

荧光探针法研究壳聚糖水凝胶形成过程及其性能

强俊超* * 王明珍 房 喻*
胡道道 崔亚丽 王元勤
(陕西师范大学化学系 西安 710062)

摘要 基于芘(Py)单体荧光光谱结构对微观环境变化的敏感性,以及介质粘度及Py分子间距对Py激基缔合物形成的影响,以戊二醛交联壳聚糖(CS)水凝胶体系为例研究了Py荧光探针法监测水凝胶形成过程及其溶胀性能的可行性.结果表明,Py荧光光谱精细结构的变化(以 I_3/I_1 为参量)或Py激基缔合物荧光强度与单体荧光强度之比(I_E/I_M)的变化与CS水凝胶的形成及溶胀程度有很好的对应关系.此外,CS凝胶网状结构中包埋的聚N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)的构象变化也可由探针光谱变化反映出来.利用这种荧光探针方法有助于从分子水平上探知凝胶形成过程的微观本质.此外,这种方法也可作为光纤传导监测凝胶形成过程和溶胀的基础.

关键词 荧光探针, 芘, 壳聚糖, 聚(N-异丙基丙烯酰胺), 水凝胶

Study of the Chitosan Gel Formation Process and the Gel Properties Using Fluorescence Probe

QIANG Jun - Chao WANG Ming - Zhen FANG Yu *
HU Dao - Dao CUI Ya - Li WANG Yuan - Qin
(Department of Chemistry, Shaanxi Normal University, Xi'an, 710062)

Abstract Because of the sensitivity of the fine structure of the fluorescence emission spectrum of the monomer of pyrene(Py) to its microenvironment and the dependence of the excimer formation on the viscosity of the medium and the distance between the probe molecules, pyrene was employed as a fluorescence probe to monitor the chitosan(CS) gel formation process and the gel swelling properties. It was shown that the changes in the fine structures(I_3/I_1) of its fluorescence spectrum and/or its excimer formation efficiency (I_E/I_M) was well related to the gelation process and the gel swelling degrees. The conformational change of the PNIPAM trapped in the CS gel could also be monitored by the probe technique. The present results may be taken as the basis for the design of an opticfibe method, which may be used to monitor gel formation and swelling processes.

Keywords fluorescence probe, pyrene, chitosan, poly(N-isopropylacrylamide), hydrogel

某些合成水凝胶的溶胀性能对外部条件的变化具有快速、可逆响应的特征. 这一性能使得这类凝

胶材料在未来生物产品的分离、纯化、药物控制释放和化学机械系统制作等方面有可能获得重要应用.

* E-mail: yfang@snnu.edu.cn, * * 咸阳师范专科学校访问学者

收稿日期: 1999-07-16, 修回日期: 2000-01-07, 定稿日期: 2000-03-12, 国家自然科学基金(29973024), 陕西省自然科学基金及教育部留学回国人员基金资助课题

(Received July 16, 1999. Revised January 7, 2000. Accepted March 12, 2000)

因此近年来,对这类材料的制备和性能研究呈日益上升的趋势.

传统上对溶液-凝胶转化过程的跟踪多采用粘度法^[1]. 这种方法给出的信息仅限于宏观可感知部分,不能反映凝胶形成过程的微观本质,而且也不能反映所形成凝胶的内部结构及其随时间的变化. 因此有人将小角 X 射线衍射(SAXS)^[2],核磁共振(NMR)^[3],顺磁共振(ESR)^[4],和荧光探针^[5,6]等技术先后引用来研究凝胶的形成过程及其内部结构. 其中以荧光探针技术用的最多,至今已用到过的探针分子有 7-偶氮吲哚(7-azaindol),1-萘酚(1-naphthol),嘧啶(pyrimine),芘(pyrene, Py),钌的联吡啶配合物 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 及一端或两端都连接有 Py 分子的聚苯乙烯(Py-PS, Py-PS-Py)探针. 然而这些方法所研究过的体系无一例外都是四乙氧基硅烷(TEOS)/乙醇/水. 这是一个典型的低温合成石英玻璃体系,体系中固形物含量 $w(\text{TEOS})$ 达 50% 以上. 而正常高分子水凝胶体系固形物仅含 1%~1.5%,与前者差异很大. 到目前为止,还未见将荧光探针法直接用于高分子水凝胶形成过程及其性质研究的报道.

