

中国科学技术大学

University of Science and Technology of China

博士学位论文



论文题目 拉曼光镊表征偶氮聚合物囊泡
光响应机理研究

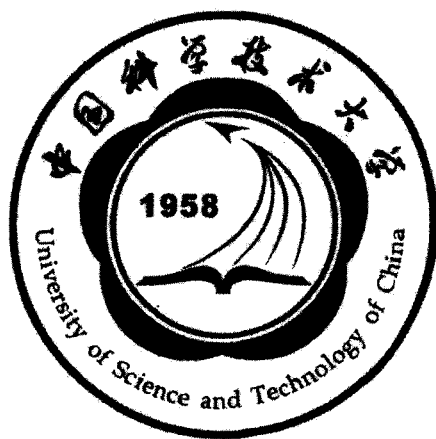
作者姓名 薛 国 胜

学科专业 光学与光学工程

导师姓名 郭光灿 教授 李银妹 教授

完成时间 二〇一三年十二月

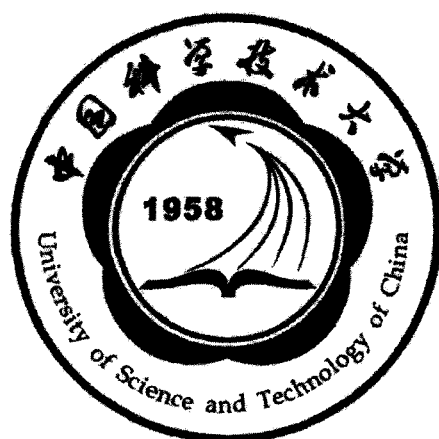
中国科学技术大学 博士学位论文



拉曼光镊表征偶氮聚合物囊泡 光响应机理研究

作者姓名: 薛国胜
学科专业: 光学与光学工程
导师姓名: 郭光灿 教授
李银妹 教授
完成时间: 二〇一三年十二月

University of Science and Technology of China
A Dissertation for doctor's Degree



**Research on photoresponse of azobenzene
containing polymer vesicles with optical
tweezer Raman spectrum**

Author's Name: Guosheng Xue

Speciality: Optics and Optical Engineering

Supervisor: Prof. Guangcan Guo, Prof. Yinmei Li

Finished time: December, 2013

中国科学技术大学学位论文原创性声明

本人声明所呈交的学位论文,是本人在导师指导下进行研究工作所取得的成果。除已特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含任何他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中作了明确的说明。

作者签名: 薛国胜

签字日期: 2014.3.23

中国科学技术大学学位论文授权使用声明

作为申请学位的条件之一,学位论文著作权拥有者授权中国科学技术大学拥有学位论文的部分使用权,即:学校有权按有关规定向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版,允许论文被查阅和借阅,可以将学位论文编入《中国学位论文全文数据库》等有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人提交的电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

公开 保密 (____年)

作者签名: 薛国胜

导师签名: 李根木

签字日期: 2014.3.23

签字日期: 2014.3.20

摘 要

光镊是利用高度聚焦的激光微束形成的光学梯度力势阱来实现对微纳米量级粒子的捕获与操控的技术,它所产生的皮牛量级的力正好适用于操控微纳米量级的粒子。随着各种新技术的出现,光镊技术近年来发展十分迅速,出现了阵列光镊,表面等离子体光镊,涡旋光镊等新型光镊。同时光镊技术与其他技术相结合,比如光刀、双光束干涉技术、微弱荧光检测技术、扫描共焦显微技术、电泳及光谱分析,拉曼光谱等,更是扩大了其应用领域。

Raman 光谱是分析物质化学组分和结构的重要检测技术,它具有化学指纹识别的功效,与荧光光谱相比,Raman 光谱具有不受水的吸收影响,不需要对样品进行复杂的荧光标记,样品用量少等优点。我们将显微拉曼光谱技术和光镊操纵技术相结合,利用 785nm 激光做光源,研制了一台拉曼光镊系统,该系统可以同时实现稳定捕获单个微米粒子并长时间稳定激发收集拉曼光谱信号的功能。由于粒子被稳定的俘获在远离波片表面的液体中,可以避免样品池表面对探测信号的干扰,因此在悬浮胶体体系微粒光谱探测中具有很大的优势。

两亲嵌段共聚物具有亲水和疏水两部分,能够自组装形成微米尺度的聚集体,胶束。嵌段共聚物的组装和小分子表面活性剂一样,在溶液中能够呈现出不同的形态,如复合胶束、圆球状、长棒状、空心囊泡等。由于嵌段共聚物制备的囊泡的研究在微反应器,药物输运,对比增强成像和模拟生物膜等方面的应用潜力很大,聚合物囊泡研究引起了科学家们的广泛兴趣。在溶液中,含有偶氮生色团的亲疏水两嵌段聚合物在光辐照下具有光响应特性,如光诱导沉淀,凝聚和自组织等。最近,含有偶氮苯生色团的两亲性嵌段共聚物受到人们广泛的关注。不同波长光照下,偶氮基团的顺反异构反应将使偶氮聚合物的结构和性质发生变化,这种微观变化会导致宏观转变。正是由于聚合物囊泡的巨大应用前景,我们利用拉曼光镊对偶氮囊泡体系的光响应行为进行了一系列实验研究。本文工作主要包括:研制具有光镊捕获,拉曼光谱探测,紫外激发等多种探测功能的拉曼光镊系统,

对偶氮聚合物组装的囊泡结构的光响应行为进行表征,通过探测交联剂以及间隔基对囊泡膜性质的影响,推理囊泡光致形变过程中的反应机理;组装双组份偶氮囊泡发现了微相分离现象,并对微区内光致异构速率进行分析;利用微针吸附方法探测了偶氮囊泡的表面弹性模量。

本论文内容一共九章。第一章绪论,主要介绍拉曼光镊的研究背景,应用和研究现状以及将拉曼光镊应用于偶氮囊泡的研究意义。第二章首先介绍拉曼光镊实验设备的设计原理,系统构成,应用范围以及使用方法。然后介绍将拉曼光镊系统应用于偶氮囊泡的光响应研究而进行的几个实验。第三章是交联囊泡的伸缩膨胀速率分析,第四章是对不同间隔基长度的偶氮囊泡发生不同的光致可逆形貌转化的机理分析,第五章是甲氧基偶氮囊泡的破裂重组,第六章介绍双组份囊泡的微相分离,第七章讲述偏振拉曼探测囊泡表面基团取向等。第八章将微针与光镊结合起来探测囊泡膜的弹性模量。最后第九章是论文的总结与展望。

本文的创新点主要在于发展光镊技术使之与拉曼光谱技术相结合形成一套多功能探测系统。利用这套系统应用于对偶氮聚合物囊泡的光响应特性进行研究,得到一系列新现象比如光致形貌转化,微相分离运动,破裂重组等,并根据这些过程中拉曼光谱信号演化对其机理做了解释。这项研究对于探索新型功能囊泡制备有很大的借鉴意义。

关键词: 拉曼光镊、偶氮苯聚合物、二面体囊泡、光响应、相分离、交联剂

Abstract

Optical tweezers(OT) are the beam gradient optical traps where micro particles could be trapped by focusing the laser beam using a microscope objective. The gradient force generated by optical tweezers is in the pinoNewton region and is suitable to trap and manipulate microscale and nano- scale particles. In the last ten years, with the advent of new technologies like plasma, hologram, and photon crystal fiber the OT technologies develops very quickly, a lot of new OTs have been created such as surface plasmon optical tweezers(SPOT), optical trap array and optical vertex trap and so on. When combined with other technologies such as weak fluorescence detection technology, dual-beam interference technique, scanning confocal microscopy and Raman spectrum, the application areas of OT are much more expansive.

Raman spectroscopy is an important detection technique in analyzing the chemical composition and structure of matter. It is able to achieve chemical fingerprint recognition and plays a unique role in chemistry, materials science, biomedicine, food hygiene, environmental monitoring and other fields. Compared with the fluorescence detection technology, its ascendancy lie in weak absorption of water from the sample, is unnecessary complex fluorescent labeling, only require a small amount of sample etc. We employ the 785nm diode laser as the light source of OT and combined the Raman spectrometer to build a set of optical tweezers Raman spectrum (OTRS) system. The OTRS system can capture a single micron particles to collect Raman spectra excitation signal stably for long time. Since the particle is stably trapped in liquid remote from the surface of glass-plate to avoid interference with the surface effect of the sample cell, it is suitable in the spectrum detection of suspended particle in colloidal system.

Amphiphilic block copolymers can self-assemble to form micron size aggregates or micelles. Block copolymer aggregates, like small molecule surfactants, can assume

a range of different morphologies in dilute solution, including spheres, rods, vesicles, compound micelles, and others. In the past years, vesicles prepared from block copolymers have been well investigated. The interest in polymer vesicles was motivated, in part, by their potential use as micro reactors, targeted drug delivery, contrast enhanced imaging, and mimic for biological membranes. In solutions of amphiphilic molecules or polymers containing suitable chromophores, exposure to light can be used to achieve photo responses, such as precipitation, aggregation, and self-assembly. Recently, azobenzene-containing amphiphilic block polymers have received considerable attention. Upon light irradiation, azobenzene polymers can show a variety of structure and property variations triggered by the trans-cis photoisomerization of the azo chromophores, which in turn triggers mesoscopic up to macroscopic changes. Based on the big application potential of the polymer vesicle system, we utilize the OTRS system to study the photoresponsive behaviors of azobenzene vesicles. They are described in the following part.

There are nine chapters in this thesis. The first chapter is the introduction of my work, include the research background status of OTRS, and the significance of studying property of azobenzene containing vesicles. The second chapter we describe the design principles, system configuration of OTRS system and its applications and instruction. And then in the next six chapters, I present six experiments about the application of OTRS system in the photo response behaviors of azobenzene containing polymer vesicle. The first experiment is I add the cross linker (Dibromopropane, DBP) to the membrane of the azobenzene polymer vesicles (PNIPAM-b-PAzPy6), and detecte the photo induced shrink-expansion of vesicle under UV light. The next experiment is three kind of polymers with different space chain length self-assemble vesicle have different morphology change under UV light irradiation. We also used another azobenzene polymer (PNIPAM-b-PAzoMO) to prepare vesicle, and it ruptures and reconstructed in

to small vesicle under UV light. When two different azobenzene polymer are combined in the same solution, they formed Janus vesicles. The two part of the binary vesicle have different rate of trans-cis isomerization. We add polarize element to the OTRS system to detect the orientation of azobenzene group in the shell of vesicle under UV light. Because the mechanical property is important in the stability of the vesicle, and it is harder than the small molecular vesicles, I used the micropipette absorption (MPA) technology to detect the elastic modular of the polymer vesicles.

The main innovation of this dissertation is to develop optical tweezer technology. I combined optical tweezers and Raman spectroscopy to form a versatile detection system OTRS. I use this detect system to study the photo induced transform behaviors of azobenzene containing polymer vesicles, and base on the Raman change analyzed its mechanism. The study have major implications for the exploration of new functional vesicles.

Key word: optical trapping Raman spectrum, azobenzene polymer, Janus vesicle, photo response, phase separation, cross linker

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 光镊技术	1
1.2 分散体系中的拉曼光谱	2
1.3 拉曼与光镊结合及其应用	5
1.4 偶氮苯聚合物囊泡	8
1.4.1 偶氮囊泡的光响应	8
1.4.2 偶氮苯聚合物囊泡光响应性质的调控	10
1.5 本文研究内容	11
第 2 章 拉曼光镊系统原理及设计	17
2.1 拉曼光镊原理	17
2.1.1 拉曼散射光谱基本原理	17
2.1.2 光镊基本原理	23
2.1.3 光阱的主要参数	25
2.2 拉曼光镊设备硬件性能参数及设计方案	28
2.2.1 光镊光源	28
2.2.2 拉曼光谱仪	29
2.2.3 显微镜及 CCD 相机	31
2.2.4 光学耦合器件	31
2.3.5 拉曼光镊系统光路设计	31
2.3 拉曼光镊系统使用说明及数据处理方法	34
2.3.1 系统操作说明	34
2.3.2 拉曼散射光谱数据的处理方法	35
2.4 本章小结	37

第三章 拉曼光镊探测交联偶氮囊泡光致伸缩膨胀	39
3.1 引言	39
3.2 材料和方法	41
3.2.1 偶氮吡啶共聚物 PNIPAM-b-PAzPy6 的合成	41
3.2.2 交联偶氮囊泡的制备	42
3.3 实验结果及讨论	43
3.3.1 PNIPAM-b-PAzPy6 囊泡膜内的交联反应	43
3.3.2 交联效应对囊泡光致伸缩膨胀变化的影响	45
3.3.3 拉曼光镊系统实时测量交联偶氮囊泡的伸缩膨胀过程	47
3.4 本章小结	49
第四章 光致偶氮囊泡 JANUS 与均匀结构的可逆转化	53
4.1 引言	53
4.2 实验研究	56
4.2.1 偶氮吡啶共聚物的合成	56
4.2.2 溶液中 PNIPAM-b-PazPy 聚合物囊泡的制备	56
4.3 实验结果及讨论	56
4.3.1 偶氮共聚物 PNIPAM-b-PazPyn(n=0,2,6) 组装及表征结果	56
4.3.2 PNIPAM-b-PazPy2 组装偶氮囊泡的光致可逆形貌变化	59
4.4 本章小结	65
第五章 偶氮囊泡的光致破裂重组	69
5.1 引言	69
5.2 实验研究	70
5.2.1 材料和试剂	70
5.2.2 大分子链转移剂 PNIPAM-CTA 的合成	70
5.2.3 PNIPAM-b-PAzoMO 嵌段共聚物的合成	70

5.2.4 PNIPAM-b-PAzoMO 自组装囊泡的制备及表征	71
5.3 甲氧基偶氮囊泡的光响应	72
5.4 甲氧基偶氮囊泡光致解离机理解释	74
5.4 本章小结	77
第六章 双组份囊泡的微相分离及光致异构速率	81
6.1 引言	81
6.2 研究背景	83
6.3 实验研究	85
6.3.1 偶氮两嵌段共聚物合成	85
6.3.2 双组份混合囊泡样品制备	85
6.3.3 混合偶氮囊泡表征及测试方法	86
6.4 结果及分析	86
6.4.1 二元偶氮聚合物囊泡的微相分离	86
6.4.2 光致共聚物二元偶氮囊泡运动	88
6.4.3 二组分混合囊泡和单组份偶氮囊泡的异构速率	90
6.5 本章小结	93
第七章 偏振拉曼光镊探测囊泡表面偶氮基团的取向	97
7.1 偏振拉曼光谱探测的理论模型	97
7.2 实验设备及材料方法	99
7.3 实验结果及讨论	100
7.4 本章小结	103
第八章 微针吸入法测量偶氮囊泡膜的弹性模量	105
8.1 微针吸入 (MPA) 实验模型	105
8.2 实验设备及数据处理方法	108
8.3 实验结果及分析	109

8.4 本章小结	111
第九章 论文的总结与展望	113
缩写词索引	115
致谢.....	117
博士期间发表的学术论文与取得的成果	119

第 1 章 绪论

1.1 光镊技术

1987 年, Bell 实验室的 Arthur Ashkin 及其同事发表了一篇开创性的研究论文, 他们发现, 当一束高度汇聚的激光光束照射到微米颗粒上时, 光场和微米粒子的相互作用可以形成稳定的三维光阱, 该势阱可以将粒子吸引到光斑中心, 并束缚在光束焦点附近, 利用这一原理操控微粒的装置就被形象地称为光镊 (optical tweezers) 或者称为光钳[1]。由于光镊是通过光束形成的梯度力势阱来操控粒子的, 光镊的正式名称为单光束梯度力势阱。经过 20 多年的发展, 光镊已经成为众多科研领域的必备工具。现在关于单光束光镊的理论, 技术和应用的研究进展也尚未停止, 光镊和其它技术手段的交叉也将会进一步促进光镊在其他领域的应用[2-4]。而单分子生命科学[5, 6]、胶体物理化学[7-9]等学科的发展也在不断向数学、物理、化学等学科提出更多、更深层次的问题, 要求科研工作者开发出新的实验技术和方法, 反过来这也将促进光镊技术的进步。

目前光镊技术的主要进展体现在: 光镊操纵手段的进步和捕获效率的提高、各种特殊光束光镊的产生及应用, 操纵测量精度的提升, 光镊与其它技术广泛结合运用。光镊操作手段的进步和捕获效率的提升, 主要体现在: 光束位移控制方式及样品池操纵方式。由于光束位移控制方法的进步, 光镊已经从单光束光镊变成双光镊, 甚至出现了阵列光镊[10], 并且从早期的固定位置光镊发展到曲线扫描光镊[11]。

现在热门的研究方向是阵列光镊[12]的产生, 包括利用扫描转镜产生时分复用的阵列扫描光镊, 使用菲涅耳双棱镜产生多光束干涉阵列光镊, 利用液晶空间光调制器 (LC SLM) 调制激光束相位产生全息的阵列光镊, 通过光纤束产生阵列光镊, 利用垂直腔面发射的激光器产生阵列光镊。通过空间光调制器(SLM)和数字微镜阵列器件 (DMD) 可以实现空间滤波, 全息动态投影[13], 进而形成光

镊阵列和特殊光束形式[14]的光镊。通过实时动态控制光镊的位置，每个光镊都可以实现三维独立操纵，这在vertex(光学涡旋)、Bessel beams (贝塞尔光束)，特别是在胶体化学研究中有着独一无二的优点，这为粒子排列和分选、多粒子间相互作用的测量提供了坚实的基础[15]。阵列光镊可以解决单光镊一次操作对象少的问题，可以大批量同时进行实验，可以有效提高分散体系研究中需要大量统计的效率。

扫描光镊主要是利用了声光衍射调制器(AOD)对光斑进行循环扫描，其扫描频率达上千HZ[16]。这种光镊可以实现时分复用，灵活性很高。扫描光镊可以被认为是多光束光镊阵列的一种。随着光镊研究对象的多样化，其尺寸也越来越小，比如可以研究一些生物大分子(DNA, RNA, 蛋白质)和纳米材料[17]等，对这类微小物质的操纵定位精度和位置测量精度要求也变得越来越严格，经常需要达到 nm 量级的位移和 fN 量级的力学测量精度。

由于研究需要，光镊常常和光刀，双光束干涉，共聚焦扫描显微，微弱荧光检测，电泳及光谱分析等其它技术相结合，例如常见的与拉曼光谱系统相结合的光镊系统。拉曼光谱一般用来分析研究对象内部的原子振动能量状态，并进而研究对象内部的结构，这种方法适用于研究分散体系中粒子(细胞，囊泡，胶体粒子等)的结构及其演变[18]。

1.2 分散体系中的拉曼光谱

拉曼光谱也叫联合散射光谱，它是利用材料中的声子与光子的相互作用，通过测量被散射光子的能量差，获得测量对象的声子振动模(晶格、分子结构的振动)，它对物质结构的任何微小变化会有非常高的敏感度，因而可用被来研究物质的物理化学等各方面性质随结构的变化，是一种研究物质结构的强有力的工具。大量的化学材料是由微米粒子分散在溶液中进行处理和运输的。这些技术已经被广泛应用于很多科学领域，比如：有机化合物，聚合物，低聚物的水溶液分散

产品（墨水，粘合剂等）的封装[19-21]等等。聚合物胶体可以被用来做药物输运[22]，组装体系合成的基底[23]，将无机固体颗粒分散到溶液中来探测液体的流变特性[24]以及不溶粒子的输运[22, 25]。分散的胶体颗粒可以填充进多孔结构，这是一种很好的分散介质，还可以用作内充分子的催化剂或基底应用于化学传感上[26]。离散化的胶体结构在分子生物学中是普遍存在的，比如细胞，细菌，病毒颗粒以及囊泡结构[27]。

鉴于胶体分散体系的广泛应用，探测他们的结构、化学成分以及功能表征对于化学分析是一个很大挑战。溶剂分散方法和光散射法[28]可以用来表征粒子的尺寸以及表面电荷密度。粒子的形状和尺寸可以用电子显微镜来非原位表征。考虑到胶体材料的化学复杂性，很明显仅仅知道粒子的尺寸，形貌以及表面电荷密度，并不足以提供满足我们利用这些材料所需足够的信息。鉴别胶体粒子化学成分以及分析粒子的化学活性需要用到光谱学方法。与良好混合的溶液体系不同的是：分散在溶剂里的固体粒子之间一般不会通过碰撞来交换分子，所以它们的组分分布是不均匀的，并能保持很长时间。这种粒子之间的不均匀性决定了我们必须在单个粒子水平来表征它们。最后研究胶体的反应活性需要一种原位的分析方法，使我们能够实时观察悬浮在溶液中的粒子之间动态变化过程。

拉曼散射光谱技术是一种基于分子键对光子的非弹性散射产生的振动光谱技术，它于1928年被印度科学家 Raman 发现[29]。随着激光的产生以及设备技术的进步[30]，在生物医药、食品卫生、环境检测、化学、材料科学等诸多领域发挥着独特作用、并不断显现出更强大功能[21, 31]。Raman 光谱具有化学指纹识别的功效，与荧光光谱相比，Raman 光谱具有不受水的吸收影响，不需要对样品进行复杂的荧光标记，样品用量少等优点。

拉曼光谱方法为我们研究分散在水溶液中的胶体颗粒的化学结构提供了一个理想的工具。因为水的拉曼散射很弱，不会对样品产生的信号造成很大的干扰。这种技术与分析分散粒子的水溶液相兼容。拉曼信号的激发和散射一般是利用可见以及近红外范围的光，使这项技术与光纤和显微技术相兼容，简化了设备的集

成化发展。拉曼散射的主要缺点在于分子的散射截面很小($\sigma \sim 2 \times 10^{-28} \text{ cm}^2$), 比荧光发射散射截面小 10 个数量级以上, 这使它的应用限制于只能探测高浓度的样品。传统的拉曼散射探测分散的团块粒子很有挑战性, 如图 1.1a 所示: 只有粒子浓度非常高时才有可能探测到粒子发出的拉曼信号。即使粒子浓度很高, 也很难得到粒子与周围溶液相互作用的局域拉曼散射信号。这些问题可以通过反射照明的共焦显微镜来解决。如图 1.1b 所示: 物镜将激发拉曼信号的激光光束聚集成很小的光斑, 只有在光斑附近的区域才能激发足够强的拉曼信号这个区域可以被定义为探测区。同时样品散射的拉曼信号通过数值孔径匹配的物镜来收集[32]。这个探测区域体积非常小($\sim 1 \text{ fL}$), 这是由光束的衍射极限决定的。在稀薄粒子溶液中, 可以实现探测区域只存在一个粒子。周围的粒子扩散到探测区域的时间远长于探测时间, 满足稳定的探测条件。

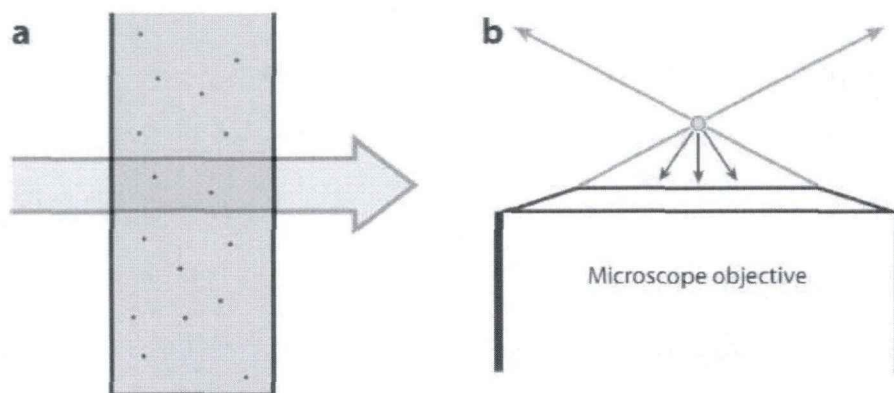


图 1.1 分散粒子样品的拉曼光谱探测

图注: (a) 传统的拉曼光谱探测设置用于稀薄的粒子分散样品。这种探测方式需要很高的粒子浓度, 否则收集到的散射光大部分是来自溶液的。(b) 单个粒子的共焦拉曼设置。探测体积只由粒子尺寸决定, 与粒子的浓度无关。拉曼散射信号由将激发光光束聚焦到粒子的物镜来收集。

共焦拉曼探测方式可以提供待探测单个粒子的组分信息, 粒子与化学反应相关的结构变化, 以及粒子与周围介质之间的分子交换。对于悬浮体系中的粒子很

难通过长期观察来得到足够强的拉曼光谱信号,因为微小粒子在低粘度的溶液中布朗运动的速度很快:一个直径为 $0.5\mu\text{m}$ 的粒子在水溶液中可以在 $\sim 1\text{s}$ 时间内逃出共焦探测区域。为了能够得到足够好的拉曼信号,我们需要发展一种方法来长时间将粒子束缚在一个固定的区域内。

1.3 拉曼与光镊结合及其应用

对于如何将微小粒子稳定地束缚在一个微小的探测区域内的问题,可以通过形成光学陷阱的方法来解决。光镊是利用高度聚焦的激光光束与折射率高于周围介质的粒子的相互作用,通过光子动量传递给粒子时,粒子受到反作用力,会被吸引到激光焦点处(此处激光密度最高,光场梯度最大)。当作用在粒子上的梯度力远大于重力以及布朗热运动产生的力时,粒子可以被稳定的束缚在激光焦点附近。

光学捕获共聚焦拉曼光谱技术(OTRS),可以对单个微米级粒子进行捕获并进行拉曼光谱分析。这项技术具有较高的空间分辨率,它不仅可以用来表征单个细胞,对于微米级聚合物颗粒或者囊泡也能进行分析。将光镊与共聚焦拉曼散射结合起来最初是应用在气溶胶粒子包括固体颗粒(玻璃,金属颗粒),以及液滴[33-35]等。这些气溶胶颗粒直径一般在几微米,通过表征粒子的成分变化可以实现检测光聚合反应,观测蒸发过程,以及探知粒子在俘获过程中温度的变化[36]。将拉曼光镊技术应用于液相微粒体系主要包括乳胶颗粒,固体粒子溶液分散体系,脂质体囊泡,聚合物囊泡以及生物细胞的拉曼检测等[37, 38]。我国上海光学精密机械研究所王育竹院士与广西科学院的黎永青教授等也在这方面做出了出色的工作。

吴华文等利用 LTRS 技术在水中单个产油的蓝藻细胞[39]进行了捕获,并对蓝藻细胞内部的脂肪酸进行了原位拉曼光谱分析(图 1.2)。他们通过特意去除培养液中的氮元素,利用拉曼光镊捕获并测量了单个蓝藻细胞的拉曼信号随时间的变化,研究氮元素在细胞新陈代谢中的作用。如图 12.13,在培养液缺少氮元

素的条件下,比较了第0天、第2天,直到第14天的细胞拉曼信号的变化,可以发现蓝藻细胞的脂类、TAG等含量在升高,而核酸、淀粉等含量在下降,这就揭示了氮元素在细胞的新陈代谢中的作用。这种单细胞拉曼光谱为筛选产油藻类提供了一种实时快速的高通量选择性方法。

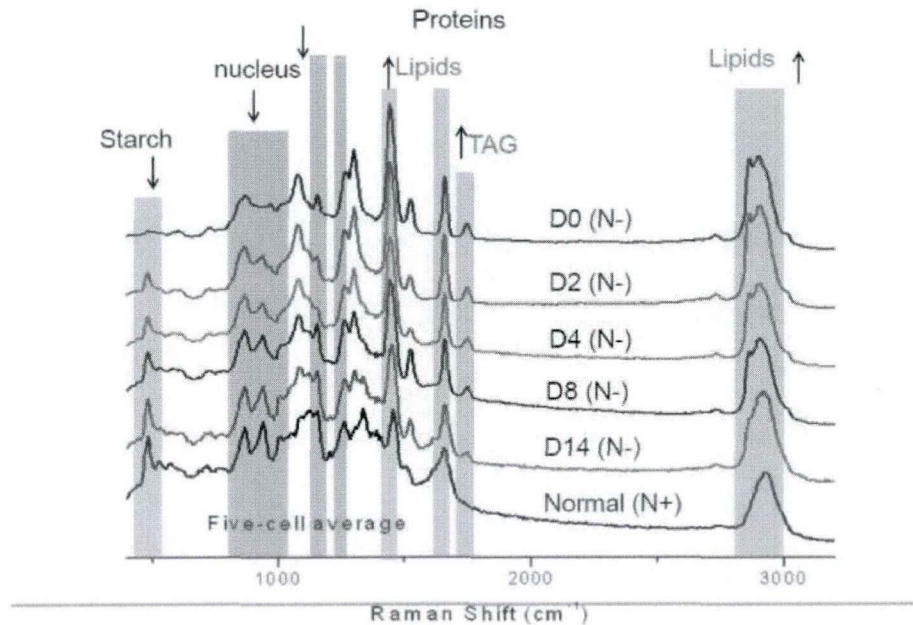


图 1.2 拉曼光谱应用于蓝藻细胞内脂质体含量分析实验

图注: 在缺少氮元素的培养基中蓝藻细胞的拉曼频移信号。N-代表培养基中缺少氮元素, N+代表培养基中添加了氮元素, D代表天数。

Joel 等利用共聚焦拉曼光谱研究了温度敏感的磷脂体囊泡中模型药物的释放过程[40, 41]。他们将模型药物—硝基苯化合物装载到囊泡中。随着溶液温度上升,囊泡膜中的磷脂分子会发生相变,逐渐将药物释放到囊泡外面。通过分析囊泡膜中磷脂烷基链的拉曼振动峰的模式变化以及硝基苯对称收缩振动峰变化,可以表征硝基苯化合物药物的释放过程。他们发现:升温时,相变随着硝基苯的释放过程发生,有两步:首先是囊泡膜所处的水环境变化,随后药物缓慢释放出来。通过调控囊泡膜的成分,他们发现硝基苯的释放过程伴随着囊泡膜中纳米孔洞的形成。孔洞中水分子的有序排列方式以及孔洞的存在时间都会影响药物的释放。拉曼光谱在这项研究中还可以被用来研究药物的释放动力学。

拉曼光谱除了可以分析生物细胞特性，也可以对微米尺度的囊泡进行分析。J. Schaefer 等使用共聚焦拉曼光谱研究了含有双炔磷脂组装的囊泡膜在 254nm 紫外光照射下的聚合物动力学和结构变化。在不同温度下，光聚合反应后可以形成红色和黄色二种聚合物，它们分别可以用 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动峰 1455cm^{-1} 和 1508cm^{-1} 以及 $\text{C}\equiv\text{C}$ 伸缩振动峰 2080cm^{-1} 和 2110cm^{-1} 区分出来 (图 1.3)。他们发现聚合物的凝聚的速率和照射紫外光的强度成正比线性关系，因为光照强度可以控制囊泡膜中，光解反应所形成的自由基浓度。这种双炔囊泡的热致变色是可逆的：在升温时，红色聚合物的 $\text{C}=\text{C}$ 和 $\text{C}\equiv\text{C}$ 拉曼振动峰会同时下降，而黄色聚合物在 1508cm^{-1} 和 2110cm^{-1} 的峰强度会上升；当温度下降时，黄色聚合物的对应的拉曼峰强度会下降，红色聚合物拉曼峰强度再次出现并上升。这说明该聚合物的热致变色过程是可逆的。通过分析拉曼峰强度的改变，可以计算得到热致变色过程中焓值的变化。变温拉曼光谱分析表明：初始加热时的焓变高于冷却时的焓变。此外，聚合物的共轭结构在降温时会发生扩展。这些现象说明原先聚合物内部的应力在加热的时候释放出来，在冷却的时候形成更加有序的长程共轭结构[40]。

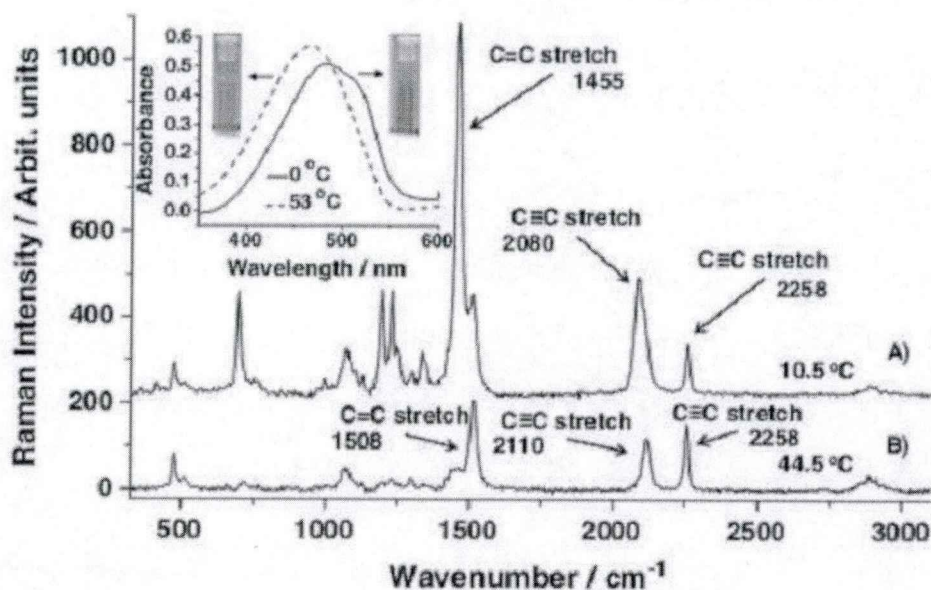


图 1.3 拉曼光谱探测温度敏感性磷脂囊泡的药物释放

1.4 偶氮苯聚合物囊泡

偶氮苯分子能够在光照下发生光致顺反异构和取向, 基于偶氮的光响应组装体已经得到了比较多的研究, 研究的主要对象是胶束和囊泡体系。与胶束体系相比, 囊泡在作为药物载体的应用领域更占优势。因为它可以用疏水的囊泡壁包覆疏水化合物, 其内部的水空腔可以用来包裹亲水性化合物, 囊泡的这种性质允许我们设计和开发基于偶氮苯聚合物囊泡的微反应器和靶向药物传输系统, 具有活性物质可以被保护起来并在需要的时候通过光波控制释放; 此外偶氮苯的聚合物囊泡用来模拟生物细胞的结构和功能。尽管目前已经有比较多的工作报道了偶氮苯囊泡的光响应性质如光致解离、光致融合、光诱导形态转变等, 但是其光响应内在的分子变化机理, 仍然还不清楚[42-44]。因为偶氮发生顺反异构时, 由于顺式和反式结构分子偶极矩差异而引起分子亲水疏水性质的变化; 因为分子从伸展状态转变为弯曲状, 会破坏偶氮苯基团在囊泡膜中的堆积状态; 当偶氮基团在囊泡膜中形成各项同性液晶相时, 顺反异构还会导致相变的产生。这些因素导致偶氮苯囊泡的光响应机理比较复杂。

1.4.1 偶氮囊泡的光响应

Li Minhua 等制备了侧链含有偶氮液晶基元的两嵌段共聚物, 在溶液中组装成囊泡后用紫外光照射观察了其破裂过程, 如图 1.4 所示。他们给出的解释是偶氮苯分子发生光致顺反异构, 产生 nematic-isotropic 即各项同性的液晶态转变, 同时聚合物链的构象从棒状逐渐变为线团形状。偶氮苯聚合物组装囊泡的部分表面曲率发生变化, 微孔增大, 然而其他部分形状保持不变, 从而发生非常缓慢的 bursting 的行为[45]。

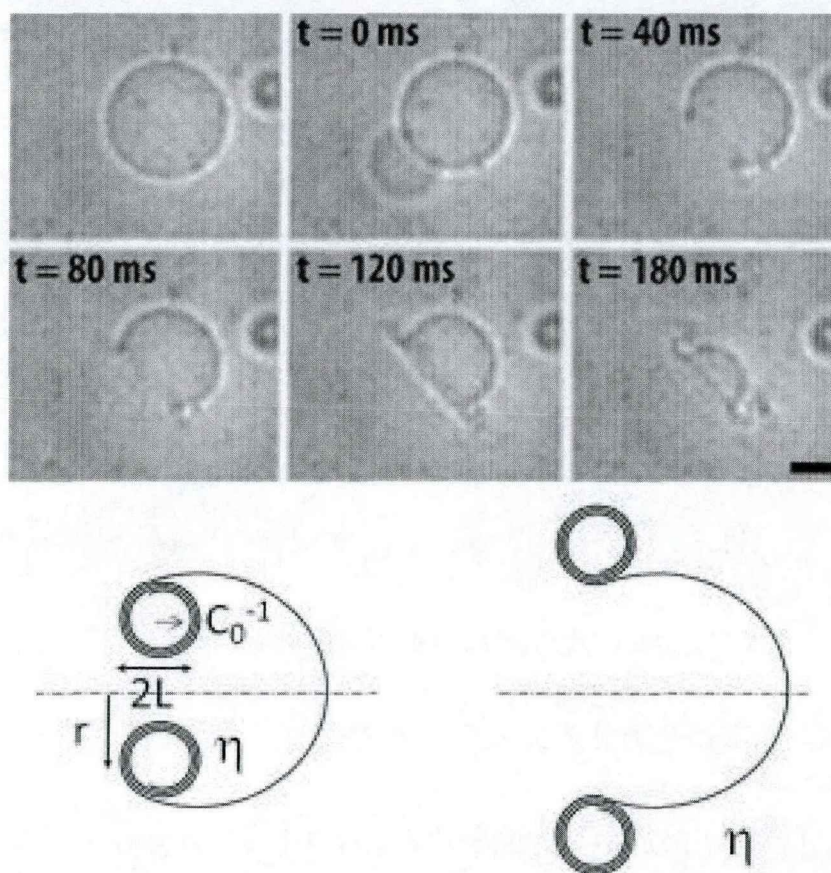


图 1.4 囊泡的紫外光致形变照片及示意图（对称球形-非对称球形-破裂）

Yan Deyue 等使用超支化聚合物组装的囊泡模拟了细胞的聚集行为(图 1.5)。他们分别利用偶氮苯和环糊精修饰了超支化聚合物的表面,这类超支化聚合物在溶液中可以通过自组装形成囊泡。当这两种表面修饰了不同基团的囊泡相互混合在一起时,由于偶氮苯和环糊精之间可以产生主配体络合作用,囊泡与囊泡之间逐渐形成聚集状态。在紫外光照下,偶氮苯基团发生顺反异构从而破坏络合作用,囊泡之间开始解聚集。在可见光照射下,偶氮恢复到热力学稳定的反式异构状态,与环糊精重新结合形成主配体的络合结构,囊泡会重新开始聚集。因此,这一过程可以通过切换照射光的波长进行可逆的转换[46]。

