保证可注射性，体系在注射前 (低温下) 处于溶液状态且具有足够低的粘度，这样才能使用针头注射，减轻注射时患者的疼痛；(b) 在温度高于 LCST 或其他条件改变时，化学交联或物理缔合溶胶-凝胶化转变过程在注入后开始发生或完成，形成不可流动的固态/半固态凝胶，并且这种转变是可逆的；(c) 凝胶体系应具有优异的生物相容性，应可生物降解或可逐渐溶解，产品应可生物再吸收；(d) 凝胶体系需要根据需求满足一些特定的要求，例如，用于药物释放系统时凝胶体系要具有缓释性能，并且自身结构不会破坏药物/细胞的活性；用于组织工程时凝胶体系应具有细胞粘附能力等。

在温和条件下 PNIPAM-based 热致交联纳米水凝胶因其良好的三维载体性能、生物相容性、低侵入性和给药适应性，在生物医学领域，特别是药物输送和组织工程领域受到人们的青睐。基于 PNIPAM 的药物输送智能热致交联纳米水凝胶已受到广泛研究。例如 Vincent Pertici 等人[51]以开环聚合/氮氧化物介导聚合 (ROP/NMP) 研制了一种可注射、可生物降解的水凝胶 (两亲性 PNIPAM-b-PLA-b-PEG-b-PLA-b-PNIPAM 五嵌段共聚物)。该水凝胶能在 30 ℃ 下从胶束状态通过聚乙二醇中心嵌段的胶束间桥联作用转变为凝胶状态。水凝胶通过聚乳酸酯类的水解发生降解，从而实现胶束核中预载药物的释放，这种将热凝胶化的 PNIPAM 微创注射与生物可降解聚合物控制药物释放相结合的策略已被广泛应用于构建药物传递系统 (图 1.16 (A))。

组织工程是利用细胞和组织作为药物直接治疗疾病和恢复局部功能的一个重要领域，PNIPAM-based 可注射热致交联纳米水凝胶在组织工程中常应用于软组织 (器官、肌腱、皮肤、肌肉、血管等) 和硬组织 (骨和软骨等) 领域。如图 1.16 (B) 和 (C) 所示，Ali Navae 等人[52]报道了一种生物杂化温度响应型 PNIPAM-明胶基可注射水凝胶 (PNJ-Gelatin)，PNIPAM 共聚物中明胶和丙烯酸酯中的硫醇可以引发 PNIPAM 的化学凝胶化和二次物理交联。该水凝胶具有优异的生物活性和机械稳定性，可用于建心脏组织支架。心肌细胞 (CM) 以及与心肌成纤维细胞 (CF) 等生物学分析结果表明合成的 PNJ-Gelatin 生物杂化水凝胶能提供合适的微环境来支持心肌细胞的功能，最终促进受损心肌的修复和再生。

1.5 本课题的提出

智能/刺激响应型纳米水凝胶是一种结合了水凝胶和纳米材料特性的且在生物微环境中单个或多个刺激条件作用下发生自身化学/物理性质不同程度改变的高分子聚合物，具有高含水量、高溶胀性和机械可调性、良好的生物相容性和凝

胶结构高度可设计性等特点。其中，具有温度响应性的 PNIPAM 纳米水凝胶由于优异的性能被广泛研究，基于 PNIPAM 纳米水凝胶制备具有溶胶-凝胶转变特性的热致交联纳米水凝胶已成为生物医学等研究领域的热点。

1.5.1 研究目的及意义

PNIPAM 纳米水凝胶具有接近人体生理温度的 LCST，良好的三维网络载体性能、高含水性、良好的生物相容性等特性，成为理想的热致交联可注射医用材料。然而，纯 PNIPAM 纳米水凝胶在高于 LCST 时会发生剧烈的相变行为，导致大量的水被排出，粒径剧烈收缩无法形成交联位点，浊度变大凝胶从蓝色变为白色，消除了水凝胶体系的许多优点且无法实现溶胶-凝胶转变。理想的热致交联可注射纳米水凝胶应在注射前 (低温) 下处于溶液状态且粘度较低，这样才能保持微创注射，减轻疼痛感。在注射后，凝胶体系随着温度或其它生理条件改变，发生物理或化学交联缔合从溶液转变为不可流动的固态/半固态凝胶。并且，该凝胶体系应具有优异的生物相容性和生物降解性等特点。凝胶化的温度和速率以及其它特定应用条件也是需要考虑的因素。因此，NIPAM 常被用于功能性单体与其它单体结合构建 PNIPAM-based 可注射热致交联纳米水凝胶。

官能团的引入和凝胶网络结构的合理调整和设计可以调节 PNIPAM 聚合物的热行为，使其溶胶-凝胶转变成为可能。然而，目前绝大多数的基于 PNIPAM 制备的 PNIPAM-based 热致交联纳米水凝胶基于嵌段型纳米水凝胶、接枝型纳米水凝胶、支化和线型纳米水凝胶等，虽然这类热致交联水凝胶能实现较好的溶胶-凝胶转变，具有一定的机械性能且能用于药物递送、组织工程等领域，但是它们的合成方法大多基于可控/“活性”自由基聚合，包括氮氧稳定自由基法、引发转移终止剂法 (Iniferter)、原子转移自由基聚合 (ATRP)、可逆加成-断裂转移法 (RAFT) 法等，这些方法大大提高了聚合反应和聚合产物的结构可控性，分子设计能力强，但是需要经过复杂的制备过程，使用高分子催化剂和链转移剂，增加了合成成本，并且可能影响聚合物的纯度和增加毒性；虽然无规聚合物也能制备 PNIPAM-based 热致交联纳米水凝胶且不涉及复杂的反应过程，但它们中的大多数需要较高的聚合物浓度 (>10 wt%) 或需要额外的添加剂 (如盐等) 才能实现溶胶-凝胶转变；溶胶-凝胶转变也可以通过互穿 PNIPAM 凝胶网络中的另一个网络来实现，以降低高于相变温度的收缩程度，并通过疏水相互作用保持水凝胶之间的相互接触，然而，这种互穿网络在相变温度以上的收缩程度很小 (小于 10%)，这大大降低了水凝胶的温度响应性。由于 PNIPAM 纳米水凝胶体系通常需要在疏水性和亲水性之间取得微妙的平衡才能实现溶胶-凝胶转变，因此，开发一种合成步骤简单、所需凝胶浓度较低且不添加额外的盐或其他添加剂的方法制备 PNIPAM-based 热致交联可注射纳米水凝胶对推进其在生物领域的实际应用具有

一定的意义和挑战性。

1.5.2 主要研究内容

疏水缔合是构建稳定水凝胶的中心交联单元，疏水单元聚集成胶束核作为交联点，增加疏水胶束形成链的长度有利于凝胶的形成。理论上，适当的疏水-亲水平衡可以形成被亲水聚合物链段包围的疏水结构域。如果聚合物之间的相互作用占主导地位，即使是无规共聚物，也会进一步诱导溶胶-凝胶转变。通过与疏水单体共聚来增强疏水缔合，稳定聚合物间的相互作用，是促进 PNIPAM 凝胶化的有效方法。本文通过乳液沉淀聚合方法制备了三种能实现可逆的溶胶-凝胶转变的温敏性二元共聚纳米水凝胶。对合成凝胶的结构及凝胶化性能进行表征，探究了单体用量、乳化剂和交联剂对三种水凝胶粒径及凝胶化性能的影响。此外，从分子角度探究了纳米水凝胶的凝胶化机理和引入疏水性单体侧基的空间位阻对热致物理交联纳米水凝胶溶胶-凝胶转变的影响。最后，考察了三种纳米水凝胶的可注射性能和体外细胞毒性，证明三种纳米水凝胶在生物医学领域具有较好的应用潜力。主要工作如下：

(1) 通过酰氯化反应合成了三种结构与 NIPAM 类似的疏水性单体，利用乳液沉淀聚合法，将三种疏水性单体分别与 NIPAM 共聚，改变了合成的条件，得到一系列 PNPE、PNPA 和 PNCH 温敏性共聚纳米水凝胶。通过动态光散射 (DLS)、核磁氢谱 (^{1}H NMR)、红外 (FT-IR)、扫描电镜 (SEM)、透射电镜 (TEM) 等对合成水凝胶的结构及性能进行表征，探究了不同单体配比、乳化剂 SDS 和交联剂 BIS 对纳米水凝胶的粒径、粒径分布、相变行为以及凝胶化行为的影响。

(2) 为了探究不同空间位阻的侧链疏水基团苯乙基、苯基和环己基的引入对 PNIPAM-based 纳米水凝胶温度响应相变的影响，利用变温 ^{1}H NMR、变温 FT-IR 对 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶的凝胶化机理进行了探究。同时，利用微扰相关移动窗口 (PCMW) 和二维相关光谱 (2Dcos) 研究了三种纳米水凝胶的突变温度、相变范围和温度扰动顺序。从分子结构的角度揭示空间位阻和立体结构对共聚纳米水凝胶溶胶-凝胶转变的影响。

(3) 通过流变学测试表征了三种纳米水凝胶的剪切储存模量 (G') 和损耗模量 (G'') 随温度和时间的变化。同时探究了纳米水凝胶的可注射性能和生物相容性，证明三种纳米水凝胶的生物医学应用潜力。

第二章　温敏性共聚纳米水凝胶的制备及溶胶-凝胶转变条件探究

2.1　引言

环境刺激响应性纳米水凝胶是一类高度交联的聚合物，具有良好的保水性能，可以根据外界刺激 (如温度、pH、酶、氧化剂或还原剂以及电场或磁场) 可逆地改变其溶解性、体积、形状和构象[53-55]。由于具有可控性、靶向性和缓释性、高载药量和良好的渗透性、生物相容性和生物降解性，刺激响应纳米水凝胶已被广泛应用于热致交联可注射水凝胶体系[56]。因此，在生物医学领域，热致交联可注射水凝胶被广泛用于 3D 细胞支架[57]、组织工程[58]、药物和基因传递[7,59]、伤口愈合[60]等。通常，原位形成的水凝胶有两种类型，即化学交联水凝胶[61]和物理交联水凝胶[62]。与化学交联的不可逆宏观水凝胶不同，物理交联的温敏性水凝胶受各种物理相互作用 (如疏水作用、氢键作用和静电相互作用等) 并且可以响应温度在液体和固体状态之间可逆地切换[63]。

作为一种典型的热敏水凝胶，PNIPAM 是原位形成物理交联水凝胶的理想材料。PNIPAM 在 LCST (～32 ℃[64]) 附近迅速发生可逆的线团到微球的转变，这种剧烈的相转变行为消除了水凝胶体系的许多优点[65]。以前的工作已证明引入官能团和合理调整和设计凝胶网络结构可以调节 PNIPAM 基聚合物的热行为，使其能够凝胶化。然而，目前基于 PNIPAM 的热凝胶化水凝胶大多具有一定局限性。因此通过简单的合成步骤、较低的凝胶化浓度和不添加额外的盐或其他添加剂来实现 PNIPAM 纳米水凝胶的热凝胶化的报道很少。疏水缔合作用是构建稳定水凝胶的中心交联单元，增加疏水单元聚集成胶束核作为交联点的数量和疏水胶束形成链的长度有利于凝胶的形成[66]。理论上，适当的疏水-亲水平衡可以形成被亲水聚合物链段包围的疏水结构域，如果聚合物之间的相互作用占主导地位，即使是无规共聚物，也会进一步诱导溶胶-凝胶转变[66-68]。通过与疏水单体共聚来增强疏水缔合，稳定聚合物间的相互作用，是促进 PNIPAM 凝胶化的有效方法。同时，疏水域的形成与共聚物凝胶中单体的空间位阻和立体结构密切相关。引入侧基形成的空间位阻和疏水部分之间的分子间相互作用，弱化了聚合物内部的相互作用，能对纳米水凝胶在相变附近的水化和结构行为产生重要的影响[69]。因此利用更简单的合成方法，在不添加额外的盐或其他添加剂的情况下，制备较低凝胶化浓度的热致物理交联纳米水凝胶是本文的目的。

在本章中，我们尝试合成与 NIPAM 结构类似的丙烯酰胺单体，通过与 NIPAM 简单的共聚，期望制备热致物理交联共聚纳米水凝胶。首先通过酰氯反应制备了不同的疏水性单体：PEAA、PAA 和 CHAA。通过 ^{1}H NMR 和 FT-IR 等方法表征了单体的结构，证明单体成功合成。然后利用合成的单体与 NIPAM 二元共

聚，利用一锅法成功制备了无须添加额外的盐或其他添加剂的热致物理交联纳米水凝胶：P(NIPAm-co-PEAA) (PNPE)、P(NIPAm-co-PAA) (PNPA) 和 P(NIPAm-co-CHAA) (PNCH)。制备了不同疏水性单体比例、不同乳化剂 SDS 和交联剂 BIS 添加量的一系列纳米水凝胶，期望能调整比例实现热致溶胶-凝胶转变。通过纳米水凝胶的 SEM、TEM 图像和 DLS 测试，探究了单体配比、乳化剂和交联剂对共聚纳米水凝胶粒径、分散性、凝胶化浓度和凝胶化温度等影响。

2.2 实验试剂及实验仪器

2.2.1 实验试剂

本章所用实验试剂如表 2.1 所示。

表 2.1: 实验试剂

试剂名称	供应商	纯度	英文或简称
苯乙胺	Innochem (Beijing)	98%	Phenethylamine
苯胺	Shanghai Jiachen Chemical Co., Ltd	≥99%	Aniline
环己胺	Sigma-Aldrich Co., Ltd, China	≥99%	Cyclohexylamine
丙烯酰氯	Sigma-Aldrich Co., Ltd, China	98%	Acryloyl chloride
三乙胺	Shanghai Titan Scientific Co., Ltd	≥99%	Triethylamine
二氯甲烷	Shanghai Titan Scientific Co., Ltd	≥99.5%	DCM
正己烷	Sigma-Aldrich Co., Ltd, China	AR	Hexane
乙酸乙酯	Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd	AR	EA
乙醇	Shanghai Titan Scientific Co., Ltd	≥99%	Ethanol
N-异丙基丙烯酰胺	Sigma-Aldrich Co., Ltd, China	97%	NIPAM
N,N'-亚甲基双丙烯酰胺	Sigma-Aldrich Co., Ltd, China	AR	BIS
过硫酸铵	Sigma-Aldrich Co., Ltd, China	>99%	APS
十二烷基硫酸钠	Sigma-Aldrich Co., Ltd, China	≥99%	SDS
氢氧化钠	Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd	≥96%	NaOH
盐酸	Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd	AR	HCl
透析袋	Shanghaiyuanye Bio-Technology Co., Ltd		

2.2.2 实验仪器

本章所用实验仪器如表 2.2 所示。

表 2.2: 实验仪器

仪器名称	型号	厂商
恒温水浴磁力搅拌仪	PUREDU	上海普渡生化有限公司
集热式恒温加热磁力搅拌器	DF101-S	上海豫华仪器有限公司
分析天平	AL204	美国 Mettler Toledo 仪器公司
超声震荡仪	B3510E	美国 Branson 有限公司
超纯水机	DIRECT-Q 3 UV	德国 Merck Millipore 公司
冷冻干燥机	K775X	美国 Quorum 有限公司
动态激光光散射 (DLS)	BI-200SM	美国 Brookhaven 公司
透射电镜 (TEM)	JEM-2100	日本 Hitachi 公司
傅里叶变换红外光谱仪	Spectrum Two	美国珀金埃尔默仪器有限公司
全数字化核磁共振谱仪	avance3hd600mhz	美国 Bruker 公司

2.3 疏水性单体的合成及表征

2.3.1 疏水性单体的合成

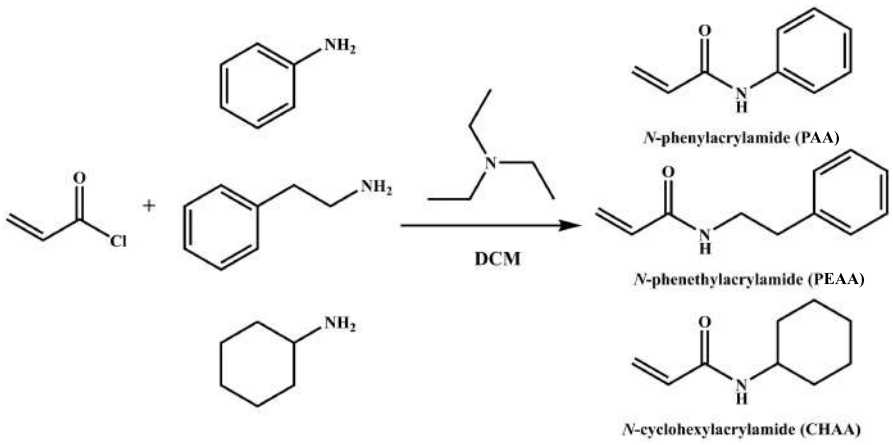


图 2.1: 疏水性单体 PEAA、PAA 和 CHAA 的合成示意图

三种疏水性单体的合成方法如图 2.1 所示。PEAA 的具体的合成方法：将苯乙胺 (2.42 g, 20 mmol) 装在 50 mL 圆底烧瓶中，并溶于无水二氯甲烷 (25 mL) 中。将混合溶液冷却至 0 ℃ (冰/水)。向冷却的烧瓶中加入无水三乙胺 (2.12 g, 21 mmol)，然后加入丙烯酰氯溶液 (1.90 g, 21 mmol) 丙烯酰氯溶于 5 mL 无水二氯甲烷 (DCM) 中。将混合物在 4 ℃ 下搅拌 3 h，然后加热至室温，用 1 M 盐酸溶液 (30 mL) 淬灭, 萃取有机相，用 1 M 氢氧化钠 (30 mL) 和盐水 (30 mL) 洗涤, 用无水 $NaSO_4$ 干燥, 浓缩得到橙色油状物质。粗混合物通过硅胶柱色谱法 (6 : 1 正己烷: 乙酸乙酯) 洗脱, 得到浅黄色油 (产率 2.86 g, 81.7%)。

PAA 的合成过程同 PEAA 类似，将苯乙胺换成苯胺 (1.86 g, 20 mmol)。用 1 : 20 的乙酸乙酯：石油醚混合物重结晶得到白色固体 (2.28 g, 产率 77.6%)。

CHAA 的合成以环己胺 (1.98 g, 20 mmol) 开始。粗混合物通过硅胶柱色谱法 (5 : 1 正己烷: 乙酸乙酯) 洗脱, 得到白色固体 (2.45 g, 产率 80%)。

2.3.2 疏水性单体的表征

疏水性单体的结构通过核磁氢谱和红外光谱表征。使用全数字化核磁共振谱仪 (avance3hd600mhz) 测试三种单体的 ^{1}H NMR 谱图。一般称取 10 mg 样品置于 5 mm NMR 专用样品管中，根据样品的溶解性选择合适的氘代试剂 (0.5 mL) 溶解样品后测试。

单体的红外光谱是在傅立叶红外光谱仪 (Spectrum Two) 上采用 KBr 压片法得到的。样品为干燥粉末或可以研磨成粉末，用量 1～2 mg。扫描次数为 16 次，分辨率为 4 cm^{-1}，在 4000～400 cm^{-1} 的范围内进行红外光谱扫描。

2.4 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶的制备

2.4.1 不同单体配比的 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶的制备

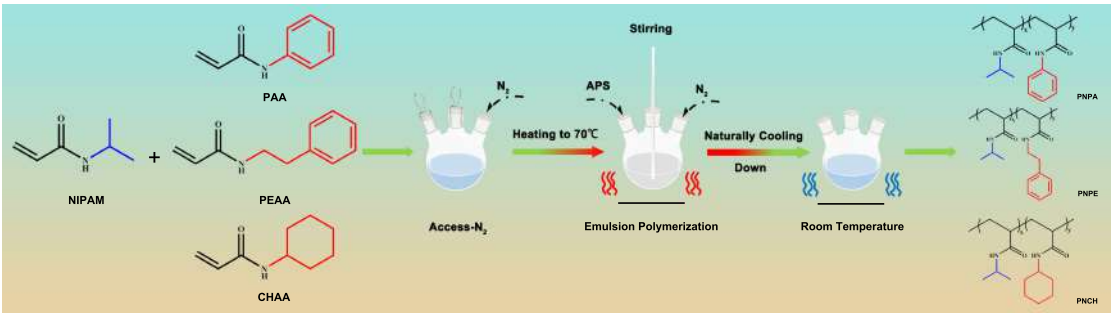


图 2.2: PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶的合成示意图

表 2.3: 不同单体配比 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶的制备配方

Sample	NIPAM/g	PEAA/g	BIS/g	SDS/g	APS/g	H_2O/g
PNPE 1	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PNPE 3	1.075 (95 mol%)	0.053 (3 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PNPE 5	1.052 (93 mol%)	0.088 (5 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PNPE 7	1.030 (91 mol%)	0.123 (7 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PNPE 10	0.996 (88 mol%)	0.175 (10 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PNPE 14	0.951 (84 mol%)	0.245 (14 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100

通过乳液沉淀聚合法合成了 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶，合成示意图如图 2.2 所示。将共聚单体 (NIPAM、PEAA 和 BIS) 和 SDS (0.05 g, 2 mmol) 溶于超纯水 (100 mL) 中。进料中的总单体为 10 mM, 而共聚单体的摩尔比 (100-x/x/2) (NIPAM/PEAA/BIS) 根据所需的 PEAA 含量而变化。在 70 ℃ 的氮气保护下，使用 APS 引发聚合 4 h, 将产物冷却到室温终止反应，并用去离子水透析一周以除去表面活性剂和未反应的分子。每天更换透析水 3 次。根据 PEAA 占进料中总单体含量的比例，所得的 PNPE 纳米水凝胶分别表示为 PNPE1, PNPE3, PNPE5, PNPE7, PNPE10 和 PNPE14。表 2.3 列出了详细的合成配方。

2.4.2 不同乳化剂用量的 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶的制备

乳化剂用量能影响凝胶体系的稳定性和粒径大小，对溶胶-凝胶转换也有着巨大的影响。为了探究 SDS 对凝胶凝胶化的影响，控制 NIPAM 与单体等比例 NIPAM：PEAA：BIS=97：1：2。添加不同用量的乳化剂 SDS 分别溶于 100 mL 超纯水中，具体配方见表 2.4。根据添加的 SDS 量，所得的 PNPE 纳米水凝胶分别表示为 PES-0, PES-0.02, PES-0.05, PES-0.1, PES-0.15 和 PES-0.2。

表 2.4: 不同乳化剂用量的 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶的制备配方

Sample	NIPAM/g	PEAA/g	BIS/g	SDS/g	APS/g	H_2O/g
PES- 0	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0	0.05	100
PES-0.02	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.02	0.05	100
PES-0.05	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PES- 0.1	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.1	0.05	100
PES-0.15	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.15	0.05	100
PES- 0.2	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.2	0.05	100

2.4.3 不同交联剂含量的 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶的制备

同样地，为了探究交联剂 BIS 对纳米水凝胶凝胶化的影响，制备了不同交联剂含量的凝胶。具体配方如表 2.5 所示，根据添加的 BIS 量，所得的 PNPE 纳米水凝胶分别表示为 PEB-0.02, PEB-0.06, PEB-0.1, PEB-0.15, PEB-0.2 和 PEB-0.3。

表 2.5: 不同交联剂含量的 P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶的制备配方

Sample	NIPAM/g	PEAA/g	BIS/g	SDS/g	APS/g	H_2O/g
PEB-0.02	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.02	0.05	0.05	100
PEB-0.06	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.06	0.05	0.05	100
PEB- 0.1	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.1	0.05	0.05	100
PEB-0.15	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.15	0.05	0.05	100
PEB- 0.2	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.2	0.05	0.05	100
PEB- 0.3	1.098 (97 mol%)	0.018 (1 mol%)	0.3	0.05	0.05	100

2.5 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的制备

2.5.1 不同单体配比的 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的制备

P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的合成过程与 P(NIPAM-co-PEAA) 体系类似，如图 2.2 所示。根据 PAA 占进料中总单体含量的比例，所得的 PNPA 纳米水凝胶分别表示为 PNPA1, PNPA3, PNPA5, PNPA7, PNPA10 和 PNPA14。不同 PAA 单体含量的 PNPA 水凝胶配方如表 2.6 所示。

表 2.6: 不同单体配比 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的制备配方

Sample	NIPAM/g	PAA/g	BIS/g	SDS/g	APS/g	H_2O/g
PNPA 1	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PNPA 3	1.075 (95 mol%)	0.044 (3 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PNPA 5	1.052 (93 mol%)	0.074 (5 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PNPA 7	1.030 (91 mol%)	0.103 (7 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PNPA 10	0.996 (88 mol%)	0.147 (10 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PNPA 14	0.951 (84 mol%)	0.206 (14 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100

2.5.2 不同乳化剂用量的 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的制备

不同乳化剂用量的 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶控制 NIPAM 与单体等比例 NIPAM：PAA：BIS=97：1：2, 具体配方见表 2.7。根据添加的 SDS 量，所得的 PNPA 纳米水凝胶分别表示为 PAS-0, PAS-0.02, PAS-0.05, PAS-0.1, PAS-0.15 和 PAS-0.2。

表 2.7: 不同乳化剂用量的 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的制备配方

Sample	NIPAM/g	PAA/g	BIS/g	SDS/g	APS/g	H_2O/g
PAS- 0	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0	0.05	100
PAS-0.02	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.02	0.05	100
PAS-0.05	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
PAS- 0.1	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.1	0.05	100
PAS-0.15	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.15	0.05	100
PAS- 0.2	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.2	0.05	100

2.5.3 不同交联剂含量的 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的制备

不同交联剂含量的 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶控制 NIPAM 与单体等比例 NIPAM : PAA=97 : 1, 具体配方见表 2.8。根据添加的 BIS 量，所得的 PNPA 纳米水凝胶分别表示为 PAB-0.02, PAB-0.06, PAB-0.1, PAB-0.15, PAB-0.2 和 PAB-0.3。

表 2.8: 不同交联剂含量的 P(NIPAM-co-PAA) 纳米水凝胶的制备配方

Sample	NIPAM/g	PAA/g	BIS/g	SDS/g	APS/g	H_2O/g
PAB-0.02	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.02	0.05	0.05	100
PAB-0.06	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.06	0.05	0.05	100
PAB- 0.1	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.1	0.05	0.05	100
PAB-0.15	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.15	0.05	0.05	100
PAB- 0.2	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.2	0.05	0.05	100
PAB- 0.3	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.3	0.05	0.05	100

2.6 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶的制备

2.6.1 不同单体配比的 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶的制备

P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶合成过程同 PNPE 体系类似，如图 2.2 所示。根据 CHAA 占进料中总单体含量的比例，所得的 PNCH 纳米水凝胶分别表示为 PNCH1, PNCH3, PNCH5, PNCH7, PNCH10, PNCH13 和 PNCH16。不同 CHAA 单体含量的 PNCH 凝胶配方如表 2.9 所示。

表 2.9: 不同单体配比 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶的制备配方

Sample	NIPAM/g	CHAA/g	BIS/g	SDS/g	APS/g	H_2O/g
PNCH 1	1.098 (97 mol%)	0.015 (1 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.02	0.05	100
PNCH 3	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.02	0.05	100
PNCH 5	1.052 (93 mol%)	0.077 (5 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.02	0.05	100
PNCH 7	1.030 (91 mol%)	0.107 (7 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.02	0.05	100
PNCH 10	0.996 (88 mol%)	0.153 (10 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.02	0.05	100
PNCH 13	0.962 (85 mol%)	0.199 (13 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.02	0.05	100
PNCH 16	0.928 (82 mol%)	0.245 (16 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.02	0.05	100

2.6.2 不同乳化剂用量的 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶的制备

不同乳化剂用量的 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶控制 NIPAM 与单体等比例 NIPAM : CHAA : BIS=95 : 3 : 2, 具体配方见表 2.10。根据添加的 SDS 量，所得的 PNCH 纳米水凝胶分别表示为 CHS-0, CHS-0.02, CHS-0.05, CHS-0.1, CHS-0.15 和 CHS-0.2。