本工作首次将 Py 探针法用于研究戊二醛交联壳聚糖(CS)水凝胶的形成过程及水凝胶的溶胀和温敏效应. 该方法选用 Py 作为探针是由于其单体荧光光谱的精细结构(特别是 384nm 左右的峰 3 与 373nm 左右的峰 1 强度之比 I_3/I_1 ,)对微环境的极性特别敏感^[7,8],同时当 Py 达一定浓度时,激基缔合物的形成也与体系性质的改变(如粘度)关系很大. 因此,基于对 Py 荧光光谱精细结构及激基缔合物形成的测定,就有可能实现对凝胶形成过程及其内部结构变化的监测.

1 实验

1.1 试剂和仪器

实验所用 Py 购自 ACROS(纯度 96%),粗品以乙醇为溶剂,用索氏提取器反复抽提,抽提液中析出的晶体为纯品 Py,戊二醛,柠檬酸等均为分析纯,未经纯化直接使用. 实验用水均经离子交换再二次蒸馏纯化.

Perkin-Elmer LS-50B 荧光/磷光/发光仪, Perkin-Elmer 2400 元素分析仪等实验室常规仪器和设备.

1.2 壳聚糖制备

根据文献^[1]方法,将虾壳经酸化,除杂,脱色等

处理得到甲壳素,放入 50% 的 NaOH 溶液中,在通 N_2 条件下,电动搅拌,加热到 (110~120)℃,持续 4h,然后洗涤干燥得 CS,用 pH 滴定法^[9]测得脱乙酰度为 72.6%,粘度法测得分子量为 7.9×10^5 .

1.3 聚 N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)制备

N-异丙基丙烯酰胺单体(NIPAM)经由丙烯酰氯^[10]和异丙胺按文献^[11]方法合成. $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}$ (计算值: C, 63.71; H, 9.73; N, 12.38. 实测值: C, 63.75; H, 10.58; N, 12.37). 单体于二氧六环中经偶氮二异丁腈(AIBN)自由基引发聚合制得 PNIPAM,产品经乙醚反复抽提纯化,测得粘均分子量为 2.4×10^5 , PNIPAM 的最低临界溶解温度(LCST)约为 31℃(温度计未校准).

1.4 凝胶形成动态过程监测

CS 凝胶的制备基本采用文献^[1]的方法. 具体步骤是准确称取 0.10g CS,放入 10mL 试管中,加入 5mL 去离子水,1.00mL 柠檬酸($1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$),充分振荡至 CS 溶解完全,再加入 Py 储备液 0.12mL($6.2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$),摇匀,水泵抽除空气至溶液中气泡完全消失,最后加入 0.80mL 戊二醛溶液(0.025),混匀. 移取 3mL 溶液至石英比色皿中,在 335nm 激发波长下扫描不同时刻体系的荧光光谱. 并以同样方法制备包埋有 PNIPAM 的 CS 凝胶 [$m(\text{PNIPAM}):m(\text{CS}) = 0.25:1$]并用探针法跟踪凝胶化过程.

1.5 温度对 CS 包埋 PNIPAM 结构的影响

将盛有 CS 和 CS/PNIPAM 凝胶的比色皿置于有循环水装置的样品架中,以 335nm 为激发波长,分别测定温度为 25, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 39℃ 时各凝胶体系中 Py 的荧光光谱.

1.6 溶胀比及醇水混合溶剂对凝胶内部结构的影响

将一系列上述方法所制备的凝胶放入纯水中,控制时间得到具有不同溶胀比的凝胶,或将 CS 凝胶置于不同比例乙醇水混合溶剂中平衡过夜,得到一系列在不同醇水比例混合溶剂中达到溶胀平衡的凝胶. 本实验中溶胀比用溶胀后凝胶样品质量 m 与溶胀前凝胶样品质量 m_0 之比表示. 凝胶样品中 Py 荧光光谱的测定在固体样品架上进行.