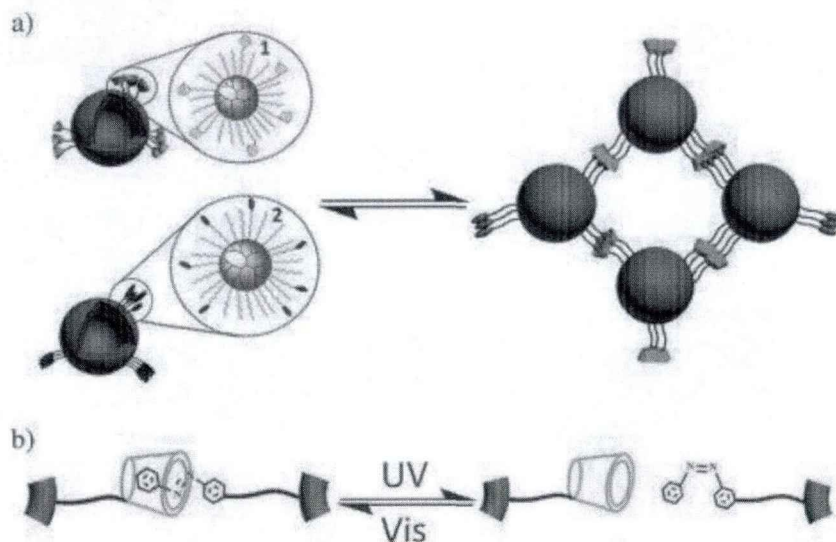


图 1.5 囊泡的紫外光致聚集

1.4.2 偶氮苯聚合物囊泡光响应性质的调控

尽管目前对于嵌段共聚物的合成和改性有了比较完善的方法，然而目前偶氮苯聚合物的结构对囊泡的光响应影响和控制的文献报道却不多。众所周知，嵌段共聚物的组装体形貌可以通过聚合物的组成以及链拓扑结构、亲疏水嵌段的长度、聚合物的浓度这些因素来进行调控。对于囊泡的光响应调控也可以依照这种方法，一方面从聚合物的内部结构入手，另一方面可以从囊泡所处的外部环境如温度、溶剂、光照条件等因素进行。

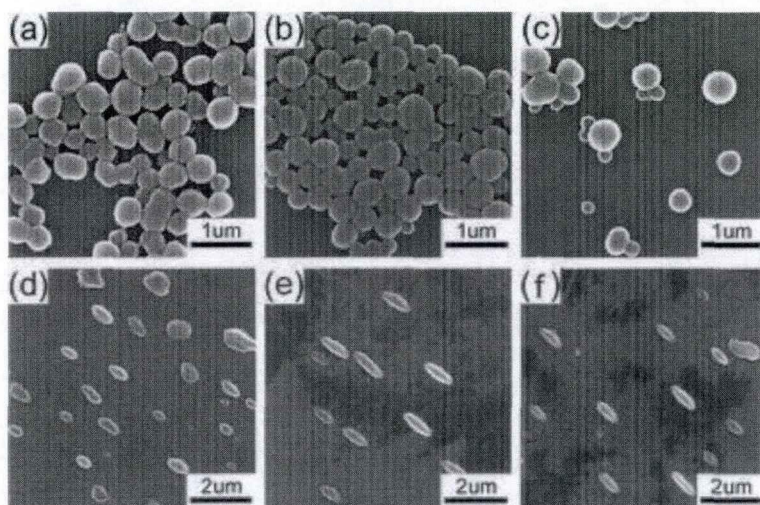


图 1.6 偶氮苯囊泡紫外光致单向伸长

Chen 等最近合成了 ABC 型的含偶氮苯的嵌段共聚物, 如图 1.6。通过调节聚合物中偶氮苯的嵌段部分的长度和组装浓度, 可以得到各种形貌的复合囊泡。同时他们也研究了偶氮含量对囊泡紫外光响应的影响: 囊泡沿着紫外光偏振方向拉长。在偏振光照射下, 偶氮苯基团含量越高的囊泡, 其形变程度越大[47]。

除了聚合物组成和分子结构这些内部因素, 激发光的强度、频率和偏振状态等外部刺激因素也可以调节囊泡的光响应变化。比如: 在紫外光下偶氮苯聚合物囊泡可以发生形变, 如果换成可见波长的光照射, 这个形变过程就能进行可逆的回复; 光照强度也能用来调控囊泡的光响应性, 这主要是因为偶氮苯基团在紫外光照射下的饱和异构化程度有着光强依赖性, 而且光照强度也会影响单位时间内异构转化分子数; 特定方向的偏振光照射, 无论对于囊泡或胶体粒子都会诱导产生形变, 且形变方向和偏振光的照射角度有关, 该现象与高分子的极性有关: 分子的长轴在相同方向偏振光激发下, 会变长从而使组装结构在相应方向发生拉伸形变[47-49]。

1.5 本文研究内容

本文工作主要围绕拉曼光谱与光镊技术结合形成的拉曼光镊系统及其应用于偶氮聚合物自组装囊泡光响应性质的研究展开。论文结构框架如下:

第一章为绪论, 介绍论文的拉曼光镊和偶氮聚合物组装囊泡光响应的研究背景以及研究意义。第二章内容是实验设备的设计原理、系统构成、应用范围以及使用方法。第三章到第七章, 针对拉曼光镊系统的应用展开, 进行了以下几个实验: 首先在偶氮吡啶囊泡 PNIPAM-b-PAzPy6 加入交联剂 DBP (1,3 二溴丙烷), 观察其光致伸缩膨胀程度的变化; 接着利用不同间隔基长度的偶氮聚合物 PNIPAM-b-PAzPyn (n=0, 2, 6) 组装囊泡, 光照下出现不同的形貌转化 (伸缩膨胀, 产生不均匀表面形貌) 这些变化都是可逆的, 经分析这与主链与侧链之间的相互作用强度相关; 利用偶氮聚合物 PNIPAM-b-PAzoMO 组装囊泡, 发现这种囊泡在紫外光照

下会发生破裂，接着重新组装成尺寸较小（ $\sim 1\mu\text{m}$ ），但大小均一的囊泡；双组份偶氮组装囊泡会产生微相分离，即形成 Janus 结构观察了其微区在紫外光照下的运动；拉曼光镊加偏振元件，通过旋转激发光偏振方向探测了囊泡表面偶氮基团取向等。第八章将利用微针吸入法来探测囊泡膜的弹性模量。最后，第九章是论文的总结与展望。

本文的创新点主要在于发展光镊技术使之与拉曼光谱技术相结合形成一套多功能探测系统。并将这套系统应用于对偶氮聚合物囊泡的光响应特性进行研究，得到一系列新现象，比如：光致可逆形貌转化、微相分离及其运动、破裂重组等，并根据这些响应过程中拉曼光谱信号的演化对其机理做了解释。这些实验研究对于探索新型功能囊泡制备有很大的借鉴意义。

参考文献

1. Ashkin A, Dziedzic J. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria [J]. *Science*, 1987, 235(4795): 1517-1520.
2. Cardenas N, Mohanty S K. Optical tweezers assisted quantitative phase imaging led to thickness mapping of red blood cells [J]. *Applied Physics Letters*, 2013, 103(1):
3. Kandinov A, Raghunathan K, Meiners J C. Determining the Elasticity of Short DNA Fragments using Optical Tweezers and Protein-Mediated DNA Loop Formation Assays [J]. *Biophysical Journal*, 2013, 104(2): 262a-262e.
4. LaFratta C N. Optical tweezers for medical diagnostics [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(17): 5671-5677.
5. van Loenhout M T J, De Vlaminck I, Flebus B, et al. Scanning a DNA Molecule for Bound Proteins Using Hybrid Magnetic and Optical Tweezers [J]. *Plos One*, 2013, 8(6):
6. Zhong M C, Wei X B, Zhou J H, et al. Trapping red blood cells in living animals using optical tweezers [J]. *Nature Communications*, 2013, 4(6): 1768-1772.
7. Soni G V, Jonsson M P, Dekker C. Periodic Modulations of Optical Tweezers Near Solid-State Membranes [J]. *Small*, 2013, 9(5): 679-684.

8. Taylor M A, Knittel J, Bowen W P. Optical lock-in particle tracking in optical tweezers [J]. *Optics Express*, 2013, 21(7): 8018-8024.
9. Cosgrove T. *Colloid Science: Principles, Methods and Applications* [M]. Wiley, 2005.
10. Wang X L, Gou X, Chen S X, et al. Cell manipulation tool with combined microwell array and optical tweezers for cell isolation and deposition [J]. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2013, 23(7): 1517-1520.
11. Yupapin P P, Kulsirirat K, Techithdeera W. Optical Capsule and Tweezer Array for Molecular Motor Use [J]. *Ieee Transactions on Nanobioscience*, 2013, 12(3): 222-227.
12. Eckert K, Mompert J, Birkl G, et al. One-and two-dimensional quantum walks in arrays of optical traps [J]. *Physical Review A*, 2005, 72(1): 012327.
13. Gibson G, Carberry D M, Whyte G, et al. Holographic assembly workstation for optical manipulation [J]. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 2008, 10(4): 044009.
14. Grier D G. A revolution in optical manipulation [J]. *Nature*, 2003, 424(6950): 810-816.
15. Libal A, Reichhardt C, Reichhardt C O. Realizing colloidal artificial ice on arrays of optical traps [J]. *Physical Review Letters*, 2006, 97(22): 228302.
16. Hertz H. Standing - wave acoustic trap for nonintrusive positioning of microparticles [J]. *Journal of Applied Physics*, 1995, 78(8): 4845-4849.
17. Svoboda K, Block S M. Biological applications of optical forces [J]. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 1994, 23(1): 247-285.
18. Stilgoe A B, Heckenberg N R, Nieminen T A, et al. Phase-Transition-like Properties of Double-Beam Optical Tweezers [J]. *Physical Review Letters*, 2011, 107(24):
19. Indian Institute of Management Ahmedabad. Assessing the regional and district capacity for operationalizing emergency obstetric care through first referral units in Gujarat [M]. Ahmedabad: Indian Institute of Management, 2009.
20. Smith F, RamosGabatin A, Olalde L. Reduced particle size sulfur colloid for lymphoscintigraphy. [J]. *Journal of Nuclear Medicine*, 1996, 37(5): 1403-1403.
21. Muniappan R, Reddy G V P, Raman A. *Biological control of tropical weeds using arthropods* [M]. Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press, 2009.

22. Koehn F E, Carter G T. The evolving role of natural products in drug discovery [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4(3): 206-220.
23. Fontes A, Ajito K, Neves A A R, et al. Raman, hyper-Raman, hyper-Rayleigh, two-photon luminescence and morphology-dependent resonance modes in a single optical tweezers system [J]. *Physical Review E*, 2005, 72(1):
24. Williams P S, Xu Y H, Reschiglian P, et al. Colloid characterization by sedimentation field flow fractionation: Correction for particle-wall interaction [J]. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(3): 349-360.
25. Tao Z H, Wang G W, Xu X D, et al. Monitoring and rapid quantification of total carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cells using laser tweezers Raman spectroscopy [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2011, 314(1): 42-48.
26. King M D, Thompson K C, Ward A D, et al. Oxidation of biogenic and water-soluble compounds in aqueous and organic aerosol droplets by ozone: a kinetic and product analysis approach using laser Raman tweezers [J]. *Faraday Discussions*, 2008, 137(173-192).
27. Xie C, Dinno M A, Li Y-q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells [J]. *Optics Letters*, 2002, 27(4): 249-251.
28. Wright L S, Chowdhury A, Russo P. Static light scattering instrument for rapid and time-resolved particle sizing in polymer and colloid solutions [J]. *Review of Scientific Instruments*, 1996, 67(10): 3645-3648.
29. Raman B V, Vasudev G D. Dr. B.V. Raman : the man and his mission [M]. New Delhi Mumbai: UBS Publishers' Distributors ; Distributors for Western India, Preface Books, 2000.
30. Letokhov V S, Meystre P. *Advances in laser physics* [M]. Australia: Harwood Academic, 2000.
31. Grasselli J G, Bulkin B J. *Analytical Raman spectroscopy* [M]. New York: Wiley, 1991.
32. Petrov D. Raman spectroscopy of optically trapped particles [J]. *JOURNAL OF OPTICS A PURE AND APPLIED OPTICS*, 2007, 9(8): S139.
33. Degueldre C, Favarger P Y, Wold S. Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 555(2): 263-268.
34. Degueldre C, Favarger P Y, Rosse R, et al. Uranium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2006, 68(3): 623-628.

35. Nicolaou K, Pfefferkorn J, Roecker A, et al. Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 1. General principles and solid-phase synthesis of benzopyrans [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(41): 9939-9953.
36. Melrose J R. Colloid flow during thickening - a particle level understanding for core-shell particles [J]. *Faraday Discussions*, 2003, 123(355-368).
37. Andrew D. Analysis of liposomal membrane composition using Raman tweezers [J]. *Chemical Communications*, 2004, 9): 1120-1121.
38. Kitamura N, Kitagawa F. Optical trapping—chemical analysis of single microparticles in solution [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2003, 4(3): 227-
39. Wu H, Volponi J V, Oliver A E, et al. In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(9): 3809-3814.
40. Schaefer J J, Ma C, Harris J M. Confocal Raman Microscopy Probing of Temperature-Controlled Release from Individual, Optically-Trapped Phospholipid Vesicles [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(21): 9505-9512.
41. Cherney D P, Harris J M. Confocal Raman microscopy of optical-trapped particles in liquids [J]. *Annual review of analytical chemistry*, 2010, 3(6): 277-297.
42. Korir G K, Karukstis K K. Azo dye aggregation on cationic vesicle surfaces [J]. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2004, 227(4): U481-U485.
43. Li N, Wang X G. Hollow and Vesicle-Like Aggregates of an Amphiphilic Azo Random Copolymer Bearing Branched Azobenzene Side Chains [J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2013, 4): 549-555.
44. Perelman L A, Karukstis K K. Spectroscopic characterization of azo dye aggregation on cationic vesicle surfaces. [J]. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2003, 225(7): U657-U658.
45. Mabrouk E, Cuvelier D, Brochard-Wyart F, et al. Bursting of sensitive polymersomes induced by curling [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(18): 7294-7298.
46. Jin H, Zheng Y, Liu Y, et al. Reversible and Large - Scale Cytomimetic Vesicle Aggregation: Light - Responsive Host-Guest Interactions [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(44): 10352-10356.

47. Wang Y, Lin S, Zang M, et al. Self-assembly and photo-responsive behavior of novel ABC2-type block copolymers containing azobenzene moieties [J]. *Soft Matter*, 2012, 8(11): 3131-3138.

48. Viswanathan N, Kim D, Tripathy S. Surface relief structures on azo polymer films [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 1999, 9(9): 1941-1955.

49. Li Y, He Y, Tong X, et al. Photoinduced deformation of amphiphilic azo polymer colloidal spheres [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(8): 2402-2403.

第2章 拉曼光镊系统原理及设计

要了解一套设备，首先需要知道该设备的基本运行原理以及设计过程，然后才是设备的使用。因此本章首先介绍光镊形成的理论基础以及拉曼散射的基本概念。接着将详细描述系统的硬件构成，设计方案以及系统的参数指标；接着是该系统的使用说明及注意事项。最后是拉曼光谱数据的处理方法。

2.1 拉曼光镊原理

2.1.1 拉曼散射光谱基本原理

当光波（电磁波）射入介质时，如果介质中存在某些不均匀性使电磁波的传播发生改变，这就是光散射[1]。根据介质的不同光散射可以有三种情况，如图 2.2 所示：如果介质是均匀的，而且不考虑其热涨落，光通过介质后不发生任何改变，电磁波沿原来方向传播，这是一种理想情况，实际中几乎找不到与之对应的真实过程；如果介质存在一定的不均匀性，电磁波与其相互作用后被散射到其它方向，只要这种不均匀性不随时间改变，则散射光的频率不会改变，只是波矢方向受到影响，这是弹性散射，与真实的瑞利散射、廷德尔米氏散射相对应；如果介质中的不均匀性随时间而变化，则电磁波与介质会发生能量交换，使光波的能量（频率）发生变化，这使非弹性散射与真实的布里渊、拉曼散射过程相对应。

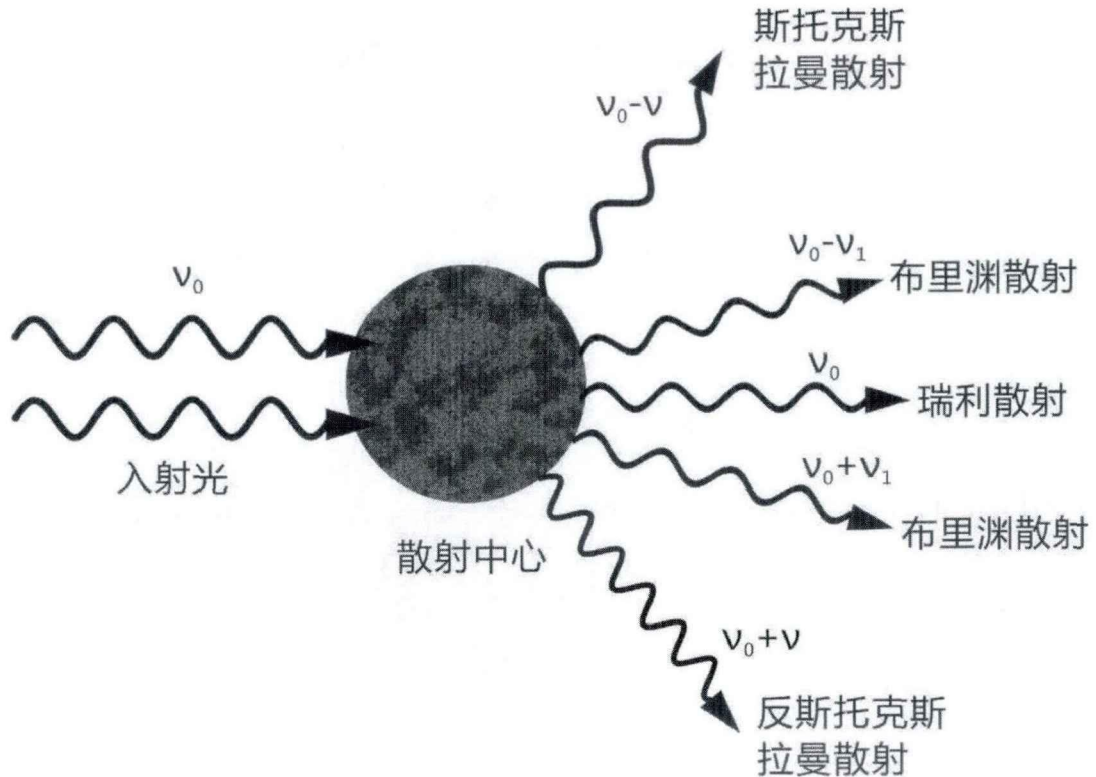


图 2.2 三种类型的光散射图示：瑞利散射、布里渊散射、斯托克斯和反斯托克斯拉曼散射

非弹性散射中的布里渊散射对应的是介质的体积特征量，由被照射介质中热诱发的分子运动产生的周期性密度波动引发，因此它可以反映介质对周围环境压力改变以及温度变化的响应，一般电磁波的能量改变很小。而拉曼散射是由于光波与介质分子相互作用，光子的能量与分子的振动、转动、各种激发元的能量相互转化而引起的。由于分子的振动、转动能级差异较大，所以光子能量（频率）的改变也分布很广。

2.2.1.1 拉曼散射的理论解释[2]

通常可以用经典电磁理论以及量子理论来解释包括拉曼散射在内的光散射。当物质分子与单波长光子相互作用时，光子的电场力作用于该分子的原子核和电子，使两者发生相对移动，这种极化的分子具有正比于电场强度 E 和极化率 α 诱导偶极矩 P ，即

$$P = \alpha E \quad (2.1)$$

其中电场强度取决于单波长光子的频率 ν_0 的振动函数:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (2.2)$$

极化率 α 决定于原子核所处的位置, 它是原子核位置的函数。对于单个简正坐标 Q_1 的双原子组成的分子, α 可由公式(2.3)表示。

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial Q_0} Q_1 \quad (2.3)$$

α_0 是极化率的平衡值。由于原子核随着频率 ν_1 振动, 因此

$$Q_1 = Q_1^0 \cos 2\pi\nu_1 t \quad (2.4)$$

上式中, Q_1^0 是最大振幅, 将式(2.4)代入式(2.3)中, 即得

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial Q_1} Q_1^0 \cos 2\pi\nu_1 t \quad (2.5)$$

将等式(2.5)代入等式(2.1)得

$$P = [\alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial Q_1} Q_1^0 \cos 2\pi\nu_1 t] E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (2.6)$$

根据公式 $\cos \theta \times \cos \phi = \frac{1}{2} \cos(\theta + \phi) \cos(\theta - \phi)$, 公式(2.6)可以表达为

$$P = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} E_0 Q_1^0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_1} \right)_0 \times [\cos 2\pi t(\nu_0 + \nu_1) + \cos 2\pi t(\nu_0 - \nu_1)] \quad (2.7)$$

公式(2.7)表明诱导偶极矩 P 是一个与瑞利散射和不同频率斯托克斯散射和反斯托克斯散射三者有关的物理量。对于含有 N 个原子的多原子分子, 有 $3N-6$ 个振动模式, 则公式(2.7)可以写成

$$P = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} E_0 Q_i^0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right)_0 \times [\cos 2\pi t(\nu_0 + \nu_i) + \cos 2\pi t(\nu_0 - \nu_i)] \quad (2.8)$$

一个分子的极化强度 P 包含三个频率成分: ν_0 , $\nu_0 \pm \nu_i$ 分别对应与瑞利散射光和斯托克斯以及反斯托克斯拉曼散射光。因此在一般的实验中, 都能观察到这些频率的散射光。

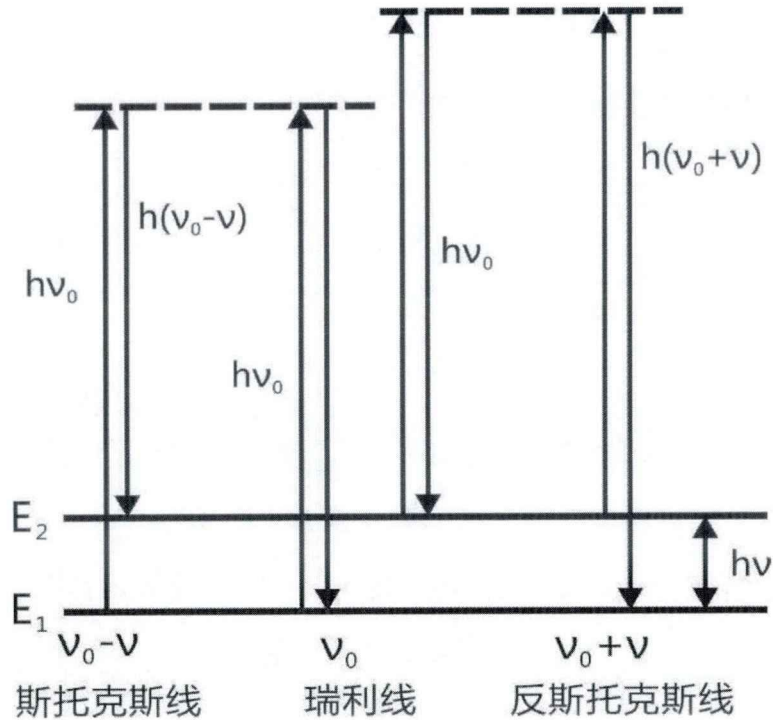


图 2.3 瑞利散射和拉曼散射的双原子分子能级示意图

拉曼散射的量子解释为：光子与介质分子的非弹性散射。这种散射过程不包括能级间的直接跃迁（吸收和辐射），而是一种与中间虚态相关的过程。以双原子分子为例，拉曼散射过程能级示意图示与图 2.3。 E_1 、 E_2 分别表示振动的基态和激发态，假定作用到样品上的激光频率为 ν_0 ，相应的光子的能量为 $h\nu_0$ 。当分子从振动基态 E_1 （或者振动激发态 E_2 ），被入射光激发到能级为 $E_1 + h\nu_0$ （或者 $E_2 + h\nu_0$ ）的虚态，然后又回到振动态 E_1 （或 E_2 ），这种散射现象为瑞利散射。另一种散射是非弹性的，即散射光的光子能量与入射光光子不同。这时有两种不同的情况：一种是处于基态 E_1 的光子被激发到虚态 $E_1 + h\nu_0$ ，然后跃迁回到激发态 E_2 ，产生能量为 $h(\nu_0 - \nu)$ 的光子，称为斯托克斯散射；另一种是出于振动激发态 E_2 的分子被激发到虚态 $E_2 + h\nu_0$ ，然后回到振动基态 E_1 ，产生能量为 $h(\nu_0 + \nu)$ 的光子，称之为反斯托克斯散射。两条线对称分布在入射激光波长的两侧。

能级关系的解释和经典电磁理论的解释虽然能定性的理解拉曼散射现象，但是不能解释其全部现象。例如上述讨论不能说明实际观察到的斯托克斯线（stokes）比反斯托克斯线(anti-stokes)强的现象。可以用分子能级的玻尔兹曼分

布来说明这一点。玻尔兹曼分布定律认为：在一定温度下处于基态的分子数目比处于激发态的分子数目多，从上图 2.3 可以看出：斯托克斯线与激发初始处于基态的分子相对应；反斯托克斯线则与激发初始处于激发态的分子相对应。反斯托克斯线与斯托克斯线的强度之比满足公式：

$$\frac{I_{\text{anti-stokes}}}{I_{\text{stokes}}} = \left(\frac{\nu - \nu_i}{\nu + \nu_i} \right)^4 e^{-\frac{h\nu}{K_B T}} \quad (2.9)$$

其中 ν 是激发光频率， ν_i 是分子的振动频率， K_B 是玻尔兹曼常数， T 为绝对温度。例如在 300K，振动频率为 1000cm^{-1} 时处于基态的分子数大约为激发态的 100 倍。因此在 1000cm^{-1} 处的斯托克斯线强度比在 1000cm^{-1} 处的反斯托克斯线强 100 倍。

2.1.1.2 拉曼散射特征频率[3]

拉曼光谱的中振动频率是由特定原子团和化学键的特性决定的，这个振动频率被称为特征拉曼频率。当分子发生振动时，其键长和键角会同时发生改变，若把某一个基团的振动看作绝热的体系，即它不会与邻近的基团发生耦合作用，则这个振动的频率和强度就是该基团的特征。但是任何振动都不可能是完全孤立的，必然会受到化学环境的影响，跃迁频率产生微小的平移，频移的大小和方向可以作为该基团化学环境变化的证据，所以依据特征频率及其位移来判断各种基团的存在与否。特征拉曼频率在拉曼分析中非常重要。

在拉曼光谱中经常会使用波数 σ 来表示特征拉曼频移，它与频率 ν 以及波长 λ 的关系如下：

$$\sigma = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (2.10)$$

上式中 c 为光速。波数的单位是 cm^{-1} ，即 1cm 的长度所包含的波的数目。在拉曼光谱中找出拉曼波数差比找出绝对波数 σ 更重要，而且斯托克斯线和反斯托克斯线的拉曼波数差是对称的。

2.1.1.3 拉曼谱线强度及相对强度变化率[4]

拉曼散射的波长移动来源于散射物质的基态振动能级和激发态振动能级的不同。对于一个真实的分子，可以有许许多个不同的激发态能级。每个激发态的能级均能散射出拉曼信号。根据量子跃迁准则，每两个能级之间的跃迁几率不同，造成各个能级产生的拉曼信号强度不同。光强可由满足如下公式：

$$I_{fi} = \frac{2^3\pi}{3c^3} I_0 \omega^4 \sum_{a,b} |(A_{a,b})_{fi}|^2 \quad (2.11)$$

上式中 a, b 对应于坐标 x, y, z, $(A_{a,b})_{fi}$ 是分子的极化率, i, f 分别是分子跃迁过程中的中间态以及最终态。

根据 Brunner 等人的观点：拉曼谱线的强度与散射中心的数目成正比[5]。为了精确地研究分子在溶液中构象的变化，我们可以用拉曼谱线的相对强度变化率来比较大分子各个基团和化学键在研究过程中的前后变化，因此我们可以引入如下半定量的公式：

$$\Delta I_n = \frac{I_n - I_1}{I_1} \times 100\% \quad (2.12)$$

上式中， I_1 、 I_n 分别为变化前后的拉曼谱线的相对强度。

2.1.1.4 拉曼谱线的退偏比

分子和晶体都具有一定的对称性，它们的振动模式也具有相应的对称性质，反映在散射光谱中，各振动模式都具有自己的偏振特性，对于无规取向的分子系统，其拉曼谱的偏振特性取其统计平均，通常可以用退偏比 ρ 来描述各振动模式的偏振特性，我们给出如下定义[6]：

$$\rho = \frac{3r^2}{45\alpha^2 + 4r^2} \quad (2.13)$$

上式中， α 为该振动模式拉曼倒数极化率张量的各向同性部分， r 为其各向异性部分。当 $r = 0$ 时， $\rho = 0$ ，此时这个偏振模式被称为完全偏振；当 $\alpha = 0$ ， $\rho = 3/4$ 时，退偏比为最大值，此时这个模式被称为完全退偏；如果 ρ 取中间值，则

此模式被称为部分退偏振。上述公式(2.11)仅对对称拉曼散射张量是适用的。对于非对称拉曼散射张量的情况，其退偏比可以表示为：

$$\rho = \frac{3r_s^2 + 5r_{as}^2}{45\alpha^2 + 4r_s^2} \quad (2.14)$$

上式中，下角标 s 和 as 分别为对称振动以及非对称振动。

2.1.2 光镊基本原理

光具有能量和动量。由于普通光的动量极其微小，很难引起可觉察的宏观力学效应。因此，在激光出现之前，光的能量得到广泛的应用，光的动量却很少被利用。激光特点是它具有极高亮度和很好的指向性，它的出现使得光的力学效应极大地增强。光镊技术[1-4]正是利用激光的力学效应而发展起来，可以用来操纵微米量级粒子的技术。

2.1.2.1 光镊的几何光学理解[7]

光镊可以用几何光线光学定性的解释：每根光线都携带动量，当光线在粒子表面被折射以及反射时，传播方向发生改变，即其部分动量传递给了小球，根据牛顿第三定律：这个过程中，小球同时会受到光线施加的反作用力。考虑一个球形透明粒子，其折射率高于周围介质。一个在垂直于光轴平面内高斯分布的平面波光场，照射到粒子上，如图 2.4 所示。光束中任意一个光线都带有 $p = n_{media}P/c$ 的动量，其中 P 为该光线的功率， n_{media} 为光线传播介质的折射率，c 为真空中的光速。追踪对称分布在球两面，但功率不同的平行传播的两根光线，见下图 2.4a，很容易看出：两根光线的动量流的矢量和指向背离能量密度高的方向。因而小球会受到一个指向密度梯度方向的反作用力，这个力被称为梯度力 F_{grad} 。由于存在表面反射和吸收，小球同时会受到沿着光轴方向的散射力 F_{scat} 。接下来考虑一个被显微物镜高度聚焦的高斯光束（见图 2.4b），这是一个典型的光镊结构。球形粒子可以被看做一个正透镜，它改变了聚焦光束的发散角（使光束焦点偏离物镜

的焦平面)。如果入射光线的角度足够大, 并且小球在光焦点之外, 可以使轴向力 F_z 背向光束传播方向。这意味着形成了一个稳定的三维俘获势阱, 即任何偏离势阱中心的微小粒子都会受到一个指向中心位置的恢复力[8]。

当粒子尺寸较大, 可以忽略粒子对光波的衍射以及干涉效应时, 几何光线光学不仅可以给出光阱形成一个很好地定性解释, 还可以定量的描述光阱。因此几何光学只适合于描述对于满足粒子直径远大于光波长的情形 ($d \gg \lambda$), 如果要得到严格定量的结果, 一个实用的规则是粒子的直径至少要比光波长大 20 倍以上。

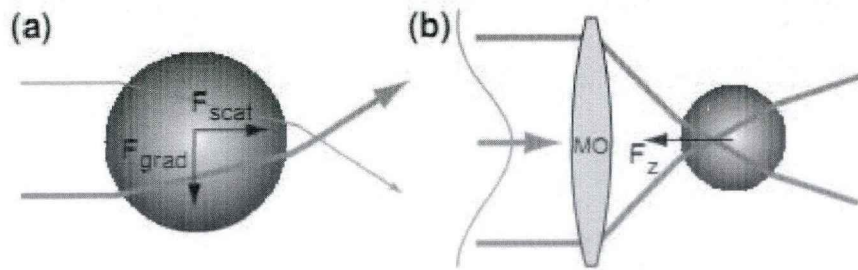


图 2.4 光镊的几何光学基本原理

图注: a 横向光强梯度会造成梯度力 F_{grad} 指向光强最强的区域, 散射力 F_{scat} 沿着光轴方向; b 通过显微物镜强聚焦的光束可以产生一个沿光轴向后的力 (F_z)。

2.1.2.2 光镊的电磁场理解[9, 10]

光阱的另一个近似描述是考虑粒子直径远小于光波长的情形 ($d \ll \lambda$)。在瑞利区域, 粒子可以看作一个与电场相互作用的无穷小的偶极子。对于一个半径为 r 的球形粒子, 在均匀电场 \vec{E} 中, 会被极化而产生偶极矩:

$$\vec{p}_{dipole} = 4\pi n_{media}^2 \epsilon_0 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \vec{E} \quad (2.15)$$

上式中粒子的相对折射率为 $m = n_{part}/n_{media}$, 真空中介电常数 ϵ_0 。偶极化的粒子在非均匀电场中会受到梯度力[11]

$$\vec{F}_{grad} = \pi n_{media}^2 \epsilon_0 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla |\vec{E}|^2 \quad (2.16)$$

对于小粒子，上述方程同样适用于含时的电场。因此对于强度为 I 的光场，梯度力可以表示为：

$$\vec{F}_{grad} = \frac{2\pi r^3 n_{media}}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I \quad (2.17)$$

对于高折射率的粒子，相对折射率 $m > 1$ ，梯度力沿着光场梯度方向。对于静态电场，根据上述表达式可以得到粒子受到的合力；当电场随时间变化时，这个偶极子也会振荡，可以看成是一个辐射能量的天线。粒子对入射光场能量的再辐射导致粒子还会受到散射力[12]，可以用下式表达

$$F_{scat} = \frac{8\pi n_{media} k^4 r^6}{3c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) I \quad (2.18)$$

上式中 $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ 是光场的波数。如果粒子吸收光能，它还会受到额外的力。这个力正比于光强，同时与 r^3 成正比。这些力的合力（包括梯度力）可以分解为径向力和轴向力图 2.5 所示。

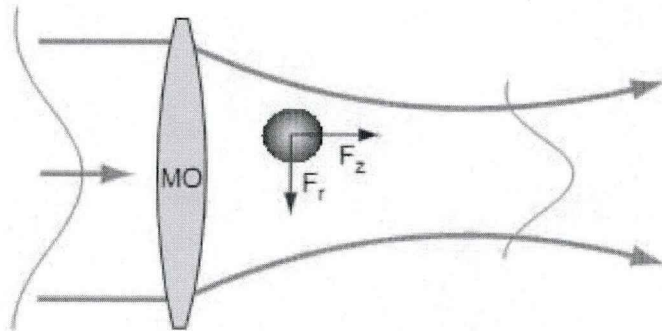


图 2.5 光镊的基本原理（瑞利区域）

图注：一个粒子被聚焦的高斯光束照射，会受到一个横向力和一个轴向力，其合力指向光强最强的方向。

当光场的聚焦程度增加时，其梯度也会随之增加。当梯度力大于散射力时，才会形成稳定的三维捕获光阱。比较粒子受到的梯度力（式 2.15）和散射力（式 2.16），我们发现当粒子直径小于一个特定阈值的时候，梯度力总大于散射力，此时粒子总能被稳定地俘获。这在实际中不会发生，因为布朗运动的存在，粒子

还会受到一个额外的力。布朗运动相应的热动能约为 $k_B T$ ，其中 k_B 为玻尔兹曼常数， T 为温度。保守的梯度力产生的光阱的势能为[13]：

$$U = \int F dr = -\frac{2\pi r^3 n_{media}}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) I + C \quad (2.19)$$

其中 C 是任意的积分常数。当粒子处于溶液中时，它会受到一个流体产生的粘滞拖拽力 $F_{drag} = -6\pi\eta r v$ ，其中 $r=d/2$ 为粒子半径， v 是粒子的相对运动速度， η 为溶液的动态粘滞系数。当粒子半径减少时，粒子的布朗运动所受的抑制会减少，更不容易被俘获。

通过上述分析，几何光学近似和瑞利近似都能直观的理解光镊的物理原理。但是对于特定尺寸的粒子($d \approx \lambda$)，上述分析都会受到限制。在这个中间区域我们需要基于基本电磁场理论进行更严格的分析，才能定量的描述光镊，具体分析见Nieminen等人的论著[9]。

2.1.3 光阱的主要参数

2.1.3.1 阱域

光阱的阱域 R 是指：当一个静止的粒子放在距离光阱中心一定距离时，粒子可以被吸引到光阱中心的最大距离。横向捕获区域可以通过如下方法测得：首先关掉光阱，把粒子放在一个距离光阱中心某个距离处，然后打开光阱，如果粒子能被捕获，则粒子位于捕获范围之内；重复上述过程，逐步增加两者距离，直到粒子不能被捕获为止。最终得到的临界距离，就是光阱的横向阱域[14]。

2.1.3.2 光阱的强度（最大捕获力）

光阱的强度是指：粒子在光阱中受到的最大回复力。对于尺寸较大的粒子，当粒子距离光阱中心约一个半径 $d/2$ 时，它所受到的回复力最大[15]。由图2.6我们可以精确得到最大光阱力所在位置。