表 2.10: 不同乳化剂用量的 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶的制备配方

Sample	NIPAM/g	CHAA/g	BIS/g	SDS/g	APS/g	H_2O/g
CHS- 0	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.02 (2 mol%)	0	0.05	100
CHS-0.02	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.02	0.05	100
CHS-0.05	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.05	0.05	100
CHS- 0.1	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.1	0.05	100
CHS-0.15	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.15	0.05	100
CHS- 0.2	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.02 (2 mol%)	0.2	0.05	100

2.6.3 不同交联剂含量的 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶的制备

不同交联剂含量的 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶控制 NIPAM 与单体等比例 NIPAM : CHAA=95 : 3, 具体配方见表 2.11。根据添加的 BIS 量，所得的 PNCH 纳米水凝胶分别表示为 CHB-0.02, CHB-0.06, CHB-0.1, CHB-0.15, CHB-0.2 和 CHB-0.3。

表 2.11: 不同交联剂含量的 P(NIPAM-co-CHAA) 纳米水凝胶的制备配方

Sample	NIPAM/g	CHAA/g	BIS/g	SDS/g	APS/g	H_2O/g
CHB-0.02	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.02	0.05	0.05	100
CHB-0.06	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.06	0.05	0.05	100
CHB- 0.1	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.1	0.05	0.05	100
CHB-0.15	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.15	0.05	0.05	100
CHB- 0.2	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.2	0.05	0.05	100
CHB-0.3	1.075 (95 mol%)	0.046 (3 mol%)	0.3	0.05	0.05	100

2.7 纳米水凝胶的表征方法

2.7.1 傅里叶变换衰减全反射红外光谱 (ATR-FTIR) 表征

红外光谱测试纳米水凝胶的结构。使用真空冷冻干燥机将待测试的纳米水凝胶进行冷冻干燥后收集样品。样品用傅立叶红外光谱仪 (Spectrum Two) 进行测试得到样品的红外光谱。扫描次数为 16 次，分辨率为 4 cm^{-1}，扫描范围为 4000～500 cm^{-1}。

2.7.2 透射电镜 (TEM) 表征

使用透射电子显微镜 (JEM-2100, 日本) 观察了纳米水凝胶的微观形貌及其尺寸大小。制样时将透析好的凝胶用超纯水稀释 200～500 倍后进行 TEM 测试。

2.7.3 粒径及分散性表征

使用 BI-9000 AT 数字时间相关器 (DLS, BI-200SM Brookhaven) 测量了纳米水凝胶的尺寸 (D_h) 和尺寸分布 (PDI) 以及对温度的响应特性。制样时，取一定量上述经透析纯化后的纳米水凝胶，加入超纯水中稀释至约 1.0 x 10^{-5} wt%。实验选择的激光波长为 532 nm, 散射角度为 90°，为保持所有样品测试时未发生相变，恒温测试时温度为 5 ℃；变温测试时温度为 5～44 ℃，以 3 ℃ 为增量。为了确保每个数据的准确性每个样品在测试前保持恒温 10 min，每个温度点测试 3 次，并选取测试结果的平均值作为最终的 D_h。其中，样品的粒径收缩率可由以下公式计算：

$$X\% = \left(D_h^{t2} - D_h^{t1}\right) / D_h^{t1} \tag{1}$$

其中，D_h^t 表示为温度为 t 时测得的粒径 D_h。

2.7.4 临界凝胶化温度和浓度表征

合成的纳米水凝胶能在一定的浓度范围内实现溶胶-凝胶的转变。最低的凝胶化浓度对本文具有讨论意义。将 1～2 滴纳米水凝胶放入折好的铝箔纸小盒中，在烘箱中高温烘干后能测得该纳米水凝胶的固含率。固含率计算公式为：

$$\text{固含率 wt\%} = \left(\frac{m_2 - m}{m_1 - m}\right) * 100 \tag{2}$$

其中 m 表示空铝箔纸小盒的质量，m_1 表示小盒加入凝胶后的质量，m_2 表示烘干后小盒加凝胶的质量。每个样品至少测试三次，取三次固含率的平均值为该纳米水凝胶的固含率。

采用试管倒置法[70]测定纳米水凝胶是否能实现溶胶-凝胶转变。具体地，将适量已知固含率的纳米水凝胶装入小试管或样品瓶中，置于恒温箱内 (精度 ± 0.1 ℃)，以 1 ℃/min 的升温速率将样品从 20 ℃ 升温至 40 ℃，在每个温度点下保温 5 min，确保样品温度恒定。然后将试管倒置，若纳米水凝胶此时不流动，则认为该样品能实现溶胶-凝胶转变，该温度可粗略的认为为该样品的临界凝胶化温度 (T_{gel})。同样地，在设定温度为 30 ℃ 的恒温烘箱内保温 5 min 后能从流体转变为凝胶状则视为能够凝胶化。逐渐加去离子水稀释至恒温后不能凝胶化，即为 30 ℃ 下该凝胶的临界凝胶化浓度。

2.8 结果与讨论

2.8.1 疏水性单体的结构表征

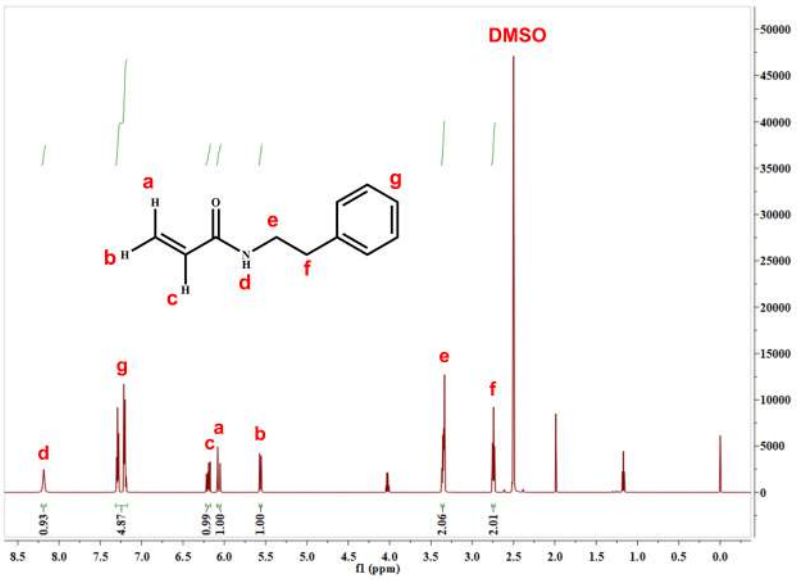


图 2.3: *N*-苯乙基丙烯酰胺 (PEAA) 的 ^{1}H NMR 谱图

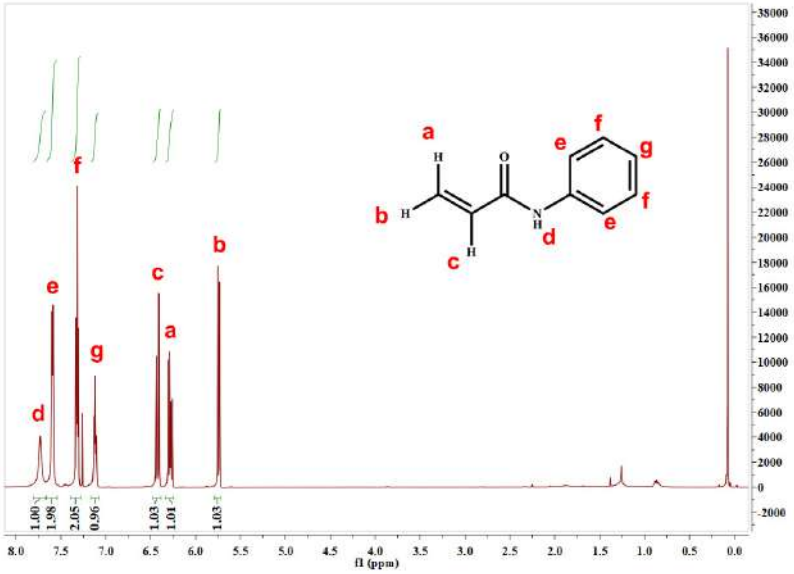


图 2.4: *N*-苯基丙烯酰胺 (PAA) 的 ^{1}H NMR 谱图

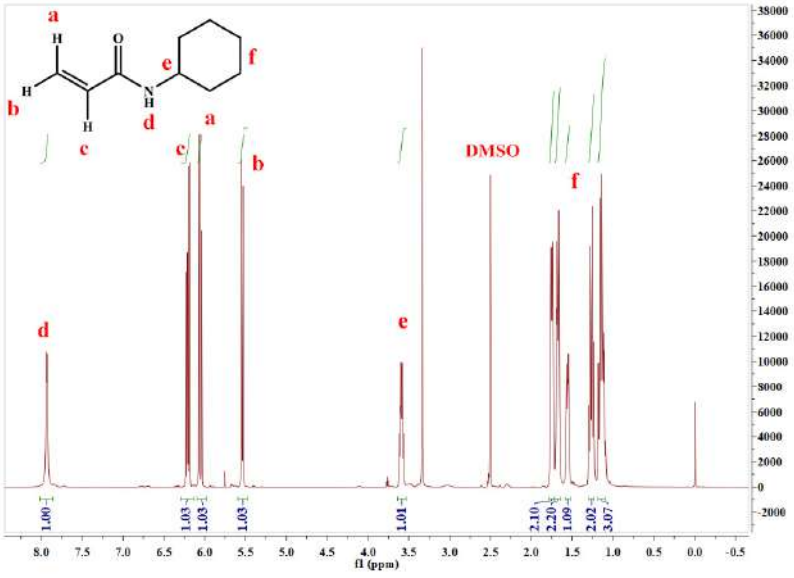


图 2.5: *N*-环己基丙烯酰胺 (CHAA) 的 ^{1}H NMR 谱图

疏水性单体 PEAA、PAA 和 CHAA 的 ^{1}H NMR 谱图分别如图 2.3、2.4 和 2.5 所示，图中标出了单体的每个质子峰。*N*-苯乙基丙烯酰胺 (PEAA)：^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.19 (s, 1H), 7.32−7.18 (m, 5H), 6.19 (dd, J = 17.1, 10.2 Hz, 1H), 6.09−6.04 (m, 1H), 5.56 (dd, J = 10.2, 1.6 Hz, 1H), 3.35 (dd, J = 12.4, 5.3 Hz, 2H), 2.74 (t, J = 7.4 Hz, 2H)。

N-苯基丙烯酰胺 (PAA)：^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.73 (s, 1H), 7.66−7.07 (m, 5H), 6.42 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 6.28 (dd, J = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 5.74 (d, J = 10.2 Hz, 1H)。

N-环己基丙烯酰胺 (CHAA)：^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7.93 (d, J = 7.4 Hz,

1H), 6.20 (dd, J = 17.1, 10.2 Hz, 1H), 6.05 (dd, J = 17.1, 2.2 Hz, 1H), 5.54 (dd, J = 10.1, 2.2 Hz, 1H), 3.62−3.55 (m, 1H), 1.78−1.52 (m, 5H), 1.30−1.09 (m, 5H)。

2.8.2 纳米水凝胶的傅里叶变换红外 (FTIR) 表征

图 2.6、2.7 和 2.8 显示了三种单体的傅里叶红外谱图。^{1}H NMR 谱图和傅里叶红外谱图证明单体成功合成。

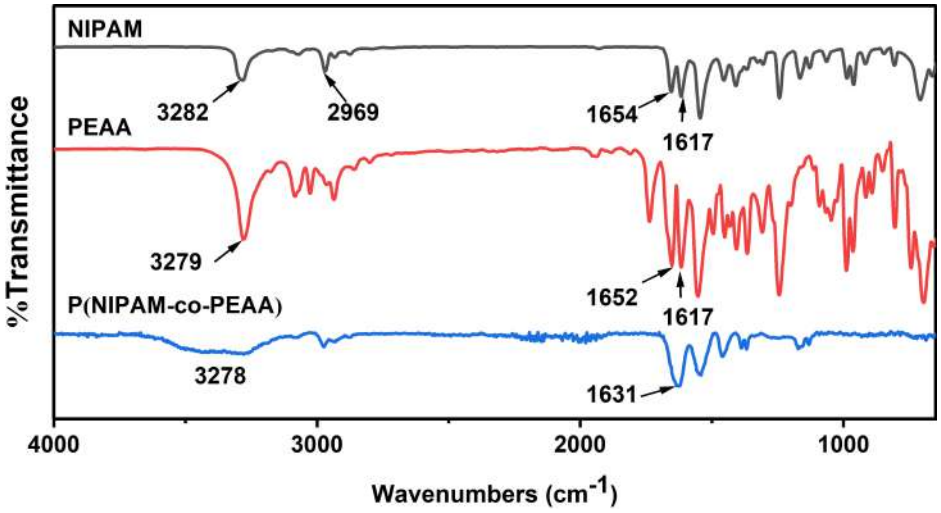


图 2.6: NIPAM、PEAA 和 PNPE 的傅里叶红外谱图

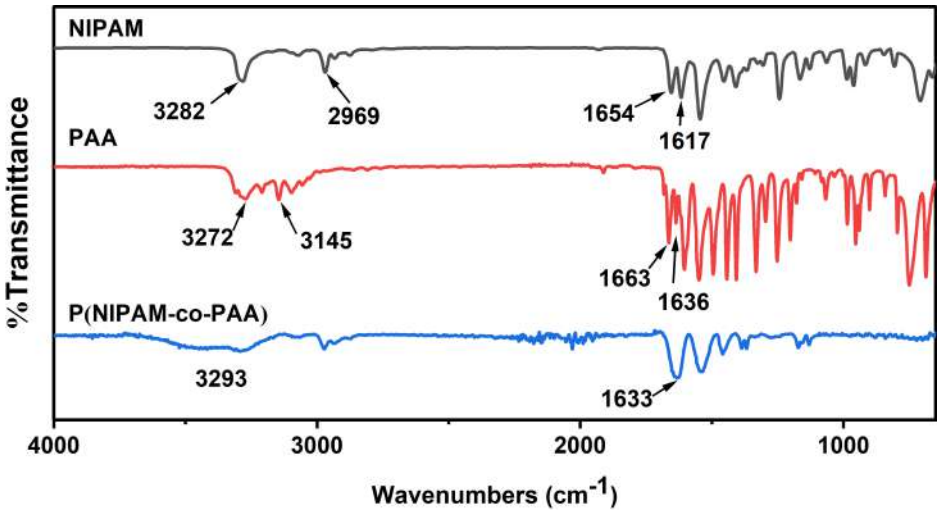


图 2.7: NIPAM、PAA 和 PNPA 的傅里叶红外谱图

根据上述制备方法，合成了 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶。利用傅里叶红外光谱表征了三种纳米水凝胶的结构，如图 2.6、2.7 和 2.8 所示。NIPAM 和三种单体的 C=C 伸缩振动峰在 1617 cm^{-1}, 1617 cm^{-1}, 1636 cm^{-1}, 1621 cm^{-1} 处，C=O 伸缩振动峰在 1654 cm^{-1}, 1652 cm^{-1}, 1663 cm^{-1}, 1655 cm^{-1} 处。而在 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶的红外图谱中 1630 cm^{-1} 附近观察到明显的 C=O 吸

收峰，而 C=C 吸收峰消失了，这说明聚合过程中 C=C 断裂发生聚合形成了纳米水凝胶，意味着成功地利用 NIPAM 和单体共聚合成了纳米水凝胶。

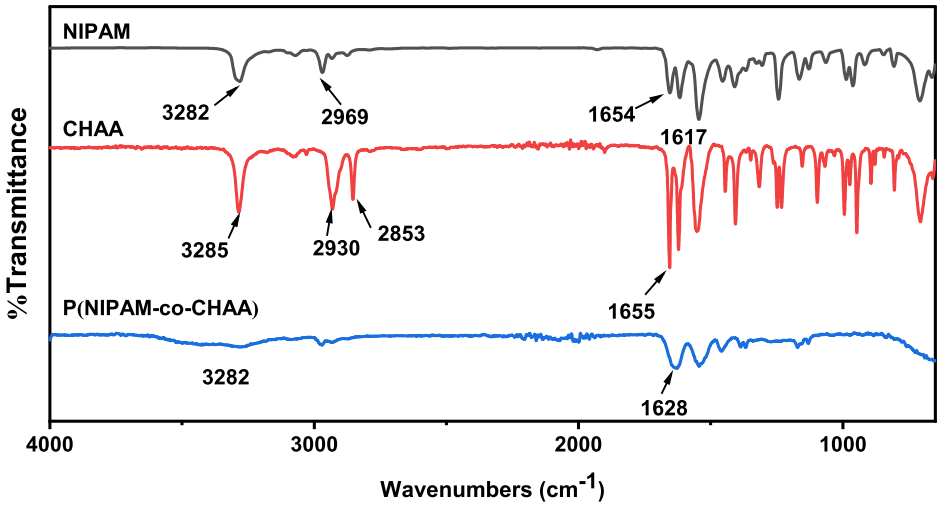


图 2.8: NIPAM、CHAA 和 PNCH 的傅里叶红外谱图

2.8.3 纳米水凝胶的形貌表征

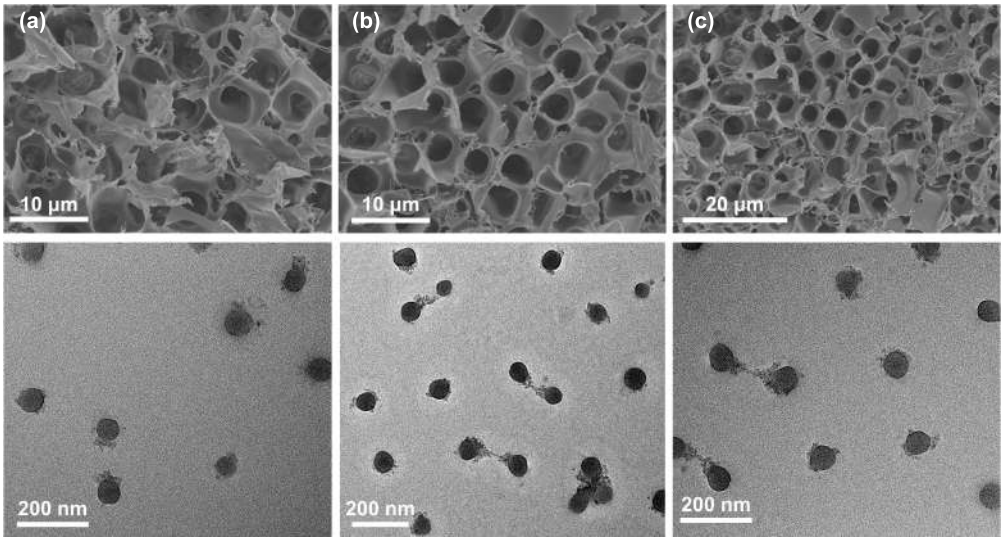


图 2.9: (a) PNPE、(b) PNPA 和 (c) PNCH 纳米水凝胶的 SEM (上) 和 TEM (下) 图

图 2.9 显示三种纳米水凝胶的 SEM 和 TEM 图像。假设 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶的微观内部结构可以保存下来，SEM 图象清楚的显示相互连接的多孔结构存在，结合纳米水凝胶的吸附特性，这些多孔结构具有药物吸收/扩散和营养扩散输送的能力。

TEM 图像能看出三种纳米水凝胶均呈“软球”状，呈现良好的单分散性。粒径为几十纳米左右。由于使用透射电镜测试时纳米水凝胶呈干态，导致纳米粒子

处于塌陷状态，测得的粒径与 DLS 测试纳米水凝胶吸水溶胀得到的粒径相比偏小。

2.8.4 单体配比对纳米水凝胶粒径及凝胶化的影响

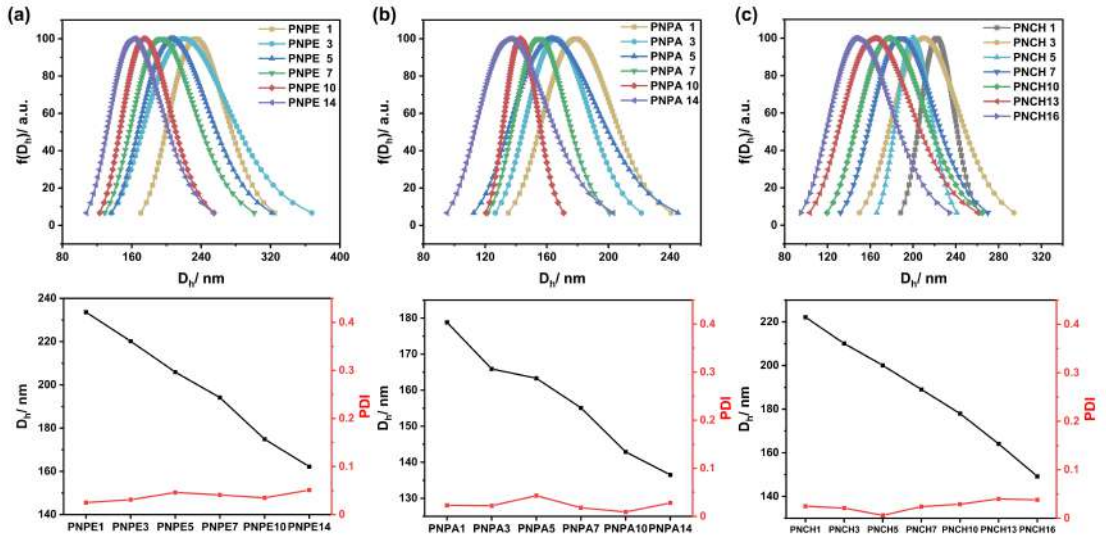


图 2.10: 不同单体配比的 (a) PNPE、(b) PNPA 和 (c) PNCH 纳米水凝胶的粒径 (上) 和粒径分布 (下) 图

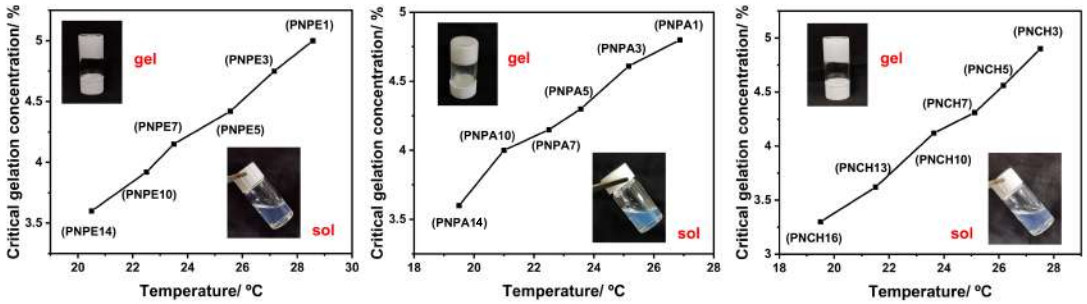


图 2.11: 不同单体配比的 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶的凝胶化温度和临界固含率

如图 2.10 所示，探究了单体配比对三种纳米水凝胶粒径及分散性的影响。对 PNPE 体系纳米水凝胶来说，随着单体 PEAA 比例 (PEAA/NIPAM=1～14%，摩尔比) 的增加，PNPE 纳米水凝胶的粒径从 233.6 nm 减小到 162.2 nm，这可能是由于随着疏水性单体 PEAA 添加量的增大，纳米水凝胶的疏水性增强，凝胶自身的作用力小于疏水作用导致的斥力，因此粒径减小。同时，PNPE 纳米水凝胶均表现出良好的单分散性 (PDI 均小于 0.05)，不随 PEAA 的增加而分散性变差。PNPA 和 PNCH 凝胶体系同样遵循这一规律。随着单体 PAA 比例 (PEAA/NIPAM=1～

14%，摩尔比) 的增加，PNPA 纳米水凝胶的粒径从 178.8 nm 减小到 136.5 nm，并具有良好的单分散性；随着单体 CHAA 比例 (CHAA/NIPAM=1～16%，摩尔比) 的增加，PNCH 纳米水凝胶的粒径从 222.1 nm 减小到 149.2 nm，并同样具有良好的单分散性。此外，PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶在单体摩尔比 1～14%，PNCH 纳米水凝胶在在单体摩尔比 3～16% 之间能较好地实现溶胶-凝胶转变，如图 2.11 所示。随着疏水单体的增加，PNPE 纳米水凝胶的临界凝胶化温度和浓度分别从 28.5 ℃/5 wt% 减少到 20.5 ℃/3.6 wt%；PNPA 纳米水凝胶从 27 ℃/4.8 wt% 减少到 19.5 ℃/3.2 wt%；PNCH 纳米水凝胶从 27.5 ℃/4.9 wt% 减少到 19 ℃/3.3 wt%。这可能是由于适当的疏水-亲水平衡才能实现凝胶化转变。凝胶体系中适量的疏水部分之间具有吸引力的分子间相互作用，削弱了聚合物内部的相互作用，疏水单元聚集成疏水域作为交联点，交联点越多，对于凝胶的形成更有利。因此，疏水单体的增加使得纳米水凝胶所需的凝胶化温度和浓度降低。值得注意的是，PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶的能实现凝胶化转变的最低单体 mol 比例为 1%，而 PNCH 纳米水凝胶的为 3%，这可能预示着三种纳米水凝胶疏水能力的强弱。以最低单体比例的水凝胶配比探究 SDS 和 BIS 对纳米水凝胶粒径和凝胶化性能的影响。

2.8.5 乳化剂用量对纳米水凝胶粒径及凝胶化的影响

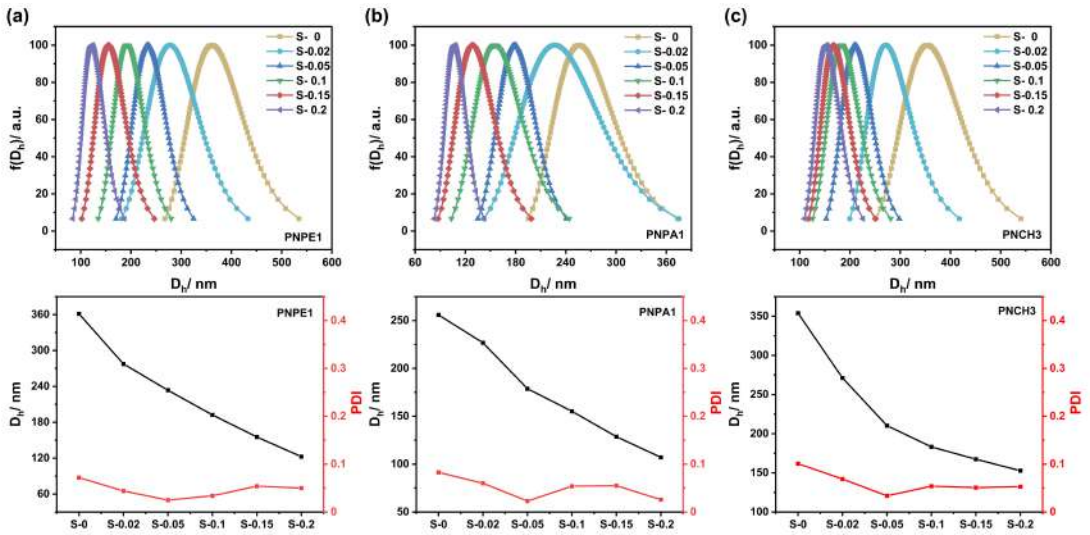


图 2.12: 不同 SDS 含量的 (a) PNPE、(b) PNPA 和 (c) PNCH 纳米水凝胶的粒径 (上) 和粒径分布 (下) 图

乳化剂用量对三种纳米水凝胶粒径及粒径分布的影响如图 2.12 所示。SDS 增加，有益于更多细小液滴的形成，凝胶微球带电荷保护层越多，粒径越小。对 PNPE 纳米水凝胶体系来说，随着乳化剂 SDS 用量 (0～0.2 g) 的增加，PNPE 纳米水凝胶的粒径从 361.2 nm 减小到 122.5 nm。未加入 SDS 前，水凝胶体系的单