2 结果和讨论

2.1 凝胶形成动态过程

利用 Py 探针法对 CS 及 CS/PNIPAM 体系凝胶形成动态过程实施监测,结果发现,探针的荧光强

度,光谱形状随溶液到凝胶的转化逐渐发生变化.图1给出了表征这种变化的参量之一 I_3/I_1 对时间的关系.由图1a可以看出交联剂刚加入后,CS体系中Py光谱的 I_3/I_1 随时间呈线性上升,大约100min后,这一变化趋于缓慢,到200min后, I_3/I_1 趋于恒定.图中c点实际上对应于体系的凝胶点.随凝胶内部结构变化的逐步完成, I_3/I_1 缓慢增长到d点,此后 I_3/I_1 趋于恒定,表明凝胶形成过程已经完成.类似的结果也反映在Py激基缔合物荧光强度(I_E , 460nm)与单体荧光强度(I_M , 373nm)之比(I_E/I_M)随时间的变化上.CS/PNIPAM体系 I_3/I_1 随时间的变化情况与CS体系很相似(图1b),说明PNIPAM的引入对CS凝胶的形成过程没有显著影响.预示CS/PNIPAM凝胶具有半互穿网络(Semi-IPN)型结构.

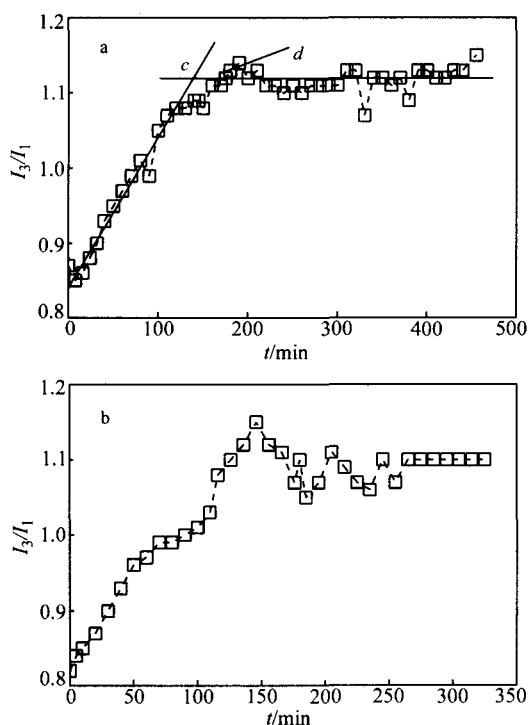


图1 I_3/I_1 随时间的变化

a—壳聚糖体系;b—壳聚糖/PNIPAM体系

通常情况下, I_3/I_1 的大小与探针分子所处微观环境极性大小密切相关,极性越大,比值越小,反之亦然.显然随CS凝胶的逐步形成,Py微环境极性逐步减小,由开始时典型极性环境($I_3/I_1 = 0.8$)变到凝胶形成后的非极性有机环境时($I_3/I_1 > 1.1$).很显然以Py为探针不但可以得到凝胶体系的凝胶点,而且可以得到凝胶形成全过程体系的变化信息,这要比粘度法等宏观方法仅能给出凝胶点要好的多.