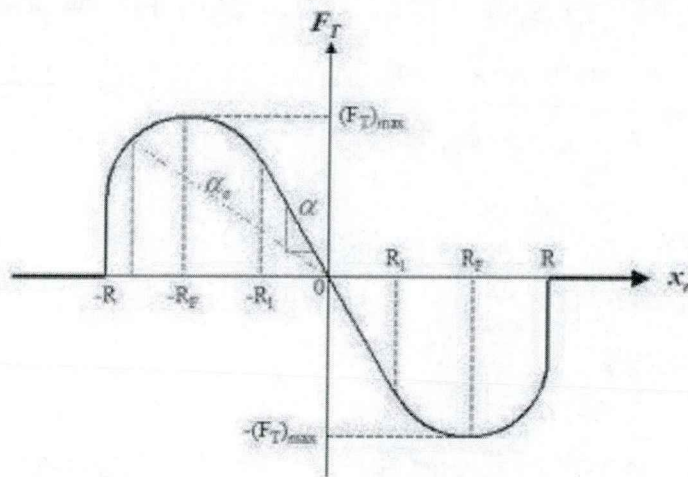


图 2.6 光阱力的横向分布

最大光阱力可以写成

$$(F_T)_{max} = Q \frac{n_f P_T}{c} \quad (2.20)$$

其中, Q 是无量纲的参数, 被称作光镊的捕获效率因子。它依赖于物镜数值孔径, 激光的波长、偏振态、模式结构, 小球的相对折射率, 以及形状等。 $\frac{n_f P_T}{c}$ 的值为入射激光的每秒产生的动量。 P_T 入射激光在焦点处的功率, n_f 为流体介质的折射率, c 为真空中的光速。对于功率为 1W 的激光产生的光镊, 光阱力一般可以达到数十皮牛[16]。

2.1.3.3 光阱刚度

在光阱的线性区间内, 粒子受到的光阱力可以用下式表达:

$$F_T = -kx_r \quad (2.21)$$

式中 F_T 为粒子在光阱中受到的光阱力, x_r 为粒子与光阱中心的距离, k 就是光阱的刚度 (stiffness)。影响光阱刚度的因素很多, 比如: 激光波长及功率, 粒子相对折射率, 以及尺寸形状等。目前有多种方法可以标定光阱的刚度, 比如: 布朗热运动法, 流体力学法, 功率谱法等, 详细的处理方法见相关文献[14, 17]。

另外光阱的线性区间 R_l （定义：回复力与粒子和光阱中心距离呈线性关系的最大距离）[18]和最大光阱力程 R_F （定义：粒子受到最大光阱力时，粒子与光阱中心的距离）都是重要光阱参数。

2.2 拉曼光镊设备硬件性能参数及设计方案

2.2.1 光镊光源

激光器的性能对于拉曼光谱测量以及光镊参数的标定都很重要。要得到好的拉曼光谱数据，需要激光器拥有很高地功率稳定性以及单色性。要实现光镊的稳定俘获，需要较高的功率，单横模结构。要得到恒定的光阱力，对光束功率稳定性要求很高。因此我们选购的是美国 Crystalaser 公司的 DL785-120-S 半导体激光器。该激光器为单横模（基横模 TEM₀₀），功率为 120 mW，功率非常稳定，其波动范围小于 1%，光束质量因子 $M^2 \sim 1.1$ ，发散角 $\sim 1\text{mrad}$ ，指向稳定性 $< 0.005\text{mrad}/^\circ\text{C}$ ，这些参数都满足我们系统的要求。我们使用 Thorlabs 公司的功率计 PD100 测量了该激光器的功率稳定性，详见图 2.7，可以看出这款激光器满足其说明书所给的指标。另外我们还使用光谱仪 SP750-G300 对激光器的单色性进行了测量，详见图 2.8，经分析其波谱线宽小于 2nm。

因为紫外光照射聚合物时会发生光化学反应而使分子结构发生变化，可见光波长激发光探测偶氮聚合物具有很强的荧光对探测造成不利影响，近红外激光波长可有效降低样品产生的荧光对拉曼信号干扰，波长更长的激光，其热效应又会显著增加，不利于样品稳定存在。综合考虑以上几个因素，我们选用的是近红外波长为 785nm 的激光作为拉曼光谱激发光，以及光镊的光源。

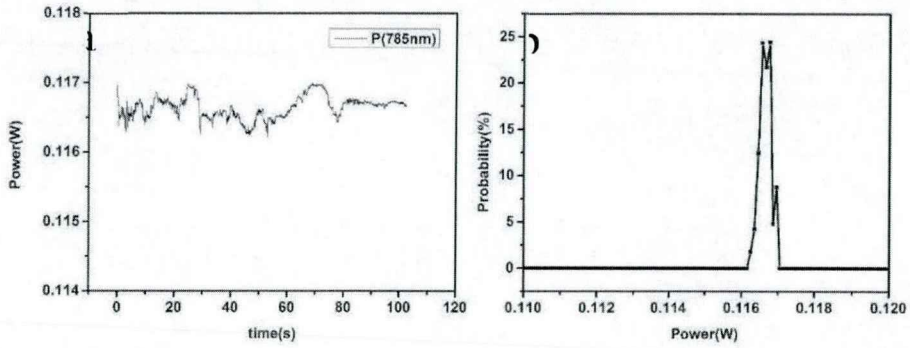


图 2.7 激光器 DL-785-S 功率稳定性测量

图注: a 激光功率随时间的变化 (采样间隔时间 10ms); b 激光功率的分布

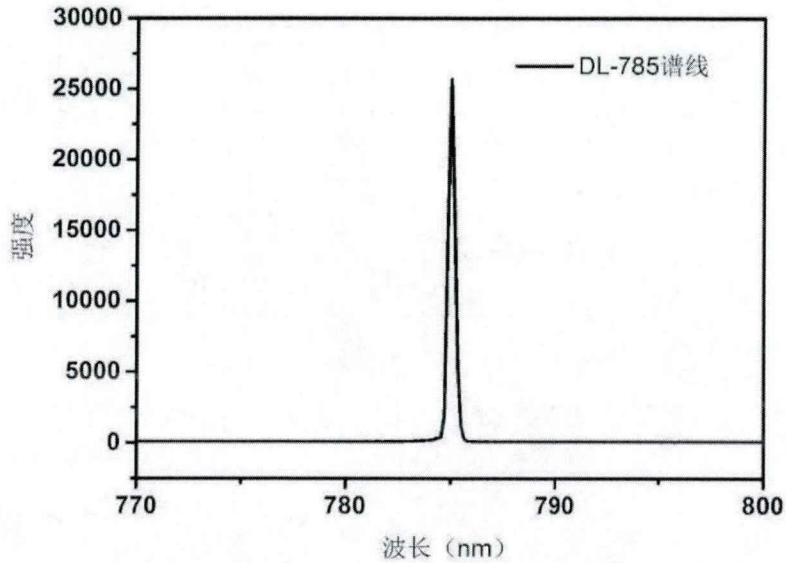


图 2.8 DL-785-S 激光器单色性测量

2.2.2 拉曼光谱仪

本系统最核心的硬件是拉曼光谱仪，我们选用的是美国 Princeton Instruments 公司的 LS-785 拉曼光谱仪。光谱仪的主要参数在表 2.1 中介绍。光谱仪的内部架构示意图详见图 2.9, 样品散射的拉曼信号以一定的汇聚角度，通过滤波狭缝，然后发散进入光谱仪，被准直透镜组 (口径率 $f/2.0$) 准直之后，到达反射光栅 ($1200\text{gr}/\text{cm}$) 表面，不同波长的拉曼散射信号被散射到不同方向，

再由聚焦透镜组（口径率 f/2.0）汇聚到液氮制冷的 CCD 靶面上，被记录下来。再由控制器的处理芯片，将光信号转化成数字信号，再由数据线传输到电脑上存储，以待进一步分析。

表 2.1 LS-785 光谱仪主要性能指标

孔径率	f/2.0
分光度(nm/mm)	6.23
空间分辨率	5cm ⁻¹ (25 μm 光纤)
波长覆盖范围	785-1050nm
象散	小于 120um
图像畸变	小于 2.5 像素
CCD 像素大小	20×20 微米
CCD 成像面积	26.8mm × 2.0mm (1340: 100)

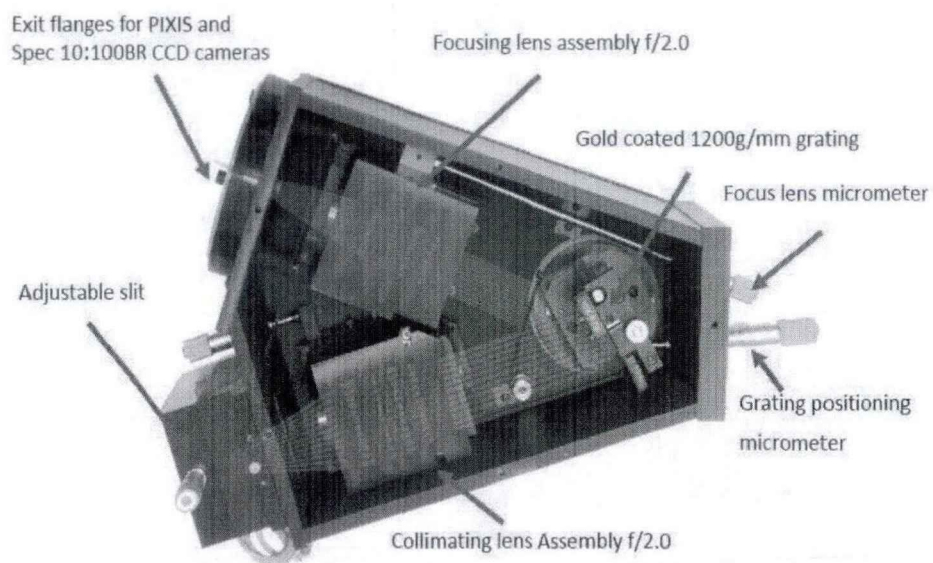


图 2.9 LS 785 拉曼光谱仪内部结构示意图

2.2.3 显微镜及 CCD 相机

本套系统使用的是倒置生物荧光显微镜 (IX70, Olympus, Japan), 显微物镜为 100 倍的油浸物镜 (100 \times , oil), 样品的成像使用的是美国 Coolsnap 公司的 CCD (Coolsnap CF mono camera, USA)。样品的精细位移操作是由压电平台来实现的。压电位移平台使用的德国 Physik Instrumente 公司的 P517.3CL, 此平台由计算机控制, 水平方向 (X、Y 方向) 上的运动精度为 1nm, 在纵向 (Z 方向) 上的运动精度为 0.1nm。

2.2.4 光学耦合器件

为了使光镊系统达到最大捕获效率, 需要将激光准直输入物镜后瞳, 并将光斑扩大到充满后瞳, 我们将激光器的输出光斑扩束, 直径为 10mm, 然后为了调节光阱的深度, 需要加入一个阱位透镜 (光路图 2.10 中 L1), 其数值口径与显微镜内的管镜 (tube lens) 相匹配, 管镜的数值孔径约为 $10/180=0.056$ 。

另外由于光谱仪的光谱信号收集光路光程较长, 我们加了一个准直透镜 (见光路图中的 L2), 和一个与狭缝内的准直透镜组口径率 ($f/2.0$) 相匹配的共焦透镜 (见光路图 2.10 中 L3)。

2.2.5 拉曼光镊系统光路设计

拉曼光镊系统的光路示意图如下图 2.11 所示: 785nm 激光自半导体激光器准直发出, 光斑直径 10mm, 之后经干涉滤光片过滤将其中杂散波长的光过滤掉, 再经透镜 L1、反射镜 M3 和二色分光镜进入显微镜。显微镜内部有一片二色镜 BS2 可以实现波长大于 780nm 的光线全部反射进入 tubelens。激发光经过 tubelens 后又变成平行光斑, 直径与物镜的通过孔径相匹配, 满足形成光镊的条件。捕获光将粒子俘获后同时能激发拉曼散射信号。散射信号沿原路导出显微镜之后透过二色镜 BS1, 再由透镜 L2 准直, 经两片边带滤色片 (edge filter) 将散射光中

激发波长的光过滤掉，之后经非球面透镜 L3 聚焦进入光谱仪狭缝，其宽度约为 $20\ \mu\text{m}$ 。狭缝的位置和捕获粒子平面形成共轭，这样可以将其他平面的散射光过滤掉，同时还能阻止外界杂散光进入，进而提高拉曼信号的信噪比。

拉曼光镊系统光路中主要元件及作用如下：

Raman spectrum: LS-785 拉曼光谱仪，实物照片见图 2.11，其内部构造前面已经介绍，其作用是：实时记录样品散射的拉曼信号，并通过数据线传入计算机存储，分析。

Edge filter: 边带滤波片 (LP01-780RU, 2 片), 0° 入射角，其透光率数据详见图 2.12a，透光区间为 790.1-1008nm。它的作用是：过滤样品散射出的 785nm 的瑞利散射光，透射大于 785nm 的拉曼散射光信号，单片滤波效率高达 OD6；

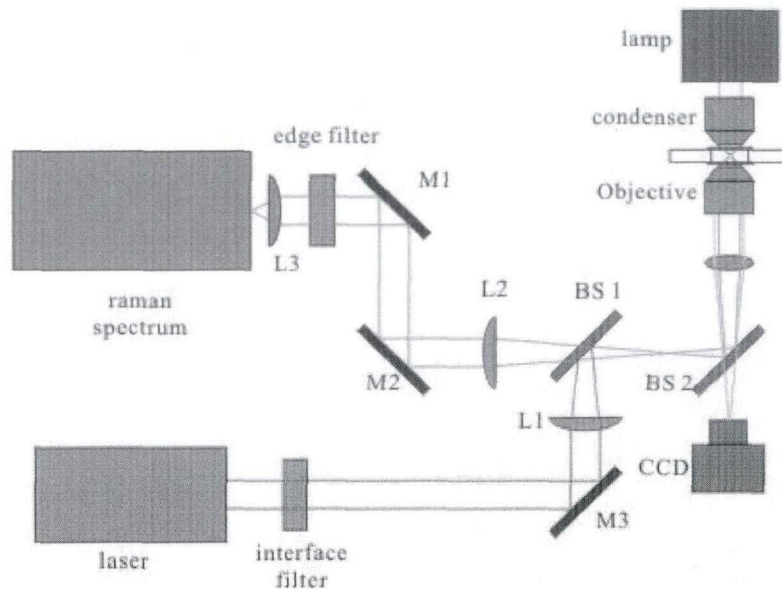


图 2.10 拉曼光镊系统光路示意图

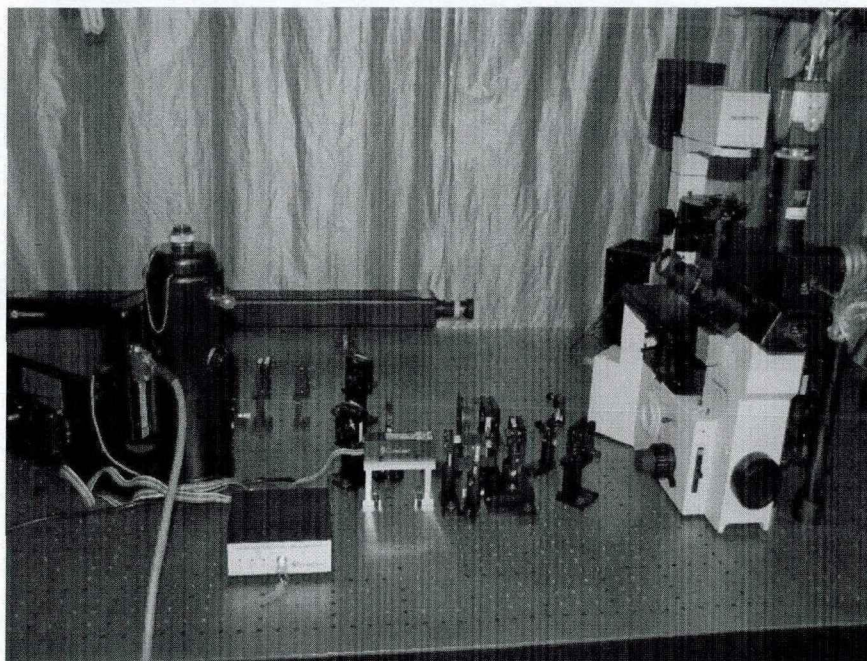


图 2.11 拉曼光镊系统的实物照片

Interface filter: 干涉滤波片 (LL01-780-12.5), 其透光率数据详见图 2.12b。
 它的作用是: 透过 785nm 的激发光, 过滤掉激光器发出的杂散波长的光。滤波效率: $OD > 5$, 609-772.2nm & 787.8-1201.8nm;

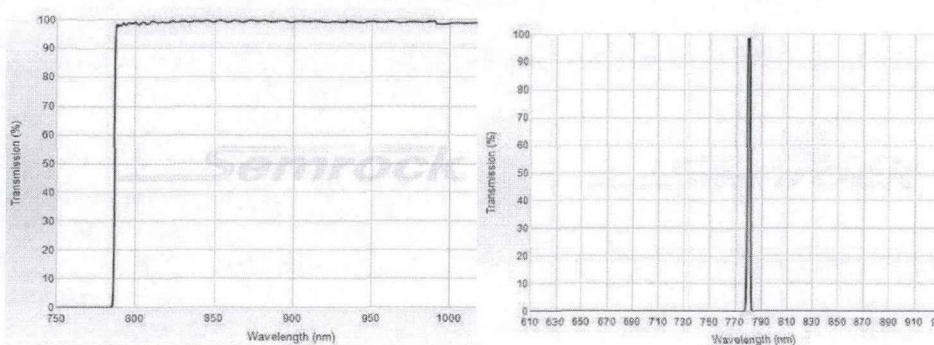


图 2.12 滤色片性能参数: a 高通滤波片 b 干涉滤波片

BS1: 分光镜 1, 45° 入射, 反射 785nm 激发光, 透射大于 785nm 的拉曼信号, BS2: 分光镜 2, 45° 入射, 反射 785nm 的激发光以及大于 780nm 的拉曼信号, 透射可见光用于 CCD 成像;

M1, M2, M3, M4: 镀银全反射镜, 45° 入射, 作用: 光路转折, 可以反射所有波长的信号;

L1, L2, L3, L4, L5 为光路耦合凸透镜。其中 L1 为阱位透镜, L4 为显微镜内的 tube lens (管镜), $f_1=175\text{mm}$, $f_2=180\text{mm}$ 。L1, L4 共焦。L2 为拉曼信号准直透镜, 因为拉曼信号收集光路光程长, 另外经过管镜的拉曼光为发散光, 需要准直才能达到所需的光斑尺寸。L3 为收集拉曼信号的非球面透镜, 将拉曼信号聚焦到狭缝进入光谱仪, $f_3=30\text{mm}$ 。L3 的 F 数为 2.0, 与光谱仪 LS-785 内部透镜组的 f 数相匹配。

2.3 拉曼光镊系统使用说明及数据处理方法

2.3.1 系统操作说明

实验开始操作步骤:

1 开机前检查光谱仪控制电源打开, 根据实验所需时间加入足够的液氮。实验中如果探测器显示温度升高, 应该及时添加液氮;

2 打开激光器 (先开启激光器后面板电源, 然后转动前面板钥匙使激光器出光), 调到指定功率, 待激光功率稳定后, 再开始后续试验;

3 打开显微镜的照明电源, 将照明光调到合适亮度, 打开 CCD 电源, 打开 CCD 软件, 监控样品成像;

4 打开压电平台电源, 打开压电平台软件 (PI2.1) 面板, 在三个坐标选框前打钩锁定样品位置, A, B 方向调到 50, C 方向调到 10;

5 组装样品池, 配置实验样品, 物镜滴油, 样品池放到载物台上, 显微物镜调焦使样品成像清晰;

6 通过压电平台移动样品池, 使粒子靠近光阱中心, 直到被光阱捕获;

7 打开拉曼光谱仪自带的 winspec 软件界面, 观看 setup->detect 菜单, 等待 CCD 的温度下降到 -120°C 时, 关闭显微镜照明光以及房间灯光采集光谱;

8 根据样品的拉曼光谱强度设置采样时间, 如果需要观察动态过程, 可以使用连续采集模式。

实验结束操作步骤:

1 关闭光谱仪软件, 控制器电源不可关闭(当冷却 CCD 的杜瓦瓶内含液氮时, 关闭控制器电源会造成光谱仪的 CCD 损坏);

2 将压电平台软件的三个坐标前的勾去掉, 关闭压电软件(PI2.1), 关闭压电平台电源;

3 关闭 CCD 软件, 断开 CCD 电源;

4 将照明光亮度调到最低, 关闭显微镜照明电源;

5 清洗样品池, 用棉签蘸酒精包着擦镜纸清洗物镜上的物镜油。

注意事项:

1 拉曼光谱仪加液氮前确认控制器电源连接好, 防止 CCD 在断电情况下冷却而发生损坏;

2 等待光谱仪 CCD 温度降到 -120°C 时, 关闭房间照明再开始测光谱。

3 长时间不使用光谱仪时, 可以关闭光谱仪控制器的电源。

4 实验开始前应该先使用硅片的 520cm^{-1} 拉曼峰校正相对波数。如果样品中有已知相对波数的拉曼峰作内标更好。

5 对于有荧光的样品需要先照射一段时间, 将荧光漂白后再进行拉曼探测。拉曼信号微弱时, 可以通过延长积分时间来增强。

2.3.2 拉曼散射光谱数据的处理方法

分析拉曼光谱的目的是探测样品的成分、分子取向、结晶态以及应力和应变状态变化等信息, 这些信息体现在拉曼光谱的各个拉曼峰的强度、宽度、面积、位置(频移)中。光谱分析通常包括 3 个部分: 确定含有待测样品成分的光谱; 从光谱噪声中分离出来有用的拉曼信号; 确立拉曼信号与试样信息间相关的数学关系或化学计量关系。

由于拉曼光谱的强度与相应样品分子浓度成正比, 它也可以用于样品含量的定量分析, 故拉曼光谱的分析内容分为两种: 1 定性分析, 因为不同的物质具有

不同的特征光谱频移，故可以通过光谱进行定性分析。拉曼光谱的定性测量能提供有关样品中振动谱带的准确光谱信息；2 定量分析，其基础是测得的分析物拉曼峰强与分析物浓度间有线性比例关系。影响拉曼峰面积和峰高度的因素不仅分析样品的浓度，还有其他因素。所以几乎所有拉曼定量分析方法，在建立标定曲线之前都使用某种类型的内标。

在拉曼光谱测定过程中，由于拉曼信号的强度很微弱，设备本身和实验人员操作技术熟练程度不足等原因，噪音的产生在采集光谱信号时难以避免，噪音中不含有用信息，因而对我们分析有用的信息会产生干扰。噪声通常分为三种情况：第一种是无规的，它和采用的测量技术以及外界环境的影响有关，即多次测量将拉曼光谱叠加取平均值时，噪音不会产生线性增加，可以通过多次重复测量来提高信噪比；第二种是规则的，随着测量次数的增加，噪音也随之增加；第三种是两者的结合，也是无规律的，同时也不是按常量变化的。实验中常用信号平滑的方法来消除随机噪音，提高信噪比，也是对光谱数据进一步分析的预处理方法。平滑处理的常用算法有：窗口移动多项式最小二乘拟合、窗口移动中位数、快速傅里叶变换、惩罚加权最小二乘法、小波系数收缩等[2]。

拉曼光谱中不同的物质具有不同的特征光谱，通过利用化学计量学方法对光谱数据进行处理和分析，可以获得很多有用的信息。有些样本得到的拉曼图谱有荧光背景，会使有效信号被淹没或变差，造成信噪比较低，难以得到很好的分析结果。所以，对拉曼光谱进行荧光背景扣除是很有必要的。目前背景扣除有两个途径：第一种是通过改进实验仪器性能或改善实验操作条件，比如更换光源，使用长波长的激发波长，可以降低其荧光背景，或者针对不同样本采用不同的实验条件等，但改进仪器构造成本太高，而且改变实验条件的方法也不通用；第二种是利用化学计量学算法来将拉曼荧光背景扣除。常用的荧光背景扣除算法包括：多项式曲线拟合方法 (Polynomial Curve-Fitting)，修正多项式拟合方法 (Modified Polynomial Fitting)，自适应拟合方法，Baseline Wavelet 算法，滚环滤波法 (Rolling circle filter)，自动背景扣除方法等。

2.4 本章小结

拉曼光镊系统将光镊与拉曼光谱探测有机结合在一起,既具有显微观察,捕获操纵的功能又具有拉曼光谱探测的功能。它适用于液相中悬浮粒子的拉曼探测,样品远离样品池表面,可以减少波片表面产生的杂散荧光信号,光镊捕获还能有效避免布朗运动对拉曼长期探测的干扰。这一章中我们介绍了拉曼光镊系统的基本原理,硬件参数,设计方案,使用方法,以及数据处理等内容,这为我们以后应用本系统的实验打下了很好的基础。

参考文献

1. 许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用 [M]. 1 ed.: 化学工业出版社, 2005.
2. 程光煦. 拉曼 布里渊散射 [M]. 2 ed.: 科学出版社, 2008.
3. Torimitsu K. Applications of raman spectroscopy in biology : from basic studies to disease diagnosis [M]. Washington, DC: IOS Press, 2012.
4. H.Niemz M. Laser-Tissue Interactions [M]. 西安: 西安交通大学出版社, 1998.
5. Brunner H. Resonance Raman scattering on the haem group of cytochrome c [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1973, 51(4): 888-894.
6. Bhaskaram K, Murthy A S, Raman K V. Agriculture in Andhra Pradesh [M]. Hyderabad: Farmers' Welfare Trust and Society of Scientists for Advancement of Agriculture, 1982.
7. Ashkin A, Dziedzic J. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria [J]. Science, 1987, 235(4795): 1517-1520.
8. Ashkin A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime [J]. Methods in Cell Biology, Vol 55, 1998, 55(1-27).
9. Nieminen T A, Knoner G, Heckenberg N R, et al. Physics of optical tweezers [J]. Laser Manipulation of Cells and Tissues, 2007, 82(207-236).

10. Pfeifer R N C, Nieminen T A, Heckenberg N R, et al. Optical tweezers and paradoxes in electromagnetism [J]. *Journal of Optics*, 2011, 13(4):
11. Ashkin A, Schutze K, Dziedzic J M, et al. Force Generation of Organelle Transport Measured In vivo by an Infrared-Laser Trap [J]. *Nature*, 1990, 348(6299): 346-348.
12. Stilgoe A B, Nieminen T A, Knoner G, et al. The effect of Mie resonances on trapping in optical tweezers [J]. *Optics Express*, 2008, 16(19): 15039-15051.
13. Shima K, Omori R, Suzuki A. Forces of a single-beam gradient-force optical trap on dielectric spheroidal particles in the geometric-optics regime [J]. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1- Regular Papers Short Notes & Review Papers*, 1998, 37(11): 6012-6015.
14. Bui A A M, Stilgoe A B, Nieminen T A, et al. Calibration of nonspherical particles in optical tweezers using only position measurement [J]. *Optics Letters*, 2013, 38(8): 1244-1246.
15. Simmons R M, Finer J T, Chu S, et al. Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap [J]. *Biophysical Journal*, 1996, 70(4): 1813-1822.
16. Ghislain L P, Webb W W. Scanning-force microscope based on an optical trap [J]. *Optics Letters*, 1993, 18(19): 1678-1680.
17. Thammawongsa N, Zainol F D, Mitatha S, et al. Nanorobot Controlled by Optical Tweezer Spin for Microsurgical Use [J]. *Ieee Transactions on Nanotechnology*, 2013, 12(1): 29-34.
18. Vermeulen K C, Wuite G J, Stienen G J, et al. Optical trap stiffness in the presence and absence of spherical aberrations [J]. *Applied optics*, 2006, 45(8): 1812-1819.

第三章 拉曼光谱探测交联偶氮囊泡光致伸缩膨胀

3.1 引言

聚合物囊泡是一种在水溶液中组装形成的空心膜结构。对于小的外界刺激，他们可以产生可控的响应，比如形变，聚集形式转变，或者破裂[1, 2]。这个特性跟囊泡的化学组成以及膜上分子的聚集状态有关[3]。这种人工膜和天然存在的细胞膜非常接近，可以用来做各种化学反应的载体[4-7]。

含有偶氮苯基团的聚合物囊泡是一种典型的具有光响应特性的囊泡结构，它可以被特定波长的光子激发。最近，Zhao Yue 课题组在观察两嵌段共聚分子组装的囊泡光性质时，发现一个光致软化效应[8]。他们合成了两种嵌段共聚物：亲水段为聚 N, N-二甲基丙烯酰胺(PDMA)或聚丙烯酸(PAA)，疏水段为含有偶氮苯基团的侧链液晶聚合物 P(BiPA-co-Azo)，并将它们组装成囊泡结构。通过加入荧光探针 HPTS 观察，他们发现囊泡膜内的共聚物分子可在紫外光照下由液晶有序相聚集状态 (Lo, Liquid Crystal order) 转变为液晶无序相 (Ld, Liquid Crystal disorder) 聚集状态，如下图 3.1 所示。打开可见光后，分子又重新恢复成液晶有序相的聚集态。这种光软化转变，可以增加质子在囊泡膜内外两侧的扩散速率，这和不良溶剂的作用相似，从而使光控药物释放应用变得可能[9]。

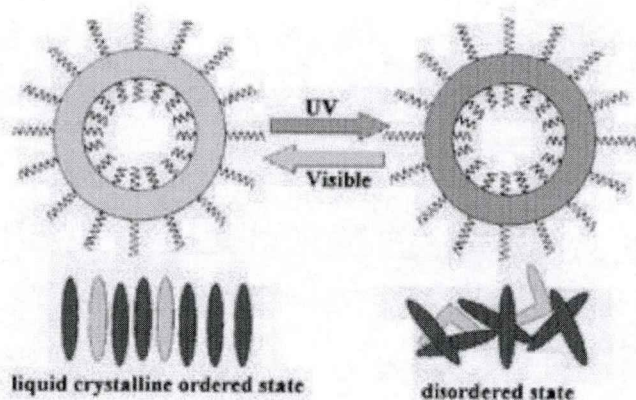


图 3.1 光敏型聚合物囊泡膜内分子液晶相有序态-无序态转变示意图

韩阔等利用 PNIPAM-b-PAzPy6 组装囊泡[10]，发现由于偶氮基团为偶氮吡啶，其中的吡啶环和氨基的相互作用导致囊泡在紫外光照时，表现出伸缩膨胀现象，如下图 3.2 所示。这种现象被认为是由于偶氮基团的顺反异构改变了，囊泡壁内分子产生了轻微交联作用。

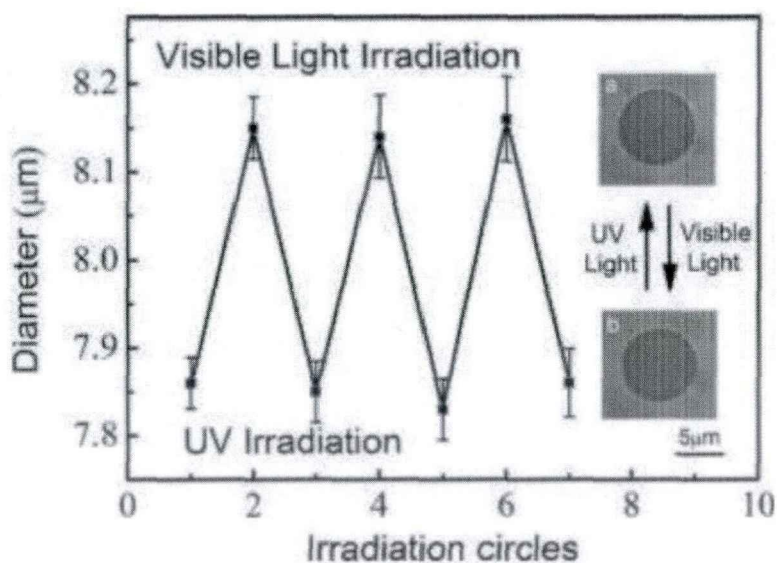


图 3.2 偶氮吡啶囊泡的光致伸缩膨胀

在前面的很多研究中发现交联作用是一种能够增强组装体（胶束，球壳等）硬度的效应[11]，可以提高组装体的稳定性，以及对有机溶剂的耐受性等[12]。对于 P(DMAEMA-co-CMA)-b-PNIPAM 组装的聚合物囊泡，在温度变化时，可以产生快速可逆的，大比率的体积变化，而表面形貌不发生变化。当表面分子被交联之后，在温度发生变化时，疏水的囊泡膜向亲水方向转变，从而聚合物分子链与水结合能力增强，变得更加舒展。这会使得囊泡膜的表面积增加，水分子更加容易进入囊泡内部，从而使囊泡体积增大。

上述这些工作通过改变温度及 PH[13]等手段，观察自组装刺激响应行为，从而得到囊泡膜的硬度变化。很有必要发展一种实时的观察单个囊泡刺激响应行为的方法，同时可以分析囊泡变化的分子机制。拉曼光镊系统就可以实现这一点。

众所周知，拉曼光谱是一种分子振动光谱，它具有不需标记，无接触损伤，样品用量少和实时测量的优点，可以给出分子变化的实时定量信息。拉曼光镊将拉曼光谱探测与光镊捕获结合在一起，可以长时间实时探测单个微米粒子的光谱，并且不会受到玻片表面的干扰，已经广泛应用于单个挤出粒子的聚合效应[14]，聚苯乙烯小球的光致结合[15]，水中的单个有机液滴化学反应[16]等研究。

本章主要工作在于：使用拉曼光镊系统探测交联偶氮囊泡在紫外光致伸缩膨胀过程中，囊泡膜中偶氮基团顺反异构速率以及最终异构度的变化。实验中使用的是表面加入交联剂 DBP (1,3 二溴丙烷) 的偶氮囊泡。我们制备了不同交联度的偶氮囊泡，分析了囊泡形貌变化与膜交联度大小以及偶氮基团异构度之间的相互关系。通过 LTRS 测量分析，我们得到如下结果：偶氮基团的顺反异构可以触发 PNIPAM-*b*-PAzPy6 囊泡的伸缩膨胀，而表面分子的交联对这个变化过程起阻碍作用。

3.2 材料和方法

3.2.1 偶氮吡啶共聚物 PNIPAM-*b*-PAzPy6 的合成

偶氮吡啶单体的合成依据的是 Zhao Yue 组的工作[8]。偶氮吡啶聚合物合成所用的试剂：THF 经过钠盐回流以及蒸馏纯化处理；triethylamine 在氢氧化钾中回流以及蒸馏；AIBN (R,R'-Azobis(isobutyronitrile)) 从酒精中重结晶后低温保存；4-(decyloxy)benzoic acid 依据 Pople J. A 提供的流程处理[17]；其它试剂均没有做预处理。偶氮吡啶聚合物合成流程如图 3.3 所示。

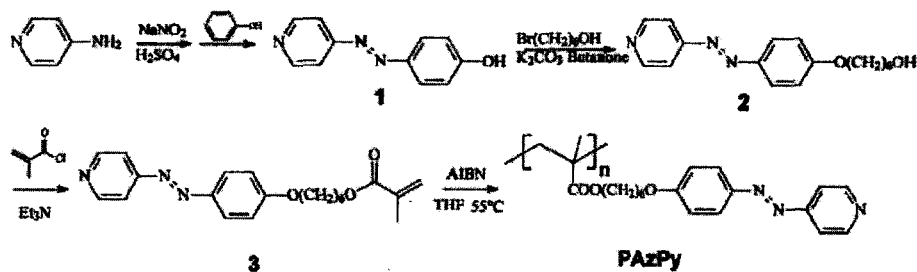


图 3.3 偶氮吡啶聚合物合成流程图

3.2.2 交联偶氮囊泡的制备

将合成的二嵌段共聚物 PNIPAM-b-PAzPy6 溶解在四氢呋喃中，初始浓度 2.0mg/mL，同时在溶液中加入一定量的 1,3 二溴丙烷，使聚合物分子中的吡啶基团和溴原子相结合，得到相应的交联度。在上述混合物中缓慢滴加超纯水同时慢慢摇动溶液。直到水所占比例达到 50% (v/v)。这过程中溶液逐渐变得浑浊，即组装出现囊泡。将混合物静置 72 小时，直到组装体系达到平衡状态。此过程温度一直维持在 30 摄氏度。组装过程示意图如图 3.4 所示。

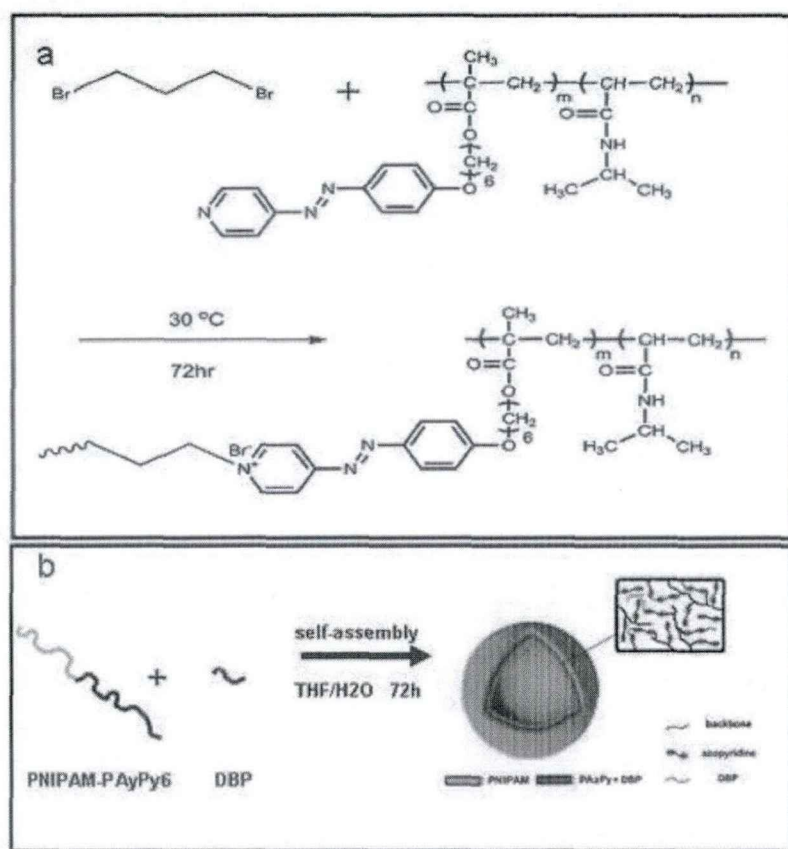


图 3.4 交联囊泡制备过程及囊泡表面结构示意图

利用红外数据可以定量标定加入交联剂 DBP 的偶氮囊泡的交联度。我们使用如下公式计算囊泡的交联度：[18]

$$\text{Degree of crosslinking} = 1 - \frac{I_{P2} \times I_{B1}}{I_{P1} \times I_{B2}} \quad (3.1)$$