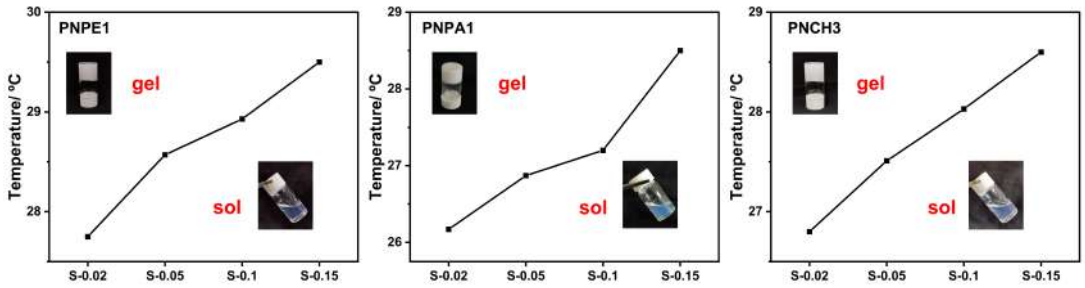


图 2.13: 不同 SDS 含量的 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶的凝胶化温度

分散指数较大 (PDI=0.072)，加入后，单分散性明显变好。PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶体系中同样发现这一规律，随着 SDS 加入量从 0 g 增加到 0.2 g，PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶的粒径变化分别为 255.9 nm 到 107.1 nm 和 353.9 nm 到 152.8 nm。未加入 SDS 前，纳米水凝胶的 PDI 较大 (0.083 和 0.101)，加入后降低为 0.05 以下，显示出良好的单分散性。另外，在相同固含率 (5 wt%) 和 BIS 含量 (摩尔比 2%) 下，随着乳化剂用量的增加，三种纳米水凝胶的凝胶化温度有所增加，如图 2.13 所示，PNPE 纳米水凝胶随 SDS 含量增加，凝胶化温度从 28 ℃ 增加到 29.5 ℃，PNPA 纳米水凝胶从 26 ℃ 增加到 28.5 ℃，PNCH 纳米水凝胶从 27 ℃ 增加到 28.5 ℃。这可能由于 SDS 用量的增加使得凝胶体系稳定性增加，粒径减小，需要更高的温度来使凝胶微球间相互接触，进而实现溶胶-凝胶转变行为。

2.8.6 交联剂用量对纳米水凝胶粒径及凝胶化的影响

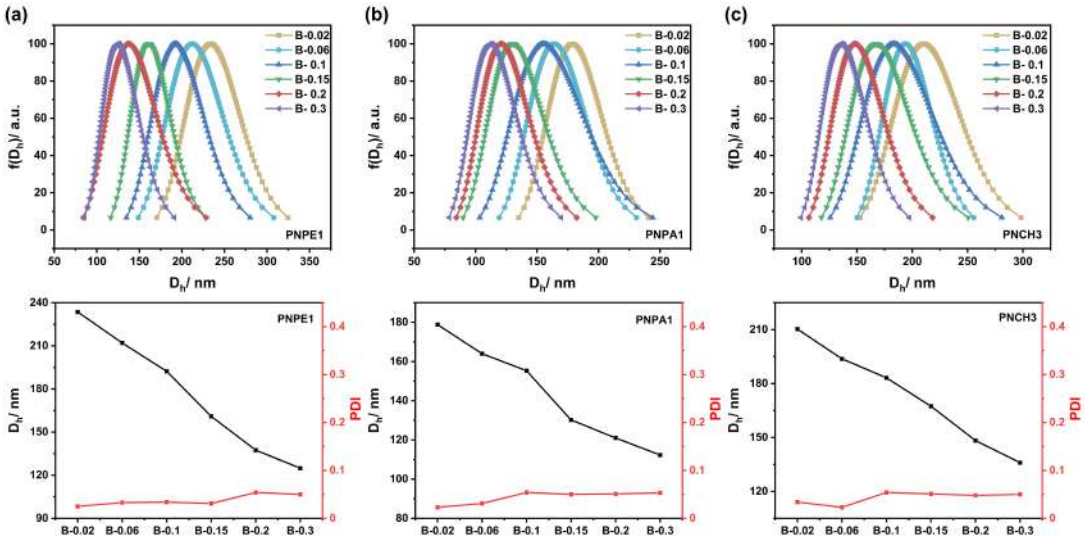


图 2.14: 不同 BIS 含量的 (a) PNPE、(b) PNPA 和 (c) PNCH 纳米水凝胶的粒径 (上) 和粒径分布 (下) 图

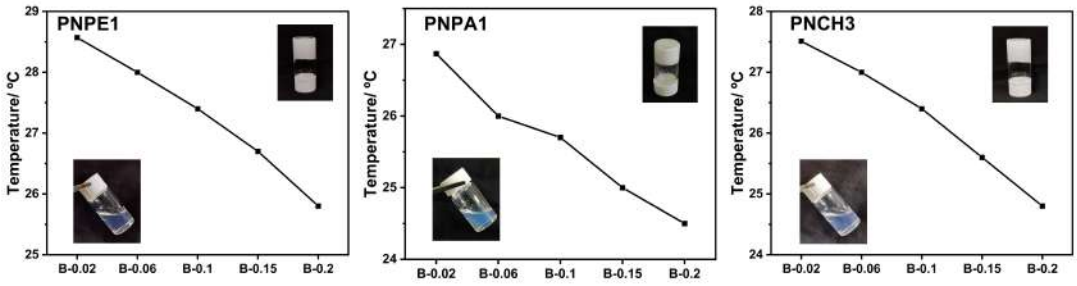


图 2.15: 不同 BIS 含量的 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶的凝胶化温度

交联剂用量对三种纳米水凝胶粒径及粒径分布的影响如图 2.14 所示。在纳米水凝胶体系中，交联剂 BIS 在线性的 PNIPAM 链段之间产生化学键，使线性链段相互交联在一起，形成球状结构。BIS 用量增多，纳米水凝胶交联程度增加，链段纠缠越多，粒径越小。

对 PNPE 纳米水凝胶体系来说，随着交联剂 BIS 含量 (0.02～0.3 g) 的增加，P(NIPAM-co-PEAA) 纳米水凝胶均表现出良好的单分散性 (PDI 均小于 0.05)，粒径从 233.6 nm 减小到 124.9 nm。同时，PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶体系中同样发现这一规律，均显示出良好的单分散性。随着 BIS 加入量从 0.02 g 增加到 0.3 g，PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶的粒径变化分别为 178.8 nm 到 112.3 nm 和 210.3 nm 到 136.0 nm。另外，在相同固含率 (5 wt%) 和 SDS 用量 (0.05 g) 下，随着乳化剂用量的增加，三种纳米水凝胶的凝胶化温度有所降低，如图 2.15 所示，PNPE 纳米水凝胶随 BIS 含量增加，凝胶化温度从 28.5 ℃ 降低到 25.5 ℃，PNPA 纳米水凝胶从 27 ℃ 降低到 24.5 ℃，PNCH 纳米水凝胶从 27.5 ℃ 降低到 24.5 ℃。这可能由于 BIS 含量的增加使得凝胶体系交联程度增加，链段纠缠越多，疏水作用增加，所需凝胶化温度降低。

2.9 本章小结

在本章中，首先通过酰氯反应合成了三种与 NIPAM 结构类似的疏水性单体 PEAA、PAA 和 CHAA。通过 ^{1}H NMR、FT-IR 表征了单体结构，证明成功合成。然后将温敏性单体 NIPAM 与三种疏水性单体共聚制备了 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶，使用 SEM、TEM 和红外表征了纳米水凝胶的结构。三种纳米水凝胶在一定条件下均能实现可逆的溶胶-凝胶转变，改变了三种纳米水凝胶体系中的疏水性单体配比、乳化剂 SDS 用量和交联剂 BIS 含量，合成了一系列的纳米水凝胶。通过 DLS 和试管倒置法探究了单体、SDS 和 BIS 对纳米水凝胶凝胶化温度的影响。具体结论如下：

(1) 成功制得纳米级的 P(NIPA-co-PEAA)、P(NIPA-co-PAA) 和 P(NIPA-co-CHAA) 共聚纳米水凝胶，三种纳米水凝胶均具有良好的单分散性。通过 SEM、TEM 表

征了三种纳米水凝胶的微观结构，均呈“软球”状，呈现良好的单分散性。SEM图像显示纳米水凝胶相互连接的多孔结构存在，这些多孔结构具有药物吸收/扩散和营养扩散输送的能力，能被应用于细胞培养或药物输送，在生物医学领域具有很广泛的应用前景。

(2) 探究了单体配比对三种纳米水凝胶粒径、分散性及凝胶化的影响。随着疏水性单体增加，纳米水凝胶粒径减小，单分散性良好不发生明显变化；PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶的能实现凝胶化转变单体摩尔比例范围为 1～14%，而 PNCH 纳米水凝胶的为 3～16%。由于适当的疏水-亲水平衡才能实现凝胶化转变，这可能预示着三种疏水单体疏水能力的强弱。另外，疏水单体含量增加，纳米水凝胶的临界凝胶化温度和浓度降低。这表明，凝胶体系中适量的疏水部分之间具有吸引力的分子间相互作用，削弱了聚合物内部的相互作用，疏水单元聚集成疏水域作为交联点，交联点越多，对于凝胶的形成更有利。

(3) 在能实现凝胶化转变的最低单体摩尔配比下探究了乳化剂 SDS 对三种纳米水凝胶粒径、分散性及凝胶化的影响。SDS 对凝胶体系的稳定具有重要的作用，随着 SDS 用量的增加，纳米水凝胶粒径减小，单分散性变好。对凝胶化性能来说，三种纳米水凝胶的凝胶化温度均有所增加，这表明 SDS 用量的增加使得凝胶体系稳定性增加，粒径减小，需要更高的温度来使凝胶微球间相互接触，进而实现溶胶-凝胶转变行为。

(4) 在能实现凝胶化转变的最低单体摩尔配比下探究了交联剂 BIS 对三种纳米水凝胶粒径、分散性及凝胶化的影响。BIS 使纳米水凝胶链段之间发生交联，链段纠缠，随着 BIS 含量的增加，纳米水凝胶粒径减小，单分散性良好不发生明显变化。对凝胶化性能来说，三种纳米水凝胶的凝胶化温度均有所降低，这表明 BIS 含量的增加使得胶体系交联程度增加，链段纠缠越多，疏水作用增加，所需凝胶化温度降低。

第三章　温敏性共聚纳米水凝胶的溶胶-凝胶转变机理探究

3.1　引言

前一章中，制备了 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶，并探究了单体比例、乳化剂和交联剂等因素对热致物理交联纳米水凝胶粒径、分散性和凝胶性能的影响。合成的纳米水凝胶均能实现可逆的温度依赖性溶胶-凝胶转变。三种纳米水凝胶相变温度、凝胶化温度和凝胶化时间不尽相同。疏水性单体对 PNIPAM-based 纳米水凝胶的相变行为具有重要的影响。为了探究疏水性单体的引入导致凝胶化转变的机理，需要从微观角度进一步探究凝胶的相变行为。

核磁共振光谱学是研究化合物分子结构的有效手段，对化合物立体结构[71]、构象分析[72]等起到重要作用。已有实验表明可以利用温度变化的核磁共振谱变化探索化学反应动力学[73]、氢键热力学[74]和分子构象[75]等。在化学反应的动态过程很难用光谱技术来表征，但是，核磁共振技术为理解和表征各种动态过程提供有意义和重要的数据。对于基于 PNIPAM 的水凝胶体系，变温核磁共振技术可用于探测热敏性相变行为。

NMR 和红外 (IR) 光谱可以提供 PNIPAM 及其共聚物系统中相分离球状结构和相互作用的重要信息，对于 PNIPAM 及其共聚物相变过程中的监测具有重要的意义。PNIPAM 纳米水凝胶结构中具有疏水性异丙基和亲水性-NHCO-基团，由于可逆的亲水-疏水平衡能发生可逆的温度依赖型相变。利用变温红外光谱和和核磁技术就能监测到整个相变过程中键合作用和质子的变化情况，有助于分析相变过程。PNPE、PNPA、PNCH 纳米水凝胶引入不同空间位阻的侧链疏水基团苯乙基、苯基和环己基。三种纳米水凝胶不但具有温度响应性，还能实现溶胶-凝胶转变，这是不同空间位阻的侧链疏水基团引入的结果。疏水域的形成解释了热敏性共聚物的凝胶化转变，这与共聚物凝胶中单体的立体阻碍和立体结构密切相关。

为了探究不同空间位阻的侧链疏水基团对 PNIPAM-based 纳米水凝胶温度响应相变的影响，进行了一系列测试。利用 DLS 研究了三种纳米水凝胶的温度依赖性相变；利用变温 ^{1}H NMR 和 FT-IR 研究了纳米水凝胶不同类型的质子和红外吸收峰随温度的变化。通过对测试曲线进行 Boltzmann 拟合，能得到转变温度和该温度下的斜率，该斜率代表纵坐标 (变量) 关于横坐标 (温度) 倾斜程度的量，在一定程度上能表示随温度变化的急缓程度，能清楚地描述 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶在溶胶-凝胶转变过程中的微观差异。同时，利用微扰相关移动窗口 (PCMW) 和二维相关光谱 (2Dcos) 研究了三种纳米水凝胶的突变温度、相变范围和扰动有序性。从分子结构的角度揭示空间位阻和立体结构对共聚纳米水凝胶溶胶-凝胶转变的影响。

3.2 实验试剂及实验仪器

3.2.1 实验试剂

本章所用的实验材料为第二章合成的 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶，配置样品固含率为 5 wt%。红外和核磁所用的样品为三种纳米水凝胶冷冻干燥得到的凝胶粉末。

3.2.2 实验仪器

本章所用实验仪器请参照第二章 2.2.2 小节。

3.3 纳米水凝胶的表征方法

3.3.1 温度响应性表征

纳米水凝胶的温度响应性表征通过 DLS 测定。样品池配置外置恒温水浴，可调节样品池温度，进而调节测试温度，其控温精度为 0.01 ℃。变温测试时设置温度为 5～44 ℃，以 3 ℃ 为增量。将不同温度下得到的粒径绘制成温度为横坐标，粒径为纵坐标的曲线，该数据曲线导数达到最大值所对应的的温度即为纳米水凝胶的相变温度 Tp。

Boltzmann 拟合方法能迅速找到曲线变化程度最大的点，在水凝胶领域常被用来确定相变温度 Tp，受到广泛的应用[76-78]。Boltzmann 拟合方程为：

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x - x_0}{dx}}} \tag{3}$$

其中 A1 和 A2 分别是函数的最小值和最大值。x_0 是曲线在横坐标轴上的拐点，在本体系可认为是转变温度[79]。该点的斜率能通过求导得到，正斜率表示纵坐标与横坐标呈正相关，负斜率表示纵坐标与横坐标呈负相关。斜率绝对值的大小表示曲线在该点处的变化程度，绝对值越大表示变化越急剧，越小表示变化越缓慢。类似地，Boltzmann 拟合方法也被应用于后续变温 ^{1}H NMR 和 FT-IR 测试中确定转变温度。

3.3.2 变温 ^{1}H NMR 表征

将冻干后的纳米水凝胶粉末 (约 0.01 g) 置于核磁管中，加入 0.5 mL 氘代水 (D_2O) 使其充分溶解。置于 avance3hd 型 (600 MHz) 核磁共振波谱仪上进行变温 ^{1}H NMR 测试。升温区间为 20～40 ℃，每 1 ℃ 采集一个数据点记录纳米水凝胶的温度变化 ^{1}H NMR 光谱。

3.3.3 变温红外 (FTIR) 表征

将冷冻干燥后的纳米水凝胶固体溶于 D_2O(浓度约为 10 wt%)，并在 4 ℃ 环境内溶胀一周, 以确保所有 N-H 质子完全氘化并确保水凝胶充分溶胀。通过密封在两个 CaF_2 窗片之间来制备用于变温 FT-IR 测量的水凝胶。不同温度下的 FT-IR 光谱均以 4 cm^{-1} 为分辨率记录在 Nicolet Nexus 470 型傅立叶红外光谱仪上, 并进行了 10 次扫描以得到可接受的信噪比。在 20～40 ℃ 之间以 1 ℃ 为增量收集了随温度变化的光谱。

3.3.4 微扰相关移动窗口 (PCMW) 表征

在特定波数范围内，加热过程中以 1 ℃ 的增量采集的变温 FT-IR 光谱通过基线校正后，使用 Morita 提供的方法[80]进行二维相关分析，并使用软件 2D Shige, ver. 1.3 (Shigeaki Morita, Kwansei- Gakuin University, Japan, 2004-2005) 进行进一步的相关计算。最终的二维彩色填充等高线图由 OriginPro 2021 绘制，红色区域定义为正相关强度，蓝色为负相关强度。选择适当的窗口大小（2m+1=11）以产生高质量的 PCMW 光谱。

3.3.5 二维相关光谱 (2Dcos) 表征

FT-IR 光谱也被用来进行二维相关分析。同样使用软件 2D Shige, ver. 1.3 (Shigeaki Morita, Kwansei- Gakuin University, Japan, 2004-2005) 用于 2Dcos 分析，并由 OriginPro 2021 进一步绘制成等高线图。同样，等高线图也是用与 PCMW 光谱相同的方法定义的颜色绘制的。

3.4 结果与讨论

3.4.1 纳米水凝胶的温度响应性表征

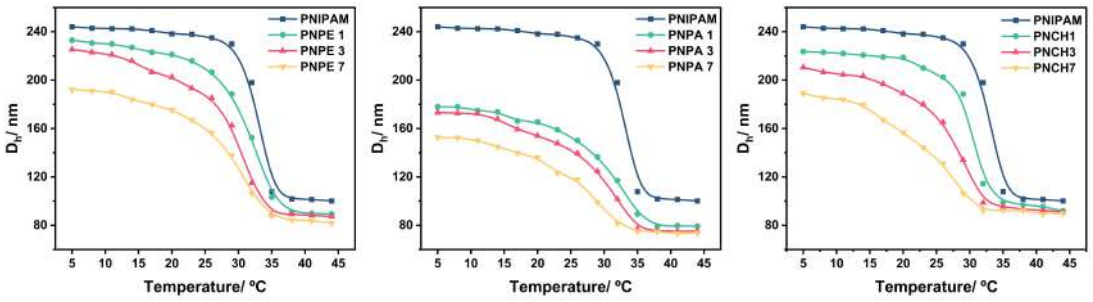


图 3.1: 不同单体配比的 PNPE、PNPA、PNCH 和 PNIPAM 纳米水凝胶粒径随温度变化曲线

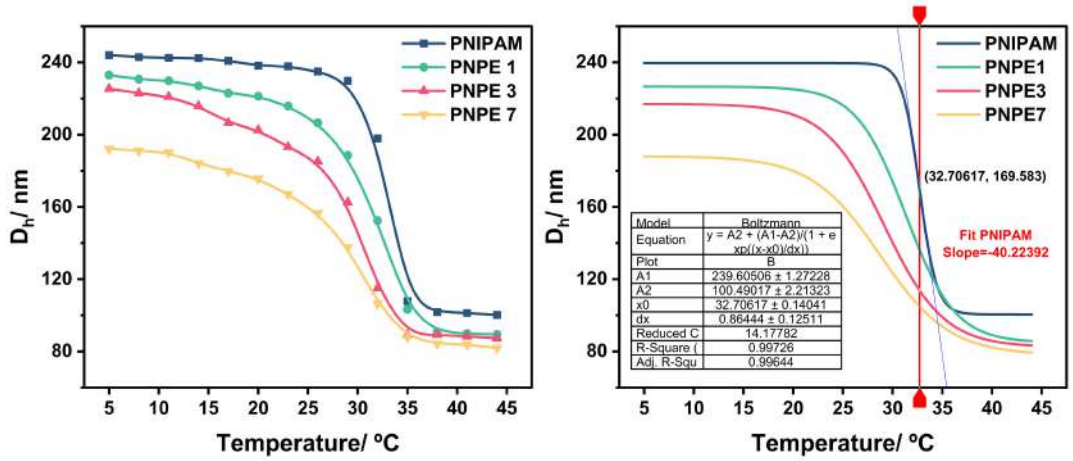


图 3.2: 不同单体配比的 PNPE 纳米水凝胶变温 DLS 的 Boltzmann 拟合

如图 3.1 所示，不同单体配比的 PNPE、PNPA、PNCH 和 PNIPAM 纳米水凝胶均表现出优异的温度响应性，表现为随着温度的升高纳米水凝胶的粒径减小，这是由于基于 PNIPAM 纳米水凝胶在水中的亲水-疏水平衡导致的。三种纳米水凝胶具有不同的粒径减小趋势，为了准确确定纳米水凝胶的相变温度 Tp 和评判变化剧烈程度，我们利用图 3.2 示例的 Boltzmann 拟合变温 DLS 曲线得到纳米水凝胶的突变点 (相变温度 Tp) 和斜率，结果如表 3.1 所示。PNIPAM 纳米水凝胶的 Tp 为 32.71 ℃，斜率为-40.22，粒径几乎垂直急剧变小, 这对应了 PNIAM 的急剧相变。而疏水单体的引入，纳米水凝胶的粒径降低，同时相变程度变缓慢，缓慢的粒径变化可能是实现溶胶-凝胶转变的前提。随着疏水单体的增加，PNPE 纳米水凝胶的 Tp 和斜率变化从 28.67 ℃/-14.22 变为 26.10 ℃/-7.90，PNPA 纳米水凝胶变化为从 27.34 ℃/-6.87 变为 24.23 ℃/-4.92，而 PNPA 纳米水凝胶变化为从 30.19 ℃/-25.10 变为 26.33 ℃/-8.68，这表明疏水性单体的引入增加了水凝胶的疏水性，从而降低了体系的相变温度，延缓了纳米水凝胶的急剧粒径变化。PNCH1 纳米水凝胶在 Tp=30.19 ℃ 时变化程度较大 (Slope= -25.10)，这可能是其无法实现凝胶化的表现。在同一比例下，PNCH 纳米水凝胶的 Tp 和斜率大于 PNPE 纳米水凝胶大于 PNPA 纳米水凝胶，这表明三种单体带来的疏水性和延缓 PNIPAM 纳米水凝胶急剧相变能力的强弱。PNPA 纳米水凝胶侧链直接引入空间位阻较大的刚性基团苯基，对 PNIPAM 纳米水凝胶急剧相变能力延缓作用最强，PNPE 纳米水凝胶次之，PNCH 纳米水凝胶最弱。

表 3.1: 不同单体配比的 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶变温 DLS 的 Boltzmann 拟合

	PNPE NPs		PNPA NPs		PNCH NPs	
mol%	Transition points/℃	Slope	Transition points/℃	Slope	Transition points/℃	Slope
1	28.673	-14.224	27.341	-6.866	30.185	-25.091
3	27.374	-11.279	25.791	-6.183	28.072	-12.972
7	26.103	-7.901	24.231	-4.917	26.332	-8.684

3.4.2 纳米水凝胶的变温 ^{1}H NMR 表征

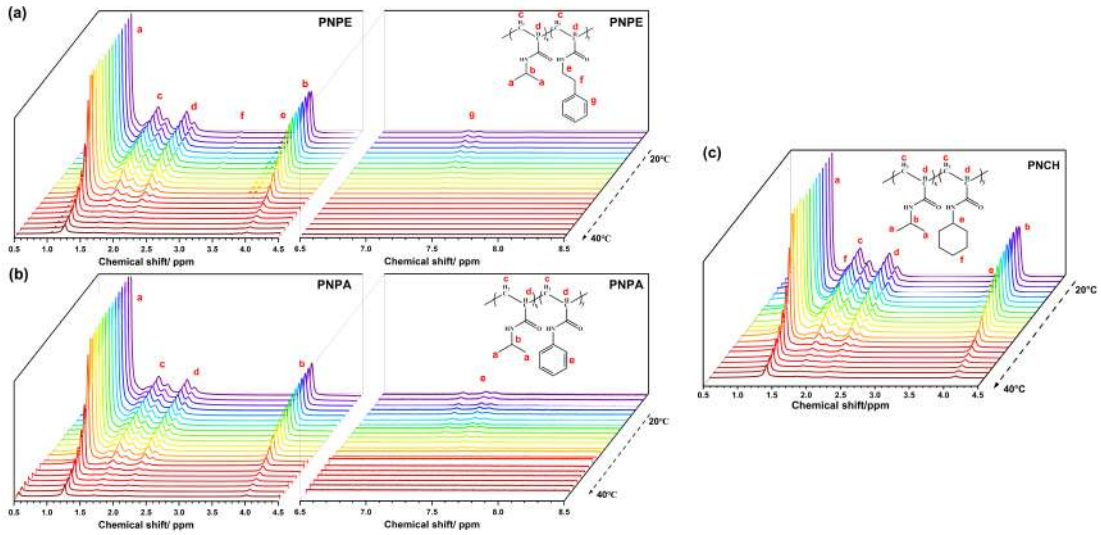


图 3.3: (a) PNPE1, (b) PNPA1 和 (c)PNCH3 纳米水凝胶在 D_2O (10 wt%) 中的归一化变温 ^{1}H NMR 谱，温度范围为 20～40 ℃，增量为 1 ℃

为了定量描述 PNIPAM 和 PNPE1、PNPA1、PNCH3 纳米水凝胶的溶胶-凝胶转变机理和相变程度，我们进行了温度可变的 ^{1}H NMR 测量，如图 3.3 和图 3.4 所示。^{1}H NMR 谱显示了纳米水凝胶在 D_2O (10 wt%) 中 20～40 ℃ 的温度响应。根据 HDO 峰在溶剂中的积分强度进行归一化后，很明显 HDO 峰在 20～40 ℃ 的整个温度范围内没有移动，而对应于纳米水凝胶的几乎所有峰都向低场移动。随着温度的升高，峰值强度急剧下降，甚至在高温下消失。之所以会出现这种现象，是因为液相核磁共振只能检测到可溶性结构，而几乎不可能检测到固体或不溶性结构。因此，当温度低于 Tp 时，三种纳米水凝胶都表现出良好的亲水性，并均匀分散在 D_2O 中，可以检测到较强的信号强度；当温度高于 Tp 时，由于 PNIPAM 链段间疏水相互作用的增加和粒子的收缩，聚合物单元的迁移率降低，与 D_2O