2.2 CS/PNIPAM凝胶的温敏性

如同在水溶液中一样,PNIPAM在CS凝胶中仍

表现出很好的温敏性.实验表明,在凝胶温度低于30℃时,整个凝胶晶莹透明,当温度上升到32℃以上时,凝胶瞬间变得不透明,且这一过程完全可逆.利用Py光谱对这一过程监测,所得结果以 I_E/I_M 对温度作图(图2),发现 I_E/I_M 在31℃前后从0.6突降到0.2.说明PNIPAM的构象变化引起Py在体系中分布或微环境的变化.这预示着Py探针不仅可以监测凝胶由溶液至凝胶的转化过程,还可以对其内部某些结构的变化进行监测,尽管这种结构的变化并不影响凝胶自身的状态.图2还给出了对CS凝胶进行同样实验的结果,可以看出 I_E/I_M 随温度上升缓慢减小,但并无突降发生.进一步说明凝胶温敏实验中 I_E/I_M 的特异性变化确实是由CS凝胶中PNIPAM的构象突变引起的.已有的研究已经表明在溶液温度低于PNIPAM的最低临界溶解温度(LCST)时,PNIPAM主要采取开放线团构象,而在溶液温度高于PNIPAM的LCST时,PNIPAM取压缩线团构象,分子中有疏水微区形成^[12,13].因此,在PNIPAM的LCST之下,Py均匀分布于溶液中,而在此温度之上,由于探针分子的疏水性Py选择性分布在疏水微区中,不难理解处于不同疏水微区中的探针分子相互碰撞形成激基缔合物的可能性较之溶液中探针自由扩散形成激基缔合物的可能性要小得多,因此在包含PNIPAM的水凝胶或水溶液中,较高温时 I_E/I_M 比低温时 I_E/I_M 要小.在实验温度范围内,Py在不包含PNIPAM的CS凝胶体系中始终处于自由扩散态,因此体系的 I_E/I_M 一直比较高,也没有突降现象发生.

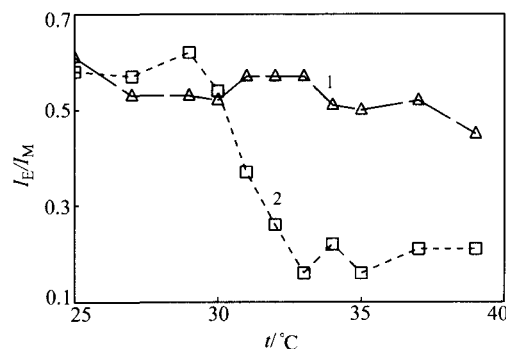


图2 两种不同的壳聚糖凝胶体系

I_E/I_M 随温度的变化

1—CS-Py;2—CS-PNIPAM-Py

2.3 CS凝胶的溶胀性

测定一系列具有不同溶胀度(m/m_0)的CS凝胶中Py的荧光光谱(见图3),从图3可以看出,在 I_M 不变的情况下,随溶胀比的增大 I_E 显著减小.这

可能是因为溶胀使凝胶体积变大,增大了探针分子之间的距离,因而使激发态 Py^* 与基态 Py 结合机会减少,从而导致了 I_E/I_M 下降.

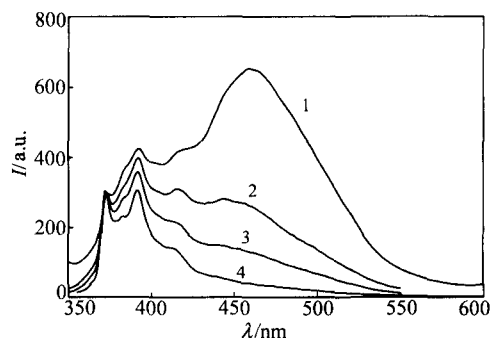


图3 不同溶胀度时 Py 探针的荧光光谱
1—溶胀度 1.00; 2—溶胀度 3.54;
3—溶胀度 4.78; 4—溶胀度 9.80
各光谱强度在 373nm 处统一调整为 300

2.4 CS 凝胶在不同比例醇/水混合溶剂中的溶胀行为

当一系列 CS 凝胶在不同比例醇水混合溶剂中浸泡一定时间后,可得不同溶胀比的凝胶,以 m/m_0 对醇的体积分数作图(图 4),可以看出,CS 凝胶的溶胀比对混合溶剂的组成有显著的依赖性,而且这种