其中： I_{P1} 为吡啶环在未交联之前的红外信号强度， I_{P2} 为交联之后吡啶环产生的红外信号峰强度； I_{B1} 为苯环在未交联之前的红外信号强度， I_{B2} 为交联后苯环的红外信号强度。

3.3 实验结果及讨论

3.3.1 PNIPAM-b-PAzPy6 囊泡膜内的交联反应

交联反应是一种常用的方法用来使囊泡结构长时间稳定存在[19]，它具有操作简单的优点。通过控制膜内分子的交联程度，可以调制囊泡膜的硬度[20]。在我们组前面的实验中发现[10, 21]：在紫外光以及可见光交替照射下，PNIPAM-b-PAzPy6 组装的囊泡可以发生伸缩膨胀变化。我们猜想这个变形是由聚合物分子中的偶氮基团的顺反异构以及偶氮吡啶基团和极性基团弱的相互作用引起的。很明显，交联作用可以增强膜内分子作用强度，囊泡膜的伸缩膨胀变形应该也会受到影响。通过这个过程可以定量的研究囊泡伸缩膨胀的机理。我们使用 DBP（1, 3 二溴丙烷）作为囊泡表面分子的交联剂。交联反应所需时间较长，通常需要 72 小时才能反应完全，交联反应示意图见图 3. 4a。聚合物分子的交联度可以用添加交联剂的比率来控制。

PNIPAM-b-PAzPy6 分子内的偶氮吡啶基团和 DBP 反应可以生成季铵盐，因为 DBP 分子两端各有一个溴原子可以被取代，可以和两个偶氮吡啶基团结合，因此能将聚合物分子络合在一起，形成交联的囊泡膜，如图 3. 4b 所示。具体的实验操作过程在实验部分已经描述。通过红外测试，可以很容易确定聚合物分子交联度定量数值。由图 3. 5 可以看出：交联反应完成后， 1584cm^{-1} 处的吡啶环伸缩振动峰变弱，这表明吡啶环的伸缩受到限制；然而 1600cm^{-1} 处的苯环伸缩振动峰没有变化，这表明偶氮基团内的苯环部位不会被交联作用影响[22]。根据这两个特

征峰的改变状态，我们可以用实验部分所提到的公式 3.1，定量计算出偶氮吡啶聚合物分子的交联度。

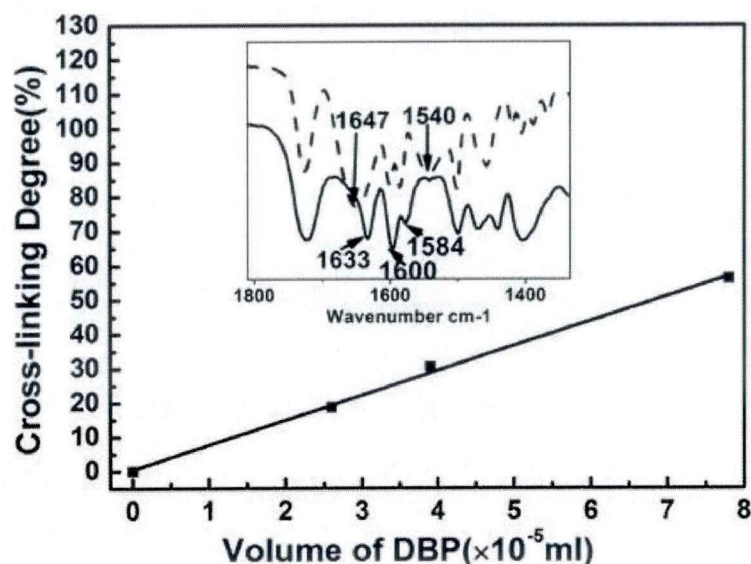


图 3.5 交联度与聚合物分子和交联剂 DBP 质量比例的关系

图注: PNIPAM-b-PAzPy6 溶解在 THF 中的 FTIR 谱 (虚线) 以及交联后的 PNIPAM-b-PAzPy6 分子的 FTIR 谱 (实线)。观察范围 $1325-1810\text{cm}^{-1}$

我们分别将不同剂量的 DBP ($7.8 \times 10^{-5}\text{mL}$, $3.9 \times 10^{-5}\text{mL}$, $2.6 \times 10^{-5}\text{mL}$) 加入 1mL 浓度为 2.0mg/mL 溶有 PNIPAM-b-PAzPy6 的四氢呋喃溶液中。经推算理论上我们可以得到三种不同的交联度 (100%, 50%, 33%) 的聚合物溶液。

自组装形成囊泡之后，静置 72 小时，即可得到不同交联度的偶氮囊泡。我们测定了该体系 IR 谱。以 1602cm^{-1} 苯环伸缩振动峰为内标，依据公式 3.1，我们计算得到三种样品的交联度: 56.3%, 30.5%, 18.7%。理论值和测量值的差别可能来源于只有一部分的 DBP 分子被包裹进入囊泡膜，另一部分在溶液中没有参与组装过程。

3.3.2 交联效应对囊泡光致伸缩膨胀变化的影响

当囊泡表面分子被交联剂络合在一起的时候,囊泡膜的化学结构以及表面形貌会发生相应的改变。我们在囊泡表面引入交联剂主要是为了使囊泡结构更加稳定[22, 23]。对于交联度为 18.7%的囊泡,在紫外光照下体积会发生 3-4%的增加,这比没有交联的囊泡变化率 13%要小很多。当紫外灯关闭后,囊泡的体积迅速恢复到原来大小。当交联度进一步增大后,囊泡的体积变化率会进一步降低,我们测量了 3 种交联度的囊泡以及未交联的偶氮囊泡在 $100\text{mW}/\text{cm}^2$ 紫外光照下的体积变化率,交联度大小与体积变化率的关系见图 3.6。由图 3.6 可以看出:囊泡的交联度为 18.7%还有比较明显的光致伸缩膨胀行为,当交联度进一步增加时,囊泡变得僵硬,难以发生上述过程。另外对于 18.7%的囊泡体积膨胀在 0.82s 时间内可达到平衡,而没有交联的囊泡的体积变化达到平衡的时间较短,为 0.66s。上述结果表明:交联过后的偶氮囊泡比没有交联的囊泡更“硬”,从而囊泡的体积变化更加困难。这给我们一个契机来进一步研究这个过程的分子反应机理,以及它与偶氮基团光致顺反异构的关系。

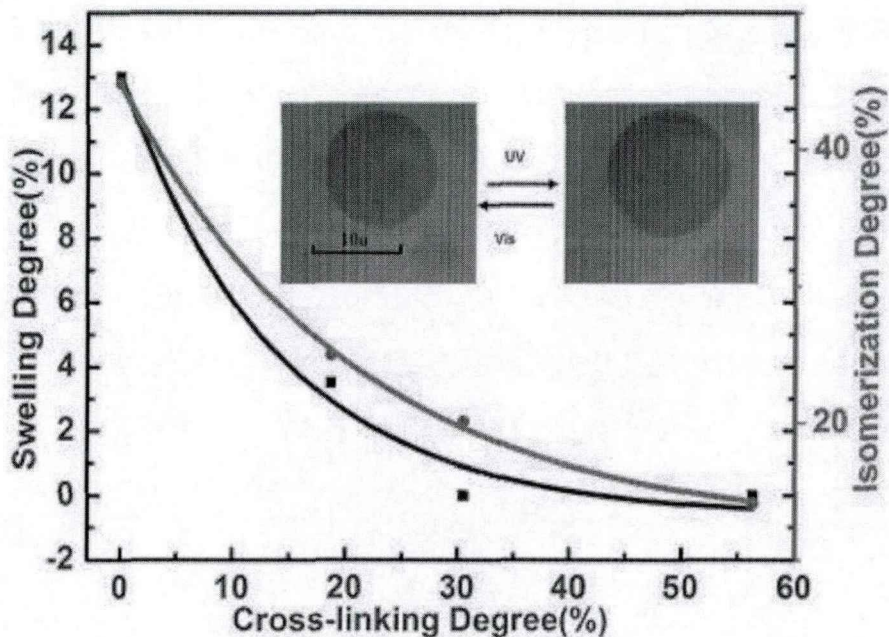


图 3.6 偶氮囊泡光致体积变化率与交联度的关系以及光致反-顺异构与交联度的关系

图注：紫外光功率密度为 $100\text{mW}/\text{cm}^2$ 。

我们猜想光致顺反异构被认为是囊泡体积伸缩膨胀的原因，UV-visible 实验是验证这个猜想的一个简单易行的方法。当囊泡经过功率为 $5\text{mW}/\text{cm}^2$ 的 365nm 紫外光照射 5 分钟后，不同交联度的囊泡体系表现出不同强度的反式偶氮苯吸收峰 (365nm)。根据邓永红等报导的文献[24]提出的计算方法，利用 UV-visible 数据，可以定量的推算出偶氮基团的异构度。所用的计算公式为：

$$\text{isomerization degree} = \frac{A_{\text{origin}} - A_s}{A_{\text{origin}}} \quad (3.2)$$

其中为紫外光照前囊泡样品在波长为 365nm 处的吸收系数，为样品在光照后稳定状态下 365nm 处的吸收系数。

经分析计算，我们得到没有交联的囊泡异构度为 44.8% ，而交联度为 18.7% 囊泡异构度为 25% ，交联度为 30.5% 囊泡异构度为 20.1% ，交联度为 56.3% 囊泡的异构度为 14.1% 。由以上分析可以看出：囊泡的异构度与交联度之间存在反比例关系，即光致顺反异构是导致囊泡伸缩膨胀的另一个影响因子。同时由图 3.6 可以看出：交联反应与伸缩膨胀比率和异构度大小同时成反比例关系，即囊泡膜的伸缩膨胀比率与囊泡偶氮基团的异构度成正比。考虑到使用紫外可见光光度计测试样品是对囊泡溶液整体测量以及从 300nm – 700nm 扫描一次所用时间长达 1 分钟，而且测试过程中需要用紫外光和可见光先后照射囊泡样品，这会影响到囊泡的异构。为了进一步确定偶氮异构在伸缩膨胀过程所起的作用，我们发展了一种可以实时快速测量偶氮光致异构的方法：使用拉曼光镊系统将单个偶氮囊泡束缚在光阱中，实时长时间测量偶氮囊泡光致形变过程中的拉曼振动光谱。所用激发光波长为 785nm 位于近红外区，不会对偶氮分子的异构产生干扰。

3.3.3 拉曼光镊系统实时测量交联偶氮囊泡的伸缩膨胀过程

拉曼光镊系统将拉曼光谱探测以及光镊捕获有机结合起来,可以长时间稳定的测量单个囊泡在整个变化过程中的拉曼振动谱。这个方法采用共焦成像,其优势在于提高目标区域的信号采集效率,区域之外的信号不能进入光谱仪,从而系统提高信噪比,同时采用液氮制冷的 CCD 采集拉曼信号可以降低热噪声,可以探测到很弱的拉曼信号。另外光镊捕获囊泡之后还能将其搬运到囊泡较少的区域,降低其他囊泡的干扰。

本次实验我们利用拉曼光镊来实时探测偶氮囊泡伸缩膨胀过程中的拉曼信号变化,从而反映囊泡膜内分子的结构变化,解释两者之间的关系。偶氮囊泡的伸缩膨胀在 1s 之内就可以完成。LTRS 采集到的不同交联度偶氮囊泡在紫外光照下拉曼信号的变化见图 3.7。该图显示的是紫外光照射 4s 时间内,每秒一次采集到的拉曼信号。各个拉曼峰的归属[25]分别为:反式偶氮异构体包括 1140cm^{-1} (CNazo 伸展), 1417cm^{-1} (NN 伸展), 1452cm^{-1} (CNC 伸展), 小峰 990cm^{-1} , 1320cm^{-1} 以及 1593cm^{-1} 均为 CC 伸展振动;顺式偶氮异构体产生的拉曼峰[26]归属包括: 597cm^{-1} (CNNC 扭曲), 1488cm^{-1} (NN 伸展)。当紫外光打开时,反式偶氮拉曼峰强度都减少,只有 THF 的拉曼峰强度不发生改变,因此可以用作内标峰。同时 597cm^{-1} 和 1488cm^{-1} 处的顺式拉曼峰强度增大,表明偶氮基团发生了反式-顺式的异构转变。 1452cm^{-1} 处的拉曼峰对应于吡啶环的 CNC 伸展,其强度也降低。出乎意料的是红外分析中出现对应于交联反应的峰在拉曼探测中没有出现。另外,当紫外光关闭后,囊泡体积在 2s 时间内恢复成初始大小。囊泡的拉曼信号在同样长的时间恢复成紫外光照射之前的强度分布。在这种条件下,我们使用反式偶氮 1417cm^{-1} 处的拉曼峰的强度,在紫外灯打开后时间的变化来反映偶氮吡啶基团的异构过程。具体分析结果见图 3.8。由图 3.8 我们可以看出:当囊泡的光致伸缩膨胀在 1s 时间达到平衡时,膜内偶氮苯基团的反-顺异构转化还没有到达平衡状态,即异构过程还在进行,而伸缩膨胀过程停止了。由此我们

推断偶氮苯基团的反式-顺式异构只是囊泡伸缩膨胀的触发因素，这和之前关于异构跟伸缩膨胀同步进行的推断不太一致。

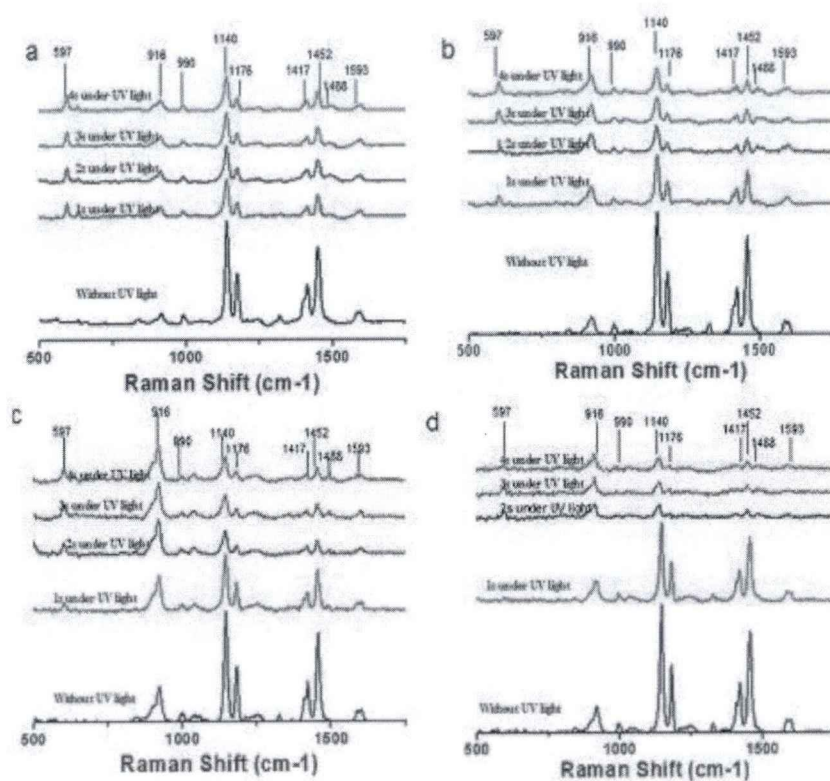


图 3.7 LTRS 采集不同交联度的单个囊泡在紫外光照下，其拉曼信号随时间的变化

图注：a 交联度 0% b 交联度 18.7% c 交联度 30.5% d 交联度 56.3%。

由图 3.8 可知，囊泡的伸缩膨胀比率一般随着交联度的增加而减少，这是由于囊泡膜的硬度增加导致的。值得注意的是：囊泡膜的硬度增加是如何影响膜内偶氮苯基团的顺反异构的。图 3.11 的插图中的曲线表示不同时间（光照 1s 时和达到平衡时）偶氮异构度和交联度的相互关系。异构度是由图 3.10 的拉曼数据的 1417cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}$) 处峰强，经过计算得到。具体计算公式[27]为：

$$\text{Degree of isomerization} = \frac{I_{\text{origin}} - I_t}{I_{\text{origin}}} \quad (3.3)$$

很明显两个时间内交联度对异构度的影响不一样：开始 1s 时异构度随交联度增加而快速增加，当达到平衡状态时，异构度随着交联度的增加几乎没有变化。

囊泡在变化过程刚开始时交联确实影响到偶氮苯基团的顺反异构。而达到平衡时，最终的异构度几乎不受交联度影响。需要指出的是：这个结果与图 3.8 中根据紫外可见光光度计得到的结果不一样。这说明拉曼光镊系统可以对上述过程进行更精确的探测分析，因为采样时间更短，只有 1s。尽管还存在很多不确定的因素影响偶氮苯基团最终的异构程度，但该方法的确为研究囊泡变化过程提供了一个更精确的探测工具。

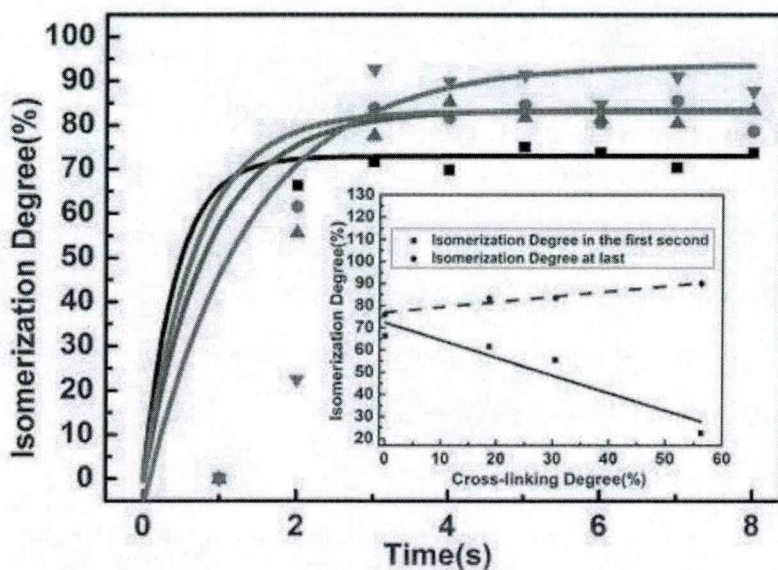


图 3.8 不同交联度的单个偶氮囊泡膜内偶氮苯基团反-顺异构度随 365nm 紫外光照射时间的变化

图注：■表示交联度为 0%；●表示交联度为 18.7%；▲表示交联度为 30.5%；▼表示交联度为 56.3%。插图：异构度在不同时间的变化趋势与交联度的关系，其中●表示平衡后最终的异构度；■表示光照 1s 后异构度的变化。

3.4 本章小结

在这一章中，我们合成了嵌段共聚物 PNIPAM-b-PAzPy6。并利用该聚合物组装了囊泡，在组装过程中加入不同剂量的交联剂 DBP (1,3 二溴丙烷)，使它进入囊泡膜内，通过交联剂与偶氮聚合物的交联反应，囊泡表面分子不同程度地结合在一起，即偶氮囊泡拥有不同的交联度。之后利用拉曼光镊系统测量了交联囊泡

的光致伸缩膨胀过程。红外光谱数据表明囊泡表面的交联过程确实存在,并且可以通过交联剂 DBP 的加入量进行控制。具有 18.7%交联度的囊泡可以发生伸缩膨胀,而更高的交联度使囊泡的伸缩膨胀现象消失。通过拉曼光谱数据分析,我们发现偶氮苯基团的顺反异构的反应时间长于囊泡伸缩膨胀达到平衡所需的时间,即前者只是后者的触发因子,而膜内聚合物分子的交联会阻碍这一过程,即偶氮囊泡膜的硬度发生改变。由于还有一些不确定的影响偶氮苯异构过程的因素存在,囊泡变形在分子层面的反应机理还有待进一步的实验进行探索。

参考文献

1. Ran X, Wang H T, Zhang P, et al. Photo-induced fiber-vesicle morphological change in an organogel based on an azophenyl hydrazide derivative [J]. *Soft Matter*, 2011, 7(18): 8561-8566.
2. Lin Y L, Chang H Y, Sheng Y J, et al. Photoresponsive Polymersomes Formed by Amphiphilic Linear-Dendritic Block Copolymers: Generation-Dependent Aggregation Behavior [J]. *Macromolecules*, 2012, 45(17): 7143-7156.
3. Broz P, Ben-Haim N, Grzelakowski M, et al. Inhibition of macrophage phagocytotic activity by a receptor-targeted polymer vesicle-based drug delivery formulation of pravastatin [J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2008, 51(3): 246-252.
4. Zhu H S, Geng Q R, Chen W Q, et al. Antibacterial high-genus polymer vesicle as an "armed" drug carrier [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1(40): 5496-5504.
5. Kodger T E, Lynch M L, Weaver M R. Dynamics of polymer-induced gel formation in vesicle mixtures. [J]. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 2005, 229(U661-U661).
6. Caria A, Regev O, Khan A. Surfactant-polymer interactions: Phase diagram and fusion of vesicle in the didodecyldimethylammonium bromide-poly(ethyleneoxide)-water system [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998, 200(1): 19-30.
7. Stauch O, Uhlmann T, Frohlich M, et al. Mimicking a cytoskeleton by coupling poly(N-isopropylacrylamide) to the inner leaflet of liposomal membranes: Effects of photopolymerization on vesicle shape and polymer architecture [J]. *Biomacromolecules*, 2002, 3(2): 324-332.

8. Yan B, Tong X, Ayotte P, et al. Light-responsive block copolymer vesicles based on a photo-softening effect [J]. *Soft Matter*, 2011, 7(21): 10001-10009.
9. Xiao W j, Guo K k. Shapes of vesicle encapsulating two aqueous phases [J]. *Soft Matter*, 2013,
10. Han K, Su W, Zhong M, et al. Reversible Photocontrolled Swelling - Shrinking Behavior of Micron Vesicles Self - Assembled from Azopyridine - Containing Diblock Copolymer [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2008, 29(23): 1866-1870.
11. Du J, O'Reilly R K. Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles [J]. *Soft Matter*, 2009, 5(19): 3544-3561.
12. Yan B, Han D, Boissière O, et al. Manipulation of block copolymer vesicles using CO₂: dissociation or “breathing” [J]. *Soft Matter*, 2013, 9(6): 2011-2016.
13. Yin Y, Xu S, Chang D, et al. One-pot synthesis of biopolymeric hollow nanospheres by photocrosslinking [J]. *Chem Commun*, 2009, 46(43): 8222-8224.
14. Haro M, Ross D J, Oriol L, et al. Spectroscopic characterization and Langmuir-Blodgett films of a novel azopolymer material [J]. *Langmuir*, 2007, 23(4): 1804-1809.
15. Eastoe J, Dominguez M S, Wyatt P, et al. Properties of a stilbene-containing gemini photosurfactant: Light-triggered changes in surface tension and aggregation [J]. *Langmuir*, 2002, 18(21): 7837-7844.
16. Mansfeld F M, Feng G Q, Otto S. Photo-induced molecular-recognition-mediated adhesion of giant vesicles [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, 7(20): 4289-4295.
17. Lacey D, Beattie H, Mitchell G, et al. Orientation effects in monodomain nematic liquid crystalline polysiloxane elastomers [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 1998, 8(1): 53-60.
18. Li Y, Lokitz B S, McCormick C L. Thermally responsive vesicles and their structural “locking” through polyelectrolyte complex formation [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45(35): 5792-5795.
19. Du J, Tang Y, Lewis A L, et al. pH-sensitive vesicles based on a biocompatible zwitterionic diblock copolymer [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(51): 17982-17983.
20. Nardin C, Hirt T, Leukel J, et al. Polymerized ABA triblock copolymer vesicles [J]. *Langmuir*, 2000, 16(3): 1035-1041.

21. Su W, Luo Y, Yan Q, et al. Photoinduced Fusion of Micro - Vesicles Self - Assembled from Azobenzene - Containing Amphiphilic Diblock Copolymers [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2007, 28(11): 1251-1256.
22. Moon J J, Suh H, Bershteyn A, et al. Interbilayer-crosslinked multilamellar vesicles as synthetic vaccines for potent humoral and cellular immune responses [J]. *Nature materials*, 2011, 10(3): 243-251.
23. Discher B M, Bermudez H, Hammer D A, et al. Cross-linked polymersome membranes: vesicles with broadly adjustable properties [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, 106(11): 2848-2854.
24. Klionsky D J, Abdalla F C, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. *Autophagy*, 2012, 8(4): 445-544.
25. Tawa K, Kamada K, Sakaguchi T, et al. Local environment dependence of photoinduced anisotropy observed in azo-dye-doped polymer films [J]. *Polymer*, 2000, 41(9): 3235-3242.
26. Marquestaut N, Martin A, Talaga D, et al. Raman Enhancement of Azobenzene Monolayers on Substrates Prepared by Langmuir-Blodgett Deposition and Electron-Beam Lithography Techniques [J]. *Langmuir*, 2008, 24(19): 11313-11321.
27. Su W, Luo Y H, Yan Q, et al. Photoinduced fusion of micro-vesicles self-assembled from azobenzene-containing amphiphilic diblock copolymers [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2007, 28(11): 1251-1256.

第四章 光致偶氮囊泡 Janus 与均匀结构的可逆转化

4.1 引言

众所周知两嵌段聚合物 (BCP) 的自组装可以形成多种可控的有序结构, 比如球形胶束, 微棒, 囊泡, 薄膜, 微管, 网状凝胶等[1], 见图 4.1。在这些有序结构中, 囊泡是一种在水溶液中形成, 并拥有空心结构以及疏水膜和亲水内外表面的球形结构[2]。最近几年, 拥有与细胞结构相似的人工膜结构—聚合物囊泡的研究吸引了大量科学家的注意, 并广泛引用于很多领域, 比如: 药物传输, 基因投递[3, 4], 生物诊断及成像等等[5-7]。

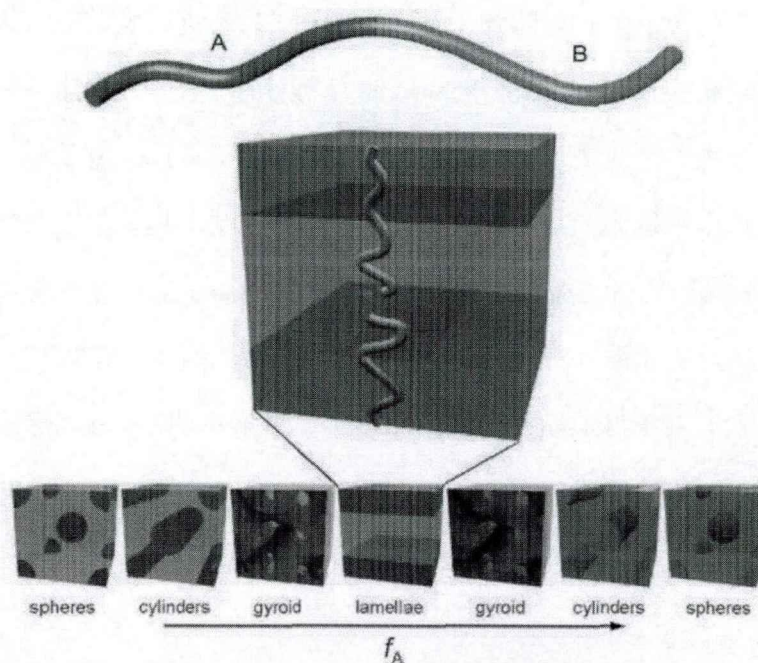


图 4.1 嵌段共聚物自组装的结构形貌

囊泡的形貌参数主要包括尺寸, 外形, 壁厚, 内含体积等。根据 Eisenberg 的理论观点[8], 有很多因素可以控制聚合物囊泡的形貌, 比如分子链长, 表面张力, 静电排斥强度, 溶液成分[9], 以及溶液中添加剂的使用(酸碱, 盐离子,

活性剂) [10], 水的体积比, 亲水链与疏水链的链长比[11-13]等。通过控制这些因素, 一些非常规的囊泡形貌已经被报道出来, 比如 Janus 囊泡, stomatocytes 囊泡, Kippah 囊泡, Spot 囊泡等[4, 9, 14-18], 见图 4.2。

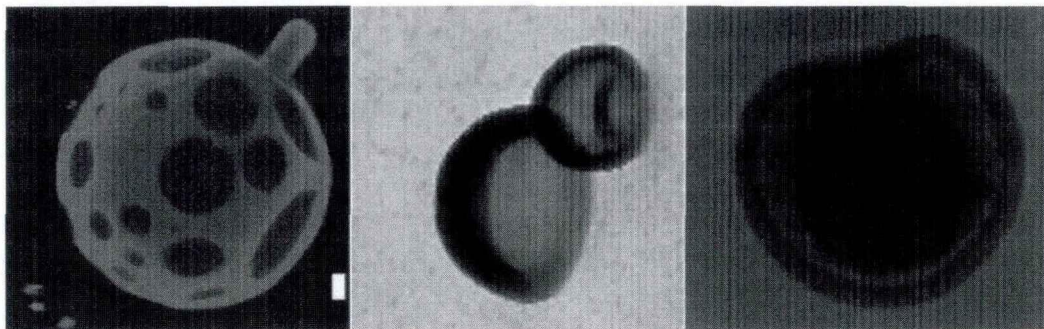


图 4.2 嵌段共聚物自组装形成的非常规形貌囊泡

图注: 左图: Spots 囊泡 中图: Kippah 囊泡 右图: Stomatocytes 囊泡

间隔基链 (spacer), 即亚甲基 ($-\text{CH}_2-$) 短链, 经常被用来连接刚性的侧链基团与较软的聚合物主链, 来降低他们之间的相互作用。间隔基的长度对于含侧链的聚合物的性质是一个重要参数。一般来讲, spacer 链长越长, 主链与侧链基团的相互作用越弱。当 spacer 的长度为 6 或者更长时, 主链与侧链的相互作用基本可以忽略。另外, 张国城[19]等研究发现 spacer 的长度改变可以影响自组装结构的聚集形式如图 4.3 所示: 当时, 只有 MTC 的头部可以接触到囊泡的膜表面, 即形成了 H 聚集[20]; 当时, MTC 的两端都可以接触到囊泡的膜表面。通过这个实验, 我们可以预期 spacer 的长度可以影响嵌段两亲性共聚物组装的囊泡膜结构[21]。

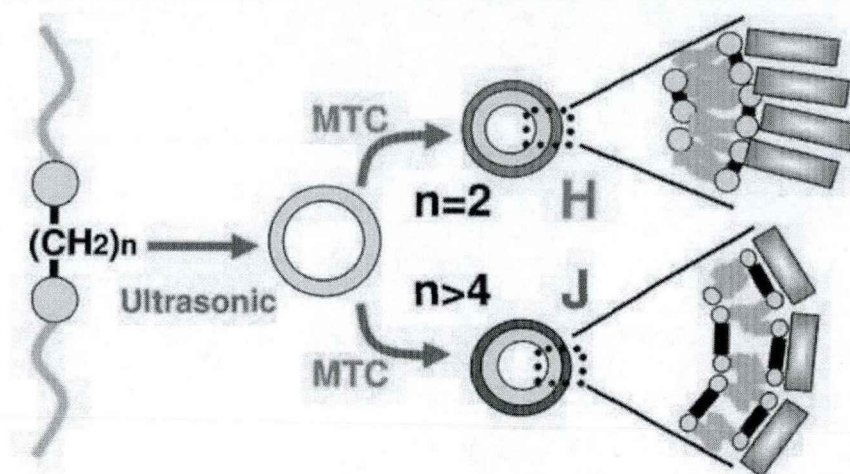


图 4.3 Spacer 长度影响聚合物囊泡膜的聚集形式

图注: $n=2$, 为 H 聚集; $n>4$, 为 J 聚集。

本章内容为以下实验的总结: 我们通过可逆加成-断裂链转移聚合方法 (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization, RAFT) 合成了一系列的两亲性嵌段聚合物分子 PNIPAM-*b*-PAzPy。合成中使用的是 NIPAM 聚合物和 AzPy-*x* 单体。这些聚合物的唯一区别是: 它们的 spacer ($-\text{CH}_2-$) 链长不同。我们用这几种聚合物分别进行自组装, 它们都能形成囊泡结构, 但是拥有不同的表面形貌: 其中 PNIPAM-*b*-PAzPy₂ 和 PNIPAM-*b*-PAzPy₆ 组装形成均匀的囊泡结构, 而 PNIPAM-*b*-PAzPy₀ 组装的囊泡则具有不均匀的 Janus 结构, 即大量的偶氮吡啶基团聚集在囊泡膜的一侧。PNIPAM-*b*-PAzPy₆ 组装的囊泡在 365nm 紫外光的照射下, 具有光致可逆伸缩膨胀的性质; PNIPAM-*b*-PAzPy₀ 组装的囊泡, 在紫外光照下观察不到形貌的变化; 而 PNIPAM-*b*-PAzPy₂ 构成的囊泡, 在光照下, 表现为可逆的形貌转化: 有光照时, 囊泡转化为不均匀的 Janus 结构, 紫外光关闭后, 囊泡会恢复成均匀的表面结构。根据我们的调研, 这是第一次在偶氮囊泡中观察到这种紫外光致可逆形貌转变现象。这个实验提供了一个制作 Janus 结构组装体的新方法。

4.2 实验研究

4.2.1 偶氮吡啶共聚物的合成

THF (四氢呋喃) 在进行实验之前需要回流以及蒸馏纯化处理, 其它试剂可以直接使用, 无需作纯化预处理。两嵌段共聚物 PNIPAM-*b*-PAzPyn ($n=0, 2, 6$) 详细的 RAFT 合成过程见第三章描述。

4.2.2 溶液中 PNIPAM-*b*-PazPy 聚合物囊泡的制备

二嵌段共聚物 PNIPAM-*b*-PAzPyn ($n=0, 2, 6$) 首先被溶解在 THF 中, 浓度为 2.0mg/L。自组装过程是在下列过程中完成的: 以 5 微升每秒的速率向聚合物的 THF 溶液中加水 (Milli-Q water), 同时不停地缓慢晃动。一直到水的质量比例达到 50% 时, 停止加水。之后, 混合溶液需要密封在离心管中静止 24 小时, 使自组装过程反应完全, 达到平衡状态, 同时维持溶液中四氢呋喃和水的比例不变。整个实验过程要在 30°C 的恒温环境下进行。

4.3 实验结果及讨论

4.3.1 偶氮共聚物 PNIPAM-*b*-PazPyn($n=0,2,6$) 组装及表征结果

本实验中的两嵌段偶氮聚合物是由 PNIPAM 和 AzPyn ($n=0, 2, 6$) 通过可逆加成-断裂链转移方法聚合而成。偶氮共聚物的分子量由凝胶渗透色谱 (GPC) 进行了测量, 三种聚合物的详细结构参数见表 4.1。

表 4.1 不同 spacer 长度的嵌段共聚物 PNIPAM-*b*-PAzPyn($n=0,2,6$) 分子结构的 GPC 曲线表征

Polymer	Mn	Mw/Mn
	×10 ⁴	

PNIPAM ₁₃₅ -b-PAzPy ₆₅₄	3.5	1.29
PNIPAM ₁₅₂ -b-PAzPy ₂₅₄	3.4	1.35
PNIPAM ₁₄₄ -b-PAzPy ₀₅₈	3.2	1.34

通过 4.2.2 所述的实验方法,我们制备得到了不同形貌的偶氮聚合囊泡如图 4.4 所示。在紫外光照之前, spacer2 和 spacer6 组装的偶氮囊泡, 表现为均一的形貌。spacer0 的偶氮囊泡却呈现出均匀的四面体形貌, 即偶氮吡啶基团集中在囊泡的一侧。由于 CCD 相机是单色的, 在 CCD 相机中只能看到亮度的差异, 然而直接用肉眼观察却能清楚的看到, 深黄色的吡啶偶氮基团集中在囊泡的一侧, 如图 4.6 中数码照片所示。

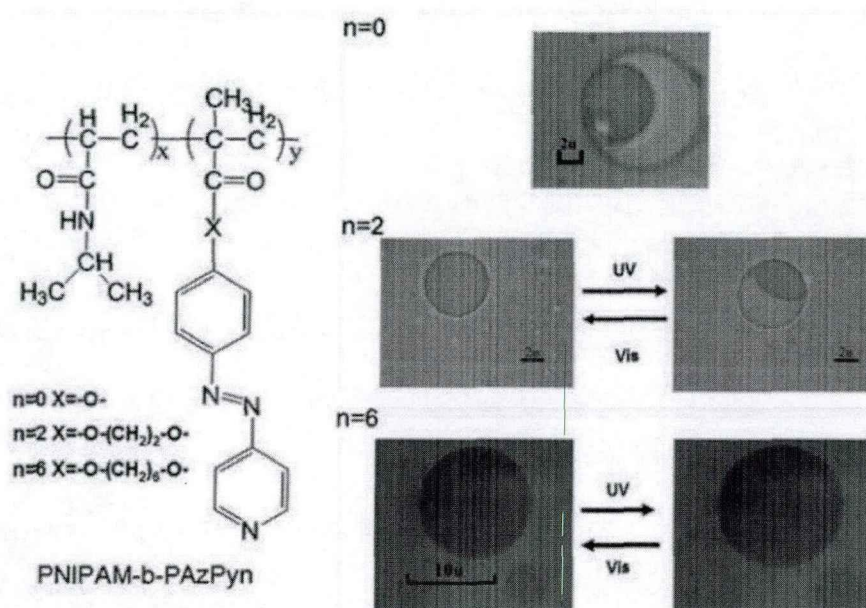


图 4.4 不同 spacer 长度的偶氮聚合物分子结构及囊泡形貌及和紫外光响应示意图

为了弄清不同 spacer 长度的偶氮聚合物组装的囊泡表现为不同形貌及光致形貌变化的机制,我们使用紫外可见光光度计来探测了几种聚合物的 THF 溶液以及组装的囊泡的 UV-Vis 谱, 结果如图 4.5 所示。