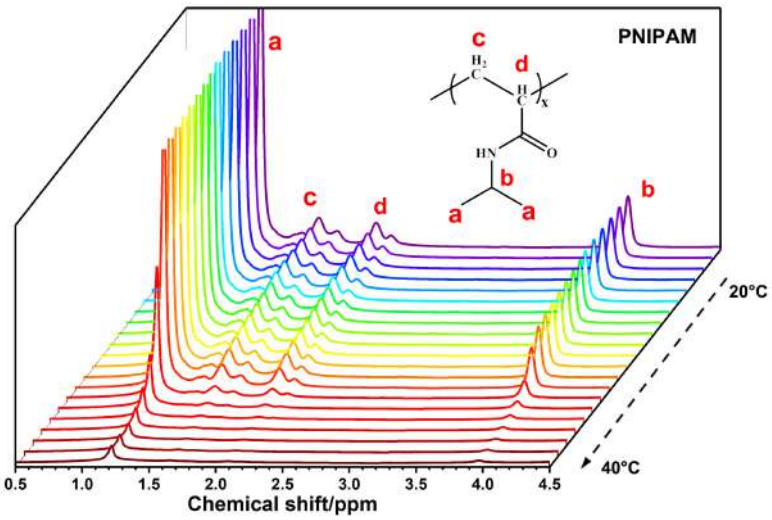


图 3.4: PNIPAM NPs 在 D_2O (10 wt%) 中的归一化变温 ^1H NMR 谱，温度范围为 20～40 ℃，增量为 1 ℃

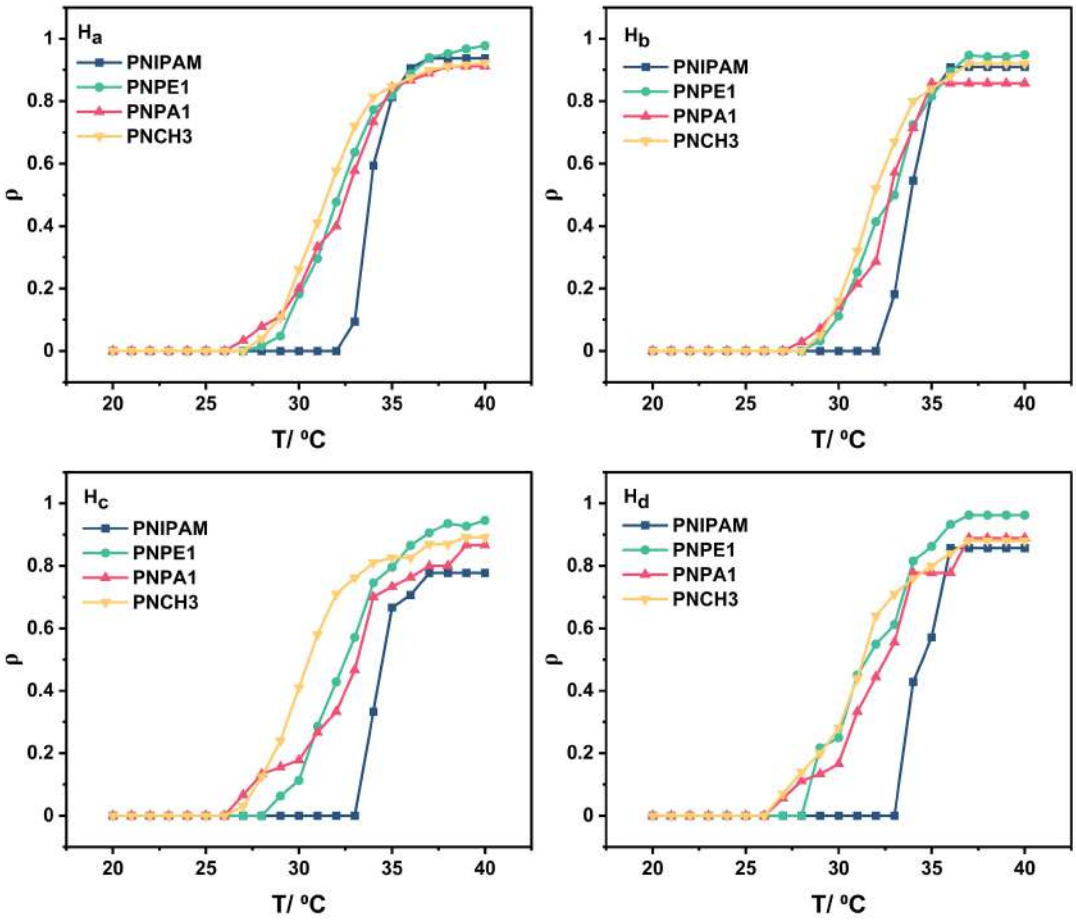


图 3.5: PNIPAM 和 PNPE1、PNPA1、PNCH3 纳米水凝胶中不同类型质子的相分离分数 ρ 随温度的变化关系，温度范围为 20～40 ℃，增量为 1 ℃

的亲水作用急剧减弱，其质子信号逐渐减弱，最终几乎不可能检测到。为了更清楚地定量描述和比较 PNIPAM 和 PNPE1、PNPA1、PNCH3 纳米水凝胶的相变过程，我们使用相分离常数的 ρ 值来描述相变的程度，其中 ρ 定义为:

$$\rho = 1 - \left(\frac{I}{I_0}\right) \tag{4}$$

其中 I 是部分相分离体系中给定线的纳米水凝胶单元的积分强度，而 I_0 是在 20 ℃ 下没有出现相分离时所选择的共振峰的归一化积分强度[81]。

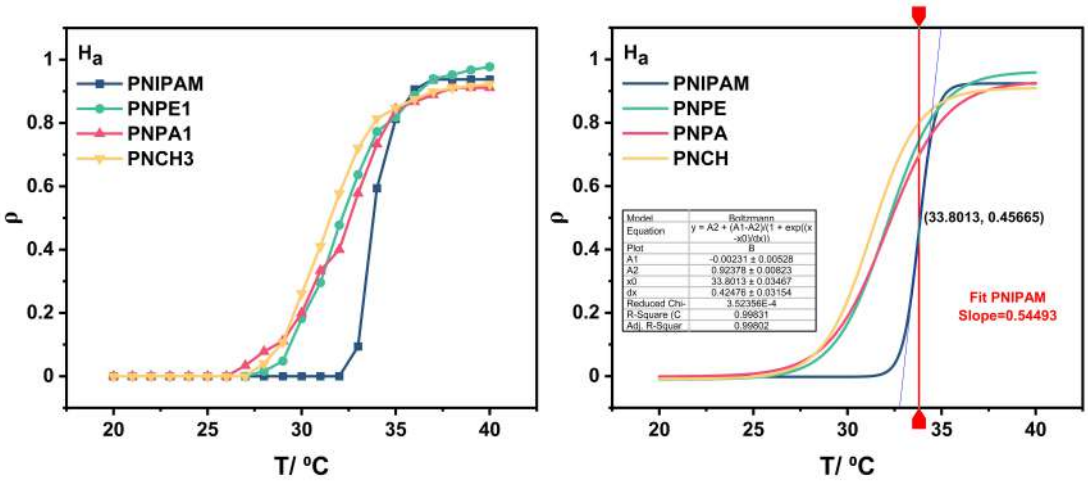


图 3.6: PNIPAM 和 PNPE1、PNPA1、PNCH3 纳米水凝胶中 H_a 质子相分离常数的 Boltzmann 拟合

表 3.2: PNIPAM、PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶每个质子相分离常数 ρ 的 Boltzmann 拟合

	PNIPAM		PNPE1		PNPA1		PNCH3	
	Transition points/℃	Slope	Transition points/℃	Slope	Transition points/℃	Slope	Transition points/℃	Slope
H_a	33.801	0.545	30.196	0.180	29.887	0.161	30.581	0.181
H_b	34.274	0.426	31.422	0.164	30.996	0.147	31.532	0.171
H_c	34.139	0.468	31.277	0.175	30.108	0.152	31.271	0.175
H_d	34.368	0.350	31.761	0.152	31.016	0.141	32.112	0.163

相分离曲线与温度的关系如图 3.5 所示。从图中的曲线可以看出，当温度低于 Tp 时，所有质子的相分离常数 ρ 几乎不变，而在 Tp 附近 ρ 急剧增加，这意味着疏水相互作用急剧增加，脱水行为也相应增加。图 3.6 显示了 PNIPAM、PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶 H_a 相分离常数的 Boltzmann 拟合方法。利用此方

法得到每个质子的转变温度和此温度下的斜率，结果列于表 3.2 中。通过该方法，能得到四种凝胶各个质子随温度的变化先后顺序和变化程度 (斜率越大表示变化越剧烈，斜率越小表示变化越缓慢)。经过比较，三种纳米水凝胶显示出相同的质子变化顺序，即 $H_a > H_c > H_b > H_d$。这可能预示着基于 PNIPAM 共聚的纳米水凝胶相变时，侧链要先于主链发生温度扰动。另外，对 H_a 来说，PNIPAM 纳米水凝胶 (图 3.4) 的 ρ 在 32～37 ℃ 间增大，转变点和斜率分别为 33.801 ℃ 和 0.545，在转变点附近 ρ 几乎垂直急剧增加，这对应了 PNIPAM 纳米水凝胶发生的急剧相变行为。而 PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶呈现较缓的 ρ 增长曲线, 这表明缓慢的相变行为是实现溶胶-凝胶转变的前提，对溶胶-凝胶转变有重要贡献。PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶的 ρ 在 27～35 ℃ 间缓慢增加，且 PNCH3 纳米水凝胶质子的转变点和斜率 (30.581 ℃, 0.181) 大于 PNPE1 纳米水凝胶 (30.196 ℃, 0.180) 大于 PNPA1 纳米水凝胶 (29.887 ℃, 0.161)，其它质子中同样发现这一规律。这表明 PNPA1 纳米水凝胶的相变行为发生的更早，更缓慢。这与上述 DLS 结果一致。值得注意的是，PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶疏水侧链上的苯乙基、苯基和环己基质子的脱水速度明显快于主链上的质子，这可能表明单体结构上具有较大空间位阻的疏水基团对水凝胶的特殊相变行为有重要贡献。由于大空间位阻疏水基团的存在，增加了分子链的刚性。当大分子链围绕这个刚性基团旋转时，由于相当大的空间位阻，阻碍了链段的运动[82]，在一定程度上，防止了颗粒受热后的瞬时收缩，使得 PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶的相变行为变缓慢，这是三种水凝胶实现溶胶-凝胶转变的重要前提。同样，由于三种基团空间位阻和疏水性的不同，PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶显示不同的相变行为。N-苯基的大空间位阻效应使得相变缓慢程度最大，N-苯乙基次之，N-环己基最弱。

3.4.3 纳米水凝胶的变温红外 (FTIR) 表征

为了比较 PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶的相变行为，利用变温红外光谱监测了三种纳米水凝胶在相变过程中的红外光谱变化。根据文献，PNIPAM 的温度响应主要是由于侧链上疏水基团的相互作用和主链之间的聚集行为[83]。为了消除杂峰和不必要峰的影响，本文只讨论了目标吸收峰和 C-H 基团振动吸收峰的光谱。如图 3.7 所示，对于 PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶，$v_{as}(CH_3)$ 和 $v_{as}(CH_2)$ 的振动吸收峰分别位于 2980 cm^{-1} 和 2940 cm^{-1} 附近。图中显示，在加热过程中，纳米水凝胶的 $v_{as}(CH_3)$ 和 $v_{as}(CH_2)$ 的振动吸收峰发生红移，并向低波数方向移动。这是因为 C-H 疏水基团周围有序的水笼状结构导致了较高的振动频率。随着温度的升高，纳米水凝胶与相邻水分子之间的疏水相互作用增强，而 C-H 基团周围的水分子数量和振动频率降低[84-85]。因此，这种红移现象表明

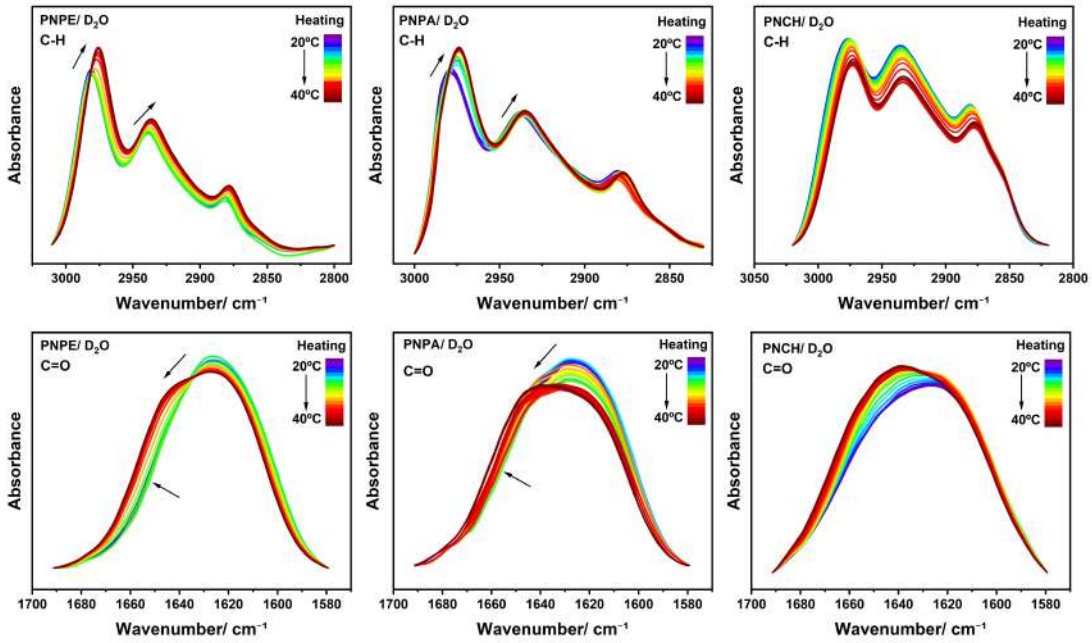


图 3.7: PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶在 D_2O (10 wt%) 中的变温红外光谱。随温度的变化范围为 20～40 ℃，增量为 1 ℃。红外光谱在 3020～2800 cm^{-1}(C-H 振动吸收峰) 和 1690～1580 cm^{-1}(C=O 振动吸收峰) 处

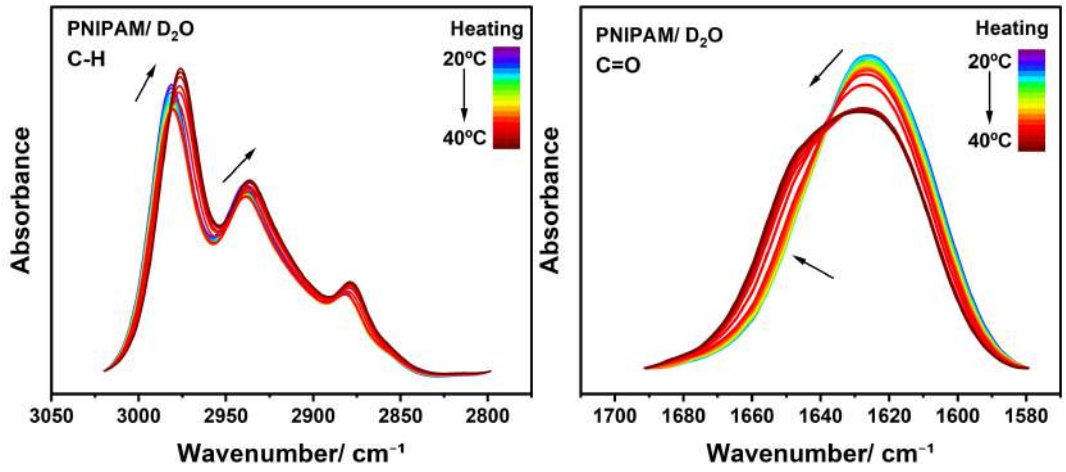


图 3.8: PNIPAM 纳米水凝胶在 D_2O (10 wt%) 中的变温红外光谱。随温度的变化范围为 20～40 ℃，增量为 1 ℃。红外光谱在 (a) 3020～2800 cm^{-1}(C-H 振动吸收峰) 和 (b) 1690～1580 cm^{-1}(C=O 振动吸收峰) 处

纳米水凝胶的脱水收缩过程。1690～1580 cm^{-1} 的 C=O 振动吸收峰可以被归属为 2 种不同的振动峰[27,83]。位于 1620 cm^{-1} 附近的振动峰表示的是 C=O 与 D_2O 之间的氢键作用 C=O···D-O-D，而位于 1650 cm^{-1} 附近的振动峰则表示 C=O 与 N-D 之间的氢键作用 C=O···D-N。

为了量化和进一步比较纳米水凝胶的脱水收缩行为，由上面的光谱绘制了

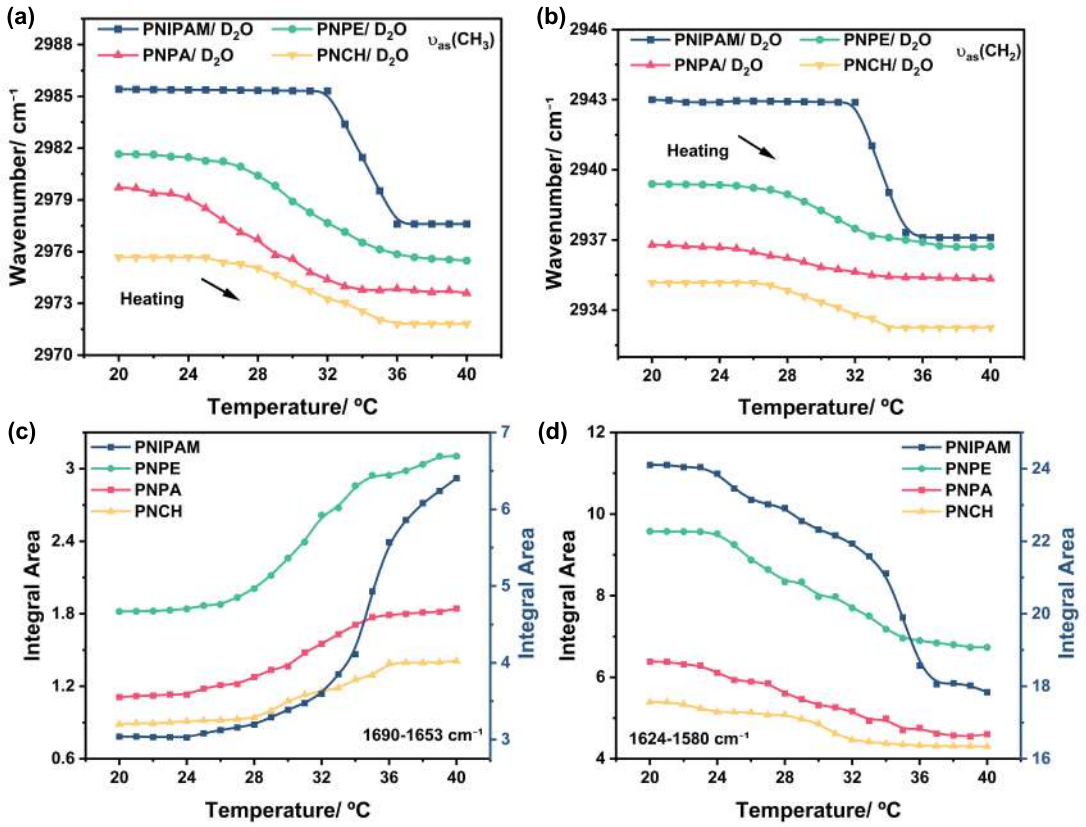


图 3.9: (a) $v_{as}(CH_3)$ 和 (b) $v_{as}(CH_2)$ 的频率随温度的变化；(c) C=O · · · D-N 带 (1690～1653 cm^{-1}) 和 (d) C=O · · · D-O-D 带 (1624～1580 cm^{-1}) 的积分面积变化

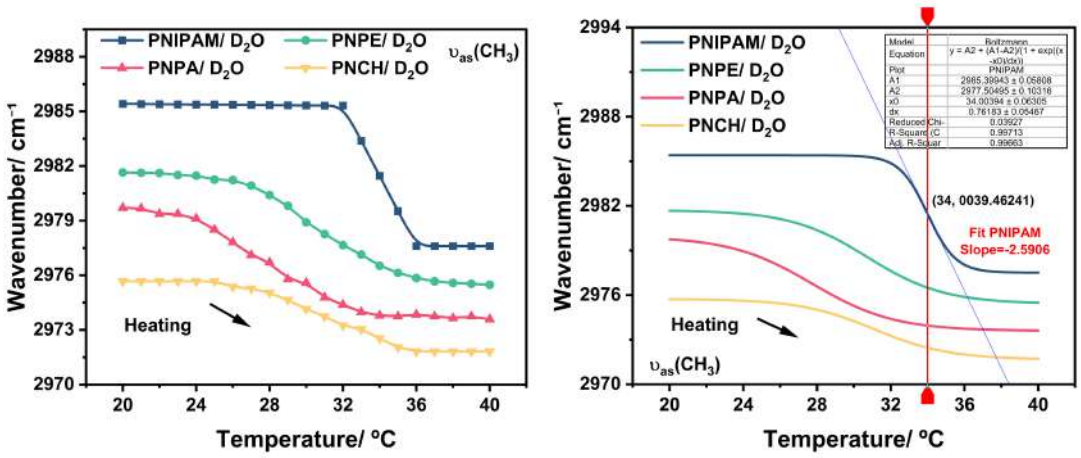


图 3.10: PNIPAM、PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶 $v_{as}(CH_3)$ 的频率随温度变化的 Boltzmann 拟合

C-H 吸收峰位移与温度之间的曲线，如图 3.9 (a) 和 (b) 所示。在初始加热过程中，即在达到 Tp 之前，$v_{as}(CH_3)$ 和 $v_{as}(CH_2)$ 的吸收峰没有明显的移动，表明没有明显的相变行为，但当温度接近 Tp 时，吸收峰的变化减小，这意味着吸收峰的降低越大，相变越严重。当温度略高于 Tp 时，吸收峰的位移不再随温度

升高而减小，表明相变结束。利用图 3.10 表示的凝胶 $v_{as}(CH_3)$ 的频率随温度变化的 Boltzmann 拟合方法，得到表 3.3。通过该方法，能得到三种水凝胶各谱峰随温度的变化先后顺序和变化程度 (斜率绝对值越大表示变化越剧烈，斜率绝对值越小表示变化越缓慢)。经比较，三种纳米水凝胶显示出相同的谱峰变化先后顺序，即 C=O···D-O-D > C=O···D-N > $v_{as}(CH_3)$ > $v_{as}(CH_2)$。可能预示着基于 PNIPAM 共聚的纳米水凝胶相变时，氢键作用最先受温度扰动，同时侧链上的甲基要先于主链上的乙基发生温度扰动，这与上述变温核磁的结果相吻合。以凝胶 $v_{as}(CH_3)$ 谱峰为例，PNIPAM 纳米水凝胶 (图 3.8) 在转变点附近 (34.004 ℃) 几乎垂直急剧增加 (转变斜率为-2.591, 负斜率表示频率随温度变化呈负相关)，这对应了 PNIPAM 纳米水凝胶发生的急剧相变行为。PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶的 $v_{as}(CH_3)$ 吸收峰缓慢向低波数移动，表明它们的缓慢相变行为。如表 3.3 所示，PNPA1 纳米水凝胶的转变点和斜率 (28.776 ℃/-0.688) 小于 PNPE1 纳米水凝胶 (30.725 ℃/-0.754) 和 PNCH3 纳米水凝胶 (30.911 ℃/-0.701)，其它谱峰中同样发现这一规律。这表明 PNPA 纳米水凝胶的相变行为发生的更早，更缓慢，这与上述变温 ^{1}H NMR 结果一致。此外，为了定量评估它们的光谱变化，计算了 C=O 伸缩区中这两个区域的积分面积作为温度的函数，如图 3.9 (c) 和 (d) 所示。在 1690～1653 cm^{-1}(C=O···D-N 带) 范围内，在加热过程中可以观察到稳定的增加。此外，与 1690～1653 cm^{-1} 范围内的积分面积变化相反，在 1624～1580 cm^{-1}(C=O···D-O-D 带) 积分面积在加热过程中呈现稳定的减小，这表明相变过程中 C=O 伸缩区的变化是由于侧链上的酰胺基团失去水分子 C=O···D-O-D，形成了 C=O···D-N 的新氢键，高分子链纠缠，从而导致了 C=O···D-D-N 的相变[85-86]。正如预期的那样，结合表 3.3，PNPA1 纳米水凝胶的光谱变化转变点和斜率比 PNPE1、PNCH3 纳米水凝胶低，这与 PNIPAM 的急剧变化不同，证明了 PNPA 纳米水凝胶的相变更缓慢。

表 3.3: PNIPAM、PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶变温红外光谱数据随温度变化的 Boltzmann 拟合

	PNIPAM		PNPE		PNPA		PNCH	
	Transition point/℃	Slope	Transition point/℃	Slope	Transition point/℃	Slope	Transition point/℃	Slope
$v_{as}(CH_3)$	34.004	-2.591	30.725	-0.754	28.776	-0.688	30.911	-0.701
$v_{as}(CH_2)$	34.852	-2.087	31.259	-0.399	30.054	-0.173	31.736	-0.396
C=O···D-N	33.904	0.551	30.531	0.162	28.746	0.082	30.846	0.089
C=O···D-O-D	33.522	-0.610	29.290	-0.246	27.747	-0.140	29.881	-0.182

3.4.4 二维红外光谱探究 P(NIPA-co-PEAA) 和 P(NIPA-co-PAA) 纳米水凝胶的相变行为

表 3.4: 纳米水凝胶的常规红外光谱和二维红外光谱谱峰归属

Assignment	PNIPAM	PNPE	PNPA
	Wavenumber/cm^{-1}	Wavenumber/cm^{-1}	Wavenumber/cm^{-1}
Hydrated $v_{as}(CH_3)$	2990	2989	2991
Less hydrated $v_{as}(CH_3)$	2971	2968	2972
$v_{as}(CH_2)$	2929	2925	2930
$v_s(CH_3)$	2873	2870	2874
C=O···D-N	1652	1653	1653
C=O···D-O-D	1624	1603	1603

微扰相关移动窗口 (PCMW) 是在 Thomas、Richardson[87] 和 Morita[80] 等人提出的传统移动窗口的基础上发展起来的一种新的分析工具。通过在关联方程中引入扰动变量，提高了该方法的适用性。PCMW 除了具有传统的移动窗口等确定尖锐变化点的独特能力外，还可以监测沿扰动方向的复杂光谱变化。同步和异步 PCMW 相关强度分别代表改变谱峰强度沿扰动方向的梯度和曲率。根据 Morita 等人总结的 PCMW 规则，变化规律可概括为：正同步相关 (红色区域) 表示光谱强度增加，负相关 (蓝色区域) 表示强度减小；正异步相关 (红色区域) 表示凸光谱强度变化，负相关 (蓝色区域) 表示凹变。

表 3.5: PCMW 测定不同谱峰带引起的突变点和转变温度范围

Assignment	PNIPAM		PNPE		PNPA	
	Abrupt change point/℃	Transition Ranges/℃	Abrupt change point/℃	Transition Ranges/℃	Abrupt change point/℃	Transition Ranges/℃
Hydrated $v_{as}(CH_3)$	35.0	33.0～37.0	32.5	26.5～34.5	31.0	26.0～35.0
Less hydrated $v_{as}(CH_3)$	35.5	33.0～37.0	33.5	26.5～34.5	31.5	26.5～35.0
$v_{as}(CH_2)$	35.5	33.0～37.0	33.0	26.5～35.0	31.5	26.0～35.0
$v_s(CH_3)$	35.5	33.0～37.0	32.5	26.5～35.0	31.0	26.0～35.0
C=O···D-N	34.5	32.0～36.0	31.0	27.0～34.0	30.5	27.0～34.0
C=O···D-O-D	34.5	32.5～36.0	30.0	27.0～34.0	30.0	27.0～34.0