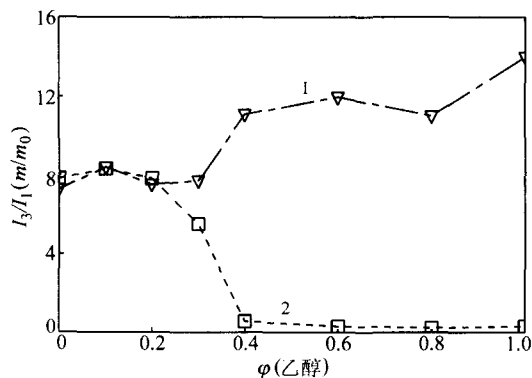


图4 I_3/I_1 和 m/m_0 随乙醇水混合溶剂
中乙醇含量的变化
1—Py 探针 ($\times 10$); 2—溶胀度

关系不是简单的线性关系.在醇体积分数小于 0.2 时,CS 凝胶溶胀度几乎不随醇含量的增加而变化,但在 0.2 之后到 0.4,溶胀比随醇含量的增加急剧下降,醇含量达 0.4 时凝胶已完全塌陷,0.4 及以后的

溶胀比变化很小.与之对应的探针光谱的 I_3/I_1 也有类似变化过程(图 4).这可能是因为醇含量在 0.2 以下时,凝胶中几乎包含的都是水,Py 的微环境相似,因此 I_3/I_1 随溶剂组成的变化不大.当溶剂中醇含量达 0.4 时,凝胶因塌陷收缩,内环境几乎全为醇,因而 I_3/I_1 明显增大,且不随溶剂组成的变化而变化.

由上述实验可知,荧光探针法是一种从微观上对凝胶形成过程及其性质进行监测的有效方法.相对于粘度法等非光谱方法,荧光探针法不仅仅可以探知凝胶形成前溶液-凝胶转化过程,而且可以跟踪凝胶点之后凝胶内部结构的进一步变化.此外,荧光探针技术还可有效监测具有半互穿网络结构的杂化凝胶中包埋成分的结构变化.可以预期荧光探针法的引入为实现对凝胶形成过程及其性质的在线监测提供了可能.

References

- 1 FANG Yu, HU Dao - Dao, *Chin. J. Polym. Sci.*, **1999**, 17, 551.
- 2 W. H. Dokter, M. F. Van Gardem, T. P. M. Beeler, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **1993**, 72, 165.
- 3 R. A. Assink, B. D. Kay, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **1993**, 74, 1.
- 4 A. Shames, O. Lev, B. Iosefzon - Kuyavskaya, *J. Non - Cryst. Solids*, **1993**, 163, 105.
- 5 L. M. Ilharco, A. M. Santos, M. J. Silva, J. M. G. Martinho, *Langmuir*, **1995**, 11, 2419.
- 6 T. A. Kikteva, B. V. Zhmud, N. P. Smimova, A. M. Eremenko, Yu Polevaya, M. Ottolenghi, *J. Colloid Interface Sci.*, **1997**, 193, 163.
- 7 K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 2039.
- 8 D. C. Dong, M. A. Winnik, *Can. J. Chem.*, **1984**, 62, 2561.
- 9 LIN Run - Xun, JIANG Su - Hong, ZHANG Mu - Shan, *Huaxue Tongbao*, **1992**, 3, 39 (in Chinese).
- 10 ZHANG Si - Gui (Eds.), "Technological Manual of Fine Organic Chemicals", Science Press, Beijing, **1991**, p. 57 (in Chinese).
- 11 TAO Zhu, MA Pen - Hua, LIU Min, ZHU Qian - Jiang, YANG Qing - Ling, *Acta Polymerica Sinica*, **1998**, 1, 21 (in Chinese).
- 12 SHI Xiang - Yang, WU Shi - Kang, SUN Cao - Min, *Acta Polymerica Sinica*, **1999**, 2, 210 (in Chinese).
- 13 C. K. Chee, S. Remer, I. Soutar, L. Swanson, *Polymer*, **1997**, 38, 483.

(Ed. XIE Hui - Qin)

(DONG Hua - Zhen)