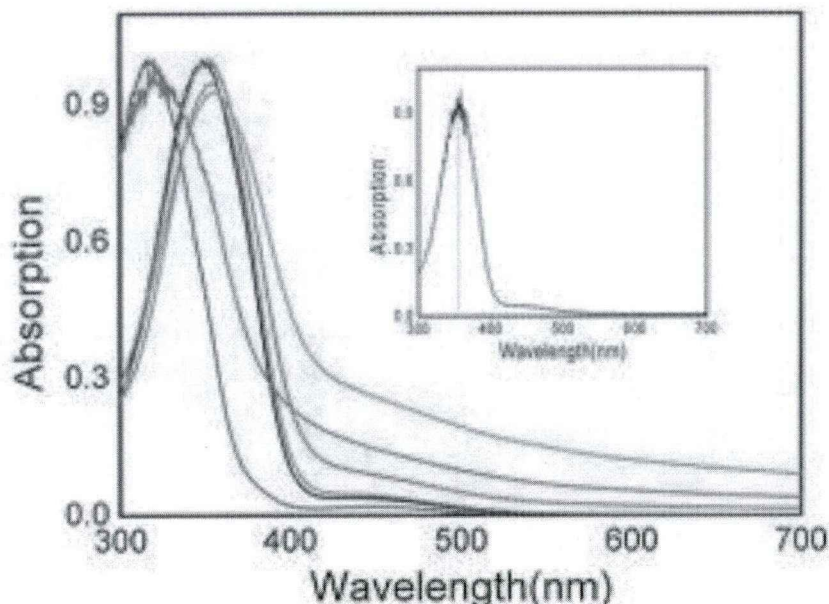


图 4.5 三种聚合物的 THF 溶液以及各自组装囊泡的 UV-Vis 谱图

图注：绿色：spacer0 偶氮囊泡；黑色：spacer2 偶氮囊泡；黄色：spacer6 偶氮囊泡；蓝色：spacer0 的 THF 溶液；红色：spacer2 的 THF 溶液；粉色：spacer6 的 THF 溶液；插图：偶氮吡啶单体分子在 THF 中的吸收谱。

由图可知：偶氮吡啶的 THF 溶液中出现了典型的反式偶氮基团在 365nm 的吸收峰。经过聚合作用，反式偶氮基团通过 $-CH_2-$ 和聚合物主链甲基丙烯酸酯相连接，因此偶氮基团相对应的反式吸收峰发生了移动：PNIPAM-b-PAzPy6 移动到了 354nm，PNIPAM-b-PAzPy2 移动到了 349nm，PNIPAM-b-PAzPy0 移动到了 317nm。吸收峰的平移可能来源于 Solvent 效应：在极性分子（THF）溶剂中，如果溶剂和溶质的相互作用增强，则吸收峰会发生红移。依据此原理偶氮吡啶基团的吸收峰会随着 spacer 长度的减少而发生蓝移，可能是由于间隔基团长度的降低导致聚合物主链与侧链偶氮基团的相互作用增强，减弱了溶剂效应对偶氮基团的影响。因此当 spacer 长度为 6 或者更长时间吸收峰的蓝移变得微乎其微甚至消失。当 spacer 为 0 即没有亚甲基连接主链和侧链时，偶氮基团的吸收峰蓝移非常明显，这意味着偶氮吡啶基团与溶剂 THF 的相互作用相对很小[22]。三种聚合物组装成囊泡后，他们的吸收峰都发生了红移，并且变宽，这意味着在自组装

过程中, 偶氮分子发生了 J 聚集。另外, spacer0 的囊泡的吸收峰在三种囊泡中蓝移量最大, 展宽最多表明这种囊泡的 J 聚集最强烈。这种强烈的聚集作用导致了 spacer0 的囊泡组装完成后就呈现出不均匀的二维体结构。

我们使用拉曼光谱探测了 PNIPAM-b-PAzPy0 组装的囊泡的聚集以及非聚集部分的拉曼信号如图 4.6 所示。图中拉曼峰的归属在第三章做了总结: 反式偶氮的拉曼峰分别出现在 1131cm^{-1} (CN_{azo} stretch), 1395cm^{-1} (NN_{azo} stretch), 1458cm^{-1} (CNC stretch), 小峰出现在 980cm^{-1} , 1308cm^{-1} , 1578cm^{-1} (CC stretch); 较强的顺式偶氮峰出现在 1478cm^{-1} (NN_{azo} stretch)。从图 4.6, 我们可以发现两个部分的拉曼信号没有太大的区别。然而拉曼信号的强度却差异很大: 聚集部分远大于非聚集部分。这证明这部分聚集了更多的偶氮吡啶基团。

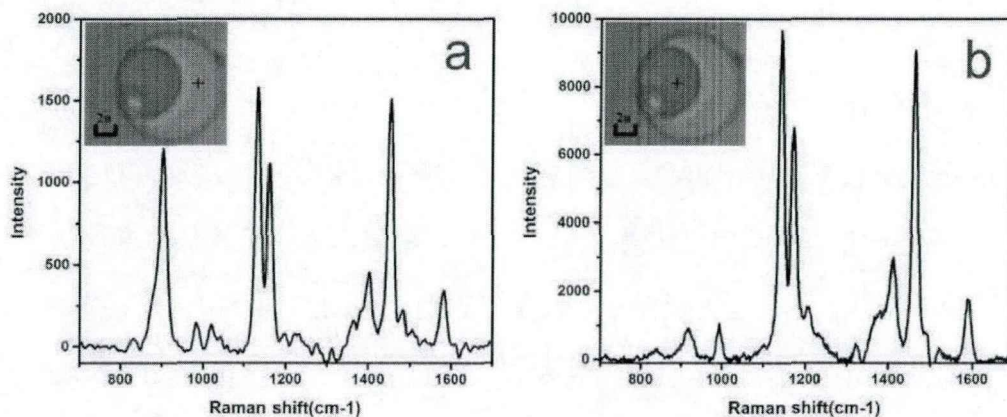


图 4.6 PNIPAM- b-PAzPy0 组装的囊泡的拉曼信号

图注: a 非聚集部分; b 聚集部分 其中“+”表示光阱中心所在点

4.3.2 PNIPAM-b-PazPy2 组装偶氮囊泡的光致可逆形貌变化

因为 PNIPAM-b-PazPyn 共聚物组装的囊泡疏水膜内有很多偶氮吡啶基团, 我们可以预见在紫外光和可见光照射下, 由于偶氮基团的顺反异构, 囊泡会发生一些可逆的形貌变化。在我们前面的实验中, 我们发现 PNIPAM-b-PazPy6 组装的囊泡在紫外光和可见光的交替照射下, 可以发生可逆的伸缩膨胀。因此现在我们主要研究 PNIPAM-b-PazPy0 和 PNIPAM-b-PazP2 组装的囊泡的光响应。

如图 4.4 所示, 对于 PNIPAM-*b*-PazPy0 组装的囊泡在光照下没有明显反应, 而 PNIPAM-*b*-PazPy2 组装的囊泡则发生不同寻常的变化, 即经紫外光照后, 囊泡表面从初始均匀的结构变成不对称的二面体结构; 关掉紫外灯, 打开可见光, 囊泡表面又回复成对称的均匀结构, 见下图图 4.7。

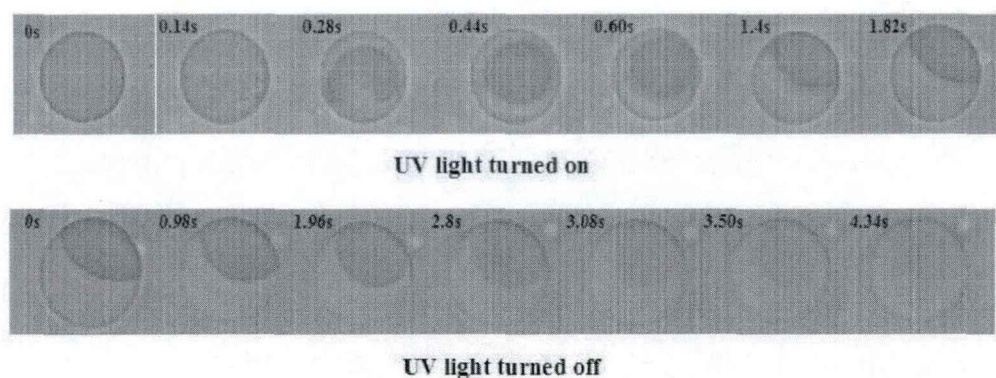


图 4.7 PNIPAM- *b*-PazPy2 组装的囊泡的紫外线开闭时的形貌变化

我们使用拉曼光镊系统研究了 PNIPAM-*b*-PazPy2 组装囊泡可逆的形貌变化过程以及 PNIPAM-*b*-PazPy0 组装囊泡的光响应。如图 4.8 所示, 对于 PNIPAM-*b*-PazPy0 组装囊泡, 无论是聚集部分还是非聚集部分, 顺式偶氮基团的变化都几乎没有变化。这是因为偶氮的强聚集导致偶氮基团的顺反异构变得困难, 而非聚集部分则是因为偶氮基团的浓度太低。然而对于 PNIPAM-*b*-PazPy2 构成的囊泡, 当紫外光打开的时候, 反式偶氮拉曼峰迅速大幅度降低, 而顺式偶氮拉曼峰则明显增高, 这表明偶氮的反式结构转变成顺式结构。除了图 4.5 所示的不同的聚集结构之外, 有可能是主链对侧链偶氮吡啶基团的限制作用导致了两者的不同反应。Spacer 链长越短, 主链对侧链的限制作用越明显, 这也增加了偶氮易构的难度。在 PNIPAM-*b*-PazPy2 构成的囊泡中限制作用相对较小, 偶氮分子相对容易异构及侧向运动, 这导致了囊泡的形貌改变。

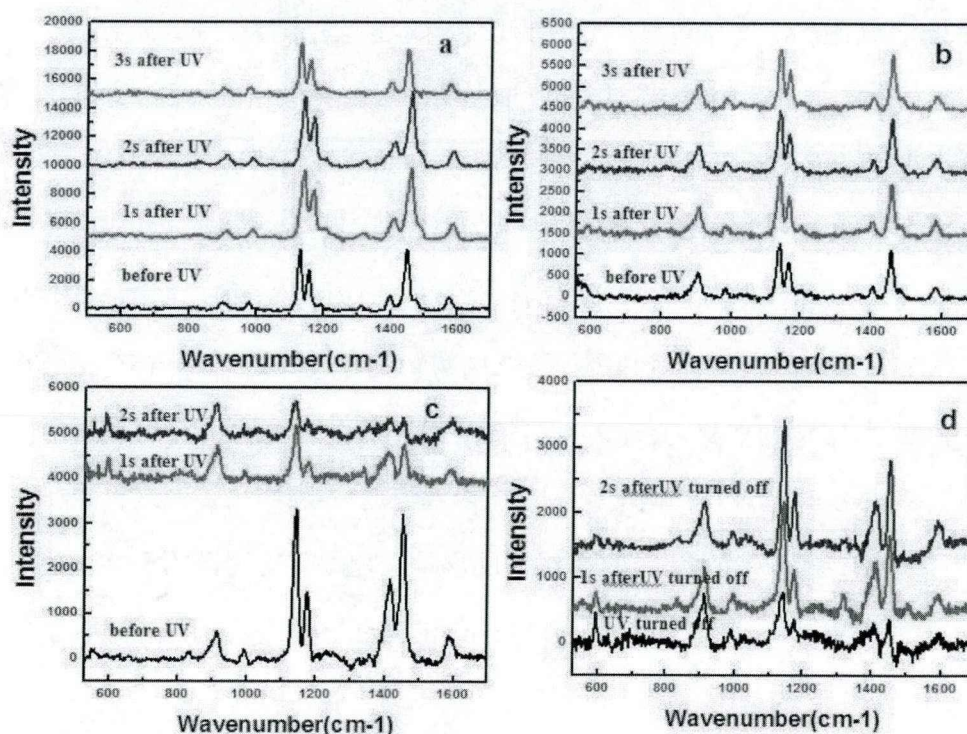


图 4.8 PNIPAM-b-PazPy0 构成的囊泡和 PNIPAM-b-PazPy2 构成的囊泡在 365nm 紫外光照下的拉曼信号。

图注: a 紫外光照时 PNIPAM-b-PazPy0 构成的囊泡的聚集部分; b 紫外光照时 PNIPAM-b-PazPy0 构成的囊泡的非聚集部分; c 紫外光照时 PNIPAM-b-PazPy2 囊泡; d 紫外光关闭后的 PNIPAM-b-PazPy2 囊泡;

我们在明场显微图像下仔细研究了囊泡在 365nm 紫外光下由均一结构变成二面体结构的详细过程。如图 4.7 以及下图 4.9 所示, 紫外光打开后, 偶氮吡啶基团的顺反异构伴随着囊泡的形变发生。在紫外光刚打开 0.14 秒时, 囊泡表面突然产生很多很小的聚集体。随着时间的进展, 聚集体逐渐融合成一个大的聚集区域。这个过程持续了大约 1.82s。图 4.9 的曲线显示的是拉曼光谱系统监测到的偶氮基团异构度随时间的变化。由于拉曼光谱以 1s/帧的速率进行采集, 我们难以采集到录像频率的拉曼数据。然而我们仍然能从光谱数据中发现两个有用的结论。第一个结论是: 偶氮基团的异构需要大约 2s 时间达到平衡。这跟囊泡形变的平衡时间 1.82s 很接近。第二个结论是: 偶氮分子在 1s 时间内异构度就达到了 66.2%, 这比接下来几秒时间的异构度变化多很多, 后面的异构度变化只有

17.2%。这也可以解释囊泡在初始的 0.14 秒内形变为什么那么剧烈。这两个结论表明偶氮吡啶基团的顺反异构是囊泡发生形貌变化的主要原因。为了进一步确认这个推论，我们使用蓝光(432nm)和绿光(532nm)来照射囊泡。在实验中，无论使用多大的功率，我们都没有发现囊泡的形变。

当紫外光关闭后，囊泡会二面体结构转化成均一结构。如图 4.9 右图所示：拉曼光谱系统给出了偶氮基团由顺式结构转变成反式结构的异构过程。这个过程大约持续了 3s 达到平衡。这个时间与图 4.7 和 4.9 中囊泡形变转换过程所需时间一致。跟顺-反异构过程不同的是，二面体囊泡的反-顺异构转变过程是一个和缓的过程，没有突变现象发生。这个缓慢的异构过程跟囊泡缓慢的形貌变化一样符合的很好。实验中，我们发现使用 432nm 的蓝光照射囊泡可以加速囊泡的回复过程。

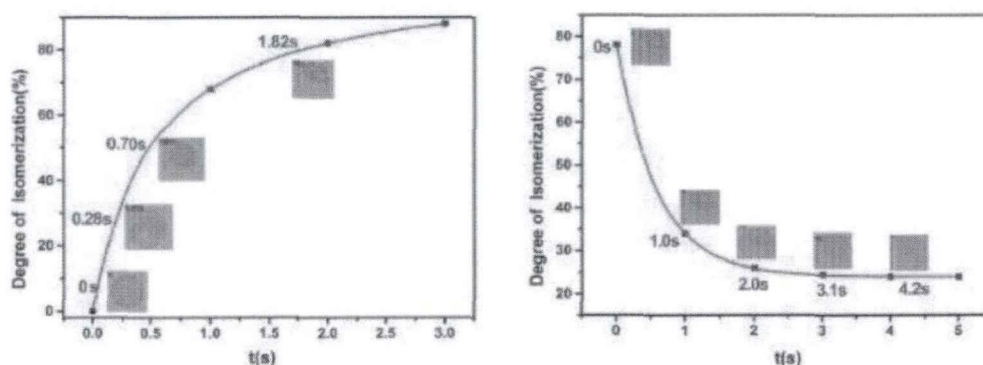


图 4.9 spacer2 偶氮囊泡的形貌变化以及偶氮基团异构度随时间的演化

图注：左图：紫外灯打开时囊泡的变化；右图：紫外光关闭之后囊泡的变化

所有上面的结果表明：光致异构是囊泡形变的主要原因。众所周知顺式偶氮异构体比反式偶氮异构体更加疏水。然而囊泡壁疏水性更强，这意味着顺式偶氮异构体比反式偶氮异构体更加难溶于水。在紫外光照下，偶氮吡啶反式异构体转变成顺式异构体，因此囊泡表面结构中的亲疏水性平衡被打破，导致偶氮分子在囊泡膜内部发生重组。而当紫外灯关闭之后，新的亲疏水性平衡得以重新建立，所以囊泡的形貌重新恢复成均匀结构。

值得指出的是,由外部触发从而偏离亲疏水平衡态而使囊泡形成二面体形貌与 spacer0 组装成的囊泡初始就形成的二面体结构是不同的。Spacer0 构成的囊泡的结构是由于主链与侧链之间没有间隔集团 ($-\text{CH}_2-$),从而使两者相互作用太强,两亲性聚合偶氮吡啶分子的疏水部分聚集在一起而造成的。对于由 spacer2 组装的偶氮囊泡,在紫外线导致偶氮苯基团从反式异构体转化成顺式异构体的过程中,两个亚甲基间隔基团的存在使顺式偶氮苯异构体发生重新聚集,从而囊泡变成不对称的 Janus 结构。这种结构处于一种不稳定的状态,当除去紫外线的刺激后,他会回复到初始稳定的均匀结构状态。很明显由 PNIPAM -b-PazPy2 组装的囊泡在紫外线的激励下有两个稳定状态。另外,我们很容易推断出当两嵌段的聚合物中疏水段的侧链疏水性增强时,稳定的 Janus 结构的囊泡就会出现。类似的情况出现在 PNIPAM-b-PazPy0 构成的偶氮苯囊泡中。这个推论由下面的实验可以得到证实。

我们在 PNIPAM-b-PazPy2 囊泡组装过程中加入了疏水的双光子染料 BCSBP (4, 4' -bis(9-carbazolyl-trans-stryl)biphenyl)。这种染料在组装过程中会驻留于囊泡的疏水膜内部,因此囊泡表面膜的疏水性会增加。此时我们通过光学显微镜观察到囊泡的确出现了不均一的 Janus 结构。我们使用激光扫描共聚焦显微镜来观察这种不对称的结构,结果如图 4.10 所示。我们使用的双光子染料可以吸收 796nm 的红外光,然后会发出 472nm 的蓝光。从图 4.10 我们可以看到这种结构内部有一个空腔。发光部分在空腔周围也呈现不对称的分布,这意味着囊泡的表面膜有一侧比较厚而且发光很强,另一侧则壁厚较薄,因而发光较弱。这充分的说明这种组装结构是具有空腔和不对称表面的 Janus 囊泡结构。聚合物的两个嵌段都是在主链上连接起来的,因此不仅是偶氮苯基团发生重组,就连整个聚合物主链都会在囊泡表面重新排布。即很多聚合物分子会集中在囊泡膜的一侧,另一侧则分子数密度较低。

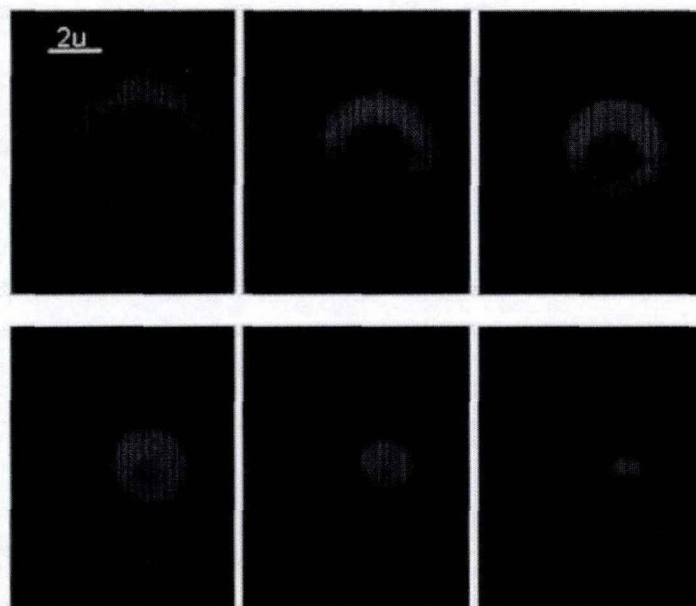


图 4.10 PNIPAM-b-PazPy2 组装偶氮囊泡的 CLSM 图像

图注：扫描图像从囊泡的赤道截面开始一直到囊泡部逐层扫描。每张扫描图像都呈现不对称的发光截面

为了进一步确认由 CLSM 得到的结论，我们在 spacer 长度为 2 的偶氮囊泡中掺入了含稀土元素铕的发光染料 $\text{Eu}(\text{DBM})_3 \text{Phen}$ [23, 24]，其中 Eu 表示 Europium，DBM 表示 dibenzoylmethide，Phen 表示 1,10-phenanthroline。样品制备过程如下：首先将一定量的 EuDP 溶解在 THF 溶液中，然后和偶氮吡啶的 THF 共混，接着重复囊泡的自组装过程。我们使用 365nm 的紫外光照射掺有染料的偶氮囊泡，其显微明场以及发光照片见图 4.11。由图可知囊泡同样出现一侧比另一侧亮的情形，这进一步证明了我们前面的论断。

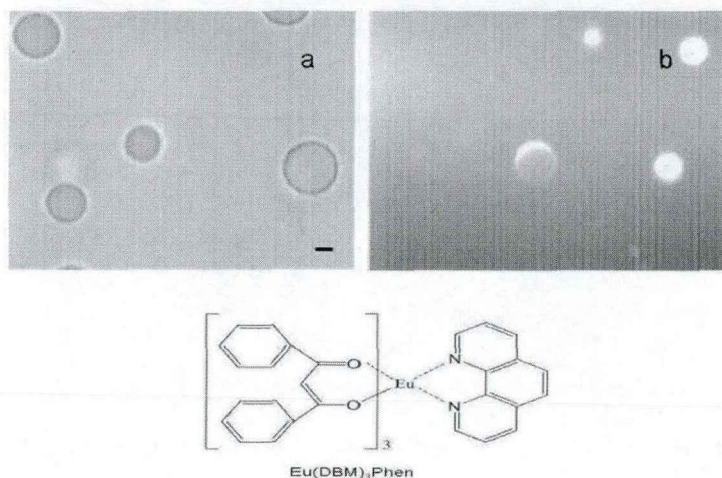


图 4.11 掺杂 EuDP 燃料的偶氮囊泡的显微照片以及 EuDP 的分子结构

4.4 本章小结

本章主要介绍了以下的实验工作。我们合成了三种两嵌段偶氮吡啶聚合物分子 PNIPAM-*b*-PazPyn ($n=0,2,6$), 并通过自组装的方法制备了三种囊泡。这三种聚合物分子区别在于主链和侧链之间连接间隔集团链长度不同, 分别具有 6, 2, 0 个亚甲基 ($-\text{CH}_2-$) 作为连接基团。在显微镜中观察, 三种囊泡具有不同的形貌结构, 并且对紫外线照射的响应也不一样。其中 spacer0 组装的囊泡呈现 Janus 结构没有光响应性; spacer2 组装的囊泡初始为均匀的形貌, 在紫外线照射下会转变成 Janus 结构, 关掉紫外线, 还可以转变回原来的均匀结构; spacer6 构成的囊泡在紫外线照射下发生可逆的伸缩膨胀现象, 这在上一章的实验中做过介绍。我们使用拉曼光谱来观察偶氮吡啶基团的紫外光致异构行为, 这跟囊泡的形貌转变是同时发生的。通过各种手段进行仔细分析, 我们发现间隔链长度的不同而导致的分子链亲疏水性的变化, 以及偶氮吡啶基团的紫外光致顺反异构是导致 PNIPAM-*b*-PazPy2 组装偶氮聚合物囊泡的形貌变化的主要原因。

参考文献

1. Christian D A, Tian A, Ellenbroek W G, et al. Spotted vesicles, striped micelles and Janus assemblies induced by ligand binding [J]. *Nat Mater*, 2009, 8(10): 843-849.
2. Hu J, Weikl T, Lipowsky R. Vesicles with multiple membrane domains [J]. *Soft Matter*, 2011, 7(13): 6092.
3. del Barrio J, Oriol L, Sanchez C, et al. Self-Assembly of Linear-Dendritic Diblock Copolymers: From Nanofibers to Polymersomes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(11): 3762-3769.
4. Matsumura A, Tsuchiya K, Torigoe K, et al. Photochemical Control of Molecular Assembly Formation in a Catanionic Surfactant System [J]. *Langmuir*, 2011, 27(5): 1610-1617.
5. Koizumi S, Hasegawa H, Hashimoto T. Ordered Structure of Block Polymer Homopolymer Mixtures Vesicle Formation and Macrophase Separation [J]. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia*, 1992, 62(75-91).
6. Caria A, Regev O, Khan A. Surfactant-polymer interactions: Phase diagram and fusion of vesicle in the didodecyldimethylammonium bromide-poly(ethyleneoxide)-water system [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1998, 200(1): 19-30.
7. Park P J, Sung W. Polymer release out of a spherical vesicle through a pore [J]. *Physical Review E*, 1998, 57(1): 730-734.
8. Liu F, Eisenberg A. Preparation and pH Triggered Inversion of Vesicles from Poly (acrylic Acid)-b lock-Polystyrene-b lock-Poly (4-vinyl Pyridine) [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(49): 15059-15064.
9. Azzam T, Eisenberg A. Fully Collapsed (Kippah) Vesicles: Preparation and Characterization [J]. *Langmuir*, 2010, 26(13): 10513-10523.
10. Xue M S, Ma C, Craig T K, et al. The Janus-faced nature of the C2B domain is fundamental for synaptotagmin-1 function [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2008, 15(11): 1160-1168.
11. Buwalda R T, Jonker J M, Engberts J B F N. Aggregation of azo dyes with cationic amphiphiles at low concentrations in aqueous solution [J]. *Langmuir*, 1999, 15(4): 1083-1089.

12. Hamada T, Sato Y T, Yoshikawa K, et al. Reversible photoswitching in a cell-sized vesicle [J]. *Langmuir*, 2005, 21(17): 7626-7628.
13. Lin Y L, Chang H Y, Sheng Y J, et al. Photoresponsive Polymersomes Formed by Amphiphilic Linear-Dendritic Block Copolymers: Generation-Dependent Aggregation Behavior [J]. *Macromolecules*, 2012, 45(17): 7143-7156.
14. Howse J R, Jones R A, Battaglia G, et al. Templated formation of giant polymer vesicles with controlled size distributions [J]. *Nature materials*, 2009, 8(6): 507-511.
15. Han M N, Okui Y, Hirade T. Light-responsive microstructures capable of pyrene monomer fluorescence switching [J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2013, 1(21): 3448-3453.
16. Li N, Wang X G. Hollow and Vesicle-Like Aggregates of an Amphiphilic Azo Random Copolymer Bearing Branched Azobenzene Side Chains [J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2013, 4): 549-555.
17. Wang D R, Wang X G. Amphiphilic azo polymers: Molecular engineering, self-assembly and photoresponsive properties [J]. *Progress in Polymer Science*, 2013, 38(2): 271-301.
18. Arai N, Yasuoka K, Zeng X C. A vesicle cell under collision with a Janus or homogeneous nanoparticle: translocation dynamics and late-stage morphology [J]. *Nanoscale*, 2013, 5(19): 9089-9100.
19. Zhang G, Zhai X, Liu M, et al. Spacer-modulated aggregation of the cyanine dye on the vesicles of gemini amphiphiles [J]. *Langmuir*, 2008, 25(3): 1366-1370.
20. Kuiper J M, Engberts J B F N. H-aggregation of azobenzene-substituted amphiphiles in vesicular membranes [J]. *Langmuir*, 2004, 20(4): 1152-1160.
21. Mundargi R C, Babu V R, Rangaswamy V, et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (d, l-lactide-co-glycolide) and its derivatives [J]. *Journal of Controlled Release*, 2008, 125(3): 193-209.
22. Xin F F, Zhang H C, Sun T, et al. Sensitive Vesicle System Based on Supramolecular Cyclodextrin Amphiphiles [J]. *Progress in Chemistry*, 2012, 24(2-3): 414-422.
23. Yan Q, Su W, Cheng Y L, et al. Luminescence and structure of Eu(DBM)(3)Phen-doped vesicles composed of amphiphilic PNIPAM-b-PAzoM [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 2008, 200(2-3): 101-105.

24. Hubbard F P, Abbott N L. Effect of light on self-assembly of aqueous mixtures of sodium dodecyl sulfate and a cationic, bolaform surfactant containing azobenzene [J]. *Langmuir*, 2007, 23(9): 4819-4829.

第五章 偶氮囊泡的光致破裂重组

5.1 引言

偶氮苯分子的光响应性质，由光致顺反异构可以引起分子的亲疏水变化、聚集状态变化、相变、超分子络合作用改变等[1-5]。这使得偶氮苯聚合物可以表现出许多有趣的光响应行为，如导电性和磁性改变、可逆的润湿性变化、光致形变等[6-8]。苏伟等发现偶氮吡啶聚合物囊泡在紫外光照下发生融合，膜表面缺陷的形成，破裂，解体和重组[9, 10]。

偶氮苯共聚物在选择性溶剂中可以自组装形成多种聚集体[11-16]。清华大学的王晓工[17]研究组用偏振紫外光对偶氮组装的胶束照射，发现胶体球沿着偏振光电矢量方向上进行拉伸，由最初的球形变为梭形[18]；Zhao Yue 等在选择性溶剂中通过偶氮聚合物自组装制备了核壳形胶束。在紫外光的照射下由于偶氮苯分子疏水性质的变化而发生光致解离[19]。因此，基于偶氮苯的自组装聚集体可以通过光诱导形态转变而实现化学物质的可控释放。

本课题组先后发现偶氮聚合物囊泡可以发生光致融合、光致伸缩膨胀、光诱导可逆形变等光响应性质。结合实验室以往的研究结果，我们发现取代基对偶氮苯囊泡的光响应行为有着极大的影响。为进一步了解取代基效应对囊泡光响应的影响，我们设计并合成了含有较强的给电子效应甲氧基基团[20]的偶氮苯嵌段共聚物 PNIPAM₁₂₃-b-PAzoMO₅₀。同时，借助共聚焦拉曼光谱对单个甲氧基偶氮苯组装囊泡的光致异构过程进行了实时的跟踪观察，并对其光响应机理进行了讨论。

5.2 实验研究

5.2.1 材料和试剂

N-异丙基丙烯酰胺 (NIPAM, 97%, 上海竞物化工科技有限公司) 使用前需要在正己烷和苯的混合溶剂 (v/v=2:1) 重结晶两次。偶氮二异丁腈 (AIBN) 用 95% 乙醇重结晶后使用。四氢呋喃 (THF 国药, 分析纯), 加入金属 Na 回流除水, 减压蒸馏后使用。甲氧基偶氮苯单体 6-[4(4-偶氮苯基) 酚氧基] 己基丙烯酸酯 (AzoMO) 和 raft 试剂 2-(十二烷基三硫代碳酸酯基)-2-异丁酸 (DTCMA) 按照文献给出的方法合成[18]。其他常用试剂没有指出的话, 是没有进行预处理而直接使用。

5.2.2 大分子链转移剂 PNIPAM-CTA 的合成

将 2g NIPAM 单体、6mg AIBN 和 120mg 链转移试剂 CTA 混合溶解在 4ml THF 中, 70℃ 下封管抽真空反应 24 小时。反应结束后用乙醚作为沉淀剂对聚合物进行提纯。将得到的粉末固体放入真空干燥器中, 在 50 ℃ 下干燥 24 小时。收集所得产物为大分子链转移剂 PNIPAM-CTA。

5.2.3 PNIPAM-b-PAzoMO 嵌段共聚物的合成

将 0.5g 的甲氧基偶氮苯单体 (AzoMO)、0.3g PNIPAM-CTA 大分子转移剂和 0.5mg AIBN 溶于 10ml THF 中, 70℃ 下封管反应 24 小时。反应结束后用甲醇作为沉淀剂对聚合物进行提纯, 产物在 50 ℃ 下真空干燥 24 小时, 收集所生成的淡黄色粉末。

5.2.4 PNIPAM-b-PAzoMO 自组装囊泡的制备及表征

首先将嵌段共聚物配制成浓度为 2.0mg/ml 的 THF 溶液，缓慢向溶液中滴加去离子水至水体积达到 50%，避光放置 24 小时后使用。在整个操作过程中室温维持在 25℃。利用 RAFT 加成断裂链转移聚合方法合成了两亲性偶氮苯嵌段共聚物 PNIPAM-b-PAzoMO。合成路线如图 5.1 所示。图 5.2 a 给出了嵌段共聚物的核磁共振氢谱以及分析结果。图 5.2 b 中给出了 PNIPAM-CTA 和 PNIPAM-b-PAZO 的 GPC 测量结果。PNIPAM-CTA 的分子量 $M_n=14153$ ，多分散指数 27 (PDI) 为 1.06。共聚后得到的 PNIPAM-b-PAZO 分子量 $M_n=34200$ ，多分散指数 (PDI) 为 1.27。至此我们采用活性自由基聚合得到了单分散的甲氧基偶氮苯嵌段共聚物，GPC 分析表明该聚合物为 $PNIPAM_{123}\text{-b-PAzoMO}_{50}$ 。

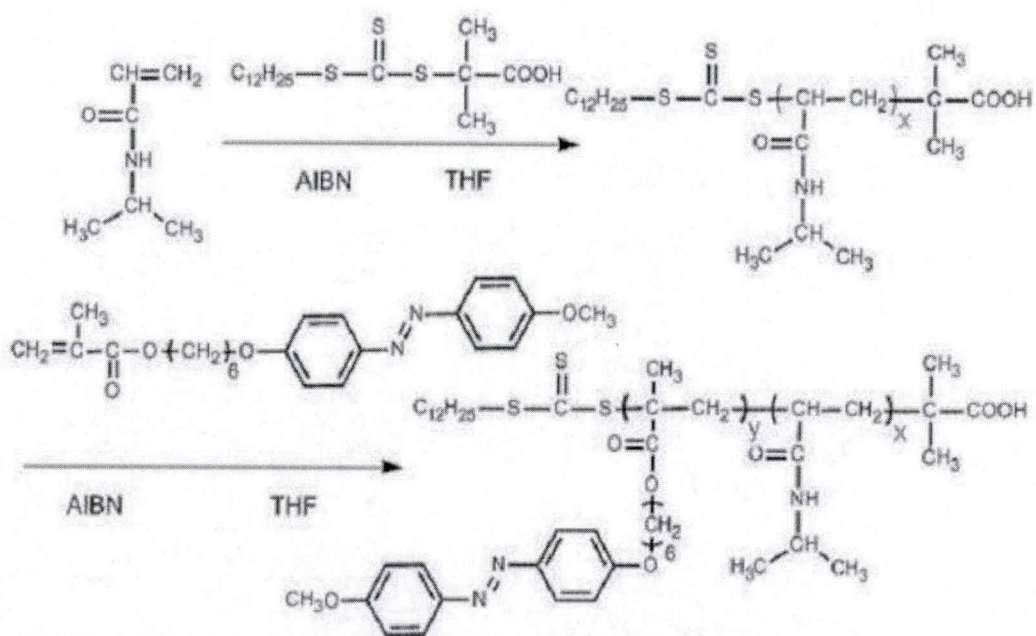


图 5.1 PNIPAM₁₂₃-b-PAzoMA₅₀ 的合成流程图

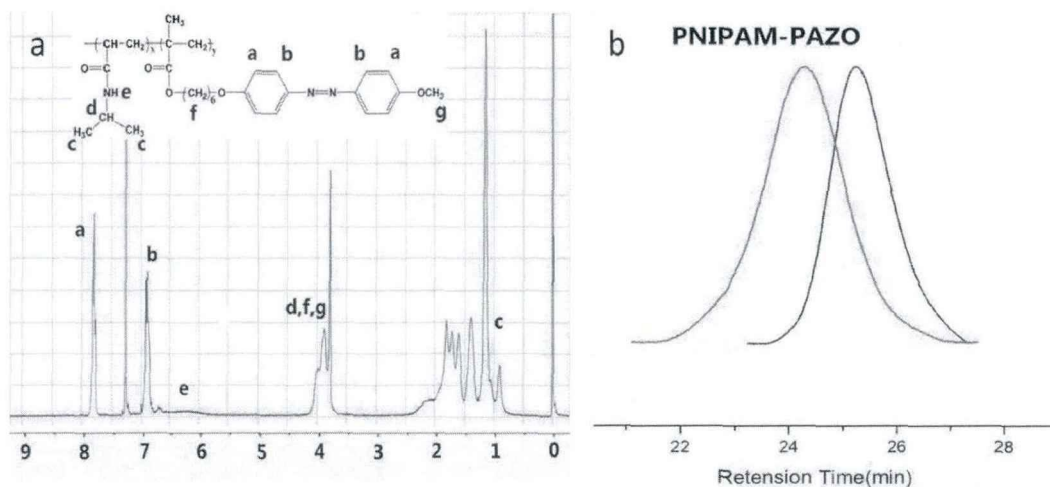


图 5.2 聚合物 PNIPAM₁₂₃-b-PAzoMA₅₀ 的表征

图注: a 核磁谱; b GPC 曲线

5.3 甲氧基偶氮囊泡的光响应

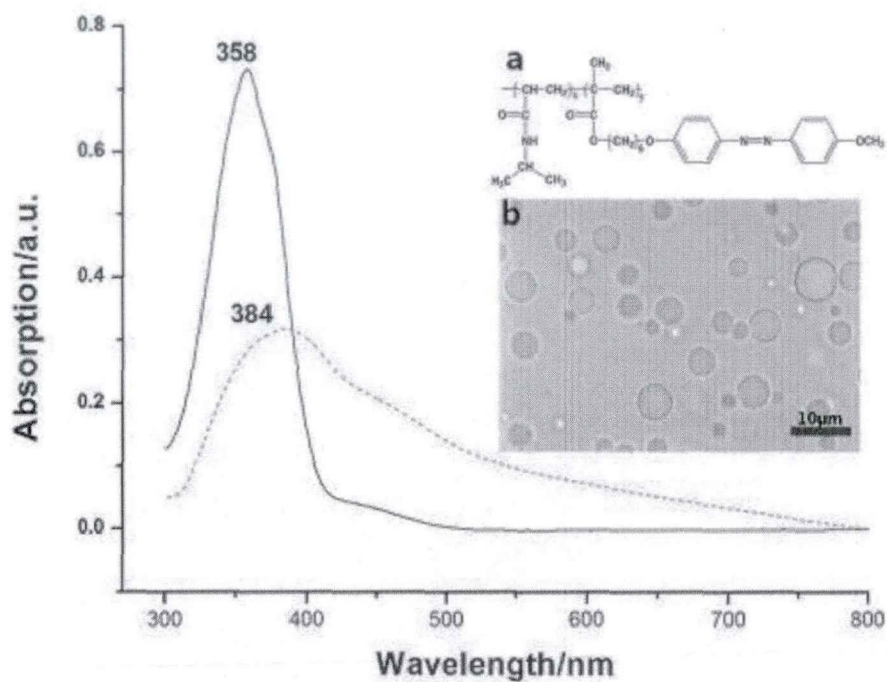


图 5.3 偶氮甲氧基囊泡的紫外可见光吸收谱以及显微照片

图注: 实线为均匀偶氮聚合物溶液的紫外可见吸收谱线, 虚线为组装成囊泡结构的聚合物溶液的紫外吸收谱线, 可以看出最强吸收峰出现红移, 即从 358nm 移动到 384nm。