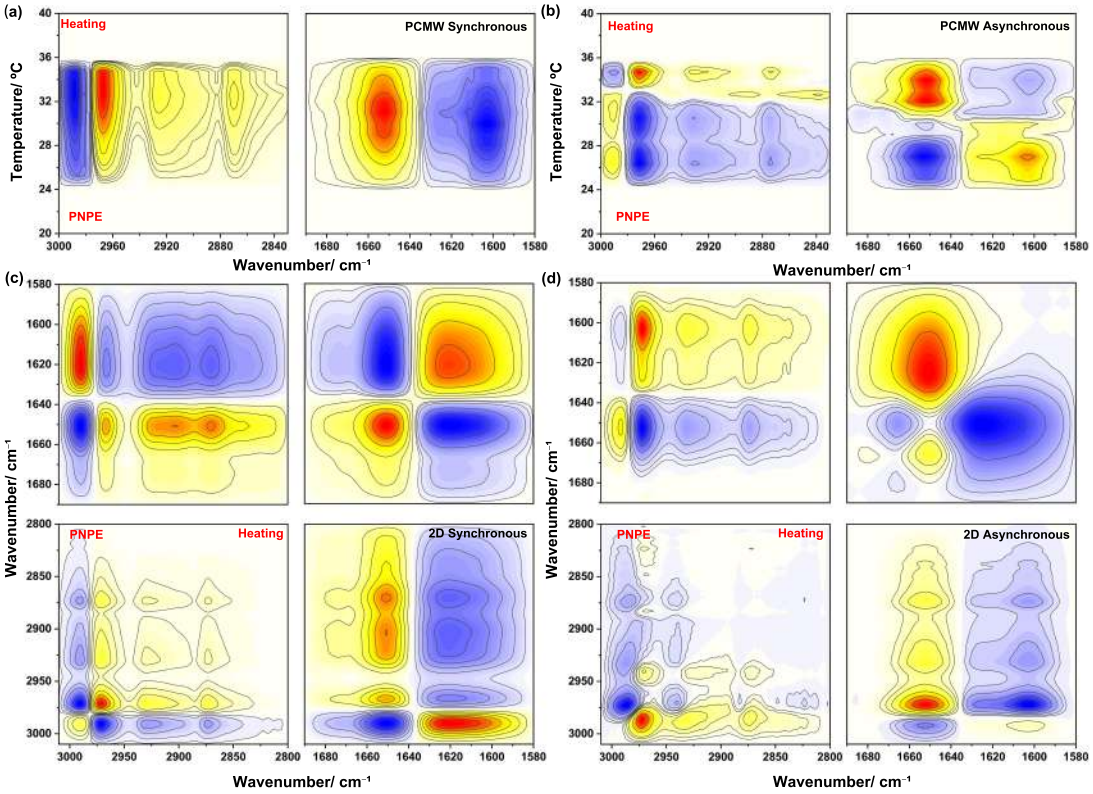


图 3.11: D_2O (10 wt%) 中 PNPE1 纳米水凝胶的 PCMW (a) 同步和 (b) 异步光谱，2D (c) 同步和 (d) 异步光谱，温度的变化范围为 20～40 ℃，增量为 1 ℃。暖色 (红色和黄色) 被定义为正强度，而冷色 (蓝色) 被定义为负强度

图 3.11、图 3.12 和图 3.13 中的 (a) 和 (b) 显示了 PNPE1、PNPA1 和 PNIPAM 纳米水凝胶在 D_2O (10 wt%) 中从 20 ℃ 加热到 40 ℃ 时的 PCMW 同步和异步光谱。在本体系中，PCMW 同步光谱可以找到尖锐的光谱变化点 (相变点)，而异步光谱可以根据等高图上的转折点确定相变温度范围。为方便起见，表 3.5 列出了 PNPE1、PNPA1 和 PNIPAM 纳米水凝胶的 PCMW 谱突变点和不同振动带的转变温度范围。显然，PNPE1 和 PNPA1 纳米水凝胶具有相似的 PCMW 谱。PNPA NPs 的突变点低于 PNPE NPs，转变温度范围略大。此外，考虑同步和异步 PCMW 谱中观察到的相关峰的值，可以更详细地了解升温过程中该峰的变化情况，为了方便讨论，表 3.4 列出了根据常规 IR 和 2DIR 的 C-H 和 C=O 区域的详细谱峰归属。以 PNPE1 纳米水凝胶为例，图 3.11 (a) 和 (b) 中的负值区域 (约 2990 cm^{-1}) 表示水合甲基基团的数量减少，而正值区域 (约 2970 cm^{-1}) 表示较少水合甲基基团的数量增加。这意味着氘化水分子在相变过程中会逐渐离开甲基。PNPE1 纳米水凝胶在突变点以下的水合甲基带的数值表现为同步谱 (2989 cm^{-1}，27 ℃) < 0 和异步谱 (2989 cm^{-1}，27 ℃) > 0，而突变点以上为同步谱 (2989 cm^{-1}，35 ℃) < 0，异步谱 (2989 cm^{-1}，35 ℃) > 0，突变点附近为异步谱 (2989 cm^{-1}，33 ℃) < 0 和异步谱 (2989 cm^{-1}，33 ℃) = 0。根据 Morita[80] 等人的规则，这些结果揭示了光谱

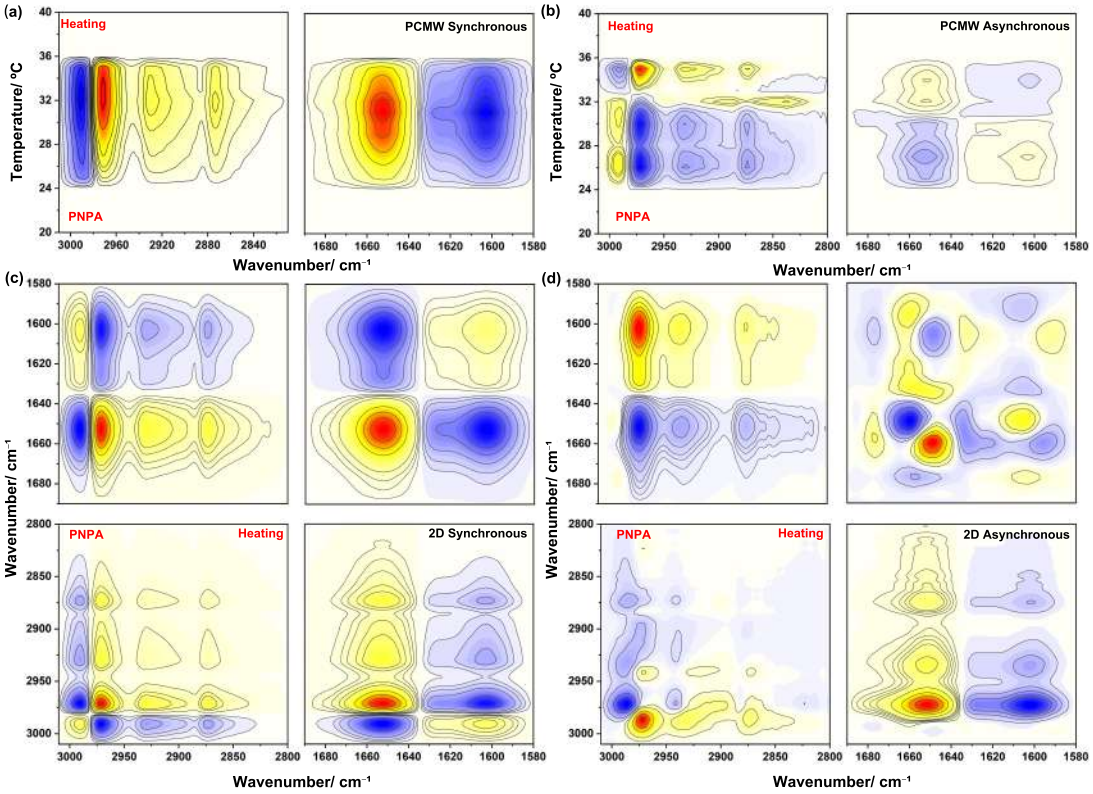


图 3.12: D_2O (10 wt%) 中 PNPA1 纳米水凝胶的 PCMW (a) 同步和 (b) 异步光谱，2D (c) 同步和 (d) 异步光谱，温度的变化范围为 20～40 °C，增量为 1 °C。暖色 (红色和黄色) 被定义为正强度，而冷色 (蓝色) 被定义为负强度

强度的变化应该是从凸减到线性减再到凹减。相反，集中在约 2968 cm^{-1} 处的较少水合甲基可描述为由凹增到线性增再到凸增。类似地，通过对 C=O 伸缩区的分析，可以得出结论：C=O ··· D-O-D 带的积分强度和水合甲基的积分强度似乎都呈现出有趣的“反 S 型”衰减，这与 C=O ··· D-N 带和较少的水合甲基 (“S”型增加) 的变化完全相反。

PNPA 纳米水凝胶与 PNPE 纳米水凝胶具有相同的 S 型和反 S 型转变。在受热过程中，PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶中水合甲基的强度变化与 PNIPAM 相似，如图 3.13 (a) 和 (b) 所示：第一步，大量水分子与甲基相互作用，相变前只有极小一部分水脱除甲基；第二步，大量水分子迅速以“S”型或“反 S”型强度变化逃离或形成相对应的甲基，这代表了典型的相变[88]。同时，PCMW 技术表明，PNIPAM、PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶在加热过程中红外峰强度突变的顺序为 PNIPAM > PNPE > PNPA，相变范围的顺序为 PNPA > PNPE > PNIPAM，前面的 DLS 和变温 ^{1}H NMR 分析结果很好地吻合了这一点。

前文利用 PCMW 确定了 PNPA 纳米水凝胶比 PNPE 纳米水凝胶具有更低的相变温度和更宽的相变范围，但是我们仍然想知道在相变过程中每个基团是如何被干扰的。为了解决这一问题，对变温傅立叶红外光谱进行了 2Dcos 分析，并对

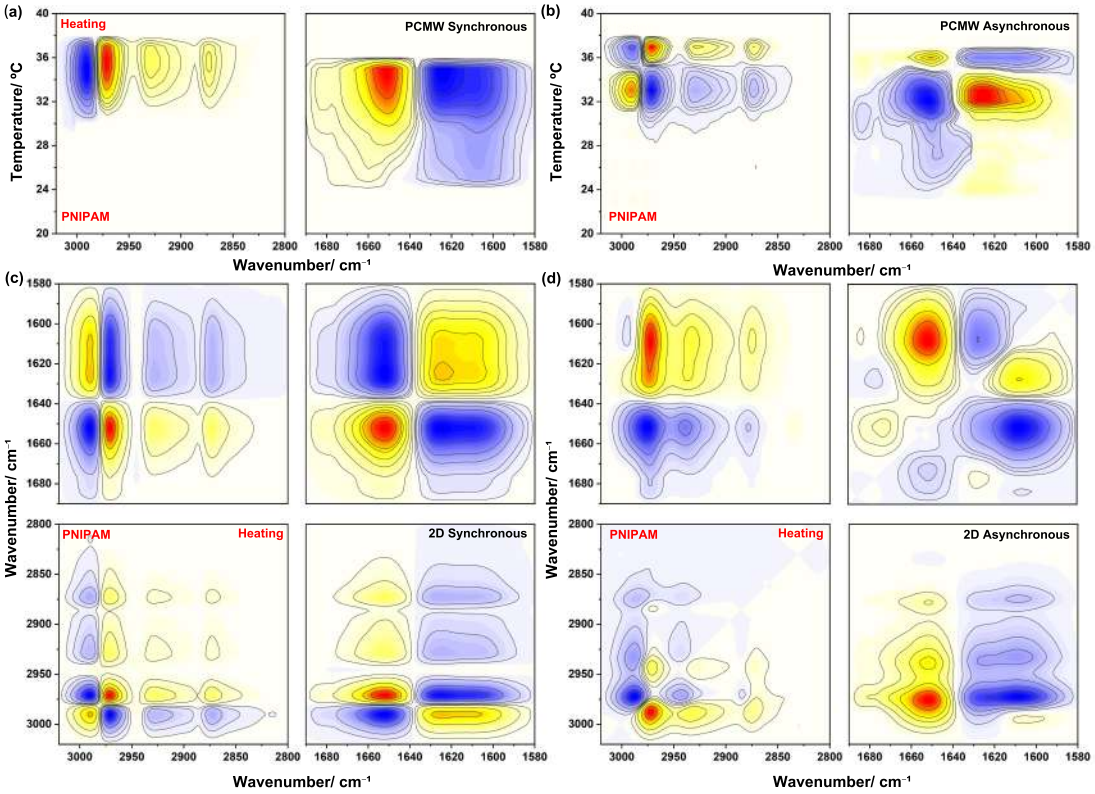


图 3.13: D_2O (10 wt%) 中 PNIPAM 纳米水凝胶的 PCMW (a) 同步和 (b) 异步光谱，2D (c) 同步和 (d) 异步光谱，温度的变化范围为 20～40 °C，增量为 1 °C。暖色 (红色和黄色) 被定义为正强度，而冷色 (蓝色) 被定义为负强度

其进行了数学处理。与传统的一维光谱相比，2Dcos 有两个独立的波数轴 (v_1，v_2) 和一个相关的强度轴，通过同步和异步光谱的联合分析，可以提取关于特定因素的分子特定波数扰动的额外有用信息。在本文中，2D 红外相关等高线图中的红色和蓝色区域分别代表正峰和负峰。如图 3.11、图 3.12 和图 3.13 中 (c) 和 (d) 所示，基于 PCMW 获得的相变范围之间的所有光谱进行 2Dcos 分析。判断规则可以概括为 Noda 规则，即如果同步和异步谱中的交叉峰值 (v_1，v_2，并假设 $v_1 > v_2$) 具有相同的符号，则 v_1 处的变化可能先于 v_2 处，反之亦然[89-90]。以 PNPE1 纳米水凝胶的 2D 同步谱 (图 3.11 (c)) 和异步谱 (图 3.11 (d)) 分析为例，(2989 / 2968 / 2925 / 2870 cm^{-1}, 1653 cm^{-1}) 和 (2989 / 2968 / 2925 / 2870 cm^{-1}, 1603 cm^{-1}) 处的 2D 同步谱和异步谱异号，结合 Noda 规则，这表明扰动顺序为 1653 > 2989 / 2968 / 2925 / 2870 cm^{-1}, 1603 > 2989 / 2968 / 2925 / 2870 cm^{-1}。(1653 cm^{-1}, 1603 cm^{-1}) 处的 2D 同步谱和异步谱异号，表明 1603 > 1653 cm^{-1}。(2989 cm^{-1}, 2968 / 2925 / 2870 cm^{-1})，(2968 cm^{-1}, 2925 / 2870 cm^{-1}) 和 (2925 cm^{-1}, 2870 cm^{-1}) 处的 2D 同步谱和异步谱同号，表明 2989 > 2968 > 2925 > 2870 cm^{-1}。综上所述，PNPE1 纳米水凝胶所有峰的温度扰动顺序为 1603 > 1653 > 2989 > 2968 > 2925 > 2870 cm^{-1}，结合表 3.4，这一结果可概括为：当温度升高时，纳米水凝胶中的氢

键最敏感，C=O···D-O-D 氢键中的水分子脱离，形成 C=O-D-N 的新氢键。然后，随着疏水性的增加，侧链中的-CH_3 基团发生脱水，形成疏水区域。然后是主链中的-CH_2-基团。根据 PNPA 纳米水凝胶的二维分析，所有谱带的大小顺序为 1603 > 1653 > 2991 > 2972 > 2930 > 2874 cm^{-1}，表现出与 PNPE 纳米水凝胶相似的相变行为。

3.5 本章小结

前一章中，制备了 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶，均能实现可逆的溶胶-凝胶转变。为了探究其溶胶-凝胶转变的机理，利用变温 ^{1}H NMR 和 FT-IR 技术从分子水平上探究了纳米水凝胶不同类型的质子和红外吸收峰在相变过程中的异同，得到的测试曲线利用 Boltzmann 拟合能更清楚地比较 PNPE、PNPA、PNCH 和 PNIPAM 纳米水凝胶的微观差异。同时，PCMW 和 2Dcos 技术能直观的揭示纳米水凝胶的突变温度、相变范围和基团受温度的扰动顺序，从分子结构的角度揭示空间位阻效应和立体结构对共聚 PNIPAM-based 热致物理交联纳米水凝胶溶胶-凝胶转变的影响。具体结论如下：

(1) PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶因为侧链疏水基团的引入不仅降低了 PNIPAM 的相变温度，同时也延缓了相变的剧烈程度。变温 ^{1}H NMR 从分子角度衡量了纳米水凝胶的相变行为。对同一质子而言，PNIPAM 纳米水凝胶的 ρ 转变点和斜率均大于 PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶，在转变点附近 ρ 几乎垂直急剧增加，这对应了 PNIPAM 纳米水凝胶发生的急剧相变行为。而 PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶呈现较缓的 ρ 增长曲线，这表明缓慢的相变行为是实现溶胶-凝胶转变的前提，对溶胶-凝胶转变有重要贡献。同时，PNPA1 纳米水凝胶质子的转变点和斜率都小于 PNPE1 和 PNCH3 纳米水凝胶，这表明单体结构上具有较大空间位阻的疏水基团对水凝胶的凝胶化行为有重要贡献，侧链中具有更大的空间位阻的 PNPA 纳米水凝胶在变温 ^{1}H NMR 结果中显示出比 PNPE 和 PNCH 纳米水凝胶更缓慢的相变行为。

(2) PNPE1、PNPA1 和 PNCH3 纳米水凝胶的变温 FT-IR 也衡量了凝胶的相变行为。纳米水凝胶的 v_{as}(CH_3) 和 v_{as}(CH_2) 的振动吸收峰发生红移，并向低波数方向移动，表明纳米水凝胶的脱水收缩过程。经比较，三种纳米水凝胶显示出相同的谱峰变化先后顺序，即 C=O···D-O-D > C=O···D-N > v_{as}(CH_3) > v_{as}(CH_2)。可能预示着基于 PNIPAM 共聚的纳米水凝胶相变时，氢键作用最先受温度扰动，同时侧链上的甲基要先于主链上的乙基发生温度扰动。对同一谱峰而言，PNIPAM 纳米水凝胶在转变点附近几乎垂直急剧增加，这对应了 PNIPAM 纳米水凝胶发生的急剧相变行为。而 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶吸收峰缓慢向低波数移动，表明它们的缓慢相变行为。PNPA 纳米水凝胶的转变点和斜率都小于 PNPE

纳米水凝胶，这表明 PNPA 纳米水凝胶的相变行为发生的更早，更缓慢，这与上述变温 ^{1}H NMR 结果相吻合。

(3) PCMW 光谱能确定 PNIPAM、PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶的光谱变化点(相变点) 和相变温度范围。结果表明，三种纳米水凝胶的相变点温度为 PNIPAM > PNPE > PNPA，相变范围 PNPA > PNPE > PNIPAM。这表明 PNIPAM 纳米水凝胶在较窄的相变温度范围内急剧相变，具有较大空间位阻的疏水性单体引入使得 PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶相变温度降低，相变的温度范围增大。考虑同步和异步 PCMW 谱中观察到的相关峰的值，可以更详细地了解升温过程中该峰的变化情况。三种纳米水凝胶水合甲基和 C=O $\cdots$ D-O-D 带的积分强度的积分强度均呈现出有趣的“反 S 型”衰减，这与较少的水合甲基峰和 C=O $\cdots$ D-N 带的积分强度的变化 (“S”型增加) 完全相反。这表明相变前只有极小一部分水脱除甲基，大量水分子与甲基相互作用。随着相变开始大量水分子迅速以“S”型或“反 S”型强度变化逃离或形成相对应的甲基，代表了典型的相变。

(4) 2Dcos 分析能确定 PNIPAM、PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶相变过程中每个基团受温度扰动的先后顺序。结果表明，三种水凝胶相变过程中显示相同的基团随温度的扰动顺序，即 C=O$\cdots$D-O-D > C=O$\cdots$D-N > Hydrated $v_{as}(CH_3)$ > Less hydrated $v_{as}(CH_3)$ > $v_{as}(CH_2)$ > $v_s(CH_3)$。这一结果可概括为：当温度升高时，纳米水凝胶中的氢键最敏感，C=O$\cdots$D-O-D 氢键中的水分子脱离，形成新氢键(C=O$\cdots$D-N)，聚合物链开始聚集。然后，随着疏水性的增加，侧链中的-CH_3 基团发生脱水，然后是主链中的-CH_2-基团。这与前文的结果一致，从微观角度得到了 PNIPAM-based 共聚纳米水凝胶的相变行为。

第四章　温敏性共聚纳米水凝胶的凝胶化性能及生物应用

4.1　引言

前一章探究了 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶的凝胶化机理。大空间位阻的疏水单体的引入延缓了纳米水凝胶的相变行为，疏水域形成的物理疏水交联点减缓了纳米水凝胶在 Tp 处的粒径收缩，引入侧基形成的空间位阻和疏水部分之间的分子间相互作用，弱化了聚合物内部的相互作用，在相变时，纳米水凝胶微球相互接触，疏水交联点的“支撑”作用大于相变时粒径收缩，最终形成凝胶。合成的纳米水凝胶均能实现可逆的溶胶-凝胶转变。在本章中，为了探究疏水性单体对水凝胶宏观凝胶化转变的影响，需要进一步探究凝胶的其它性能。

流变学是研究简单液体到软弹性体流变和变形的一种广泛使用的技术。使用流变仪，可以对各类液体、悬浮液体、熔体、凝胶与软固体进行粘度和粘弹性测试，在材料的加工特性、使用性能和微观结构之间建立关联。流变学的基础概念如剪切应力、剪切应变、粘度、粘弹性等是评价测试材料的基础流变性能。对于纳米水凝胶领域，流变学研究常用于判断凝胶的分散体形态变化，因为用振荡流变仪测量的剪切储存模量 (G') 和剪切损耗模量 (G'') 在不同形态之间往往变化很大，用流变学能更准确地补充目视观察到的形态转变[91-93]。对于一般的材料，具有三种粘度随剪切速率的变化关系 (流动曲线)。第一类：牛顿流体如硅油、低浓度分散体系等，流动曲线特征为粘度不随剪切速率发生变化；第二类：剪切变稀行为，如聚合物熔体、高分子粘合剂、分散体系等，其流动曲线特征为在低剪切速率下，材料的粘度较高，随着剪切速率增加，粘度降低；第三类：剪切增稠行为，如高浓玉米粉浆、高填充体系等，其流动曲线特征为在低剪切速率下，材料的粘度较低，随着剪切速率增加，粘度增加。在一定温度下，粘度是剪切速率的函数，大多数实际流体表现为非牛顿性质 (以剪切变稀比较常见)。剪切变稀常见于分散体系，包括乳液、悬浮液、大分子溶液、胶体以及高分子熔体等。微观上来说，该类体系在静止状态下体系内部存在纠缠的分子链或团聚的颗粒，在沿着流动方向受到外力的剪切作用下，层流状态下，层跟层之间相互摩擦，产生剪切力，有可能发生分子链解纠缠和拉伸、乳化液滴重组或变形、颗粒沿流动方向取向和团聚分子分散为原始粒子等行为。剪切速率越大，微观单元沿剪切方向的取向度越大，对于层流，层间“纠缠”减少，流动阻力下降，从而粘度降低。生活中的剪切变稀行为如大部分液态食品 (奶油、酱油、浓果汁等)、指甲油等施加额外的力之后粘度降低，还有血液流经窄小血管时发生剪切稀化，血红蛋白沿着流动方向伸长变形。

在本章中，为了探究不同空间位阻的侧链疏水基团苯乙基、苯基和环己基的引入对 PNIPAM-based 纳米水凝胶粘弹性的影响，通过动态粘弹性实验研究了

PNPE)、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶温敏性凝胶化过程，揭示了三种纳米水凝胶 G') 和 G'' 随温度和时间的变化。同时探究了纳米水凝胶的可注射性能，利用小鼠上皮成纤维细胞 (L-929) 和三种纳米水凝胶培养 24 h 后的增殖分析和细胞活死染色实验评判了三种纳米水凝胶的细胞毒性，证明三种纳米水凝胶的生物医学应用潜力。

4.2 实验试剂及实验仪器

4.2.1 实验试剂

本章所用的实验材料为表 4.1 中列出的试剂和第二章合成的 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶，每个样品配置固含率为 5 wt%。PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶冷冻干燥得到凝胶粉末留作实验备用。

表 4.1: 实验试剂

试剂名称	供应商	纯度	英文或简称
小鼠上皮成纤维细胞	中科院上海细胞库		L-929
DMEM/F12 培养基	美国 Hyclone 公司	500 mL	
胎牛血清	美国 Gibco 公司	澳洲来源	
双抗 (青霉素和链霉素)	上海元象医疗器械有限公司	0.25%/0.53 mM	
磷酸缓冲液	美国 Hyclone 公司	PH=7.4	PBS
胰蛋白酶 (0.25% Trypsin, 0.02% EDTA)	美国 Hyclone 公司	500 mL	
CCK-8 试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司	1 mL	
活细胞/死细胞双染试剂盒	美国 Hyclone 公司	500T	Calcein AM/PI
注射器	常州悦康医疗器材有限公司	10 ml	
细胞培养瓶	美国康宁公司	25 cm^2	
细胞培养板	耐思科学有限公司	96、48、24 孔	

4.2.2 实验仪器

本章所用实验仪器如表 4.2 所示。

4.3 纳米水凝胶的表征方法

4.3.1 脱水量表征

凝胶的疏水作用会导致颗粒收缩，水分子被排出。在设定的温度下对宏观共聚纳米水凝胶进行脱水量测试。具体地，将一定质量的纳米水凝胶放置于设定好

表 4.2: 实验仪器

仪器名称	型号	厂商
傅里叶变换衰减全反射红外光谱仪 (ATR-FTIR)	NEXUS 670	美国 Nicolet 公司
高级旋转流变仪	MARS 60	德国 HAAKE 公司
全数字化核磁共振谱仪	avance3hd600mhz	美国 Bruker 公司
冷冻干燥机	K775X	美国 Quorum 有限公司
超声震荡仪	B3510E	美国 Branson 有限公司
超净工作台	SW-CF-2FD	上海博讯实业有限公司
细胞计数仪	Countstar	上海睿钰生物科技有限公司
CO_2 细胞培养箱	Heraeus BB15	美国 Thermo Scientific

温度的恒温箱中，在预定的时间间隔内，取出上清液 (脱水量) 称重，那么在特定时间内纳米水凝胶的含水量为：

$$含水量\% = \left(1 - \frac{Wt}{W_0}\right) * 100 \tag{5}$$

其中 W_t 表示时间 t 取出的上清液的质量；W_0 表示初始纳米水凝胶含有的水的质量。

4.3.2 流变性能表征

所有的流变特性都是在高级旋转流变仪 (MARS 60, 德国 HAAKE 公司) 上进行的，采用直径 50 mm、间隙 1 mm 的平行板几何结构。每次测量量取约 6～10 mL 纳米水凝胶，将其铺满于平行板表面并放入仪器内测量。在恒温恒频 1 Hz 条件下，用 γ=0.01～100% 的应变扫描测定了每个样品的线粘弹性区域 (LVR)。在 0.01～100 Hz 的频率范围内，在应变幅度为 5% 的情况下获得了扫频。设定测试条件 LVR 内应变为 5%，恒定频率为 1 Hz。以 2 ℃/min 的升温速率，在 20～40 ℃ 范围内进行振荡升温，确定凝胶温度 (T_{gel}) 为 G' 和 G'' 的交叉点，将 $G' > G''$ 的温度范围定义为凝胶区。通过监测 G' 和 G'' 作为时间的函数，确定了不同相态下粘弹性性质的时间依赖性。在进入不同相态的两个不同温度下，采用振荡时间扫描的方法研究了聚合物的热可逆性。每个温度的持续时间为 200 s，温度变化连续进行，没有时间间隔。

4.3.3 体外细胞实验

小鼠上皮成纤维细胞 (L-929) 的培养: 将 L-929 从液氮罐中取出快速融化后移至超净台内。吸取部分至离心管中，加入一定量的完全培养基 (配制方法：90%

的 DMEM 高糖培养基，10% 的胎牛血清和 1% 的双抗)，以 1300 rpm 的速度在离心管中离心 3 min。结束后移入超净台中，倒掉上清液加入配好的培养基，吹打、混匀后转移到细胞培养瓶中，放入浓度为 5% 的 CO_2 培养箱中进行培养，温度设定为 37 ℃。培养过程中要时刻在显微镜中观察细胞变化，当细胞正常生长但培养基颜色变淡时需要进行换液，将细胞培养瓶移入超净台中，倒掉需要更换的培养基，使用 PBS 进行冲洗，重复三次后加入新的培养基放入 CO_2 培养箱中继续培养[94]。当观察到细胞培养瓶中细胞长满细胞培养瓶底层时，进行细胞消化与分瓶，倒掉细胞培养瓶中的培养基，使用 PBS 进行冲洗，重复三次后加入少量胰酶，放入 CO_2 培养箱中一分钟后取出[94]。若观察到细胞成片脱落则证明消化完成，立即将细胞培养瓶移入超净台中加入培养基终止消化。将细胞从细胞培养瓶壁吹打下来，并将其中的液体以 1300 rpm 的速度在离心管中离心 3 min，结束后移入超净台中去掉上清液，加入一定量的培养基并吹打混匀后平均分成两份，转移到新的细胞培养瓶中添加培养基，放入 CO_2 培养箱中继续培养[94]。

浸提液制备及细胞种植：取 100 mg 纳米水凝胶干粉浸泡 10 mL 完全培养基 24 h，无菌过滤后待用。先于 48 孔板中每孔添加 2.0 x 10^5 细胞培养 24 h 形成细胞半融合层，然后每孔再添加 800 μL 各组浸提液，培养 24 h，用 CCK 检测液检测细胞增殖性能。

细胞增殖性能检测：采用 CCK-8 试剂盒测定细胞活力，进而反映纳米水凝胶的生物相容性。CCK-8 试剂盒操作为：当种植上细胞的纳米水凝胶培养到 24 h 后，用 PBS 溶液清洗三次倒出培养基的纳米材料，防止存在残留的培养基和悬浮的死细胞。然后在每孔中加入 400 μL CCK-8 检测液 (配置方法：添加 10% 的 CCK-8 原溶液和 90% 的 DMEM/F12 培养基)，待在 37 ℃ 的培养箱中孵育 1 h 后将对应凝胶的检测液转移到 96 孔板中，使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值，进而判断细胞的数量。

细胞毒性实验：通常使用 AM/PI 细胞染料对培养的细胞进行染色，检测材料对细胞是否有毒性。由于活细胞和死细胞的细胞膜通透性不一样，使用相应染料染色时，在荧光显微镜下呈现不同的颜色，这样就能判断细胞的生长状态，进而判断材料的生物相容性。细胞毒性实验材料的制备与细胞增殖实验一致，对处理好的材料上每孔种植 1.0 x 10^5 的 L-929，种植好细胞后的材料置于浓度为 5% 的 CO_2 培养箱中进行培养 24 h，温度设定为 37 ℃，结束后取样进行活死染料染色，置于倒置荧光显微镜下观察细胞的存活状态。

4.4 结果与讨论

4.4.1 纳米水凝胶的流变表征

图 4.1 显示了 PNPE 纳米水凝胶的剪切应变 (γ) 和黏度 (η) 随剪切应变速率 ($\dot{\gamma}$) 变化的关系曲线。和大部分高分子聚合物溶液一样，PNPE 纳米水凝胶属于非牛顿流体，不遵守牛顿黏度定律，如图 4.1 (a) 所示，体系的黏度随着剪切速率的增加而降低[95]。剪切变稀区域常用幂律模型来拟合:

$$\sigma = k \cdot \dot{\gamma}^n \tag{6}$$

$$\eta\dot{\gamma} = k \cdot \dot{\gamma}^n \tag{7}$$

$$\lg \eta = (n-1) \cdot \lg \dot{\gamma} + \lg k \tag{8}$$

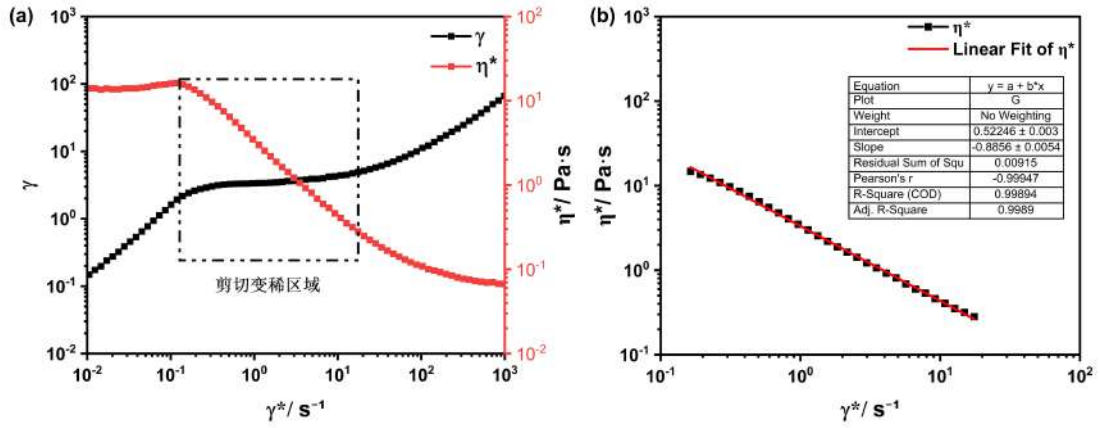


图 4.1: PNPE 纳米水凝胶的 (a) 剪切应变和黏度随剪切应变速率增大的变化曲线和 (b) 剪切变稀区域的拟合曲线

其中 σ 为剪切应力，k 为稠度系数，$\dot{\gamma}$ 为剪切应变速率，n 为非牛顿指数。公式 6 为幂律模型的一般形式，当 $n < 1$ 时，体系属于剪切变稀；当 $n > 1$ 时，体系属于剪切增稠；当 $n = 1$ 时，体系属于牛顿流体。流体的剪切应力等于黏度和剪切速率之积，即 $\sigma = \eta\dot{\gamma}$，换算后同时取对数，得到拟合的直线，如图 4.1(b) 所示，斜率 $n - 1 < 0, n < 1$，PNPE 纳米水凝胶属于剪切变稀体系。具体表现为在较低剪切速率时，PNPE 纳米水凝胶分子链段相互纠缠，处于低速牛顿区，粘度较大且不随剪切速率变化，体现零剪切黏度 (η_0)；剪切速率逐渐增大时，在剪切力作用下高分子链段可能发生解纠缠和拉伸，体系黏度在剪切变稀区域内呈线性下降；高剪切速率下，体系处于高速牛顿区，黏度基本不随剪切速率变化，体现无穷剪切黏度 (η_∞)。

动态模量测量能够精确得到纳米水凝胶材料对振荡力 (应力) 或变形 (应变)

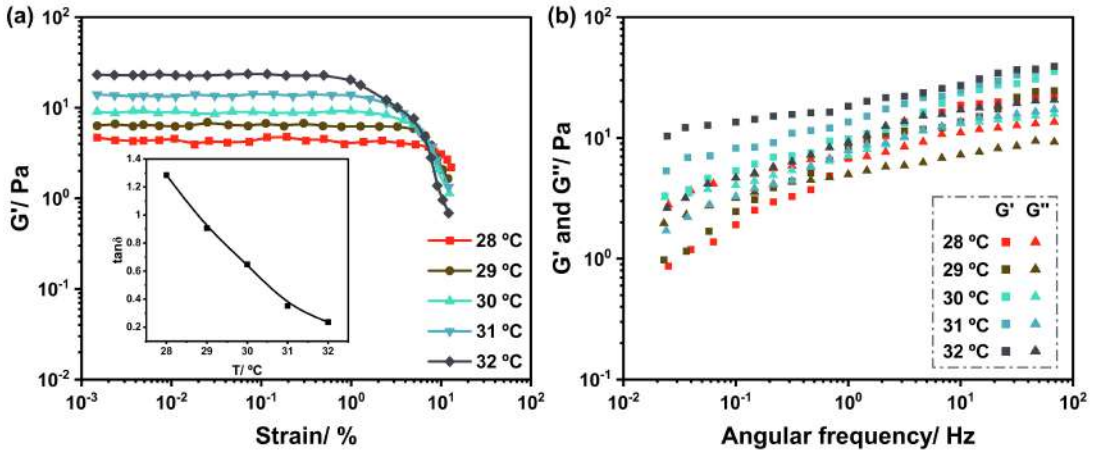


图 4.2: (a) 不同温度下 PNPE1 纳米水凝胶的储能模量 (G') 随剪切应力的变化曲线，插图显示了损耗角正切 $\tan\delta$ 随温度的变化曲线。(b) 不同温度下 PNPE1 纳米水凝胶的模量随频率的变化曲线

的响应。材料的粘弹性可以通过测量 G'(弹性特性)、G''(粘性特性) 和损耗正切 (G'' 与 G' 之比，$\tan\delta=G''/G'$) 来测量。在聚合物的线性粘弹性区域 (LVR) 内，模量与变形的幅度无关，施加的应力 (τ) 产生成比例的应变 (γ)。以振荡、蠕变等测量材料的粘弹性，需要确保在其线性粘弹性区域 (LVR) 内进行测试，该区域施加的应力不足以破坏材料结构，可以表征材料的微观特征。对 PNPE1 纳米水凝胶 (5 wt%) 在凝胶区域内进行了广泛的应变振幅扫描研究 (图 4.2 (a))。结果表明，LVR 的大小强烈依赖于温度，加热时 G' 增加，表明疏水交联密度增加引起的刚性增加[96]，损耗角正切 $\tan\delta$ 变小，LVR 区域变窄。在线性粘弹性区域内改变施加应变的频率得到图 4.2 (b)，在低频下，大多数情况下 G'' 大于 G'，因此系统以粘性为主 ($\tan\delta > 1$)，而在高频时情况正好相反，G' 大于 G''，弹性行为占主导地位 ($\tan\delta < 1$)。

研究了 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶的宏观温度依赖性相变。一般来说，随着温度的升高，水凝胶呈现不同的相态，如图 4.3 所示。纳米水凝胶放置在低温 (如 20 °C) 下，形成浅蓝色透明溶液 (CS 相)。随着温度的升高，溶液的粘度降低，而流动性增加，这是由于纳米颗粒疏水作用较弱导致颗粒收缩所致。随后，当温度接近凝胶化温度时，水凝胶经历溶胶-凝胶相变，形成浅蓝色凝胶相 (CG 相)，是否形成凝胶相通过轻轻倾斜瓶子的方法来鉴定[62]。随后，水凝胶之间的疏水性继续增强，凝胶颗粒继续收缩，宏观水凝胶从颜色变为乳白色，形成乳白色凝胶相 (OG 相)。最后，发生脱水收缩，网络中的水分子被排出，形成脱水凝胶相 (DG 相)。

PNIPAM 纳米水凝胶升温时无法凝胶化，只能从 CS 相变成 OS 相，这与 PNIPAM 的急剧相变相关，如图 4.4 所示，纯的 PNIPAM 纳米水凝胶升温时只能

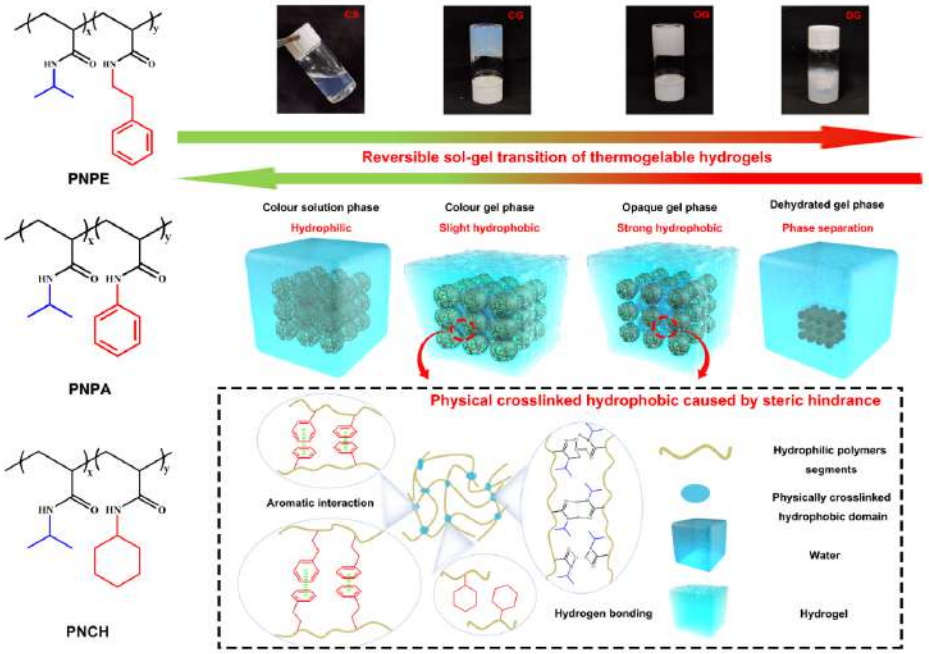


图 4.3: PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶的结构式以及在水溶液中溶胶-凝胶转变过程中典型纳米水凝胶相态的照片和键合作用示意图。CS：彩色溶液相；CG：彩色凝胶相；OG：不透明凝胶相；DG：脱水凝胶相

从淡蓝色溶液变为乳白色溶液，流变曲线对应了这一种相变行为，即 G'' 始终大于 G'，相变前后都表现为溶液状态。具有 CS→CG→OG→DG 转变的聚合物的典型曲线如图 4.5 (a) 所示，可以很容易地划分为不同的相。在凝胶化温度以下，PNPE1 纳米水凝胶均表现为粘性液体（$G''>G'$）。由于共聚物相互作用增加，储能和损耗模量随温度增加，凝胶化温度（T_{gel}）被确定为 G' 和 G'' 的交叉点（$G'=G''$，$\tan\delta = 1$），这显示出了系统从粘性流体变成弹性网络的起点。随着温度进一步升高，储能模量进一步增加形成了更稳定更具弹性的凝胶，凝胶强度提高了两个以上的数量级。在此过程中，又可以分为 CG 和 OG 两个凝胶相。在最大值之后

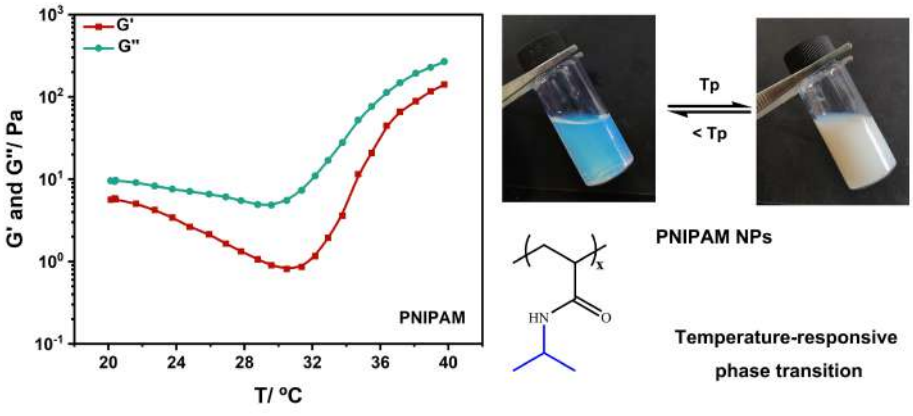


图 4.4: PNIPAM 纳米水凝胶的模量-温度曲线、结构式和温度响应性相变图

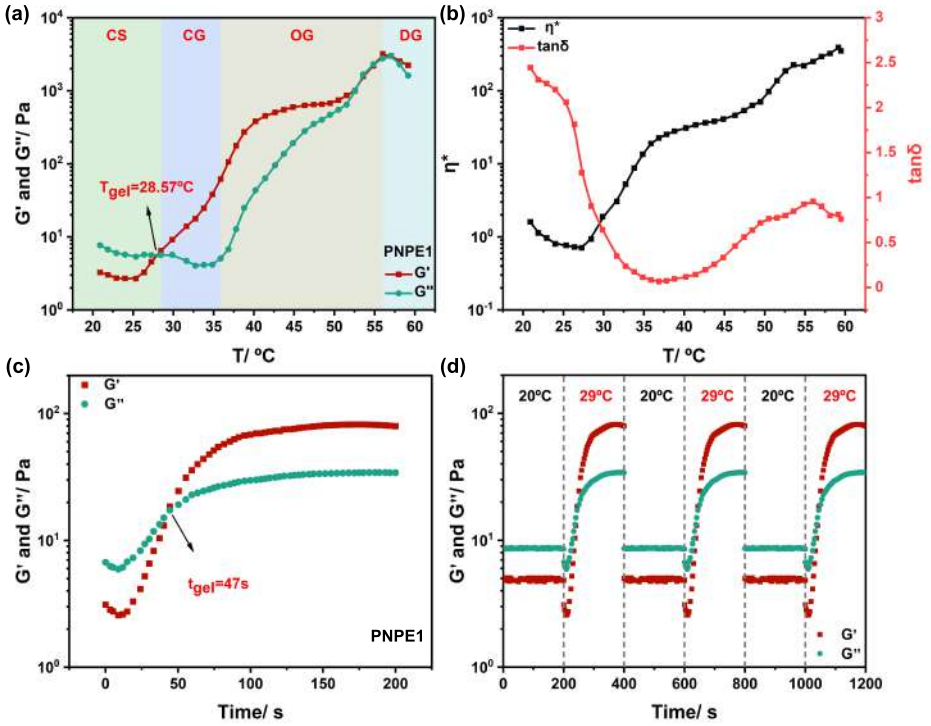


图 4.5: PNPE1 纳米水凝胶 (5 wt%) 的 (a) G' 和 G'' 随温度变化曲线以及 (b) 粘度 (η^*) 和损耗角正切 (tan δ) 随温度变化曲线；(c) G' 和 G'' 随时间的变化曲线以及 (d) CS 相和 CG 相之间的流变可逆性

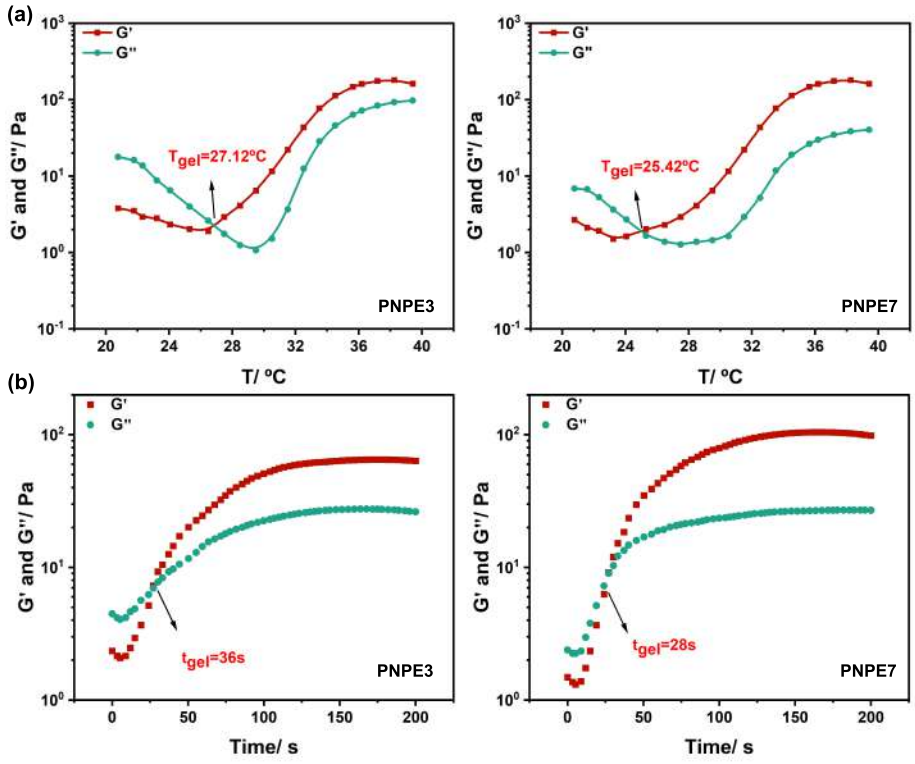


图 4.6: 不同 PNPE/NIPAM 比例的 PNPE3 (5 wt%) (左) 和 PNPE7 纳米水凝胶 (5 wt%) (右) 的 G' 和 G'' 随温度 (a) 和时间 (b) 的变化曲线

的模量开始下降对应了系统的宏观相分离。随温度变化的水凝胶的黏度和损耗正切也体现了纳米水凝胶的“溶胶-凝胶”转变过程，如图 4.5 (b) 所示。CS 相中凝胶体系的 $G''>G'$，因此 $\tan\delta>1$；随着温度升高，纳米水凝胶较弱的疏水作用导致的颗粒收缩引起溶液流动性增加，粘度减小。G' 的增长速率大于 G''，$\tan\delta$ 降低。当 $\tan\delta=1$ 时，凝胶体系发生凝胶化，凝胶体系从此温度后由粘性流体变成弹性网络，因此黏度会在此点之后突增。CG 相中凝胶体系的 $G''<G'$, $\tan\delta<1$, 随着温度的继续升高，G' 的增长速率大于 G''，$\tan\delta$ 降低，降低到最低点时，认为 CG 相结束；OG 相中凝胶体系的 $G''<G'$, $\tan\delta<1$, G' 的增长速率小于 G''，$\tan\delta$ 增加，当 $\tan\delta=1$ 时，凝胶体系又达到了溶胶-凝胶的转换点，在此点之后，凝胶开始脱水即 DG 相。

此外，图 4.5 (c) 和 (d) 显示了 PNPE1 纳米水凝胶 (5 wt%) 在加热过程中 G' 和 G'' 的时间变化曲线以及 CS 相和 CG 相之间的流变可逆性。PNPE1 纳米水凝胶在其凝胶化温度 (29 ℃) 下可以在 47 s 内快速凝胶化。当温度在 20 ℃ (凝胶化温度以下) 和相应的凝胶化温度之间时，水凝胶呈现可逆的溶胶-凝胶转变。当温度从 20 ℃ 跃升到其凝胶化温度 (29 ℃) 时，粘性溶液立即形成稳定的凝胶。当凝胶温度从 29 ℃ 降至 20 ℃ 时，凝胶迅速崩解并恢复其液体行为。弹性模量和损耗模量立即恢复到初始值。经过 3 次加热/冷却循环后，凝胶的流变性能完全恢复，表明 PNPE1 纳米水凝胶具有可逆的溶胶-凝胶转变行为。

图 4.6 显示了具有不同 PNPE/NIPAM 比例的 PNPE 纳米水凝胶 (5 wt%) 的凝胶行为。随着单体摩尔比从 1% 增加到 7%，PNPE 纳米粒子的表观溶胶-凝胶转变温度从 28.57 ℃ 下降到 25.42 ℃，表明体系的凝胶温度随着疏水单体的增加而降低。同样地，纳米水凝胶模量关于时间的曲线中，随着单体比例从 1% 增加到 7%，PNPE 纳米粒子的表观溶胶-凝胶转变时间从 47 s 减少到 28 s，表明体系的凝胶时间随着疏水单体的增加而减少。如图 4.3 所示，给出了纳米水凝胶的结构式和键合示意图。在凝胶过程中，疏水单体的引入形成共聚水凝胶，水溶液中亲水聚合物链段之间的交联点形成疏水结构域，从而减缓共聚水凝胶的快速相变和脱水。同时，由于物理交联的疏水性，PNPE 纳米水凝胶之间还存在氢键和芳环相互作用等成键作用，使得 PNPE 纳米水凝胶能够实现溶胶-凝胶转变。引入疏水单体量增加，水溶液中疏水结构域形成的物理交联点越多，共聚纳米水凝胶的相变行为就更加缓慢，氢键和芳环相互作用等成键作用增强，体系需要实现凝胶化的温度和时间就减短。

如图 4.7 (a) 所示，PNPA1 纳米水凝胶 (5 wt%) 同样具有 CS→CG→OG→DG 相转变的流变学曲线。结合图 4.7 (b)，很容易的将 PNPA1 的凝胶化行为划分为不同的相态。PNPA1 纳米水凝胶 (5 wt%) 在 26.87 ℃ 发生凝胶化转变。在凝胶化温度 (27 ℃) 下,PNPA1 纳米水凝胶 (5 wt%) 在 38 s 内形成了稳定的凝胶，并且在三个 20 ℃ 到 27 ℃ 之间的温度循环间较好的实现了溶胶-凝胶转变的可逆循环，

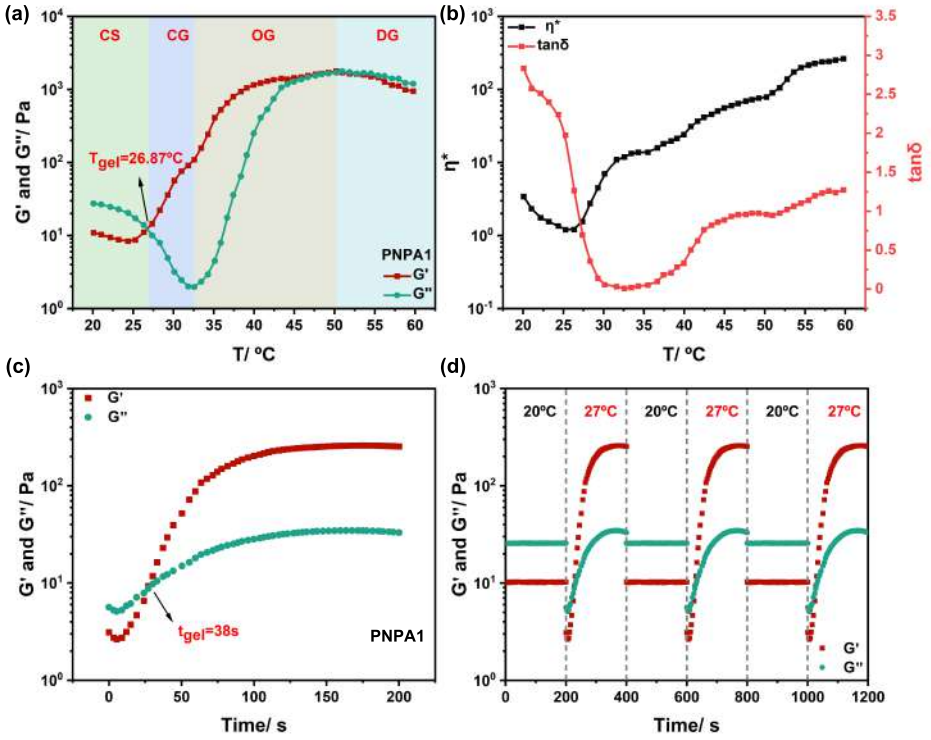


图 4.7: PNPA1 纳米水凝胶 (5 wt%) 的 (a) G' 和 G'' 随温度变化曲线以及 (b) 粘度 (η^*) 和损耗角正切 (tan δ) 随温度变化曲线；(c) G' 和 G'' 随时间的变化曲线以及 (d) CS 相和 CG 相之间的流变可逆性

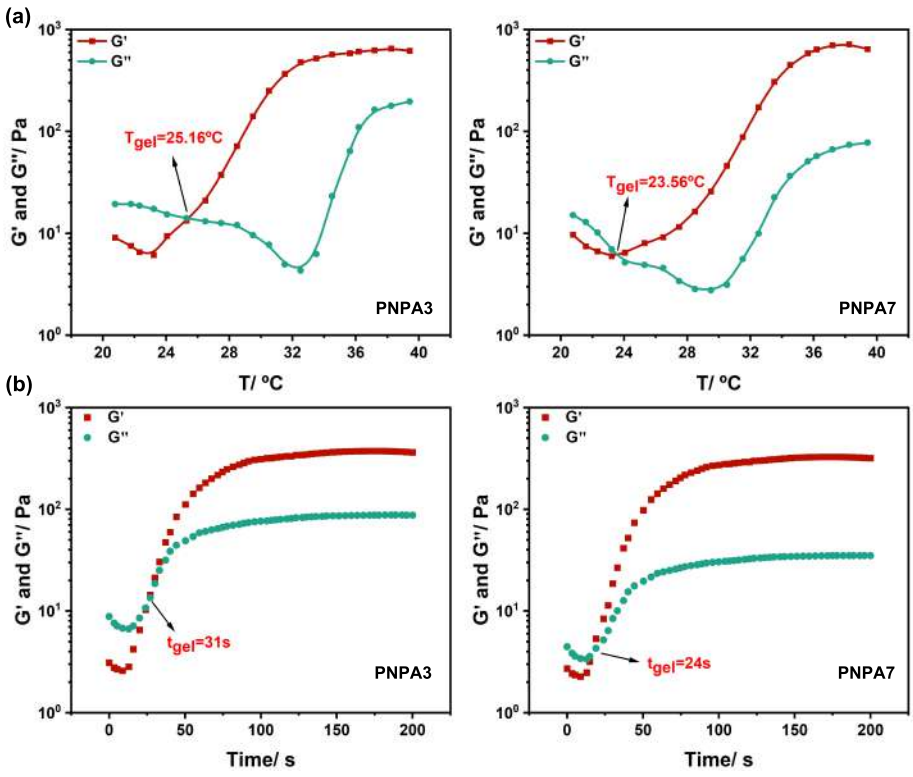


图 4.8: 不同 PNPA/NIPAM 比例的 PNPA3 (5 wt%) (左) 和 PNPA7 纳米水凝胶 (5 wt%) (右) 的 G' 和 G'' 随温度 (a) 和时间 (b) 的变化曲线