在光学显微镜下,可以直接观察所聚合物自组装形成的囊泡。如图 5.3 所示, PNIPAM-b-PAzoMO 在浓度 2mg/ml, 质量比为 1:1 的 H₂O/THF 混合溶剂中, 自组装形成的偶氮苯囊泡大部分尺寸在 5 微米左右。在 THF 溶液中, PNIPAM-b-PAZO 的紫外吸收光谱显示了甲氧基偶氮苯生色团的特征吸收, 吸收峰 358nm 和 434nm 分别对应着偶氮反式和顺式结构的吸收峰。当 PNIPAM-b-PAZO 自组装形成微米囊泡后, 最大吸收峰 358nm 红移到 384nm。吸收峰的峰形和峰宽变化, 可以归因于水含量的增加导致溶剂极性增大引起的溶剂化效应使得吸收峰向长波长方向移动, 其他因素如偶氮聚集态的改变也会导致吸收峰的红移[21]。

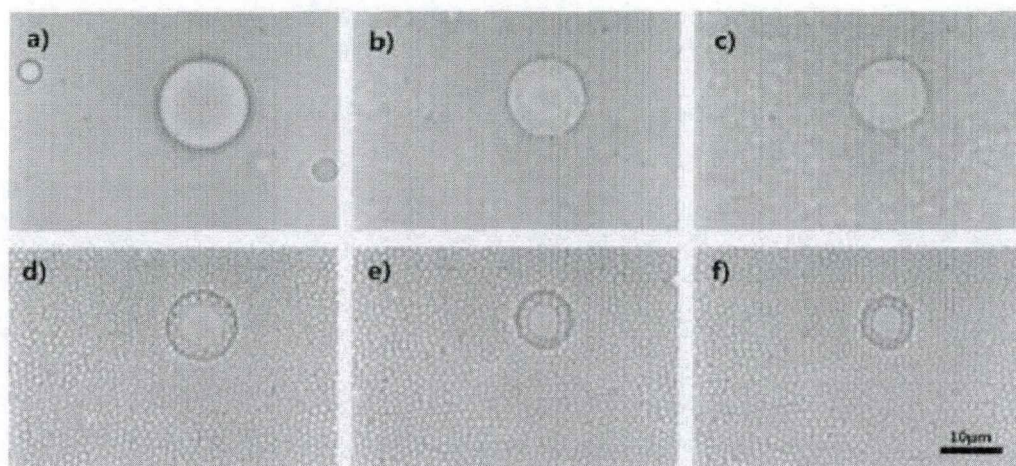


图 5.4 甲氧基偶氮囊泡在紫外光下的分裂重组装

为观察偶氮苯聚合物囊泡的光响应性质, 我们选择了一个直径为 13.8 微米的囊泡。如图 5.5 所示, 在紫外光(365nm, 1.5mW/cm²)照射下, 大量尺寸均匀的小囊泡(1µm)在母囊泡周围形成并向外围扩散。同时母囊泡的尺寸也随着逐渐缩小至 8.2 微米。整个分裂过程在 40s 内完成, 母囊泡的尺寸不再随着光照的延长而进一步变化。

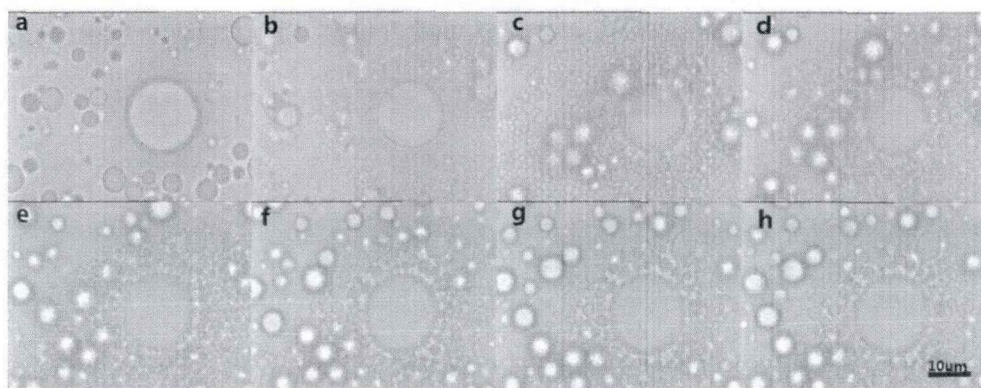


图 5.5 溶液中甲氧基偶氮囊泡在可见光下的分裂重组装

图注: a 光照前; b-c 436nm (功率密度为 1.5 mW/cm^2) 照射, 时间分别为 10s, 40s; d-h 为 532nm (功率密度为 1.5 mW/cm^2) 光照, 照射时间分别为 50s, 70s, 260, 300s, 370s。

在实验过程中用可见光 436nm 照射囊泡, 也发现了囊泡的分裂行为。如图 5.5 所示, 这些分裂中的囊泡用绿光 532nm 照射或者关闭光源, 分裂过程终止, 小囊泡逐渐相互融合。同时我们发现这一过程具有明显的光强依赖性。当紫外光 365 nm 或者可见光 436 nm 的光源强度降低到 0.1 mW/cm^2 时, 则观察不到囊泡的分裂行为。这表明囊泡的分裂过程可以通过调节光强或者光波长进行调控。

表 5.1 甲氧基偶氮囊泡在不同波长, 功率照射条件的光响应

Wavelength/power density	0.1 mW/cm^2	1.5 mW/cm^2
365nm	未解离	解离
436nm	未解离	解离
532nm	未解离	未解离

5.4 甲氧基偶氮囊泡光致解离机理解释

为了研究光致异构在光诱导囊泡分裂中的发挥的作用, 在这里我们使用拉曼镊子实时表征了单个 PNIPAM-b-PAzoMO 囊泡在紫外光照下发生解离时的光致异构过程, 所得到的拉曼光谱如图 5.7 所示。在打开紫外光照的同

时开始扫描拉曼信号, 每次扫描时间为 1s, 总扫描时间 10s。对拉曼光谱上各个峰的归属为: 反式偶氮的拉曼峰 1141 cm^{-1} (C-N 伸缩振动), 1189 cm^{-1} (C-N=N 弯曲振动), 1409 cm^{-1} (N=N 伸缩振动), 1456 cm^{-1} (C-N 伸缩振动), 以及弱峰 1031 cm^{-1} (C-C-C 弯曲振动), 1105 cm^{-1} (C-N 伸缩振动), 1252 cm^{-1} (N-C-C 弯曲振动), 1601 cm^{-1} (C-C 伸缩振动)。顺式偶氮峰主要为 545 cm^{-1} (N=N-C 弯曲振动), 635 cm^{-1} (C-N=N-C 扭曲振动), 1481 cm^{-1} (N=N 伸缩振动)。当紫外光照射后, 偶氮的反式峰开始降低, 于此同时偶氮的顺式峰 635 cm^{-1} 和 1481 cm^{-1} 开始出现, 这表明偶氮苯的异构化开始进行。由于 THF 溶剂峰 916 cm^{-1} 在光照时始终不变, 因此我们选择它作为内标峰。在这里反式偶氮苯的 1141 cm^{-1} (C-N 伸缩振动)处的拉曼峰强度变化用来研究光致异构过程[22]。关于异构化程度的定量计算可以参照第三章描述的计算方法[23]。图 5.6 给出了在不同光照强度下, 甲氧基偶氮异构化程度随时间的变化。从图中可以看出尽管光照强度不同, 但是偶氮苯的异构化程度在 4s 内都达到了异构平衡约 93%。这表明光照强度对偶氮苯的平衡后的异构化程度并无多大影响。然而我们在实验中发现偶氮苯囊泡只有在较高光强下才能发生分裂行为。因此光致异构并不是造成偶氮囊泡分裂的唯一因素。

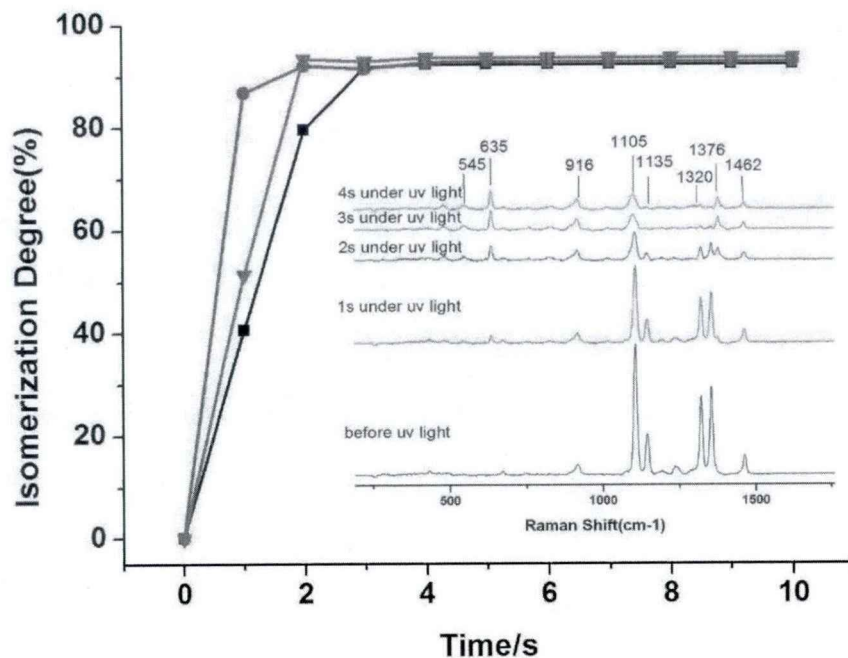


图 5.6 偶氮囊泡在不同紫外光强度（分别为■ $0.1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ；▼ $0.5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 以及● $1.5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ）照射下异构度随时间变化以及拉曼信号的变化

为了解释 PNIPAM-b-PAZO 囊泡的光致分裂对于光强的依赖性，我们提出了一个可能的机理。囊泡的分裂是光致异构和光热效应的共同作用结果。在以前的文献报道中，热效应是偶氮聚合物体系中一个比较常见的现象且热效应与光照强度有着很强的相关性[24, 25]。当用紫外光对偶氮苯囊泡进行照射时，不仅会产生光致异构，同时也会产生光热效应[26]。处于激发态的偶氮苯基团通过非辐射衰减而产生热作用，导致囊泡膜中的温度升高。当用 436nm 光进行照射时，偶氮分子会进行可逆的光致异构 *trans-cis-trans* 过程，热效应会更加明显。提高光照强度会增加激发态偶氮苯基团的数量，加速与之相应的光化学或者光物理过程[21]。因此在低光强下热效应不够显著，这或许可以解释偶氮苯囊泡的光致分裂过程在此时不会发生。

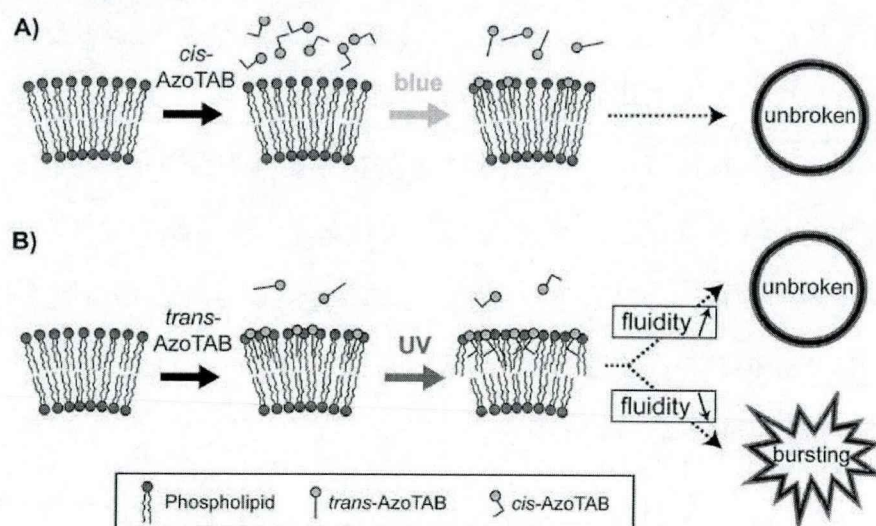


图 5.7 大尺寸偶氮囊泡的光致破裂机理[27]

偶氮苯基团在自组装时，疏水的偶氮基团会因非共价的芳香环-芳香环相互作用而在囊泡膜中形成紧密堆积。如图 5.7 所示，在紫外光照时，光致异构会破坏原先囊泡膜中偶氮分子的紧密堆积，使其堆积变松散。这使得膜中缺陷的产生，降低膜的机械稳定性。然而由光致异构所引起的缺陷并不足以导致囊泡的解体，因为解体需要克服聚合物链的缠绕以及表面自由能的增加。由光热效应所引起热扰动会增加聚合物链的运动，进一步破坏膜的稳定性。随着光照强度的增加，热效应的增强最终会导致膜的破坏。囊泡发生解体同时解体所产生的碎片由于疏水作用聚集在一起，重新组合成小的囊泡。当这些小囊泡被 532nm 光照射时，或者关闭紫外光源，热效应被终止同时顺式偶氮苯逐渐回到热力学稳定的反式结构。这些小囊泡开始逐渐融合并达到一个新的平衡态。在这里需要注意的是相比可见光，由紫外光照射所产生的小囊泡尺寸更加均一。这可以用光致异构引起囊泡膜的软化效应，有助于膜的变形和分裂。

5.5 本章小结

我们使用活性自由基聚合得到偶氮苯嵌段共聚物，在溶液中可以自组装得到微米级尺寸的囊泡。这种偶氮苯聚合物囊泡可以对紫外光和可见光都做出响应，

发生光致分裂且该过程部分可逆。通过调节光照强度或者光源波长,可以控制囊泡的分裂过程。为了研究囊泡分裂的机理,我们使用 LTRS 研究了单个囊泡在紫外光照下的异构化过程。结果表明光致异构不是囊泡分裂的唯一因素,光热效应对囊泡的分裂也有贡献。我们的发现为设计基于偶氮苯聚合物的光响应囊泡提供了一个新的途径,同时这也拓展了偶氮苯聚合物囊泡在生物系统里的实际应用。因为紫外光很容易在生物组织内被散射,并损伤细胞和组织。因此使用可见光控制囊泡的功能是比较理想的选择。

参考文献

1. Jung G H, Kim J K, Thinh P X, et al. Photo-controlled fabrication of honeycomb-patterned films in poly(N-vinylcarbazole/azobenzene) copolymer [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 2013, 272(6-17).
2. Koshiha Y, Yamamoto M, Kinashi K, et al. Photo-induced alignment behavior of azobenzene compound in thin film [J]. *Thin Solid Films*, 2009, 518(2): 805-809.
3. Xu Z D, Zhang Y, Chen X F, et al. Photo-induced magnetic anisotropy of polymer film containing azobenzene organic free radical group [J]. *Chinese Physics Letters*, 2003, 20(2): 240-242.
4. Wu P F, Rao D V G L N. Optimization of photo-induced molecular reorientation in azobenzene polymer film [J]. *Optical Materials*, 2003, 21(1-3): 295-299.
5. 王罗新, 王晓工. 偶氮苯顺反异构化机理研究进展 [J]. *化学通报*, 2008, 71(4): 101-107.
6. Xu Z D, Li Z, Ninulescu V, et al. Geometry control of photo-induced microstructures in an azobenzene polymer film [J]. *Chinese Physics Letters*, 2001, 18(3): 379-381.
7. Rutloh M, Zebger I, Hoffmann U, et al. Photo-induced orientation effects parallel and perpendicular to the polarization vector of the incident laser light observed in the same azobenzene-containing LC polymer film. [J]. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 1998, 216(U127-U127).
8. Jin H, Huang W, Zhu X, et al. Biocompatible or biodegradable hyperbranched polymers: from self-assembly to cytomimetic applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(18): 5986-5997.

9. Su W, Luo Y H, Yan Q, et al. Photoinduced fusion of micro-vesicles self-assembled from azobenzene-containing amphiphilic diblock copolymers [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2007, 28(11): 1251-1256.
10. Su W, Zhao H, Wang Z, et al. Sphere to disk transformation of micro-particle composed of azobenzene-containing amphiphilic diblock copolymers under irradiation at 436 nm [J]. *European Polymer Journal*, 2007, 43(2): 657-662.
11. Jin H B, Zhou Y F, Huang W, et al. Polymerization-like Multilevel Hierarchical Self-Assembly of Polymer Vesicles into Macroscopic Superstructures with Controlled Complexity [J]. *Langmuir*, 2010, 26(18): 14512-14519.
12. Li X, Yang H, Xu L M, et al. Janus Micelle Formation Induced by Protonation/Deprotonation of Poly(2-vinylpyridine)-block-Poly(ethylene oxide) Diblock Copolymers [J]. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2010, 211(3): 297-302.
13. Ting C L, Frischknecht A L. Activated pathways for the directed insertion of patterned nanoparticles into polymer membranes [J]. *Soft Matter*, 2013, 9(40): 9615-9623.
14. Sakai H, Imamura H, Kondo Y, et al. Reversible control of vesicle formation using electrochemical reaction [J]. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2004, 232(2-3): 221-228.
15. Song X D, Perlstein J, Whitten D G. Supramolecular aggregates of azobenzene phospholipids and related compounds in bilayer assemblies and other microheterogeneous media: Structure, properties, and photoreactivity [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119(39): 9144-9159.
16. Koizumi S, Hasegawa H, Hashimoto T. Ordered Structure of Block Polymer Homopolymer Mixtures Vesicle Formation and Macrophase Separation [J]. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia*, 1992, 62(75-91).
17. 王罗新; 虞新林; 许杰; 李松年; 王晓工. 顺反异构化对偶氮类含能化合物感度的影响 [J]. *物理化学学报*, 2008, 24(10): 1756-1760.
18. Wang G, Tong X, Zhao Y. Preparation of Azobenzene-Containing Amphiphilic Diblock Copolymers for Light-Responsive Micellar Aggregates [J]. *Macromolecules*, 2004, 37(24): 8911-8917.
19. Jiang J, Tong X, Zhao Y. A new design for light-breakable polymer micelles [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(23): 8290-8291.

20. Zhao Y. Photocontrollable block copolymer micelles: what can we control? [J]. *J Mater Chem*, 2009, 19(28): 4887-4895.
21. Kim H K, Wang X S, Fujita Y, et al. Reversible Photo - Mechanical Switching Behavior of Azobenzene - Containing Semi - Interpenetrating Network under UV and Visible Light Irradiation [J]. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2005, 206(20): 2106-2111.
22. Barrett C J, Mamiya J-i, Yager K G, et al. Photo-mechanical effects in azobenzene-containing soft materials [J]. *Soft Matter*, 2007, 3(10): 1249-1261.
23. Liu R, Liu J-f, Zhou X-x, et al. Applications of Raman-based techniques to on-site and *in vivo* analysis [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30(9): 1462-1476.
24. Walker R, Audorff H, Kador L, et al. Synthesis and Structure-Property Relations of a Series of Photochromic Molecular Glasses for Controlled and Efficient Formation of Surface Relief Nanostructures [J]. *Advanced Functional Materials*, 2009, 19(16): 2630-2638.
25. Bandara H D, Burdette S C. Photoisomerization in different classes of azobenzene [J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(5): 1809-1825.
26. Beharry A A, Wong L, Tropepe V, et al. Fluorescence imaging of azobenzene photoswitching in vivo [J]. *Angewandte Chemie*, 2011, 123(6): 1361-1363.
27. Diguët A, Yanagisawa M, Liu Y-J, et al. UV-induced bursting of cell-sized multicomponent lipid vesicles in a photosensitive surfactant solution [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(10): 4898-4904.

第六章 双组份囊泡的微相分离及光致异构速率

6.1 引言

聚合物囊泡, 经常被称作“polymersome”, 是一种在溶液中通过自组装过程人工制作的封闭的膜结构[1, 2]。聚合物囊泡的尺寸通常位于 0.1-10 微米区间, 表面膜的厚度在 10-20 纳米范围。由于聚合物囊泡具有高度的稳定性, 为我们研究先进功能材料提供了一个有力的工具和载体[3], 尤其是含有偶氮苯基团的聚合物囊泡, 由于在不同波长光照之下会发生顺反异构, 从而改变形貌[4-6], 这为我们实现光控的药物传输以及释放提供了潜在的工具。

二面体粒子, 又称作 Janus 粒子, 是指由具有不同的物理性质或化学性质的两半或两个半面构成的各向异性粒子。Janus 粒子可以分为三类: 聚合物颗粒、无机粒子和聚合物-无机二元复合颗粒[7-9]。由于 Janus 粒子具有两个或更多个不同组分的化学组成或不对称的形貌特点, 与传统具有对称性结构的粒子相比, Janus 粒子有着许多特殊的性能[10]。最近在工业和学术领域得到越来越多的关注, 例如它可以作为胶体表面活性剂、化学和生物传感、光子晶体、药物运送和控制释放系统等[11-13]。

制备二面体粒子的方法有很多种, 如微流体法、表面引发聚合、Pickering 乳液法、表面改性法、原位电化学法等。而制备聚合物不对称颗粒的最常用的原理是基于嵌段聚合物的相分离, 这些方法有多嵌段聚合物自组装、无机粒子诱导聚合物组装法、聚合物共混法等[14]。众所周知, 嵌段共聚物由于微相分离, 除了在本体和薄膜中能形成高度规则的微相结构, 还可以在选择性溶液中形成各种自组装结构, 如囊泡状、管状、洋葱状、棒状、球形、碗形、环形等[15]。嵌段共聚物的化学组成、分子量、嵌段比、聚合物浓度、溶剂的性质、温度等因素都会影响聚合物的组装过程, 进而影响组装体的形貌[16]。值得注意的是由两种

聚合物（两者区别可以是 AB/AC，也可以是 AB/CD，或者只是链长不同）组成的混合组装体也可以产生微相分离，从而分成成分不同的微区。聚合物的微区分相同样可以在由不同的共聚物组成的“patchy micelles” 中被发现[17]。近期，Caterina LoPresti 等人将不同成分的囊泡以不同比例混合，得到了含有大量的拥有不同表面微区的聚合物囊泡[18]，如下图 6.1 所示。这些微区形状很接近，但是尺度分布很广从纳米尺度一直到微米尺度都有分布，同时这些微区的维度跟囊泡的尺寸呈线性比例。该工作同时研究了这些微区随时间逐渐融合的演化过程。上述工作提供了一种行之有效的方法来控制囊泡的膜结构。

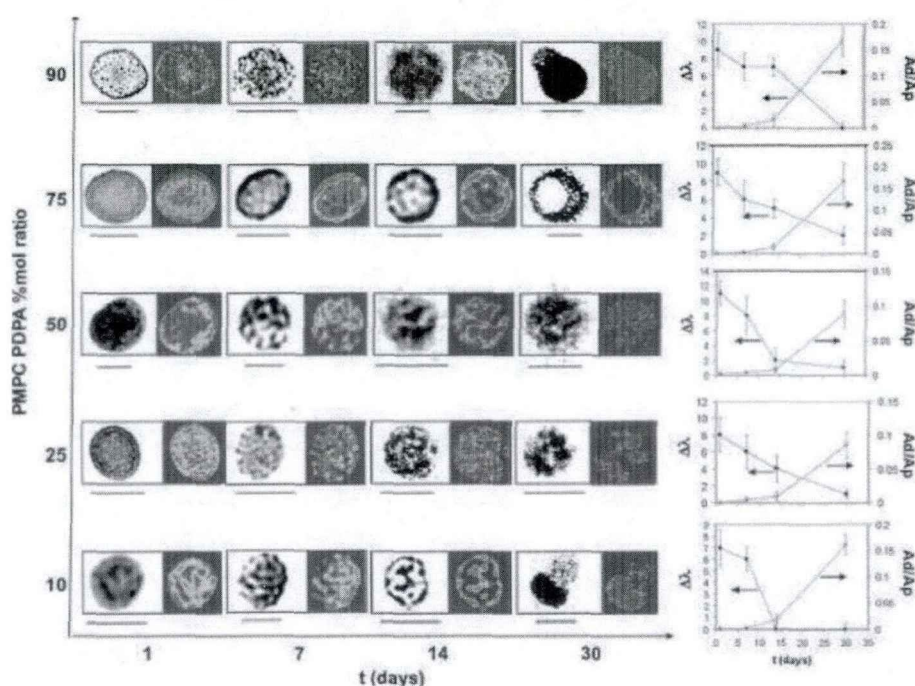


图 6.1 不同比例 PMPC₂₅-PDPA₇₀/PEO₁₆-PBO₂₂ 混合囊泡的粗粒化微区形貌及其演化

本实验是在前面实验观察到单组分囊泡出现 Janus 形貌的基础上，进一步研究一种新的双组份 Janus 囊泡的紫外光响应性质。我们首先利用 RAFT 方法制备了两种偶氮嵌段共聚物 PNIPAM-b-PAzoMO 和 PNIPAM-b-PAzPy。然后将它们同时加到 THF/H₂O 溶液中进行自组装，形成混合囊泡。然后观察混合囊泡的形貌变化以及紫外光响应性质。同时利用拉曼光镊系统探测混合囊泡的微区成分以及比较了几种囊泡的异构速率，并对观察结果的产生机理做了初步探讨。

6.2 研究背景

两嵌段聚合物 Janus 颗粒包括了胶束、棒状粒子、盘状粒子，囊泡等，如图 6.2 所示[19, 20]。结合本文的研究内容，在这里我们集中介绍不对称囊泡的制备。原理上，使用多价配体和多价的两亲性聚合物进行选择配位也可以诱导组装体产生分相。

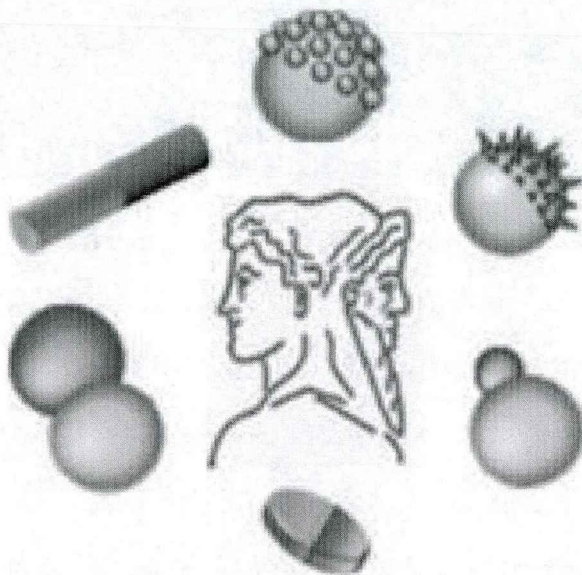


图 6.2 Janus 粒子形貌示意图

Christian Discher 等报道了使用配位结合的方法制备了表面带有斑点的囊泡、条状胶束和 Janus 囊泡[16]。他们使用了不同的多价离子对离子型聚合物进行配位桥接，在囊泡表面产生了斑点以及在柱状胶束内产生条纹，这种分相结构可以保持数年之久。他们发现钙离子只有在高离子浓度和 pH 值条件下才会诱导囊泡表面产生分相结构，而铜离子由于强的配位作用，容易在囊泡表面产生裂缝状分相结构。

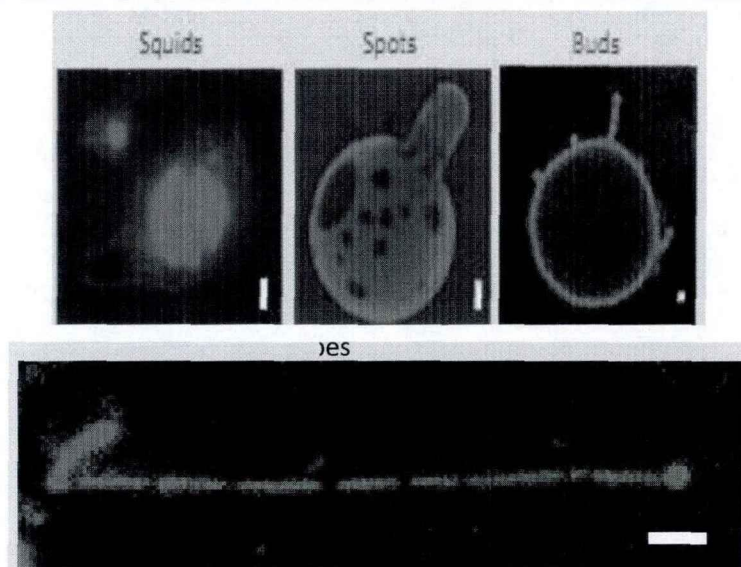


图 6.3 Discher 等观察到的 squids, spots, buds and stripes 囊泡形貌[16]

Wilson 等用二面体囊泡设计了一个纳米尺度的发动机引擎[18, 21]。他们制备了内部装有铂 (Pt) 纳米颗粒的碗状聚合物囊泡, 其表面有个孔洞。这种聚合物囊泡在含有双氧水的溶液中组装。由于铂催化双氧水分解生成氧气, 气体从囊泡表面的孔洞中溢出从而推动囊泡形成定向的运动。他们实验中 Janus 囊泡的制备方法是预先在 THF/二氧六环混合溶剂中溶解聚苯乙烯-聚乙二醇共聚物 (PS-PEG), 缓慢加入水形成囊泡, 再通过透析将有机溶剂移除。尽管 THF 和二氧六环 (DMF) 都可以从囊泡内穿过囊泡膜向外扩散, 但水分子却不能从外部透过囊泡膜, 所以囊泡内外的渗透压难以达到平衡。渗透压不平衡导致囊泡膜向内折叠, 形成口形的碗状结构。随着有机溶剂逐渐的移除, 聚苯乙烯分子链会逐渐硬化形成玻璃态, 囊泡膜逐渐丧失变形能力并将口形结构冻结住。铂纳米颗粒的包覆体可以在囊泡溶液透析前加入到体系中, 随着透析过程的进行将纳米颗粒负载到囊泡的空腔内。

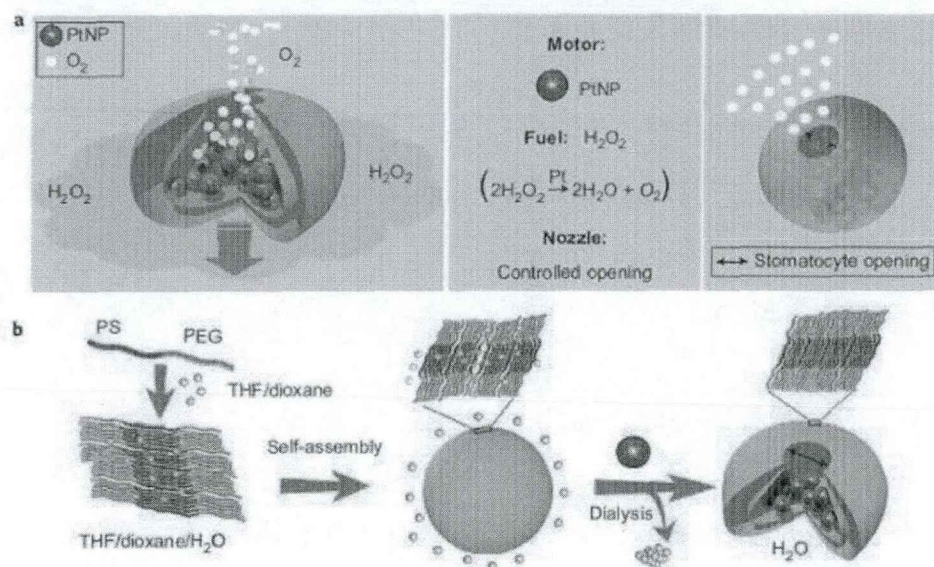


图 6.4 超分子纳米发动机的设计原理

6.3 实验研究

6.3.1 偶氮两嵌段共聚物合成

本实验所用的两种两嵌段偶氮聚合物分子分别为 PNIPAM₁₂₃-b-PAzoMO₅₀, Mw/Mn=1.27 和 PNIPAM₁₃₅-b-PAzPy₅₄, Mw/Mn=1.29。他们同样是利用 RAFT 方法聚合而成, 具体合成过程已经在前两章介绍过, 在此不再重复。其他试剂的处理方法也与前面的实验相同。

6.3.2 双组份混合囊泡样品制备

将不同质量比的 PNIPAM-b-PAzoMO 和 PNIPAM-b-PAzPy 配制成总浓度为 2mg/ml 的 THF 溶液, 向溶液中以约 5 μ L/s 的速度缓慢滴加去离子水, 边滴边轻轻摇晃, 直到水的体积分数达到 50% 为止。组装好的混合溶液在 25 $^{\circ}$ C 下避光放置至少 24h, 使溶液内的组装过程达到平衡状态, 然后才能用来做下一步实验。

6.3.3 混合偶氮囊泡表征及测试方法

本实验使用的表征方法主要为拉曼光谱探测以及显微图像观察,所使用的拉曼光镊设备也在第二章中有详细描述。

6.4 结果及分析

6.4.1 二元偶氮聚合物囊泡的微相分离

为了在混合囊泡表面产生分相我们选择了具有相同亲水链段、不同疏水链的两种嵌段偶氮共聚物 PNIPAM₁₃₅-b-PAzPy₅₄ 和 PNIPAM₁₂₃-b-PAzoMO₅₀, 它们的疏水嵌段化学结构和分子量都不相同。在制备囊泡时,按不同质量比将这两种聚合物共同溶解于 THF 中,水作为沉淀剂缓慢加入到体系中。混合完毕后避光静置 24 小时,可以观察到杂化囊泡的形成。图 6.5 中显示的是嵌段共聚物按质量比为 1:1 共混时,制备的双组分杂化囊泡,可以观察到杂化囊泡的表面分成对比度有明显差异的两个区域。为了进一步确定微区的组成,我们使用 LTRS 对微区进行了原位观察。图 6.5 b 和 c 分别是暗区和明区各自的拉曼光谱。我们将这两张拉曼光谱图和单组分的囊泡的光谱图做了比较,结果确定暗区的组成是 PNIPAM-b-PAzoMO, 明区的组成是 PNIPAM-b-PAzPy。

表 6.1 两种偶氮聚合物的拉曼峰位移及其归属

PNIPAM-b- PAzoMO		PNIPAM-b-PAzPy	
拉曼位移(cm ⁻¹)	归属	拉曼位移(cm ⁻¹)	归属
--	--	997	CCC bend
1158	CN stretch	1158	CN stretch
--	--	1197	CNN bend
1210	CNN bend	--	--
1446	NN stretch	1446	NN stretch

续表

PNIPAM-b-PAzoMO	PNIPAM-b-PAzPy	拉曼位移 (cm ⁻¹)	归属
-----------------	----------------	-----------------------------	----

两个微区的拉曼光谱峰的归属列于表 6.1 当中。可以发现这些拉曼峰均来自反式偶氮异构体的分子振动。其中 916cm⁻¹ 的拉曼峰来自于溶剂 THF。我们将这个峰作为拉曼光谱的内标峰。由于各个相区的拉曼光谱和他们各自形成的纯聚合物囊泡的拉曼谱图是一致的，因此这说明了在杂化囊泡的形成过程中，两种疏水偶氮苯嵌段由于不相容而在囊泡表面形成了相分离。

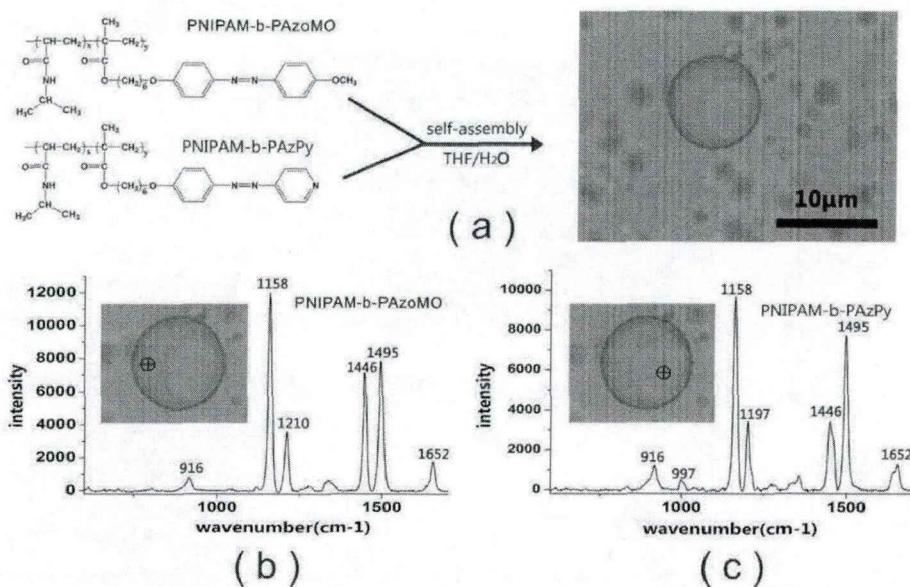


图 6.5 双组份混合囊泡的组装过程以及相应微区的拉曼信号

图注：十字为光阱中心所在位置

我们进一步通过调节两种嵌段共聚物共混时的质量比，对囊泡的形貌进行了调控。图 6.6 中显示的是 PNIPAM-b-PAzPy 在共混物中比例从 10%到 90% 时，囊泡的形貌变化。PNIPAM-b-PAzPy 所形成的微相区域在杂化囊泡的表面总是倾向于形成圆形区域，这使得他们比较容易辨认。这可能源于两个区域的表面张力系数存在差别。偶氮吡啶区域的边界呈圆形是因为此时边界上的线性张力能量最小

[22], 而处于一种平衡状态。随着 PNIPAM-b-PAzPy 含量的提高, 更多的 PAzPy 嵌段引入到囊泡膜内, PNIPAM-b-PAzPy 相区的面积也不断提高, 由图 6.6 可以看出 PAzPy 微区比率的与 PAzPy 的质量比率成正比。偶氮吡啶聚合物含量在 40%~60% 时, PNIPAM-b-PAzPy 相区在囊泡表面总是偏向一侧。混合囊泡在溶液中采取这种空间构象的原因可能是由相分离所引起的囊泡表面的密度不均匀分布。囊泡在重力作用下发生旋转从而使其重心降低。需要说明的是偶氮吡啶相区在质量分数低于 40% 时, 它的颜色相对比较暗。该现象主要是 PNIPAM-b-PAzPy 相区在显微镜下离焦所造成的。

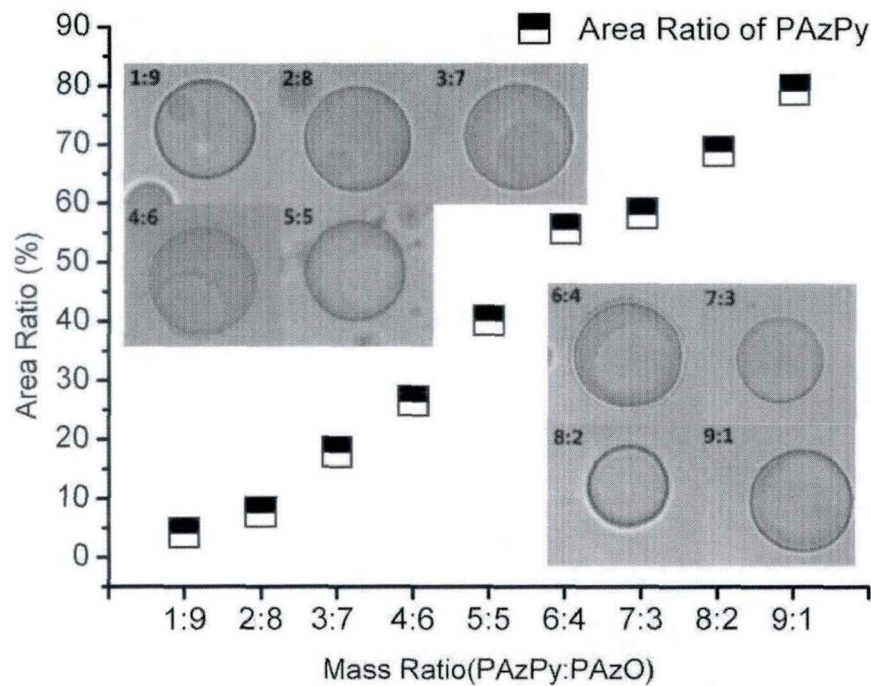


图 6.6 PAzPy 在双组份混合囊泡中所占的面积比率随组分比率的变化以及不同组分质量比例构成的二元杂化囊泡的显微照片

6.4.2 光致共聚物二元偶氮囊泡运动

在前面的实验中, 我们发现 PNIPAM-b-PAzPy6 组装的单组分囊泡可以在紫外光照射下发生可逆的伸缩膨胀[23], 而 PNIPAM-b-PAzoMO 组装的单组分囊泡在紫

外和可见光照下都会发生光致分裂[24]。这个实验中，我们同样关心杂化囊泡各区域的光响应行为。如图 6.7 所示，我们使用功率密度为 $0.5\text{mW}/\text{cm}^2$ ，波长 365nm 的紫外光照射 Janus 囊泡(质量比 1:1)。当观察单个杂化囊泡时，PNIPAM-b-PAzPy 微区没有发生膨胀行为，同时 PNIPAM-b-PAzoMO 微区也没有光分裂行为发生。这说明分相对于混合囊泡不同区域的光响应产生了极大的影响。偶氮吡啶区域在光照下会从囊泡的一侧向中心区域移动大约不到 3s 时间，该区域运动到达平衡位置；撤去紫外光时或者采用 532nm 光照射，吡啶微区从中心逐渐移动到一侧，回复时间大约为 150s。使用 436nm 光照射也可以引起这种现象，并且该回复过程是可逆的。

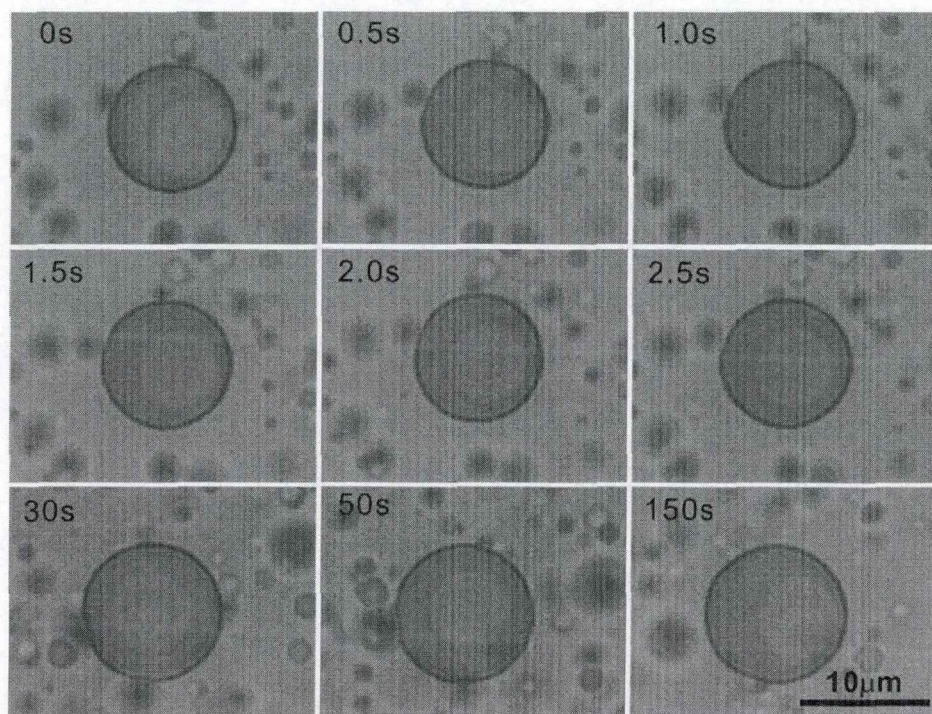


图 6.7 365nm 紫外线照射下偶氮吡啶区域在双组分混合囊泡(质量比 1:1)表面旋转运动。

图注：紫外灯打开时间在 0.5s，关闭时间在 3s。

基于以下考虑，我们推断这种可逆的光致运动是由偶氮苯的光致顺反异构过程导致的。首先偶氮苯嵌段在囊泡膜中会形成紧密的堆积，紫外光照或可见光 436nm 光照时偶氮苯分子从原先的伸展的 *trans* 构象向弯曲的 *cis* 构象转变，这

会打破偶氮分子的紧密堆积,使得囊泡表面积产生扩张,分相区域的密度从而降低。其次由于各个微相区域的异构化速率存在差异(见下文LTRS探测结果分析)以及聚集程度的不同,杂化囊泡的膜密度分布必然发生变化进而影响囊泡的重心转移,使相区发生移动。众所周知,不溶于水的偶氮嵌段部分收缩于囊泡双层膜的内部,在吡啶偶氮聚集区域内可能存在偶氮分子的液态有序相[25](Lo, liquid ordered),在紫外线的激发下,松散的反式偶氮构象倾向于形成液态无序相(Ld, liquid disordered)。当紫外光关闭或使用532nm光源照射时,偶氮苯分子从cis构象向热力学稳定的trans构象转变,又重新形成液态有序相。偶氮苯基团由松散堆积逐渐向紧密堆积转变,杂化囊泡表面的分子重新分布,建立新的平衡状态,微相区又移动回到初始状态。整个回复过程所需要的时间比光诱导微相区移动的时间长的多,这说明液相有序态向液相无序态转变,比液相无序态向液相有序态转变的速度进行快很多。

6.4.3 二组分混合囊泡和单组份偶氮囊泡的异构速率

我们使用拉曼光镊系统测量了混合囊泡和纯囊泡中偶氮基团的光致可逆顺反异构的反应速率。实验中我们使用三种紫外光功率(0.5, 1.0, 1.5mW/cm²)来激发偶氮基团的trans-cis异构过程。我们以1帧/秒的采集速率探测了囊泡的拉曼信号随时间的变化过程。图6.8a, b分别是偶氮吡啶和甲氧基偶氮苯组装的单组分囊泡在1.0mW/cm²功率紫外光照下的拉曼信号变化过程。由此图可以看出偶氮的反式拉曼峰(1158, 1197, 1446, 1495, 1652cm⁻¹)在紫外灯打开后迅速降低。而顺式拉曼峰(1519 cm⁻¹)则增长到一个稳定的值。他们同时在3s左右的时间达到新的平衡状态。

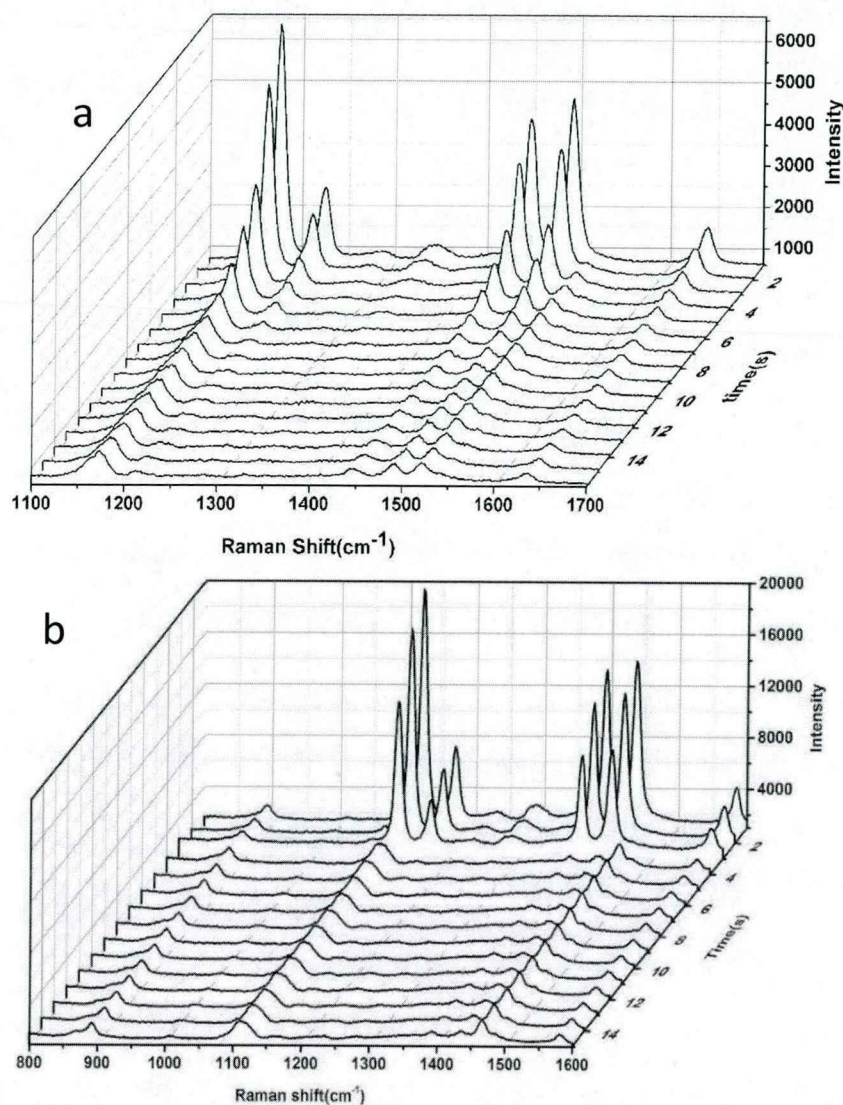


图 6.8 紫外光照下单组份偶氮吡啶以及甲氧基偶氮苯囊泡拉曼信号随时间的变化

图注：紫外灯在 0.5S 时打开，功率 $1.0\text{mW}/\text{cm}^2$ 。a 偶氮吡啶单组分囊泡，b 甲氧基偶氮苯单组分囊泡

我们可以用下面的方法来定量计算偶氮基团的光致顺反异构度：

$$D(t) = \frac{I(0) - I(t)}{I(0)} \quad (6.1)$$

其中 $D(t)$ 为偶氮光致异构度随时间变化的函数。 $I(t)$ 为反式偶氮构象的拉曼峰 1495cm^{-1} 的强度随时间变化的函数。 $I(0)$ 为紫外灯打开之前反式偶氮构象拉曼峰强度。

图 6.9a 和 b 显示的是混合囊泡的两个区域两种偶氮基团的异构度随时间的变化曲线。由图可知该曲线是指数增长函数曲线，依据文献[26, 27]我们可以用下面公式表达：

$$D(t) = D(0) + A * e^{\frac{t-t_0}{t_c}} \quad (6.2)$$

其中 $D(t)$ 是光致异构度随时间变化的函数， t_c 是表征偶氮苯异构速率的特征时间； A 和 t_0 是指数函数的拟合参数。我们通过 Origin 使用最小二乘法来拟合异构度随时间演化函数。

图 6.9c 显示的是我们通过拟合得到的异构度演化的特征时间。通过分析，很容易看出：对于所有的囊泡，光致异构速率随着激发 UV 光功率密度的增加而成比例的加快。对于单组份偶氮囊泡紫外线功率对囊泡的最终异构度的影响很小。而对于二元杂化囊泡的 PNPAM-b-PAzoMO 区域的最终稳定状态的异构度却随着 UV 激发功率的增加而略有增加，目前还不太清楚是什么原因造成的。另外二元杂化囊泡的异构速率慢于相应组分组装的单组分囊泡。在我们的测量中 PAzPy 区域的异构特征时间比 PAzoMO 的长，这说明 PAzPy 的化学稳定性比 PAzoMO 要高一些，因而异构态转化稍微困难些。因为囊泡的壁厚只有几十个纳米，所以偶氮聚合物分子聚集在囊泡膜内会受到很强的束缚作用，这会影响偶氮分子在膜内的聚集形式[15]。微区的束缚作用更强一些，倾向于聚集成 Lo 相，这种有序相会减慢异构的反应过程。异构速率随 UV 激发光功率增加而变快可以这样解释：偶氮分子的强光照射下，发生顺反异构的几率会增加，因而单个囊泡膜内变成顺式不稳定构象的偶氮分子增多。而偶氮吡啶在囊泡上呈收缩的圆形区域与其较慢的异构速率相对应，这说明对于化学稳定的化学基团，倾向于聚集成更加稳定的状态，从而对外界的刺激变得不太敏感。

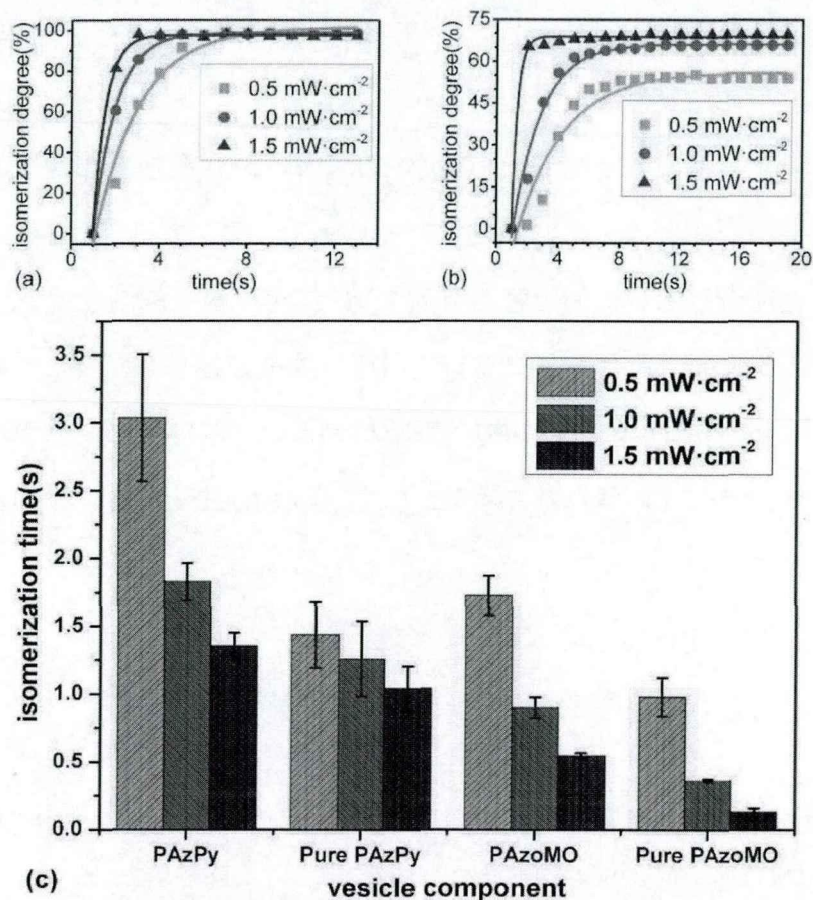


图 6.9 不同功率紫外光照(0.5, 1.0, 1.5mW/cm²)下单组分囊泡和混合囊泡的异构度随时间的变化以及不同组分囊泡异构度随时间演化的特征时间

图注: a 混合杂化偶氮囊泡的 PNIPAM-b-PAzPy 区域光致异构度演化曲线; b 混合杂化偶氮囊泡的 PNIPAM-b-PAzoMO 区域光致异构度演化曲线; c 不同组分囊泡偶氮基团异构特征时间比较: PAzPy 表示混合囊泡的 PNIPAM-b-PAzPy 区域, PAzoMO 表示混合囊泡的 PNIPAM-b-PAzoMO 区域, Pure PAzPy 表示 PNIPAM-b-PAzPy 组装的单组份囊泡, Pure PAzoMO 表示 PNIPAM-b-PAzoMO 组装的单组份囊泡

6.5 本章小结

我们用两种含偶氮苯的嵌段共聚物 PNIPAM-b-PAzoMO 和 PNIPAM-b-PAzPy 的 THF 溶液共混后, 然后加水, 组装制备了光响应不对称的杂化囊泡。这种囊泡的两种组分区别仅仅是疏水链段的侧链偶氮基团 (及 AB/AC)。此二元杂化囊泡的表面形成了明显的微相分离, 它的形貌可以通过调节嵌段共聚物混合

时的质量比进行调控。同时在 365nm 和 436nm 光照射下, 微相区可以发生移动。该现象我们用光诱导囊泡表面密度分布的改变来解释。利用拉曼光镊技术, 我们研究微区的化学组成以及光致异构速率, 结果发现混合囊泡中相应区域的光致异构速率比单组分的囊泡速率慢, 这说明相分离对光致异构有着很强的抑制作用。

通过调控偶氮苯囊泡的两种组分质量比例, 可以极大的改变囊泡的形貌和光响应性质。目前对于其中的有些现象我们还不能很好地加以解释, 如相分离的如何产生, 分相对于偶氮苯光致异构的影响机制等。目前对于二面体囊泡的光响应性质的解释大部分还停留在推测阶段, 要发掘其中的机理还需要我们付出更多的努力。

参考文献

1. Jung M, Hubert D H W, Bomans P H H, et al. New vesicle-polymer hybrids: The parachute architecture [J]. *Langmuir*, 1997, 13(26): 6877-6880.
2. Meier W, Hotz J. Vesicle-templated polymer hollow spheres. [J]. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 1998, 215(U421-U421).
3. Zhu H S, Geng Q R, Chen W Q, et al. Antibacterial high-genus polymer vesicle as an "armed" drug carrier [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1(40): 5496-5504.
4. Tang Y C, Wang Z N, Xiao J W, et al. Studies of Phospholipid Vesicle Deposition/Transformation on a Polymer Surface by Dissipative Quartz Crystal Microbalance and Atomic Force Microscopy [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2009, 113(45): 14925-14933.
5. Yan Q, Su W, Chen Y L, et al. Reversible modulation in luminescence intensity of a single vesicle composed of diblock azo-copolymer and tris(dibenzoylmethanate)(phenanthroline)europium(III) [J]. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, 71(5): 1644-1647.
6. Li N, Wang X G. Hollow and Vesicle-Like Aggregates of an Amphiphilic Azo Random Copolymer Bearing Branched Azobenzene Side Chains [J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2013, 4): 549-555.

7. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, et al. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(42): 39469-39475.
8. Nicholson G M, Gaudins A. Spiders of medical importance in the Asia-Pacific: Atracotoxin, latrotoxin and related spider neurotoxins [J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2002, 29(9): 785-794.
9. Sevink G J A, Zvelindovsky A V. Mesoscopic dynamics of complex vesicle formation: kinetic versus thermodynamic factors [J]. *Molecular Simulation*, 2007, 33(4-5): 405-415.
10. Li X, Yang H, Xu L M, et al. Janus Micelle Formation Induced by Protonation/Deprotonation of Poly(2-vinylpyridine)-block-Poly(ethylene oxide) Diblock Copolymers [J]. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2010, 211(3): 297-302.
11. Han Y Y, Cui J, Jiang W. Vesicle Structure and Formation of AB/BC Amphiphile Mixture Based on Hydrogen Bonding in a Selective Solvent: A Monte Carlo Study [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116(30): 9208-9214.
12. Arai N, Yasuoka K, Zeng X C. A vesicle cell under collision with a Janus or homogeneous nanoparticle: translocation dynamics and late-stage morphology [J]. *Nanoscale*, 2013, 5(19): 9089-9100.
13. Li W, Gunton J D. Self-Assembly of Janus Ellipsoids II: Janus Prolate Spheroids [J]. *Langmuir*, 2013, 29(27): 8517-8523.
14. Willerich I, Grohn F. Thermodynamics of Photoresponsive Polyelectrolyte-Dye Assemblies with Irradiation Wavelength Triggered Particle Size [J]. *Macromolecules*, 2011, 44(11): 4452-4461.
15. Deng Y H, Li Y B, Wang X G. Colloidal sphere formation, H-aggregation, and photoresponsive properties of an amphiphilic random copolymer bearing branched azo side chains [J]. *Macromolecules*, 2006, 39(19): 6590-6598.
16. Christian D A, Tian A W, Ellenbroek W G, et al. Spotted vesicles, striped micelles and Janus assemblies induced by ligand binding [J]. *Nature materials*, 2009, 8(10): 843-849.
17. Mukherjee S, Maxfield F R. Membrane domains [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20(839-866).

18. LoPresti C, Massignani M, Fernyhough C, et al. Controlling polymersome surface topology at the nanoscale by membrane confined polymer/polymer phase separation [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(3): 1775-1784.
19. Zhao Y. Light-Responsive Block Copolymer Micelles [J]. *Macromolecules*, 2012, 45(9): 3647-3657.
20. Hu J L, Weikl T R, Lipowsky R. Vesicles with multiple membrane domains [J]. *Soft Matter*, 2011, 7(13): 6092-6102.
21. Wilson D A, Nolte R J, van Hest J C. Autonomous movement of platinum-loaded stomatocytes [J]. *Nature Chemistry*, 2012, 4(4): 268-274.
22. Baumgart T, Hunt G, Farkas E R, et al. Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2007, 1768(9): 2182-2194.
23. Shen G Y, Xue G S, Cai J, et al. Photo-induced reversible uniform to Janus shape change of vesicles composed of PNIPAM-b-PAzPy2 [J]. *Soft Matter*, 2013, 9(8): 2512-2517.
24. Chen K, Xue G, Shen G, et al. UV and visible light induced fission of azobenzene-containing polymer vesicles [J]. *Rsc Advances*, 2013, 3(22): 8208-8210.
25. Wu Y, Stefl M, Olzyska A, et al. Molecular rheometry: direct determination of viscosity in Lo and Ld lipid phases via fluorescence lifetime imaging [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013,
26. Zimmerman G, Chow L-Y, Paik U-J. The Photochemical Isomerization of Azobenzene [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80(14): 3528-3531.
27. Kumar G S, Neckers D. Photochemistry of azobenzene-containing polymers [J]. *Chemical Reviews*, 1989, 89(8): 1915-1925.

第七章 偏振拉曼光谱探测囊泡表面偶氮基团的取向

拉曼光谱是一种广泛应用的材料表征以及化学分析手段[1-4]。然而经典的拉曼分析常常忽略激发光的偏振特性。为了进一步得到更多的光谱信息,偏振拉曼探测手段逐渐发展起来,它通过调控激发光的偏振方向,可以为探测疲劳材料提供重要的应力分布信息。这项技术还可以测量受到外力压迫双轴样品的微电子结构的变化[5]。这种技术也适用于纳米管薄膜材料的探测,例如探测纳米膜内分子的取向及结构。与其他探测分子取向的方法比如 X Ray 布拉格散射,中子小角度衍射等相比,这种方法具有很高的分辨率($\sim 100\text{nm}$)和灵敏度,而需要的样品量很少,而且处理简单等优点。

偶氮异构体具有光响应特性。在偏振光照射下,它可以在 trans 和 cis 之间转换。Trans 异构态的吸收截面具有很强的各向异性,吸收强度随激发光偏振角度变化而变化。然而 cis 异构态的吸收各向异性系数很低。因此,在光照时 trans 异构态的分子其方向和密度都会发生变化,即光活性很高。偶氮生色团的光致取向重组吸引了众多研究组进行广泛的研究[6-10]。

本章内容主要描述了通过在拉曼系统中加入偏振光学元件(半波片)形成偏振可控的拉曼探测设备,然后探测偶氮囊泡表面偶氮基团的取向。由于紫外光可以诱导偶氮基团的顺反异构,因此偶氮基团的取向与紫外激发光的偏振方向紧密相关。我们通过将紫外光过滤成偏振光后,再来激发偶氮囊泡,来观察紫外光方向对基团取向的影响。

7.1 偏振拉曼光谱探测的理论模型

众所周知,经典的拉曼散射理论表明[11, 12]:拉曼光谱(非共振)的远场散射强度依赖于拉曼散射张量以及散射方向的几何夹角,可以用下式表达:

$$I \propto (e_\gamma^i \alpha'_{\gamma\beta} e_\beta^s)^2 \quad (7.1)$$

其中 I 为拉曼信号强度, e_γ^i 和 e_β^s 是单位极化矢量。 γ 和 β 分别是激发光的电场矢量方向和拉曼散射光的矢量方向; $\alpha'_{\gamma\beta}$ 为被探测分子的拉曼张量, 里面包含分子的振动信息。

对于柱状对称的偶氮生色团和共振拉曼散射过程[13], 分子极化张量可以表示为以下对角化的形式:

$$\vec{\alpha}_{\gamma\beta} = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_1 & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_1 & 0 \\ 0 & 0 & \alpha_3 \end{bmatrix} \quad (7.2)$$

其中 α_1 和 α_2 分别是表征垂直于分子主轴极化方向 (\perp) 以及平行于分子主轴极化方向 (\parallel) 的维像系数, 主要由材料分子的介电常数决定。

对于标准的拉曼散射探测[14], 通常使线性偏振激发光或者平行于分子极化方向(\parallel)或者垂直于分子极化方向(\perp), 由单位体积内含有 N 个偶氮染料分子的各项同性的样品产生的后向散射拉曼辐射的强度为:

$$I_{xx}^{\perp,0} \propto \langle \alpha_{xx}^2 n_T \rangle = \frac{N}{15} (8\alpha_1^2 + 3\alpha_3^2 + 4\alpha_1\alpha_3) = I_{yy}^{\parallel,0} \quad (7.3)$$

$$I_{xy}^{\perp,0} \propto \langle \alpha_{xy}^2 n_T \rangle = \frac{N}{15} (\alpha_1^2 + \alpha_3^2 - 2\alpha_1\alpha_3) = I_{yx}^{\parallel,0} \quad (7.4)$$

基于偏振激光会导致各向异性的理论[12]: 对于稳态过程, 即 n_T 不随时间改变时, 假定反式偶氮分子的角向分布函数由 AHB (angular hole burning) 过程决定, 可以由下面公式表示:

$$n_T(\theta) \cong \frac{N(1-E \cos^2(\theta_p))}{4\pi} \quad (7.5)$$

其中 θ_p 为激发光偏振方向和分子主轴的夹角。 $E = \mu I/\nu$ 为泵浦密度, 依赖于两个因子 $\mu \sim 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{mJ}$, $\nu \sim 0.1 \text{ s}^{-1}$ 和 $I \sim 10^2 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 为激光功率密度。

7.2 实验设备及材料方法

拉曼光谱设备的具体构成在第二章已经详细介绍过了，在此不再重复。本章实验中为了提高设备的空间分辨率，更进一步探测囊泡的表面性质即偶氮基团在膜内的取向，我们在系统中加入了如下几个光学器件：(1)在激光器进入显微镜前加入一片半波片（ $\lambda/2$ ）。由于激光器出射的激光为水平方向的线偏光，经过半波片后，其偏振方向会随着半波片的旋转而旋转，其转过的角度为偏振片转过角度的两倍。从而能够实现激发光偏振方向的自由控制；(2)我们在紫外激发光前加入一片偏振滤片，由于紫外光是由汞灯提供为非相干光，其偏振方向各项同性。紫外激发光经过偏振片后，被过滤成只含有沿一个方向偏振的光；(3)在拉曼光谱收集光路上我们加入了一个检偏器（偏振片），可以探测激发光偏振方向改变后拉曼光谱信号偏振角度的变化。

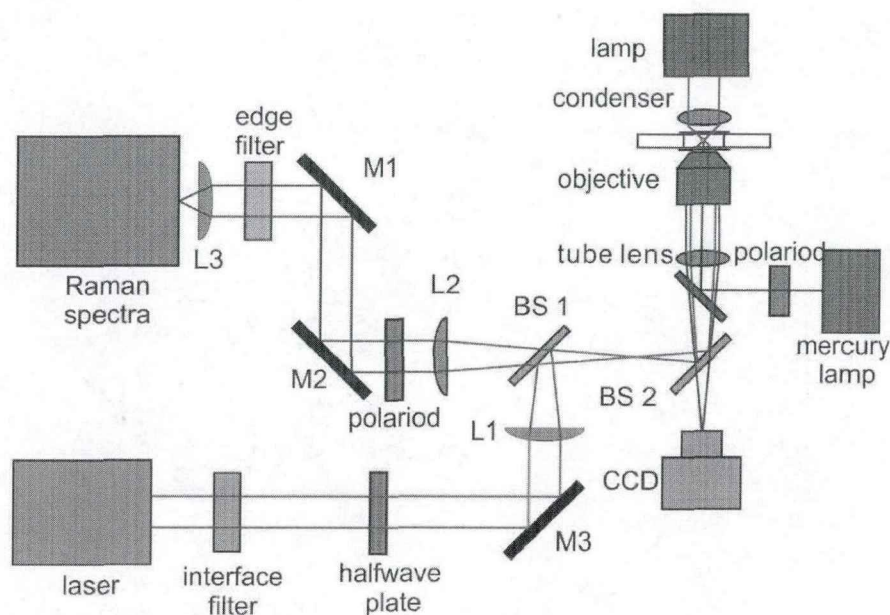


图 7.1 偏振拉曼光谱设备示意图

图注：半波片改变激发光偏振方向；偏振片选择紫外光的偏振方向。

偶氮囊泡的制备过程在前面几章中已经做了详细介绍,在此不再重复。我们在本次实验中分别对 PNIPAM-b-PAzPy2 和 PNIPAM-b-PAzPy6 组装的偶氮囊泡表面进行了探测。

7.3 实验结果及讨论

通过实验部分描述的方法我们成功制备了偶氮聚合物囊泡,并使用偏振拉曼光镊设备对其进行了探测。如图 7.2 所示:我们通过旋转半波片激发光偏振角度发生旋转,半波片每旋转 15° ,测量一次囊泡的拉曼信号的强度,由于激发光的偏转角度为半波片的两倍,因此拉曼信号在激发光每旋转 30° 时测量一次。发现拉曼信号随激发光偏振角度的旋转发生周期性变化。拉曼峰的归属在前面几章也有描述,在此不再重复说明。同样我们针对 1417cm^{-1} (N=N 伸缩振动)处的拉曼峰的强度变化进行了分析如图 7.3 所示。

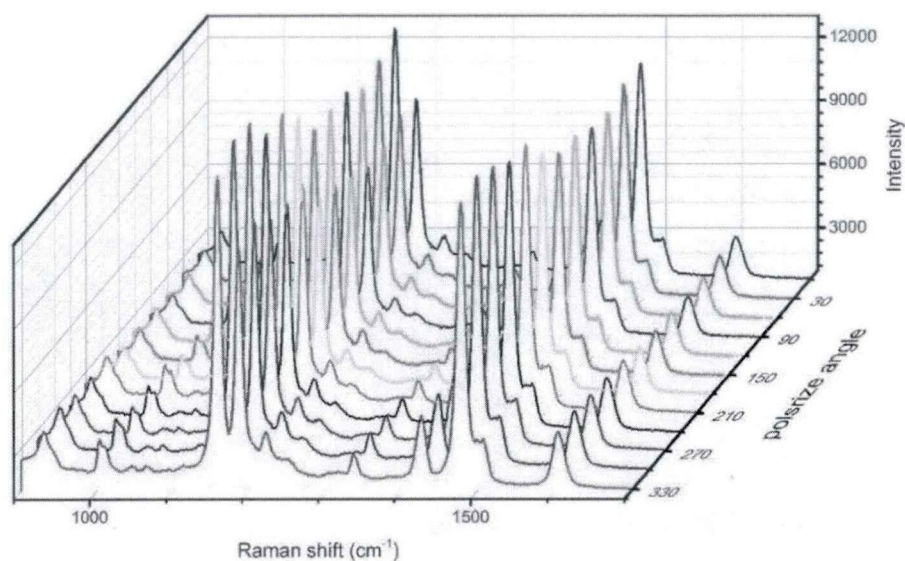


图 7.2 space6 组装偶氮囊泡拉曼信号($800\text{-}1800\text{cm}^{-1}$)强度随激发光(785nm)偏振角度的变化

基于文献中给出的理论模型[15, 16]:拉曼散射的强度在分子主轴的方向与激发光偏振方向垂直时才能达到最大值,而两者平行时拉曼强度会降到最低。由

于我们使用的是倒置显微镜激发光自下而上照射，因此偏振方向时绕着 Z 轴旋转。由图 7.3 可以看出：在偏振紫外光打开之前，当激发光偏振角度在 X-Y 平面内与 X 轴 30° 时，膜内的偶氮分子的拉曼强度达到最大。当紫外光($1.5\text{mW}/\text{cm}^2$) 打开后，偶氮分子产生拉曼信号最强的位置变成了与 X 轴夹角 45° 。这说明线偏振的紫外光会使偶氮分子的主轴发生旋转，即偶氮分子会重新取向，其示意图如图 7.4 所示。对于间隔基长度为 6 时，囊泡表面的偶氮分子拉曼信号退偏比为 0.87，当间隔基长度为 2 时，拉曼信号的退偏比会上升到 0.92，即两个垂直方向的拉曼信号强度差异缩小。这是由于各向同性的 cis 异构态存在，使拉曼峰在 trans 异构态偶氮分子吸收最弱的方向依然很强。

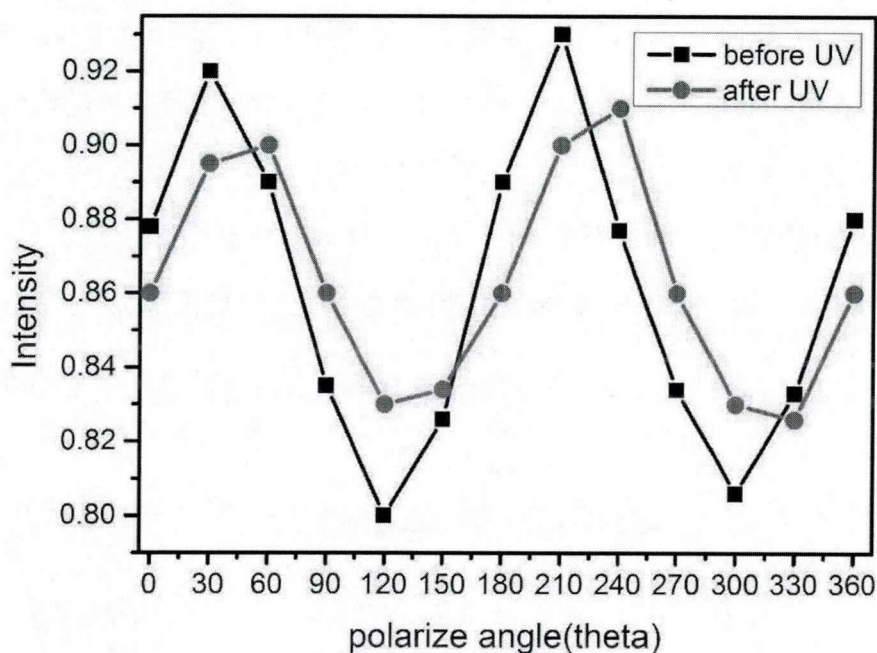


图 7.3 相对波数 1417cm^{-1} (N=N 伸缩振动)处拉曼峰强度随激发角度的变化

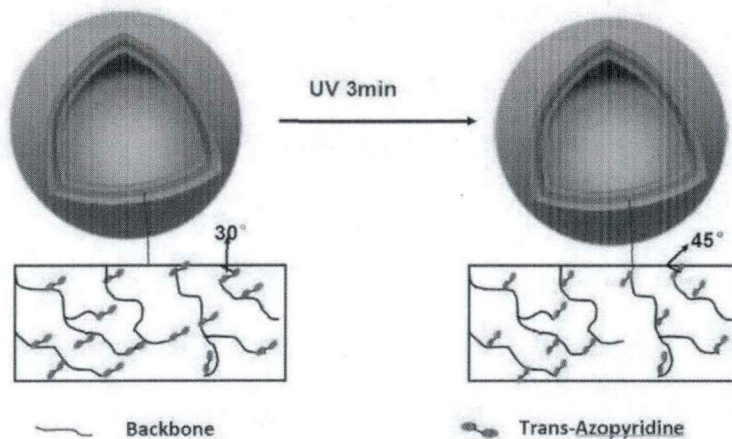


图 7.4 偶氮囊泡膜内分子光致重新取向示意图

为了进一步探测偶氮囊泡表面的分子取向，我们针对囊泡的 5 个不同部位，分别探测了其偶氮分子取向。探测结果如图 7.5 所示。由图可知：囊泡的前，中，后三个部位的拉曼信号在 90° 是达到最强，这意味着囊泡表面的偶氮基团振动方向垂直于 X 轴。而囊泡的左侧部位拉曼信号在 60° 时最强，而对称的右侧部位的拉曼信号在 120° 达到最强，这两部分取向互补意味着囊泡的偶氮基团取向在囊泡表面相对于等价代换的球坐标系是一致的，如图 7.6 所示。

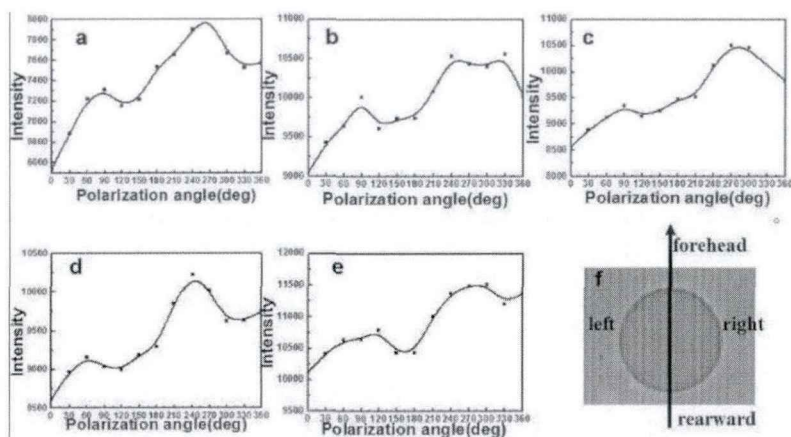


图 7.5 偶氮囊泡表面不同部位的偶氮分子在紫外光照下相对波数 1417cm^{-1} 处拉曼谱峰的强度变化

图注：囊泡坐标示意图：a 靠后部位 b 靠前部位 c 靠左部位 d 靠右部位 e 中心部位 f 囊泡方位示意图

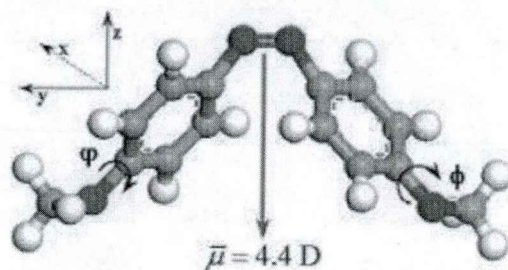


图 7.6 囊泡体系等价代换到球坐标示意图

7.4 本章小结

本章我们通过在原拉曼光谱系统加入偏振光学元件（偏振片，半波片等）使系统具备了偏振探测功能，提高了系统的空间分辨率。我们利用这一改进，对 PNIPAM-b-PAzPy2 和 PNIPAM-b-PAzPy6 组装的囊泡表面分子取向进行了探测。通过偏振拉曼探测，我们发现：偶氮囊泡表面的分子呈特定取向，并对这一趋向特征形成的机理，进行了初步探讨。另外间隔基长度在影响异构度的同时，也会对拉曼信号的退偏比产生影响：随着间隔基增长，退偏比变小。由于我们对这一现象的形成还难以形成有力的解释，需要提供更多的实验证据。

参考文献

1. Yakovlev V V. Biochemical applications of nonlinear optical spectroscopy [M]. Boca Raton: CRC Press, 2009.
2. Lasch P, Kneipp J. Biomedical vibrational spectroscopy [M]. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2008.
3. Torimitsu K. Applications of raman spectroscopy in biology : from basic studies to disease diagnosis [M]. Washington, DC: IOS Press, 2012.
4. Lehn J. Supramolecular chemistry [J]. Science, 1993, 260(5115): 1762-1763.
5. Jones J L, Hoffman M. Determination of domain orientation in lead zirconate titanate ceramics by Raman spectroscopy [J]. Applied Physics Letters, 2006, 88(16): 162903-162903-162903.