表明了其物理交联的可逆性。图 4.8 显示了具有不同 PNPA/NIPAM 比例的 PNPA 纳米水凝胶 (5 wt%) 的凝胶行为。随着单体摩尔比从 1% 增加到 7%，PNPA 纳米粒子的表观溶胶-凝胶转变温度从 26.87 ℃ 下降到 23.56 ℃，同样表明体系的凝胶温度随着疏水单体的增加而降低。另外，纳米水凝胶模量关于时间的曲线中，随着单体比例从 1% 增加到 7%，PNPA 纳米粒子的表观溶胶-凝胶转变时间从 38 s 减少到 24 s，同样表明体系的凝胶时间随着疏水单体的增加而减少。

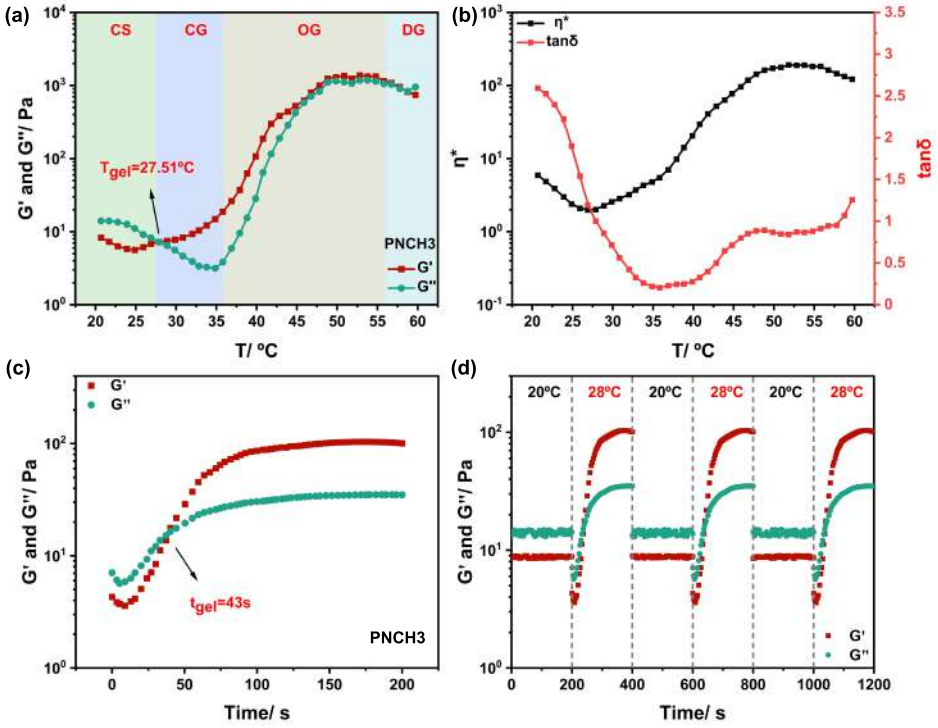


图 4.9: PNCH3 纳米水凝胶 (5 wt%) 的 (a) G' 和 G'' 随温度变化曲线以及 (b) 粘度 (η^*) 和损耗角正切 (tan δ) 随温度变化曲线；(c) G' 和 G'' 随时间的变化曲线以及 (d) CS 相和 CG 相之间的流变可逆性

对 PNCH 纳米水凝胶来说，前文已经提到，PNCH3 纳米水凝胶才能实现溶胶-凝胶转变，而 PNCH1 纳米水凝胶无法实现凝胶化行为。图 4.9 (a) 表明了 PNCH3 纳米水凝胶 (5 wt%) 同样能实现 CS→CG→OG→DG 的相转变。结合图 4.9 (b)，很容易的将 PNCH3 的凝胶化行为划分为不同的相态。PNCH3 纳米水凝胶 (5 wt%) 在 27.51 ℃ 下实现溶胶-凝胶转变。在凝胶化温度 (28 ℃) 下，PNCH3 纳米水凝胶 (5 wt%) 在 43 s 内形成了稳定的凝胶，并且在三个 20 ℃ 到 28 ℃ 之间的温度循环间较好的实现了溶胶-凝胶转变的可逆循环，同样表明了其物理交联的可逆性。图 4.10 显示了具有不同 PNCH/NIPAM 比例的 PNCH 纳米水凝胶 (5 wt%) 的凝胶行为。显而易见，PNCH1 纳米水凝胶 (5 wt%) 随温度变化的模量曲线中并没有交点 ($G' = G''$)，损耗模量一直大于弹性模量，这表明 PNCH1 纳米水凝胶 (5 wt%) 随温度变化发生相变，并没有实现溶胶-凝胶转变，图 4.10 (b) 的模

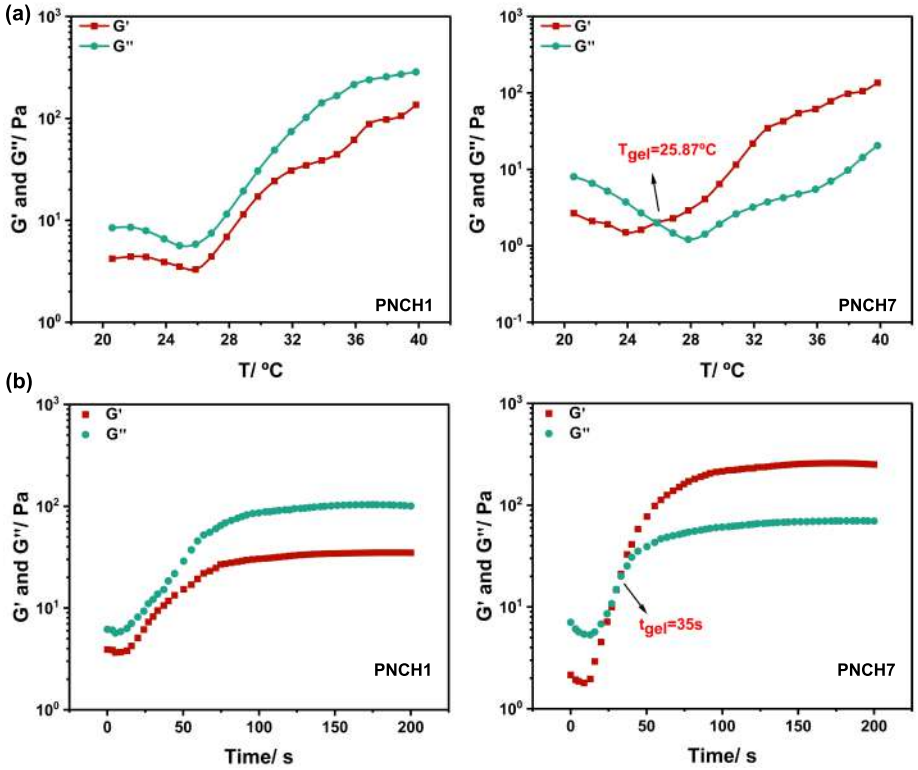


图 4.10: 不同 PNCH/NIPAM 比例的 PNCH1 (5 wt%) (左) 和 PNCH7 纳米水凝胶 (5 wt%) (右) 的 G' 和 G'' 随温度 (a) 和时间 (b) 的变化曲线

量随时间变化的曲线 ($G' < G''$) 中同样证明这一点，这与 PNIPAM 纳米水凝胶一致。另外，随着单体摩尔比从 3% 增加到 7%，PNCH 纳米水凝胶的溶胶-凝胶转变温度从 27.51 ℃ 下降到 25.87 ℃，同样表明体系的凝胶温度随着疏水单体的增加而降低。另外，纳米水凝胶模量关于时间的曲线中，随着单体比例从 3% 增加到 7%，PNCH 纳米水凝胶的溶胶-凝胶转变时间从 43 s 减少到 35 s，同样表明体系的凝胶时间随着疏水单体的增加而减少。

值得注意的是，在疏水单体摩尔比例为 3% 时，PNCH 纳米水凝胶的凝胶化温度为 27.51 ℃，PNPE 纳米水凝胶的凝胶化温度为 27.12 ℃，而 PNPA 纳米水凝胶的凝胶化温度为 25.15 ℃，这可能是由引入 PNIPAM 纳米水凝胶网络中的疏水单体的空间位阻不同而造成的。PNPA 纳米水凝胶侧链中引入空间位阻较大的苯基，使得物理交联的疏水区更多，物理疏水交联点强度增加，同时苯环间还存在芳环相互作用等成键作用，使得 PNPA 纳米水凝胶具有更低的凝胶化温度和较短的时间。PNCH 纳米水凝胶侧链中引入空间位阻较小的环己基，形成的疏水域和物理交联点强度低于苯基和苯乙基，因此具有较高的凝胶化温度和较长的凝胶化时间。

4.4.2 纳米水凝胶的脱水量表征

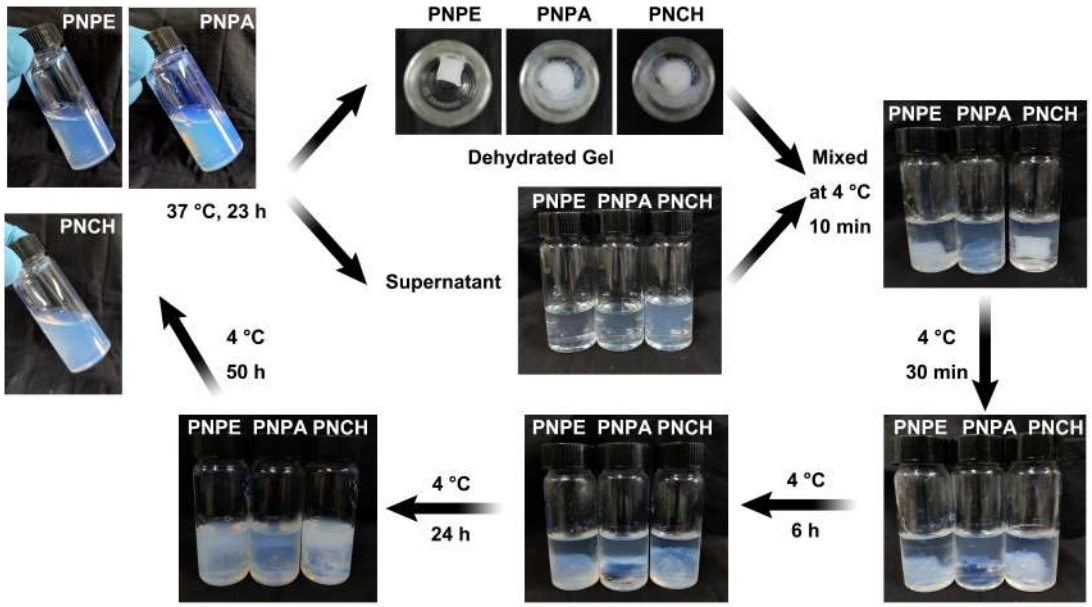


图 4.11: 5 wt% PNPE3、PNPA3 和 PNCH3 纳米水凝胶的去溶胀/溶胀示意图

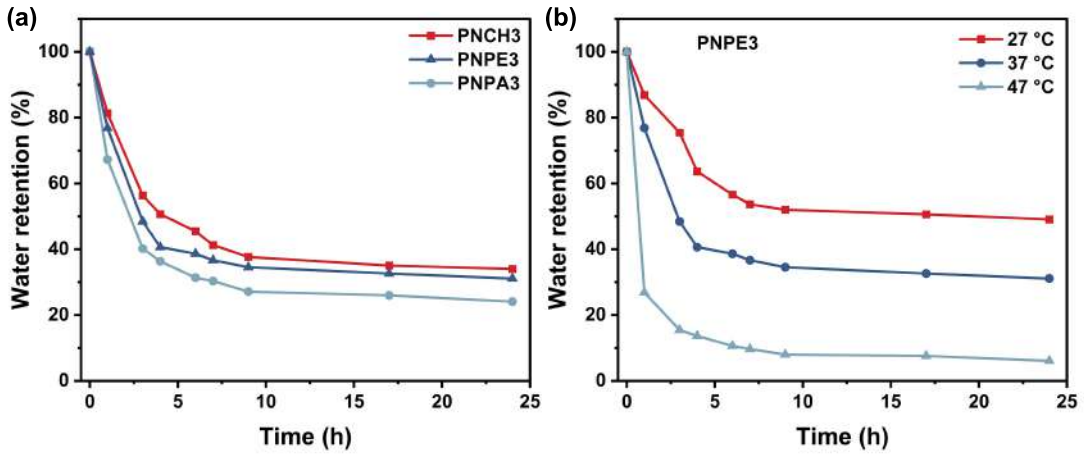


图 4.12: (a) 37 ℃ 下，5 wt% PNPE3、PNPA3 和 PNCH3 纳米水凝胶的孵育时间与剩余含水量关系曲线；(b) 不同温度下 5 wt% PNPE3 纳米水凝胶的孵育时间与剩余含水量关系曲线

宏观温敏性水凝胶在 T_{gel} 以上会发生脱水收缩行为[97]，水凝胶网络迅速收缩，水分子从凝胶网络中脱出。因此，我们以 PNPE3、PNPA3 以及 PNCH3 纳米水凝胶为例，研究了其脱水/溶胀行为，以及孵育时间对纳米水凝胶的热致脱水收缩行为的影响。首先，三种纳米水凝胶的脱水/溶胀行为如图 4.11 所示，PNPE3、PNPA3 以及 PNCH3 纳米水凝胶置于 37 ℃ 环境下孵育，宏观水凝胶发生相分离。间隔特定时间点将宏观水凝胶收缩脱出的水 (上清液) 取出，23 h 后，三种纳米

水凝胶的脱水收缩行为已趋于稳定，停止孵育，最终的排出的水分子和脱水收缩后的宏观凝胶如所示。然后，将宏观凝胶与其各自排出的上清液混合后置于 4 ℃环境下孵育，观察宏观凝胶的溶胀过程。结果表明，脱水收缩后的宏观凝胶在温度降低后缓慢吸水溶胀，颜色从白色缓慢变蓝，恢复至原状需要约 80 h，具有明显的迟滞现象。这也间接证明了在 PNPE3、PNPA3 以及 PNCH3 纳米水凝胶溶胶-凝胶化过程中，凝胶网络内存在分子内/分子间的相互作用，如氢键作用、疏水作用等，因此从凝胶恢复至溶胶状态需要更多的时间。如图 4.12 所示，将前文研究脱水/溶胀行为操作中特定时间点取出的上清液进行称重，利用公式 5 计算出宏观凝胶脱水后的剩余含水量。图 4.12 (a) 的脱水斜率表明，PNPE3、PNPA3 以及 PNCH3 纳米水凝胶的初始脱水速率为 PNCH3 > PNPE3 > PNPA3，最终的脱水量和含水量都是 PNCH3 > PNPE3 > PNPA3。凝胶的疏水性能越强，在 Tp 以上，其脱水收缩能力和程度也越大。图 4.12 (b) 表示温度对宏观凝胶脱水量的影响，孵育温度越高，相同时间内，其脱水作用越强。27 ℃ 下 PNPE3 宏观水凝胶在 1 h 内脱水很少，而在 47 ℃ 下，1 h 内的脱水量高达 80%。温度越高，其疏水作用越强，从而脱水收缩能力也越强。

4.4.3 纳米水凝胶的可注射性能表征

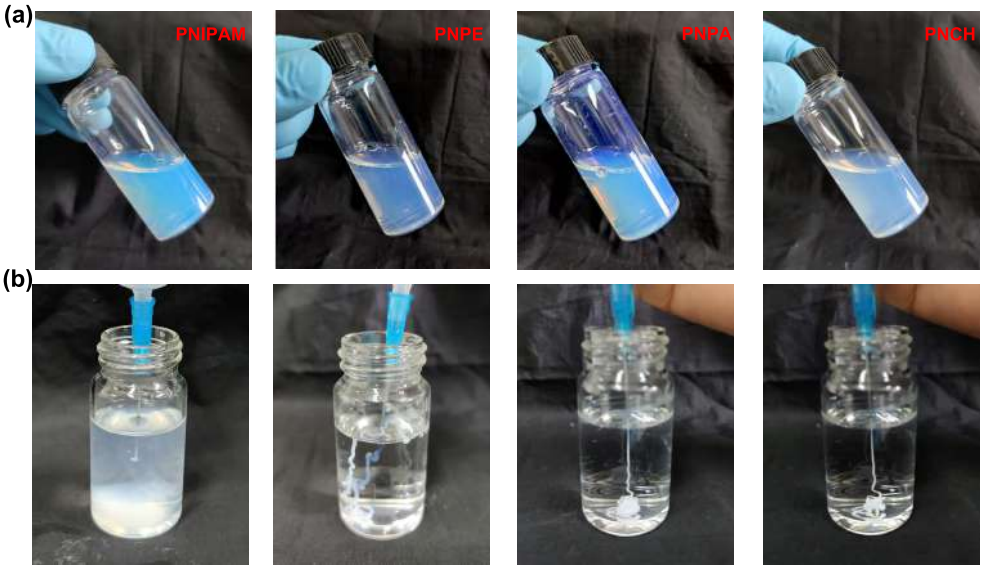


图 4.13: 5 wt% PNIPAM、PNPE3、PNPA3 和 PNCH3 纳米水凝胶的可注射性能

图 4.13 表明纳米水凝胶的可注射性能，PNIPAM、PNPE3、PNPA3 和 PNCH3 纳米水凝胶在室温下均呈现良好的流动状态，使用注射器抽取 2 mL 纳米水凝胶注入恒温 37 ℃ PBS 溶液中，PNPE3、PNPA3 和 PNCH3 纳米水凝胶立即发生溶胶-凝胶转变，呈现固体的凝胶状态，具有优异的可注射性能。作为对比，PNIPAM 纳米水凝胶无法实现溶胶-凝胶转变，只能发生相变。

4.4.4 纳米水凝胶的体外细胞毒性表征

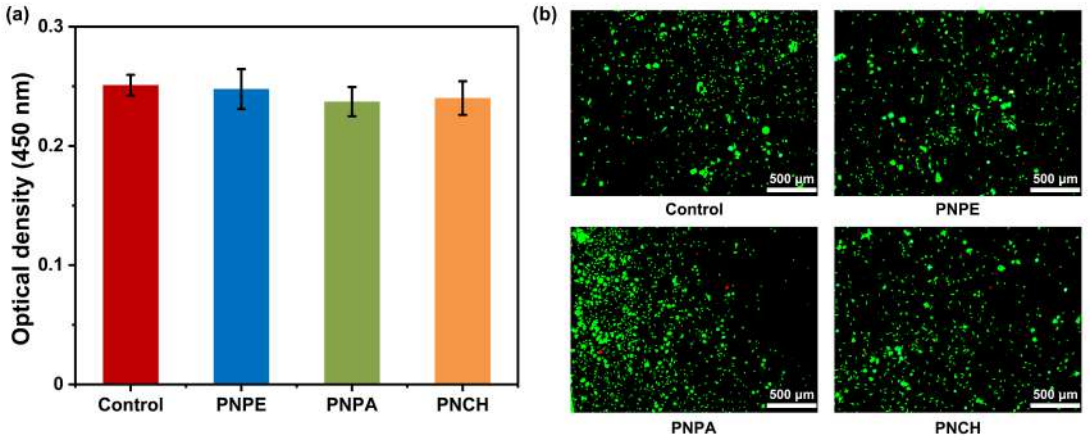


图 4.14: L-929 细胞与 PNPE3、PNPA3 和 PNCH3 纳米水凝胶培养 24 h 后的 (a) 增殖分析图和 (b) 细胞活死染色图。ANOVA 单因素检验，$p<0.05$

CCK-8 (Cell Counting Kit-8 细胞计数试剂) 检测是一种常用的体外细胞毒性评价的光学方法，它通过测量细胞活力敏感染料在受试液中的吸光度评判材料的细胞毒性大小。由于使用了高度水溶性的四唑盐，CCK-8 检测具有显著的敏感性和操作方便性, 比其他基于四唑盐的检测方法 (如 MTT) 具有更高的检测灵敏度[98]。CCK-8 测定中含有 WST-8 染料：2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐，它在电子电子耦合试剂 1-甲氧基-5-甲基吩嗪鎓硫酸二甲酯 (1-Methoxy PMS) 存在的情况下，被细胞内线粒体中的脱氢酶还原，形成水溶性较好的的橙黄色甲瓒产物 (Formazan)[99]，因此细胞增殖越多越快，活细胞数量越多，橙黄色甲瓒产物越多，颜色就越深；反之亦然。通过酶标仪测定 450 nm 处记录 Formazan 的吸光度 (OD 值)，就可以简单地估计细胞活力[100]。

活细胞/死细胞染色试剂盒是采用 Calcein-AM/PI 双染细胞方法染色活细胞和死细胞。试剂盒工作原理在于：Calcein-AM (钙黄绿素乙酰甲酯) 在传统的 Calcein (钙黄绿素) 基础上引入乙酰甲氧基甲酯 (AM) 基团，增加了疏水性，因此能够轻易穿透活细胞膜, 是一种高度亲酯、对活细胞进行荧光标记的细胞染色试剂。Calcein-AM 本身不发荧光，一旦进入细胞后，细胞质内的酯酶将其剪切形成膜非渗透性的极性分子 Calcein，留在细胞内并发出亮绿色荧光 (Ex/Em=490 nm/515 nm)[101]。由于死细胞缺乏酯酶，因此 Calcein-AM 仅对活细胞进行染色[101]。另一方面，PI (碘化丙啶) 是一种细胞核染料，它不能穿透完整的活细胞膜，仅能穿过死细胞膜的不规则区域进入细胞核，并嵌入细胞的 DNA 双螺旋区域从而产生红色荧光 (Ex/Em=535 nm/617 nm)，因此 PI 仅对死细胞染色[102]。两种染料都可以被 490 nm 激发，因此可以用荧光显微镜同时观察活细胞和死细胞。这样，

Calcein-AM/PI 就被结合用来作为活细胞和死细胞的双重染色。

L-929 和三种纳米水凝胶培养 24 h 后的增殖分析图和细胞活死染色图如图 4.14 所示。培养 24 h 后，图 4.14 (b) 可以明显看出活细胞 (绿色) 占主导地位，24 h 内仅观察到微量死细胞 (红色)，这表明纳米水凝胶具有良好的细胞相容性。CCK-8 测定增殖结果与上述结果一致，培养 24 h 后，空白样的 OD 值为 0.25 ± 0.01，PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶的 OD 值分别为 0.25 ± 0.02，0.24 ± 0.01 和 0.24 ± 0.01，三种纳米水凝胶同空白样相比增值速率没有显著性差异。这两种实验结果可以说明三种纳米水凝胶对小鼠上皮成纤维细胞 (L-929) 没有明显的毒性，三种凝胶均能为其生长增殖提供一个良好的环境。这也表明三种可注射纳米水凝胶能用于生物医学领域，在组织工程、药物负载等需要低毒性和良好生物相容性要求的领域具有广阔的应用前景。

4.5 本章小结

前一章中，利用变温 ^{1}H NMR 和 FT-IR 技术从分子水平上探究了 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶能实现可逆的溶胶-凝胶转变的相变机理。引入的不同侧链疏水基团 (苯乙基、苯基和环己基) 对基于 PNIPAM 的纳米水凝胶相变行为具有重要的贡献。三种凝胶表现出不同的凝胶化行为，包括不同的凝胶化温度、凝胶化时间、相转变温度等。在本章中，主要对宏观纳米水凝胶进行脱水/溶胀行为观测，通过流变学测试，表明三种水凝胶的模量随温度和时间的变化差异；同时，探究了纳米水凝胶的可注射性能，利用小鼠上皮成纤维细胞 (L-929) 探究了三种纳米水凝胶的体外细胞毒性。具体结论如下：

(1) 流变测试表明，结合 PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶随温度变化的黏度 (η^*) 和损耗角正切 ($\tan\delta$) 的变化曲线，三种纳米水凝胶模量 (G'、G'') 随温度变化的曲线体现了它们彩色溶液相 (CS) → 彩色凝胶相 (CG) → 不透明凝胶相 (OG) → 脱水凝胶相 (DG) 的“溶胶-凝胶”转变过程。随着单体配比增加，PNPE、PNPA 和 PNCH 热致物理交联纳米水凝胶的凝胶化温度随着疏水单体的增加而降低，凝胶化时间随着疏水单体的增加而减少。由于三种疏水单体的引入，共聚水凝胶溶液中亲水聚合物链段之间存在疏水结构域形成的交联点，疏水交联点减缓 PNIPAM 共聚水凝胶的快速相变和脱水并使纳米水凝胶在相变温度以上保持相互接触，从而形成热诱导的物理凝胶。疏水性单体的摩尔比增加，疏水结构域形成的交联点增多，凝胶化温度降低，所需的凝胶化时间就减短。另外，在相同单体比例下，PNPA 纳米水凝胶的凝胶化温度低于 PNPE 和 PNCH 纳米水凝胶，凝胶化时间也比 PNPE 和 PNCH 纳米水凝胶短，这可能是因为 PAA 单体中的酰胺键直接连接到具有更大空间位阻的苯基上，PNPA 纳米水凝胶侧链中具有更大的空间位阻，使得物理交联的疏水区强度更高，形成速度更快，使相变行为更加

缓慢，从而 PNPA 纳米水凝胶的凝胶化温度降低，凝胶化时间缩短。

(2) PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶在 Tp 以上发生脱水收缩行为，因为凝胶网络存在的额外的氢键或疏水作用，三种纳米水凝胶相变脱水后具有明显的滞后恢复现象。PNPE3、PNPA3 以及 PNCH3 纳米水凝胶由于侧链引入疏水单体的空间结构、疏水性能不同，初始脱水速率、最终的脱水量和含水量均不同，表现为 PNCH3 > PNPE3 > PNPA3。凝胶的疏水性能越强，在 Tp 以上，其脱水收缩能力和程度也越大。

(3) PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶具有优异的可注射性。其体外细胞毒性结果表明三种纳米水凝胶对 L-929 没有明显的毒性，培养 24 h 后，三种纳米水凝胶同空白样相比增值速率没有显著性差异，均能为其生长增殖提供一个良好的环境。这也表明三种热致物理交联纳米水凝胶能用于生物医学领域，在组织工程、药物负载等需要低毒性和良好生物相容性要求的领域具有广阔的应用前景。

第五章　总结与展望

本文致力于开发一种合成步骤简单、所需凝胶浓度较低且不添加额外的盐或其他添加剂的方法制备 PNIPAM-based 热致物理交联纳米水凝胶，期望在药物输送和组织工程等方面具有独特的应用前景。全文总结如下：