6. Kobayashi H, Koumoto K, Jung J H, et al. Sol-gel phase transition induced by fiber-vesicle structural changes in sugar-based bolaamphiphiles [J]. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 2002, 11): 1930-1936.
7. Hamada T, Sato Y T, Yoshikawa K, et al. Reversible photoswitching in a cell-sized vesicle [J]. *Langmuir*, 2005, 21(17): 7626-7628.
8. Jog P V, Gin M S. A light-gated synthetic ion channel [J]. *Organic Letters*, 2008, 10(17): 3693-3696.
9. Liu Y C, Le Ny A L M, Schmidt J, et al. Photo-Assisted Gene Delivery Using Light-Responsive Catanionic Vesicles [J]. *Langmuir*, 2009, 25(10): 5713-5724.
10. Ran X, Wang H T, Zhang P, et al. Photo-induced fiber-vesicle morphological change in an organogel based on an azophenyl hydrazide derivative [J]. *Soft Matter*, 2011, 7(18): 8561-8566.
11. Loudon R. Theory of the first-order Raman effect in crystals [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series A Mathematical and Physical Sciences*, 1963, 275(1361): 218-232.
12. Anastassakis E, Pinczuk A, Burstein E, et al. Effect of static uniaxial stress on the Raman spectrum of silicon [J]. *solid state Communications*, 1970, 8(2): 133-138.
13. Balachandran U, Erer N. Raman spectra of titanium dioxide [J]. *Journal of Solid State Chemistry*, 1982, 42(3): 276-282.
14. Trotter P. Azo dye tautomeric structures determined by Laser-Raman spectroscopy [J]. *Applied Spectroscopy*, 1977, 31(1): 30-35.
15. Sourisseau C. Polarization measurements in macro- and micro-Raman spectroscopies: molecular orientations in thin films and azo-dye containing polymer systems [J]. *Chemical Reviews*, 2004, 104(9): 3851-3892.
16. Biswas N, Umapathy S. Structures, vibrational frequencies, and normal modes of substituted azo dyes: infrared, Raman, and density functional calculations [J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2000, 104(12): 2734-2745.

第八章 微针吸入法测量偶氮囊泡膜的弹性模量

双层膜结构的囊泡是一种很好的工程材料,它们可以为内含物提供很好地保护,包括机械的,化学的,以及电学的屏障使其免受外界的伤害。囊泡膜的机械性质在其稳定性,变形能力,以及可通透性方面发挥着非常重要的作用,直接影响其在药物传输释放以及化学反应微容器方面的应用。这是一种在溶液中自组装形成的动态结构,会受到多种短程力的作用包括:水分子与聚合物分子的水合作用、聚合物分子之间的范德瓦尔斯力以及分子内部的静电作用力等,这些作用力会改变膜的形貌以及机械强度。目前有多种方法探测膜的机械强度,包括:光子相关谱,动态光散射,原子力显微镜[1]以及 X 光衍射等[2],但是最有潜力的,直接并且简单易行的测量方法是微针吸入法(micropipet aspiration, MPA)[3]以及光镊法。由于光镊测量法量程较小,最多只能达到几百个皮牛量级,而微针吸入法的最大测力范围可以达到纳牛甚至微牛量级[4],因而更适合测量机械强度更高的聚合物囊泡的机械强度[5]。目前微针吸入法已经应用于多种膜结构的机械测量包括:红细胞[6],巨型脂质体囊泡[7]。该方法还能探测膜结构在受到应力条件下,小分子(水,乙醇等)的穿膜能力[8,9]。

8.1 微针吸入(MPA)实验模型

对于薄膜材料,其形变及形变率可以通过表面局部的形变来定量描述。作用在膜表面上的外力可以分为以下几类[10]:张力 τ_n ,面积剪切力 τ_s ,垂直于表面的弯矩 M 。对应的膜的形变为:膜面积的伸缩膨胀 $\alpha = \frac{A-A_0}{A_0}$,面内的延展 $\lambda = L/L_0$ (表面剪切),其中面积密度为常数;膜的弯曲 $\Delta C = \Delta(1/R)$ 此时膜的框架形状不变,如图 8.1 所示。对于各项同性的膜材料有三种一阶弹性关系分别为:

- (1) 平均张力 $\bar{\tau}$,它正比于膜表面积的伸缩比率

$$\bar{\tau} \equiv \frac{\tau_1 + \tau_2}{2} = K \alpha \quad (8.1)$$

其中 τ_1 和 τ_2 分别为张力 τ 的平行表面分量以及垂直表面分量。 α 为相对面积变化率

$$\alpha \equiv \frac{A - A_0}{A_0} \quad (8.2)$$

其中 A_0 和 A 分别为初始的表面积和加应力发生形变后的表面积。

(2) 表面剪切力 τ_s 正比于面内剪切形变:

$$\tau_s \equiv \frac{\tau_1 - \tau_2}{2} = 2\mu e_s \quad (8.3)$$

(3) 弯矩 M 正比于膜的曲率变化:

$$M = B \Delta \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (8.4)$$

其中 R_1 和 R_2 为表面内两个方向的曲率半径。

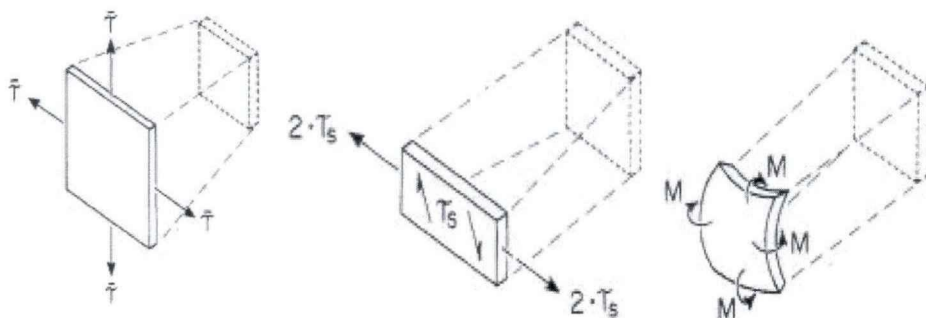


图 8.1 薄膜材料的形变示意图[11]

这三种一阶变化的弹性关系表明柔性膜在常温下是可压缩的,但是不会发生固态和液态聚集态的结构转变。这种情况适用于常温下的脂质体以及聚合物囊泡膜的弹性测量[12]。

吸入法为在液相中测量双层膜囊泡结构的弹性模量提供了一个很好的方法。在测量过程中,半径为 R_v 的双层膜囊泡被内径为 R_p ($\sim 5\mu\text{m}$)的微针吸进一部分,如图 8.1 所示。囊泡在微针内部的投影长度为 L 。当微针内部的吸附压强变化($\Delta P = P_1 - P_2$)时,囊泡被吸入的长度变化为 ΔL ($L_1 - L_2$)。由于微针压力的变化速率较快,因此在这段时间里囊泡内外的分子交换(扩散以及渗透)可以忽略,即

囊泡的体积保持不变, 可以看作常数。当吸入长度 L 较小时, 囊泡的表面积 A 的变化量 ΔA 与 ΔL 成正比。即

$$\Delta A \cong 2\pi R_p \Delta L (1 - R_p/R_v) \quad (8.5)$$

由此可得相对面积变化率:

$$\alpha = \frac{\Delta A}{A_0} = 2\pi R_p \Delta L (1 - R_p/R_v) / A_0 \quad (8.6)$$

对于薄膜材料相对面积变化率 α 在负压吸附下来源于膜的两种形变, 可用公式 8.6 表示:

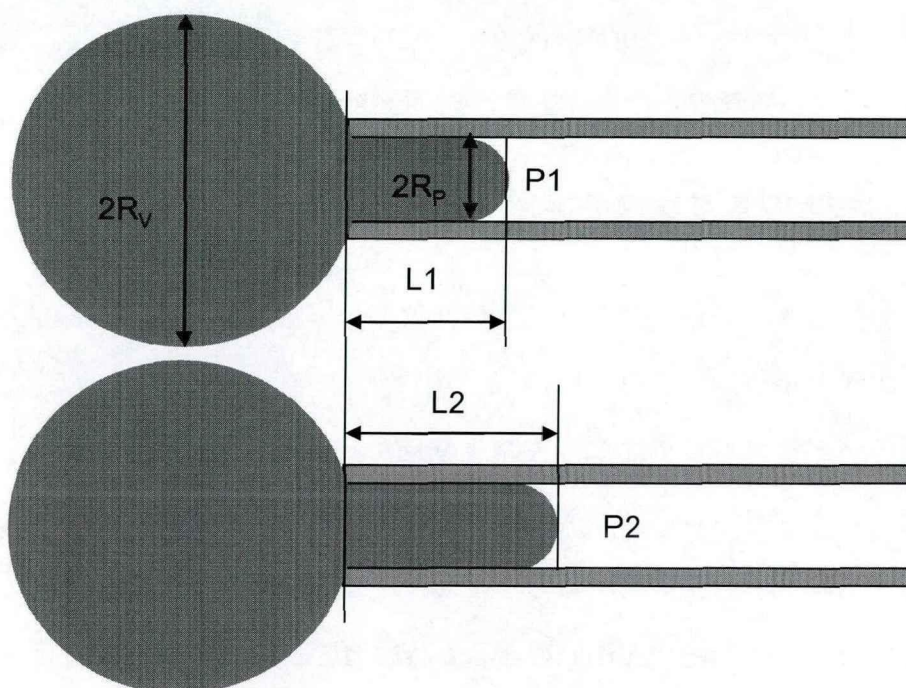


图 8.2 微针吸入 (MPA) 实验模型图

$$\alpha = \left(\frac{K_B T}{8\pi k_c} \right) \ln \left(1 + \frac{c_0 \tau A}{k_c} \right) + \frac{\tau}{K_A} \quad (8.7)$$

其中 k_c 是弯曲模量, K_A 是面积压缩模量, k_B 是玻尔兹曼常数, T 为温度, c_0 为常数依赖于膜的波动模式 (球面谐振模式或者平面波模式)。膜的热涨落对于聚合物膜非常微弱, 在显微镜里很难观察到, 因此 c_0 非常小, 趋于 0。在低张量区, 对数项占主导, 即 $\ln(\tau)$ 和 α 成直线关系。弯曲模量 k_c 由 $\ln(\tau)$ 和 α 的直线的斜率决定。上式中的第二项对应于单位面积分子数的变化。对于高应变区 ($\tau >$

0.5 mN/m), 膜的伸缩模量由占 τ/K_A 主导。此时斜率被称作 AACM (apparent area compressibility modulus), 即 K_{app} 。

对于吸入压强 ΔP 作用于囊泡膜上, 产生的张力 τ 可由下面公式给出:

$$\tau = \frac{\Delta P R_p}{2 - \frac{2R_p}{R_v}} \quad (8.8)$$

当作用于薄膜的外力过大即超过弹性极限时, 囊泡会发生永久性的塑性变形, 由于聚合物分子的松弛时间较长, 使囊泡内部分子重组过程变慢, 因此形变会发生延迟即发生蠕变现象。薄膜的应变 ϵ 在恒定应力 σ_0 随时间的变化可用下式表达:

$$\epsilon(t) = \sigma_0 (1 - e^{-\frac{t}{T_0}}) / E_0 \quad (8.9)$$

其中 E_0 为聚合物的高弹模量, T_0 为聚合物的松弛时间。

8.2 实验设备及数据处理方法

微针吸入实验所用的微针是由拉针仪制作 (PM10, 日本 Narishigen 公司), 其原理是利用电阻丝加热 1mm 直径的玻璃毛细管至玻璃软化, 然后施加拉力匀速拉伸玻璃管, 使其受热部位收缩成直径约 5~10 μ m 的微管, 然后将其拉断形成微针。之后通过煅针仪 (FM-900, 日本 Narishigen 公司) 将管口处理平整即可使用。本实验所用压力控制器为 SM-300 显微注射仪, 由高压氮气驱动, 可以改变微针内作用在囊泡表面的吸附压强。然后通过三维精密调整架转接, 将微针固定在显微操作平台上, 使之能够在三个方向上自由移动, 从而使微针前端和囊泡的位置可以达到重合。

本实验所用偶氮囊泡与前面几章相同, 在此不再赘述。

通过实时观察微针内压强改变后, 囊泡伸长量的变化, 可以得到应力应变曲线, 然后对测量得到的数据进行直线拟合, 得到斜率即然后乘以系数即可求出囊泡的弹性模量。同时测量时发现: 施加较大的应力并保持恒定不变时, 囊泡的形变会持续发生变化, 同时发生屈服现象, 对测量的数据进行指数函数拟合, 即可得到囊泡的断裂张力。

8.3 实验结果及分析

我们将 PNIPAM-b-PAzPy2 在 DMF 和 H₂O 溶液中组装的囊泡，装入开口的样品池内，调整微针位置是两者重合。改变微针内压强，即可将囊泡吸入微针内部。如下图所示：其中囊泡直径为 13.5 μm ，微针直径 6.5 μm 。应力改变范围在 10 ~20 psi 即 6.89~13.78 kPa。

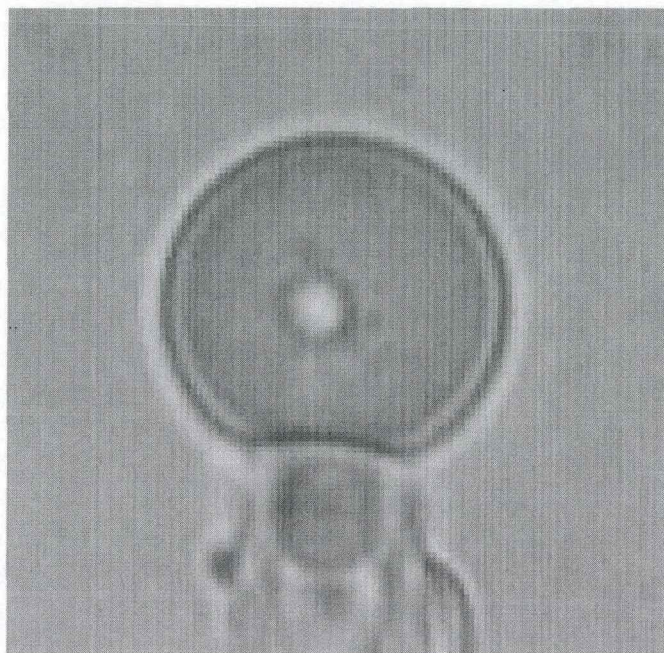


图 8.3 微针吸入 space2 的偶氮囊泡

经过探测分析，我们发现囊泡的形变与张力成正比。经上式运算得到囊泡的弹性模量为 $3.28 \times 10^5 \text{N/m}^2$ 。这个结果比红细胞的弹性模量大 3 个数量级。这说明聚合物囊泡比脂质小分子组装的细胞更加稳定，可控性更强。我们的测量结果跟理论相符即：聚合物囊泡拥有的弹性机械特性处于经典的固态壳层和液相流式膜之间，其弹性与囊泡厚度成正比，与半径平方成反比。同时具有脂质体双分子层的膜比高分子膜要柔软得多。

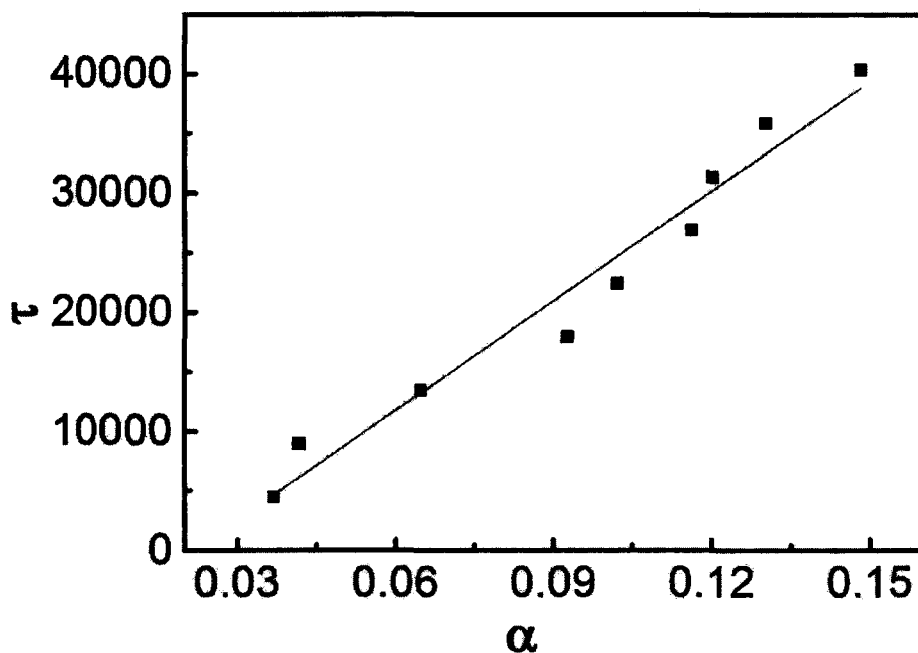


图 8.4 space2 囊泡应力与应变的相对关系

图注：直线拟合斜率为 3.28×10^5 。

同时，我们在探测过程中当囊泡所受应力较大时会发生断裂屈服现象，在应力为较大的恒定值时，得到的应变即伸长量随着时间的增长而迅速变大，呈指数变化趋势。如图 8.5 所示。与此同时在囊泡根部会出现箍缩，逐渐断裂形成新的囊泡结构。这种现象符合材料的蠕变理论，即材料的形变在外力改变后不会快速平衡，而是会发生延迟。这是由于偶氮分子在外力作用下沿着该力的方向进行了重新取向重排以及滑移等过程。如果链段运动速度比外力作用速度慢的话，就会出现形变延迟。这说明囊泡的同时具有粘性。通过向膜内添加交联剂可以使膜的抗蠕变性能提高。

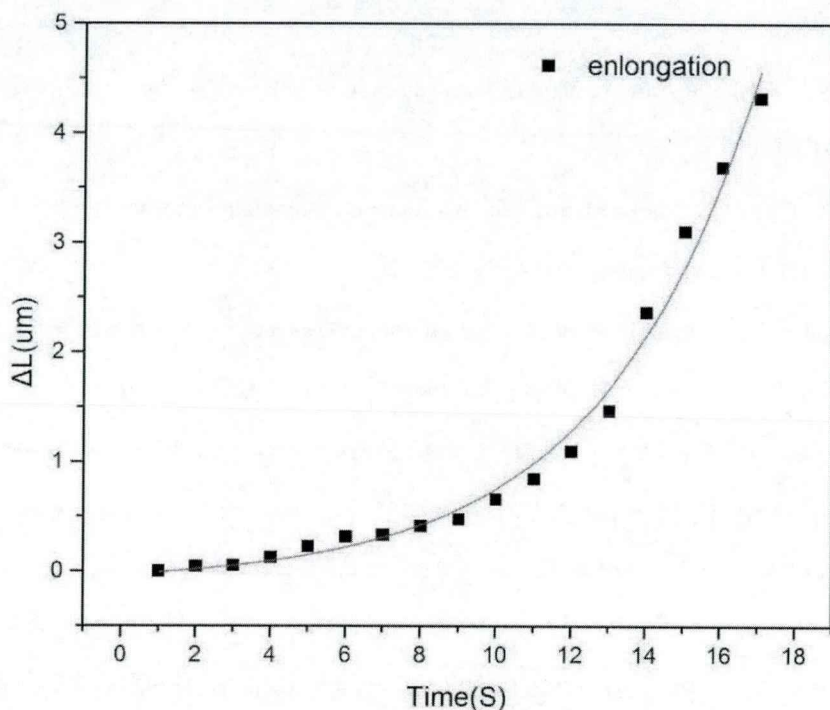


图 8.5 囊泡伸长量在恒定应力下随时间的变化

8.4 本章小结

我们在这一章里介绍了偶氮囊泡的弹性模量测量实验,由于聚合物囊泡的机械强度大于小分子脂质体双层膜结构,所以我们使用的是方法微针吸入法。通过探测我们发现偶氮聚合物囊泡的弹性模量比红细胞大一个数量级,这说明这种结构更加的稳定,适合长时间存储。由于实验中遇到囊泡与玻璃表面粘力的困难 [13],我们只是定性分析了实验数据,如果需要更多地定量数据,需要对玻片表面做修饰以减小粘附力。

参考文献

1. Nawaz S, Sánchez P, Bodensiek K, et al. Cell Visco-Elasticity Measured with AFM and Optical Trapping at Sub-Micrometer Deformations [J]. Plos One, 2012, 7(9): e45297.

2. Hubbard F P, Abbott N L. A small angle neutron scattering study of the thicknesses of vesicle bilayers formed from mixtures of alkyl sulfates and cationic bolaform surfactants [J]. *Soft Matter*, 2008, 4(11): 2225-2231.
3. Guo Q, Park S, Ma H. Microfluidic micropipette aspiration for measuring the deformability of single cells [J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(15): 2687-2695.
4. Simson D, Ziemann F, Strigl M, et al. Micropipet-based pico force transducer: in depth analysis and experimental verification [J]. *Biophysical Journal*, 1998, 74(4): 2080-2088.
5. Discher B M, Won Y-Y, Ege D S, et al. Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers [J]. *Science*, 1999, 284(5417): 1143-1146.
6. Shojaei-Baghini E, Zheng Y, Sun Y. Automated Micropipette Aspiration of Single Cells [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2013, 41(6): 1208-1216.
7. Das S, Tian A, Baumgart T. Mechanical stability of micropipet-aspirated giant vesicles with fluid phase coexistence [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(37): 11625-11630.
8. Lu Y-B, Franze K, Seifert G, et al. Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(47): 17759-17764.
9. Tian A, Johnson C, Wang W, et al. Line tension at fluid membrane domain boundaries measured by micropipette aspiration [J]. *Physical Review Letters*, 2007, 98(20): 208102.
10. Needham D, Zhelev D. Use of Micropipet Manipulation Techniques to Measure the Properties of Giant Lipid Vesicles [M]. *Perspectives in Supramolecular Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. 2007: 102-147.
11. Evans E, Needham D. Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions [J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1987, 91(16): 4219-4228.
12. Henriksen J R, Ipsen J H. Measurement of membrane elasticity by micro-pipette aspiration [J]. *The European Physical Journal E*, 2004, 14(2): 149-167.
13. Zhao Y, Das S, Du Q. Adhesion of multicomponent vesicle membranes [J]. *Physical Review E*, 2010, 81(4):1312-1316.

第九章 论文的总结与展望

本论文的主要工作是围绕光镊技术的发展应用展开的。本人将光镊捕获技术与显微拉曼光谱技术结合起来形成拉曼光镊系统,来进行科学问题研究。我们将发展起来的实验系统用于偶氮聚合物囊泡光响应性质的探测。主要包括以下几个方面:

一、 将拉曼光镊系统应用于表面加入交联剂DBP的偶氮囊泡性质的研究。利用拉曼光谱手段探索交联剂对表面的影响。我们发现随着交联剂的增加,囊泡膜会变硬,表面膜内的偶氮基团顺反异构会变得困难。这对制作具有特定硬度,稳定度高的功能囊泡有指导意义。

二、 对比研究了三种偶氮吡啶聚合物分子组装的囊泡的光响应性,这三种分子区别在于主链和侧链的间隔基长度不同。我们发现他们具有不同的光响应性:间隔基长度为0的囊泡最稳定,对紫外光没有响应,一直处于二面体形貌;间隔基长度为2的囊泡在紫外光下会发生二面体和均匀形貌的可逆转化;间隔基长度为6的囊泡形貌均匀,会发生尺寸的伸缩膨胀。通过拉曼光镊方法对这三种光响应行为进行了探测。通过探测发现偶氮的异构和光致形貌转化是同步进行的。这说明偶氮分子的间隔基长度会改变分子主链与侧链的相互作用强度,从而对表面的稳定性会发生影响。

三、 探测了双组分偶氮囊泡的相分离现象,通过探测发现混合囊泡中偶氮基团的光致顺反异构速率慢于相应的单组份囊泡,这应该是由表面发生有序相和无序相的转化造成的。相转化使囊泡微区边界变得不稳定,旋转运动使其达到一种亚稳状态。紫外光撤掉之后,囊泡表面趋于稳定微区运动随机平衡。

四、 偶氮甲氧基组装的囊泡在紫外光照下,会发生破裂,然后组装成尺寸较小但分布均匀的囊泡,通过拉曼探测该过程。我们推测光致异构不是囊泡分裂

的唯一因素,光热效应对这个过程也有贡献。我们的发现为囊泡的设计提供了一个新的途径,在紫外光照下囊泡可控的破裂为药物的定点释放提供了很好地支持。

五、在拉曼系统里引入了偏振探测功能,进一步增加了该系统的探测能力。通过改变激发光的偏振角度探测了囊泡表面的偶氮基团的分子取向。发现囊泡在偏振紫外光下,偶氮分子取向会趋于和紫外光偏振方向一致。这种一致性对囊泡的异构机理提供了很好地解释。

六、将光镊系统和微针结合起来探测囊泡膜的弹性模量,发现偶氮聚合物组装的囊泡弹性模量比红细胞的模量大1个数量级,即这种囊泡更加稳定,这也有利于聚合物囊泡系统的生物体内的应用。

通过上面几项研究,我们对偶氮囊泡的紫外光响应性质以及反应机理有了深入的了解,这为囊泡在生物细胞模拟方面的进一步应用打下很好的基础,包括可以探究膜的弹性,渗透性等参量对环境的响应等。

在本文研究过程中遇到了不少困难,比如囊泡破裂后,会脱离光阱捕获,平铺在玻璃表面,从而对探测造成不利影响;比如微针表面亲水造成囊泡膜容易粘在玻璃管内表面影响囊泡的变形。需要对表面进行修饰,使之变得疏水,减小两者之间的粘结力,从而更加准确的反映囊泡的应变响应。

本论文工作还可以往以下几个方面深入研究:比如不同组分囊泡微区弹性模量的差别,这种探测能够更加精细的研究囊泡的性质。紫外光对囊泡表面弹性模量的影响等等。另外偶氮基团的分子取向趋于一致的形成机理也有待进一步解释。如何将药物包裹进囊泡内,并可控的释放也值得进一步探索。

对于拉曼光镊设备的发展,我们可以在现有基础上增加一个独立的捕获光源,这样可以使样品的捕获更加稳定,同时拉曼信号探测效率更高。当然这个改造也需要一定的技术,使捕获光斑和拉曼信号激发光斑,重合在一起。这对系统搭建也是一个很大的挑战。同时这样的改造还可以提高系统的空间分辨率:光镊捕获的同时,可以在样品的各个微区进行拉曼信号的扫描探测。

缩写词索引

- AFM, Atomic Force Microscope, 原子力显微镜
- AOD, Acousto Optic Deflector, 声光衍射器
- Azo, Azobenzene, 偶氮苯
- BCP, Block copolymer, 嵌段聚合物
- CCD, Charge Coupled Device, 电荷耦合器件
- CLSM, Confocal Laser Scanning Microscope, 激光扫描共聚焦显微镜
- DBP, 1,3-Dibromopropane ($\text{Br}(\text{CH}_2)_3\text{Br}$), 三亚甲基二溴
- DMD, Digital Micromirror Device, 数字微镜器件
- DNA, DeoxyriboNucleic Acids, 脱氧核糖核酸
- FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer, 荧光共振能量转移
- FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy, 傅里叶变换红外谱
- GPC, Gel Permeation Chromatography, 凝胶渗透色谱
- IF, Interface filter, 干涉滤波片
- LC, Liquid Crystal 液晶
- Lo, liquid order, 液态有序相
- Ld, Liquid disorder, 液态无序相
- MatLab, Math Laboratory, MatLab® corp. 科学计算软件
- MPA, Micropipette Absorption, 微针吸附
- NMR, Nuclear Magnetic Resonance, 核磁共振
- OD, Optical Density, 光密度 $\text{OD}=\lg(1/T)$, T 为透过率
- OT, Optical tweezers, 光镊
- OTRS, optical tweezers Raman spectrum, 拉曼光镊
- PBS, Polarization Beam Splitter, 偏振分束器

- PNIPAM-b-PAzPy, Poly(N-isopropylacrylamide block Poly Azobenzene
Pyridine, N-异丙基丙烯酰胺-偶氮吡啶嵌段共聚物
- PS, Polystyrene, 聚苯乙烯
- QPD, Quadrant PhotoDiode, 四象限光电二极管
- RAFT, Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization, 加成-断裂链转移聚合
- RCF, Rolling circle filter, 滚环滤波法
- SLM, Spatial Light Modulator, 空间光调制器
- SPOT, surface plasmon optical tweezers, 表面等体光镊
- THF, tetrahydrofuran, 四氢呋喃
- TLC, Thin layer chromatography, 薄层色谱
- UV-Vis, Ultraviolet-visible spectroscopy, 紫外可见光分光光度法
- XRD, X ray diffractometer, X 射线衍射仪

致谢

本文所做的工作是在三位老师郭光灿院士，李银妹教授，蔡俊副教授的亲切关怀和悉心指导下才得以完成的。我于2008年进入光学系激光生物实验室学习，科研，中间经历了很多困难和挫折，但在老师们的帮助下，成功搭建了一套拉曼光镊系统，从而使我的博士论文工作得以顺利完成。在实验室的五年多时间里，导师们严肃的科学态度，深厚的学术功底，敏锐的科学洞察力以及精益求精的工作作风诲人不倦的师道风格都深深感染和激励着我。在论文收笔之际，谨向三位老师表达诚挚的感谢。

特别感谢中国科学技术大学高分子系的张其锦教授及其组内沈广勇博士，陈坤硕士，孙康硕士等同学提供本实验所需的偶氮聚合物囊泡。并同我一起进行实验方案的探讨，论文的修改等，为实验完成提供了不少有意的建议。

感谢天津科技大学藻类生物技术实验室的施定基老师以及组内陈宇清，张会敏，贾晓会，许晟，高伟，王轶博等各位同学。在我去天津科技大学交流学习的三个多月中，热心教给我蓝藻培养以及转基因操作技术，让我快速熟悉一个陌生的领域，让我在中科大能顺利建立蓝藻培养室。

实验室良好的工作氛围让我减少了不少压力。在此感谢实验室的师兄吴建光博士，周金华，钟敏成，任煜轩博士，周程硕士。这几位师兄带领我从熟悉实验室设备开始，一步步教给我实验操作技术以及很多细节的实验技巧。我实验技术的进步离不开这几位师兄的热心帮助。感谢王自强老师在背后默默奉献，兢兢业业工作，为我的研究工作提供了很多支持。另外感谢李煌硕士，他跟我一起进入激光生物实验室学习，相互激励，共同学习进步。从他身上学到了很多生活上的感悟。感谢高红芳，刘伟伟，周丹丹，龚雷，李迪，呼新尧等师弟师妹，在我毕业之际，给予我不少帮助。

致谢

感谢我的家人以及朋友。在我求学的几年里，是他们一直鼓励着我，让我能够放手去追寻自己的梦想。我的父亲已经年迈，仍在辛勤劳作以减轻我的负担。我的母亲在我读研第二年时，因病去世，我未能在病床前多陪陪她，在此表达深深的愧疚。我的姐姐在背后为家庭做出了很大的牺牲，是她们在家里照顾生病的母亲以及年迈的父亲，让我能放心的做科研。她们给我的动力以及对我的恩情绝非一个谢字能表达清楚。没有他们的支持我的学业很难完成。

最后谨以此文献给我的父亲和母亲，感谢他们在背后支持着我不断前进！

薛国胜

二零一三年十二月于中国科学技术大学

博士期间发表的学术论文与取得的成果

已发表论文:

1. **Guosheng Xue**, Kun Chen, Guangyong Shen, Ziqiang Wang, Qijin Zhang, Jun Cai, Yinmei Li. Phase-separation and photoresponse in binary azobenzene-containing polymer vesicles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2013, 436, 1002-1007.
2. Kun Chen*, **Guosheng Xue***, Guangyong Shen, Jun Cai, Gang Zou, Yinmei Li, and Qijin Zhang. UV and visible light induced fission of azobenzene-containing polymer vesicles. **RSC Advances**, 2013, 3, 8208-8210. (* contributed equally to this work).
3. Guangyong Shen*, **Guosheng Xue***, Jun Cai, Gang Zou, Yinmei Li and Qijin Zhang. Photo-induced reversible uniform to Janus shape change of vesicles composed of PNIPAM-b-PAzPy2. **Soft Matter**, 2013, 9, 2512 -2517 (* contributed equally to this work).
4. Guangyong Shen, **Guosheng Xue**, Jun Cai, Yinmei Li, Qijin Zhang et al. In situ observation of azobenzene isomerization along with photo-induced swelling of cross-linked vesicles by laser trapping Raman spectroscopy. **Soft Matter**, 2012, 8, 9127-9131.
5. Mincheng Zhong, **Guosheng Xue**, Jinhua Zhou, Ziqiang Wang and Yinmei Li. Measurement of interaction force between RGD-peptide and Hela cell surface by optical tweezers. **Chinese Optics Letters**, 2012, 10(10), 101701.
6. Kang Sun, Kun Chen, **Guosheng Xue**, Jun Cai, Gang Zou, Yinmei Li, Qijin Zhang. Near-infrared light induced fusion and fission of azobenzene-containing polymer vesicles. **RSC Advances**, 2013, 3, 23997-24000.
7. Gong Lei, Ren Yuxuan, **Xue Guosheng**, Wang Qianchang, Zhou Jinhua, Zhong Mincheng, Wang Ziqiang, Li Yinmei. Generation of nondiffracting Bessel beam using digital micromirror device. **Applied Optics**, 2013, 52, 4566-4575.
8. Xiaolei Wen, Zheng Xi, Xiaojin Jiao, Wenhai Yu, **Guosheng Xue**, Douguo Zhang, Yonghua Lu, Pei Wang, Steve Blair, Hai Ming. Plasmonic Coupling Effect in Ag Nanocap-Nanohole Pairs for Surface-Enhanced Raman Scattering. **Plasmonics**, 2013, 8, 225-231.

参加学术会议：

1. Oral presentation 第七届全国塑料光纤与聚合物光子学会议
安徽 合肥 2011.10.15-16
2. Oral presentation 第八届全国软物质与生命物质物理学术会议
贵州 贵阳 2012. 8.20-23
3. Poster 第三届国际光流控学术会议（优秀论文奖）
The 3rd International Conference on Optofluidics 2013
香港特别行政区 2013.8.15-17

待发表论文：

1. **Guosheng Xue**, Guangyong Shen, Zhou Jinhua, Zhong Mincheng, Qijin Zhang, Jun Cai, Yinmei Li. Probing molecular orientation in membrane of azobenzene-containing vesicle by polarized Raman tweezer. **Applied Surface Science** (submitted)