(1) 成功合成了三种疏水性单体 PEAA、PAA 和 CHAA，并利用乳液沉淀聚合法将三种疏水性单体分别与 NIPAM 共聚，改变了合成的条件，得到一系列 PNPE、PNPA 和 PNCH 温敏性共聚纳米水凝胶。DLS 和试管倒置法结果表明：a. 疏水性单体增加，纳米水凝胶粒径发生减小，单分散性良好且不发生明显变化。PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶在单体摩尔比例 1～14% 之间，PNCH 纳米水凝胶在 3～16% 之间能实现可逆的溶胶-凝胶转变过程，由于适当的疏水-亲水平衡才能实现凝胶化转变，这预示着三种疏水单体疏水能力的强弱，疏水单体含量增加，纳米水凝胶的临界凝胶化温度和浓度降低，疏水单元聚集成疏水域作为交联点，交联点越多，对于凝胶的形成更有利；b. 乳化剂 SDS 用量增加，纳米水凝胶粒径减小，单分散性变好，临界凝胶化温度均有所增加，这表明 SDS 用量的增加使得凝胶体系稳定性增加，粒径减小，需要更高的温度来使凝胶微球间相互接触，实现溶胶-凝胶转变；c. 交联剂 BIS 含量增加，纳米水凝胶粒径减小，单分散性良好不发生明显变化，临界凝胶化温度均有所降低，这表明 BIS 含量的增加使得胶体系交联程度增加，链段纠缠越多，疏水作用增加，所需临界凝胶化温度降低。

(2) 侧链疏水基团的引入不仅降低了 PNIPAM 的相变温度，同时也延缓了相变的剧烈程度。在单体比例相同的情况下，变温 DLS 结果表明 PNPA 纳米水凝胶的相变温度低于 PNPE 纳米水凝胶低于 PNCH 纳米水凝胶。利用变温 ^{1}H NMR 技术从分子角度衡量了纳米水凝胶的相变行为，结果表明与发生急剧相变行为的 PNIPAM 不同，三种纳米水凝胶缓慢的 ρ 增长曲线表示其缓慢的相变行为。苯乙基、苯基和环己基基团相当大的空间位阻，阻碍了链段的运动。在加热过程中这种缓慢的相变行为避免了纳米水凝胶的剧烈收缩、崩塌和宏观相分离行为，使纳米水凝胶在相变温度以上能保持相互接触，从而形成热诱导的物理凝胶化。同时，四种纳米水凝胶显示出相同的质子变化顺序，侧链上的质子变化先于主链上的质子，这预示着基于 PNIPAM 共聚的纳米水凝胶相变时，侧链要先于主链发生温度扰动。对同一质子来说，PNPA 纳米水凝胶质子的转变点和斜率都小于 PNPE 纳米水凝胶再小于 PNCH 纳米水凝胶，这表明 PNPA 纳米水凝胶的相变行为发生的更早，更缓慢。单体结构上具有较大空间位阻和刚性的疏水基团对水凝胶的凝胶化行为有重要贡献，侧基 N-苯基的空间位阻和刚性更大，N-苯乙基次之，而 N-环己基更弱，PNPA 纳米水凝胶在变温 ^{1}H NMR 结果中显示出比 PNPE 和 PNCH 纳米水凝胶更缓慢的相变行为。

(3) 变温 FT-IR 也表征了纳米水凝胶的相变行为。纳米水凝胶的 $v_{as}(CH_3)$

和 $v_{as}(CH_2)$ 的振动吸收峰发生红移，并向低波数方向移动，表明纳米水凝胶的脱水收缩过程。结果表明四种纳米水凝胶显示出相同的谱峰变化先后顺序，即 C=O···D-O-D > C=O···D-N > $v_{as}(CH_3)$ > $v_{as}(CH_2)$，预示着基于 PNIPAM 共聚的纳米水凝胶相变时，氢键作用最先受温度扰动，同时侧链上的甲基要先于主链上的乙基发生温度扰动。对同一谱峰而言，PNIPAM 纳米水凝胶在转变点附近几乎垂直急剧增加，对应了其急剧相变行为，而 PNPE、PNPA、PNCH 纳米水凝胶吸收峰缓慢向低波数移动，并且 PNPA 纳米水凝胶的转变温度和斜率都小于 PNPE 纳米水凝胶再小于 PNCH 纳米水凝胶，这与凝胶结构中侧链引入疏水单体基团的空间位阻大小有关。PCMW 光谱能确定 PNIPAM、PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶的光谱变化点 (相变点) 和相变温度范围，三种纳米水凝胶的相变点温度为 PNIPAM > PNPE > PNPA，相变范围 PNPA > PNPE > PNIPAM，具有较大空间位阻的疏水性单体引入使得 PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶相变温度降低，相变的温度范围增大。2Dcos 分析确定 PNIPAM、PNPE 和 PNPA 纳米水凝胶相变过程中每个基团受温度扰动的先后顺序，结果表明三种水凝胶相变过程中显示相同的基团随温度的扰动顺序，即 C=O···D-O-D > C=O···D-N > Hydrated $v_{as}(CH_3)$ > Less hydrated $v_{as}(CH_3)$ > $v_{as}(CH_2)$ > $v_s(CH_3)$。这一结果可概括为：当温度升高时，纳米水凝胶中的氢键最敏感，C=O···D-O-D 氢键中的水分子脱离，形成新氢键 (C=O-D-N)。然后，随着疏水性的增加，侧链中的-CH_3 基团发生脱水，，聚合物链开始聚集，然后是主链中的-CH_2-基团。这与前文的结果一致，从微观角度得到了基于 PNIPAM 共聚纳米水凝胶的相变行为。

(4) 纳米水凝胶的流变测试能表明在温度变化的过程中凝胶体系的模量变化。三种纳米水凝胶模量 (G'、G'') 随温度变化的曲线体现了它们彩色溶液相 (CS) → 彩色凝胶相 (CG) → 不透明凝胶相 (OG) → 脱水凝胶相 (DG) 的“溶胶-凝胶”转变过程。随着单体摩尔比增加，体系的凝胶化温度随着疏水单体的增加而降低，凝胶化时间随着疏水单体的增加而减少。相同比例下，PNPA 纳米水凝胶的凝胶化温度和凝胶化时间均小于 PNPE 纳米水凝胶再小于 PNCH 纳米水凝胶，这表明 PAA 单体中的酰胺键直接连接到具有更大空间位阻和刚性较大的苯基上，PNPA 纳米水凝胶侧链中具有更大的空间位阻，使得物理交联的疏水区强度更高，形成速度更快，使相变行为更加缓慢，避免了纳米水凝胶的剧烈收缩、崩塌和宏观相分离行为，使纳米水凝胶在相变温度以上能保持相互接触形成热诱导的物理凝胶化，从而 PNPA 纳米水凝胶的凝胶化温度降低，凝胶化时间缩短。

(5) 同时，PNPE、PNPA 和 PNCH 纳米水凝胶在 Tp 以上均发生脱水收缩行为，相变脱水后具有明显的滞后恢复现象。三种水凝胶均具有良好的可注射性能和细胞相容性，这表明三种热致物理交联纳米水凝胶能用于生物医学领域，在组织工程、药物负载等需要低毒性和良好生物相容性要求的领域具有广阔的应用前景。

在本文中，我们成功地利用简单的方法制备临界凝胶化浓度较低且不需额外的添加剂就能实现溶胶-凝胶转变的纳米水凝胶，该水凝胶具有优异的可注射性能和生物相容性，在生物医学领域具有良好的应用潜力。然而，将这些合成的热致物理交联纳米水凝胶成功地用于复杂的生物微环境是真正应用的主要挑战，在实际应用中，还存在响应速度慢、机械强度低等发展障碍。要进一步开发生物医学领域的热致交联可注射水凝胶应重点考虑体系的安全性，体外和体内毒性结果存在差距，实验小动物模型与人类状况之间的差距更大，未来临床使用的 PNIPAM-based 热致物理交联纳米水凝胶材料应倾向于安全性较高、可降解方向；创造新的性质、提高热致物理交联纳米水凝胶的模量和先进的功能也是开发需要考虑的因素。随着临床用户的关注，在开发具有“智能”功能的热致物理交联纳米水凝胶方面，未来将取得更多的成就。为了在其它领域增加 PNIPAM-based 智能水凝胶的应用，未来不仅需要更多的尝试来构建新颖的结构并提高其性能，而且还需要开发多种功能 (如多响应、自愈合和自发能量) 的 PNIPAM-based 水凝胶体系，预计来自不同背景的跨学科学者的协调努力将为 PNIPAM-based 智能水凝胶的应用带来新的光明。

参考文献

[1] Kim Y J, Matsunaga Y T. Thermo-responsive polymers and their application as smart biomaterials[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2017, 5(23): 4307-4321.

[2] Grijalvo S, Eritja R, Díaz Díaz D. On the race for more stretchable and tough hydrogels[J]. Gels, 2019, 5(2): 1-24.

[3] Van Vlierberghe S, Dubruel P, Schacht E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review[J]. Biomacromolecules, 2011, 12(5): 1387-1408.

[4] Caliari S R, Burdick J A. A practical guide to hydrogels for cell culture[J]. Nature Methods, 2016, 13(5): 405-414.

[5] Li J, Mooney D J. Designing hydrogels for controlled drug delivery[J]. Nature Reviews Materials, 2016, 1(12): 1-17.

[6] Li Z, Zhou Y, Li T, et al. Stimuli-responsive hydrogels: Fabrication and biomedical applications[J]. View, 2021: 1-25.

[7] Cascone S, Lamberti G. Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2020, 573: 1-51.

[8] Daly A C, Riley L, Segura T, et al. Hydrogel microparticles for biomedical applications[J]. Nature Reviews Materials, 2020, 5(1): 20-43.

[9] Kesharwani P, Bisht A, Alexander A, et al. Biomedical applications of hydrogels in drug delivery system: An update[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2021, 66: 1-17.

[10] Coukouma A E, Asher S A. Increased volume responsiveness of macroporous hydrogels[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255: 2900-2903.

[11] Jiang Z, Tan M L, Taheri M, et al. Strong, Self-Healable, and Recyclable Visible-Light-Responsive Hydrogel Actuators[J]. Angewandte Chemie, 2020, 132(18): 7115-7122.

[12] Werzer O, Tumphart S, Keimel R, et al. Drug release from thin films encapsulated by a temperature-responsive hydrogel[J]. Soft Matter, 2019, 15(8): 1853-1859.

[13] Yang X, Liu G, Peng L, et al. Highly efficient self-healable and dual responsive cellulose-based hydrogels for controlled release and 3D cell culture[J]. Advanced Functional Materials, 2017, 27(40): 1-10.

[14] Hendi A, Hassan M U, Elsherif M, et al. Healthcare applications of pH-Sensitive hydrogel-based devices: a review[J]. International Journal of Nanomedicine,

2020, 15: 3887-3901.

[15] Zhou Z, Qian C, Yuan W. Self-healing, anti-freezing, adhesive and remoldable hydrogel sensor with ion-liquid metal dual conductivity for biomimetic skin[J]. Composites Science and Technology, 2021, 203: 1-31.

[16] Liu Z, Liu J, Cui X, et al. Recent advances on magnetic sensitive hydrogels in tissue engineering[J]. Frontiers in Chemistry, 2020, 8: 1-17.

[17] Fan D, Wang Q, Zhu T, et al. Recent advances of magnetic nanomaterials in bone tissue repair[J]. Frontiers in Chemistry, 2020, 8: 1-30.

[18] Mallawarachchi S, Gejji V, Sierra L S, et al. Electrical Field Reversibly Modulates Enzyme Kinetics of Hexokinase Entrapped in an Electro-Responsive Hydrogel[J]. ACS Applied Bio Materials, 2019, 2(12): 5676-5686.

[19] Carlini A S, Gaetani R, Braden R L, et al. Enzyme-responsive progelator cyclic peptides for minimally invasive delivery to the heart post-myocardial infarction [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1-14.

[20] Shigemitsu H, Kubota R, Nakamura K, et al. Protein-responsive protein release of supramolecular/polymer hydrogel composite integrating enzyme activation systems[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1-11.

[21] Cheng Y, Ren K, Yang D, et al. Bilayer-type fluorescence hydrogels with intelligent response serve as temperature/pH driven soft actuators[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 255: 3117-3126.

[22] Tang Z, Fu Y, Ma Z. Multiple signal amplification strategies for ultrasensitive label-free electrochemical immunoassay for carbohydrate antigen 24-2 based on redox hydrogel[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 91: 299-305.

[23] Rani A, De Leon-Rodriguez L M, Kavianinia I, et al. Synthesis and characterization of mono S-lipidated peptide hydrogels: a platform for the preparation of reactive oxygen species responsive materials[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2021, 19(16): 3665-3677.

[24] Matsumoto A, Kuwata H, Kimura S, et al. Hollow fiber-combined glucose-responsive gel technology as an in vivo electronics-free insulin delivery system [J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 1-13.

[25] Halperin A, Kröger M, Winnik F M. Poly (N-isopropylacrylamide) phase diagrams: fifty years of research[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(51): 15342-15367.

[26] Jiang Y, Yan R, Pang B, et al. A Novel Temperature-Dependent Hydrogel Emulsion with Sol/Gel Reversible Phase Transition Behavior Based on Polystyrene-co-poly (N-isopropylacrylamide)/Poly (N-isopropylacrylamide)

Core–Shell Nanoparticle[J]. Macromolecular Rapid Communications, 2021, 42 (2): 1-7.

[27] Sun B, Lin Y, Wu P, et al. A FTIR and 2D-IR spectroscopic study on the microdynamics phase separation mechanism of the poly (N-isopropylacrylamide) aqueous solution[J]. Macromolecules, 2008, 41(4): 1512-1520.

[28] Idziak I, Avoce D, Lessard D, et al. Thermosensitivity of aqueous solutions of poly (N, N-diethylacrylamide)[J]. Macromolecules, 1999, 32(4): 1260-1263.

[29] Mikheeva L M, Grinberg N V, Mashkevich A Y, et al. Microcalorimetric study of thermal cooperative transitions in poly (N-vinylcaprolactam) hydrogels[J]. Macromolecules, 1997, 30(9): 2693-2699.

[30] Hua L, Xie M, Jian Y, et al. Multiple-responsive and amphibious hydrogel actuator based on asymmetric UCST-type volume phase transition[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(46): 43641-43648.

[31] Gandhi A, Paul A, Sen S O, et al. Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications[J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 10(2): 99-107.

[32] Li T, Wang Y, Li S, et al. Mechanically robust, elastic, and healable ionogels for highly sensitive ultra-durable ionic skins[J]. Advanced Materials, 2020, 32(32): 1-7.

[33] Tang J, Qiao Y, Chu Y, et al. Magnetic double-network hydrogels for tissue hyperthermia and drug release[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2019, 7(8): 1311-1321.

[34] Noh M, Choi Y H, An Y H, et al. Magnetic nanoparticle-embedded hydrogel sheet with a groove pattern for wound healing application[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2019, 5(8): 3909-3921.

[35] Du X, Cui H, Xu T, et al. Reconfiguration, Camouflage, and Color-Shifting for Bioinspired Adaptive Hydrogel-Based Millirobots[J]. Advanced Functional Materials, 2020, 30(10): 1-9.

[36] Salzano de Luna M, Marturano V, Manganelli M, et al. Light-responsive and self-healing behavior of azobenzene-based supramolecular hydrogels[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2020, 568: 16-24.

[37] Koetting M C, Peters J T, Steichen S D, et al. Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications[J]. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2015, 93: 1-49.

[38] Hu Y, Kahn J S, Guo W, et al. Reversible modulation of DNA-based hydrogel shapes by internal stress interactions[J]. Journal of the American Chemical

Society, 2016, 138(49): 16112-16119.

[39] Hatai J, Hirschhäuser C, Niemeyer J, et al. Multi-stimuli-responsive supramolecular polymers based on noncovalent and dynamic covalent bonds[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 12(2): 2107-2115.

[40] Podewitz M, Wang Y, Quoika P K, et al. Coil–globule transition thermodynamics of poly (N-isopropylacrylamide)[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2019, 123(41): 8838-8847.

[41] Pich A, Richtering W. Microgels by precipitation polymerization: synthesis, characterization, and functionalization[J]. Chemical Design of Responsive Microgels, 2010: 1-37.

[42] Anakhov M V, Gumerov R A, Potemkin I I. Stimuli-responsive aqueous microgels: Properties and applications[J]. Mendeleev Communications, 2020, 30(5): 555-562.

[43] Li F, Yang H, Bie N, et al. Zwitterionic temperature/redox-sensitive nanogels for near-infrared light-triggered synergistic thermo-chemotherapy[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(28): 23564-23573.

[44] Xu X, Liu Y, Fu W, et al. Poly (N-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive composite hydrogels for biomedical applications[J]. Polymers, 2020, 12(3): 1-22.

[45] Zhang K, Xue K, Loh X J. Thermo-Responsive Hydrogels: From Recent Progress to Biomedical Applications[J]. Gels, 2021, 7(3): 1-17.

[46] Cao M, Wang Y, Hu X, et al. Reversible thermoresponsive peptide–PNIPAM hydrogels for controlled drug delivery[J]. Biomacromolecules, 2019, 20(9): 3601-3610.

[47] Huang J, Jiang X. Injectable and degradable pH-responsive hydrogels via spontaneous amino–yne click reaction[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(1): 361-370.

[48] Cui S, Yu L, Ding J. Semi-bald micelles and corresponding percolated micelle networks of thermogels[J]. Macromolecules, 2018, 51(16): 6405-6420.

[49] Arranja A, Waton G, Schosseler F, et al. Lack of a unique kinetic pathway in the growth and decay of Pluronic micelles[J]. Soft Matter, 2016, 12(3): 769-778.

[50] Sun Y, Nan D, Jin H, et al. Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications[J]. Polymer Testing, 2020, 81: 1-13.

[51] Pertici V, Pin-Barre C, Rivera C, et al. Degradable and injectable hydrogel for drug delivery in soft tissues[J]. Biomacromolecules, 2018, 20(1): 149-163.

[52] Navaei A, Truong D, Heffernan J, et al. PNIPAAm-based biohybrid injectable hydrogel for cardiac tissue engineering[J]. Acta Biomaterialia, 2016, 32: 10-23.

[53] Wei M, Gao Y, Li X, et al. Stimuli-responsive polymers and their applications [J]. Polymer Chemistry, 2017, 8(1): 127-143.

[54] Li Z, Yin Y. Stimuli-responsive optical nanomaterials[J]. Advanced Materials, 2019, 31(15): 1-33.

[55] Jones S T, Walsh-Korb Z, Barrow S J, et al. The importance of excess poly (N-isopropylacrylamide) for the aggregation of poly (N-isopropylacrylamide)-coated gold nanoparticles[J]. ACS Nano, 2016, 10(3): 3158-3165.

[56] Liu M, Zeng X, Ma C, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering[J]. Bone Research, 2017, 5(1): 1-20.

[57] Wei Z, Gerecht S. A self-healing hydrogel as an injectable instructive carrier for cellular morphogenesis[J]. Biomaterials, 2018, 185: 86-96.

[58] Spicer C D. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: the importance of polymer choice[J]. Polymer Chemistry, 2020, 11(2): 184-219.

[59] Youngblood R L, Truong N F, Segura T, et al. It’s all in the delivery: designing hydrogels for cell and non-viral gene therapies[J]. Molecular Therapy, 2018, 26 (9): 2087-2106.

[60] Op’t Veld R C, Walboomers X F, Jansen J A, et al. Design considerations for hydrogel wound dressings: strategic and molecular advances[J]. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2020, 26(3): 230-248.

[61] Ishikawa S, Iijima K, Matsukuma D, et al. Interpenetrating polymer network hydrogels via a one-pot and in situ gelation system based on peptide self-assembly and orthogonal cross-linking for tissue regeneration[J]. Chemistry of Materials, 2020, 32(6): 2353-2364.

[62] Li B, Thompson M E. Phase transition in amphiphilic poly (N-isopropylacrylamide): controlled gelation[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2018, 20(19): 13623-13631.

[63] Nele V, Wojciechowski J P, Armstrong J P, et al. Tailoring gelation mechanisms for advanced hydrogel applications[J]. Advanced Functional Materials, 2020, 30 (42): 1-22.

[64] Schild H G. Poly (N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application [J]. Progress in Polymer Science, 1992, 17(2): 163-249.

[65] Dusunceli N, Sanporean C G, Drozdov A D, et al. Mechanical and microstructural characterization of poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels and its nanocomposites[J]. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part

L: Journal of Materials: Design and Applications, 2021, 235(5): 1021-1035.

[66] Yu L, Ding J. Injectable hydrogels as unique biomedical materials[J]. Chemical Society Reviews, 2008, 37(8): 1473-1481.

[67] Hennink W E, van Nostrum C F. Novel crosslinking methods to design hydrogels [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64: 223-236.

[68] Constantinou A P, Georgiou T K. Tuning the gelation of thermoresponsive gels [J]. European Polymer Journal, 2016, 78: 366-375.

[69] Ko C H, Claude K L, Niebuur B J, et al. Temperature-Dependent Phase Behavior of the Thermoresponsive Polymer Poly (N-isopropylmethacrylamide) in an Aqueous Solution[J]. Macromolecules, 2020, 53(16): 6816-6827.

[70] Zhou X, Fan X, He C. Hybrid Starlike Block Copolymer POSS–(PDMAEMA-b-PNIPAm) 8: Thermal Gelation and Its Blends with Poly (vinyl alcohol)[J]. Macromolecules, 2016, 49(11): 4236-4244.

[71] Allen D A, Tomaso Jr A E, Priest O P, et al. Mosher amides: determining the absolute stereochemistry of optically-active amines[J]. Journal of Chemical Education, 2008, 85(5): 698-700.

[72] Huggins M T, Billimoria F. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy. An Advanced Undergraduate Experiment[J]. Journal of Chemical Education, 2007, 84 (3): 471-474.

[73] Gallaher T N, Gaul D A, Schreiner S. The esterification of trifluoroacetic acid [J]. Journal of Chemical Education, 1996, 73(5): 465-470.

[74] Morton J G, Joe C L, Stolla M C, et al. NMR Determination of hydrogen bond thermodynamics in a simple diamide: a physical chemistry experiment[J]. Journal of Chemical Education, 2015, 92(6): 1086-1090.

[75] Jensen B L, Fort Jr R C. Molecular mechanics and variable-temperature 1H NMR studies on N, N-diethyl-m-toluamide. An undergraduate NMR and molecular modeling experiment[J]. Journal of Chemical Education, 2001, 78(4): 538-540.

[76] Su G, Zhou T, Liu X, et al. Micro-dynamics mechanism of the phase transition behavior of poly(N-isopropylacrylamide-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels revealed by two-dimensional correlation spectroscopy[J]. Polymer Chemistry, 2016, 8(5): 865-878.

[77] Su G, Jia L, Zhang X, et al. Exploration of the unusual two-step volume phase transition of the poly (N-vinylcaprolactam-co-hydroxyethyl methacrylate) hydrogel[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2018, 20(35): 23013-23024.

[78] Fischer T, Demco D E, Fechete R, et al. Poly (vinylamine-co-N-isopropylacrylamide) linear polymer and hydrogels with tuned thermore-

sponsivity[J]. Soft Matter, 2020, 16(28): 6549-6562.

[79] Popescu M C, Filip D, Vasile C, et al. Characterization by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and 2D IR correlation spectroscopy of PAMAM dendrimer[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2006, 110(29): 14198-14211.

[80] Morita S, Shinzawa H, Noda I, et al. Perturbation-correlation moving-window two-dimensional correlation spectroscopy[J]. Applied Spectroscopy, 2006, 60 (4): 398-406.

[81] Rudhrabatla V P, Jalababu R, Rao K K, et al. Fabrication and characterisation of curcumin loaded pH dependent sodium alginate-g-poly (acryloyl phenylalanine)-cl-ethylene glycol vinyl ether-co-hydroxyethyl acrylate hydrogels and their in-vitro, in-vivo and toxicological evaluation studies[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2019, 51: 438-453.

[82] Luo Z, Pan J, Sun Y, et al. Injectable 3D Porous Micro-Scaffolds with a Bio-Engine for Cell Transplantation and Tissue Regeneration[J]. Advanced Functional Materials, 2018, 28(41): 1-13.

[83] Sun S, Wu P. Role of water/methanol clustering dynamics on thermosensitivity of poly (N-isopropylacrylamide) from spectral and calorimetric insights[J]. Macromolecules, 2010, 43(22): 9501-9510.

[84] Schmidt P, Dybal J, Trchová M. Investigations of the hydrophobic and hydrophilic interactions in polymer–water systems by ATR FTIR and Raman spectroscopy[J]. Vibrational Spectroscopy, 2006, 42(2): 278-283.

[85] Ma L, Wu P. The role of unique spatial structure in the volume phase transition behavior of poly (N-isopropylacrylamide)-based interpenetrating polymer network microgels including a thermosensitive poly (ionic liquid)[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2018, 20(12): 8077-8087.

[86] Wang G, Wu P. Unusual phase transition behavior of poly (N-isopropylacrylamide)-co-poly (tetrabutylphosphonium styrenesulfonate) in water: Mild and linear changes in the poly (N-isopropylacrylamide) part[J]. Langmuir, 2016, 32(15): 3728-3736.

[87] Thomas M, Richardson H H. Two-dimensional FT-IR correlation analysis of the phase transitions in a liquid crystal, 4′-n-octyl-4-cyanobiphenyl (8CB)[J]. Vibrational Spectroscopy, 2000, 24(1): 137-146.

[88] Lai H, Wu P. A infrared spectroscopic study on the mechanism of temperature-induced phase transition of concentrated aqueous solutions of poly (N-isopropylacrylamide) and N-isopropylpropionamide[J]. Polymer, 2010, 51(6): 1404-1412.

[89] Noda I. Generalized two-dimensional correlation method applicable to infrared, Raman, and other types of spectroscopy[J]. Applied Spectroscopy, 1993, 47(9): 1329-1336.

[90] Noda I, Dowrey A, Marcott C, et al. Generalized two-dimensional correlation spectroscopy[J]. Applied Spectroscopy, 2000, 54(7): 236A-248A.

[91] Wang H, Wu X, Zhu Z, et al. Revisit to phase diagram of poly (N-isopropylacrylamide) microgel suspensions by mechanical spectroscopy[J]. The Journal of Chemical Physics, 2014, 140(2): 1-7.

[92] Town A, Niezabitowska E, Kavanagh J, et al. Understanding the phase and morphological behavior of dispersions of synergistic dual-stimuli-responsive poly (N-isopropylacrylamide) Nanogels[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2019, 123(29): 6303-6313.

[93] Shu R, Sun W, Liu Y, et al. The jamming and unjamming transition in poly (N-isopropylacrylamide) microgel suspensions[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2013, 436: 912-921.

[94] 金秋. 静电纺姜黄素/PLGA/明胶纳米纤维膜用于医用敷料的制备及其性能研究[D]. 东华大学, 2020.

[95] 付丽红, 赵佳琪, 李晓斌, 等. 不同杂粮淀粉物性的研究[J]. 食品科技, 2021, 46(3): 141-146.

[96] Himmelein S, Lewe V, Stuart M C, et al. A carbohydrate-based hydrogel containing vesicles as responsive non-covalent cross-linkers[J]. Chemical Science, 2014, 5(3): 1054-1058.

[97] Gu J, Zhao Y, Guan Y, et al. Effect of particle size in a colloidal hydrogel scaffold for 3D cell culture[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015, 136: 1139-1147.

[98] Zhang Y, Li W Y, Lan R, et al. Quality monitoring of porous zein scaffolds: a novel biomaterial[J]. Engineering, 2017, 3(1): 130-135.

[99] Cai L, Qin X, Xu Z, et al. Comparison of cytotoxicity evaluation of anticancer drugs between real-time cell analysis and CCK-8 method[J]. ACS Omega, 2019, 4(7): 12036-12042.

[100] 杨忠敏. PARP 抑制剂生物标志物和耐药特性与机制研究[D]. 南昌大学, 2017.

[101] 李丹. 基于石墨烯/金纳米星复合物的光热协同光动力抗癌效应及其成像研究[D]. 电子科技大学, 2016.

[102] 李文静. 基于细菌纤维素给药系统的构建及其性能初步研究[D]. 南京理工大学, 2020.

攻读硕士期间发表论文及学术成果情况

姓名. 文章名 [J]. 期刊（投稿中）

致谢

致谢内容！

姓名

2021 年 12 月于东华大学