

## 剪切流场中高分子链构象转变的 FRET 研究

瞿志超, 张俊生, 陈 巍\*

(配位化学国家重点实验室, 南京大学化学化工学院高分子科学与工程系, 南京, 210023)

**摘 要:** 高分子在流动中发生的取向和变形是导致流体产生非线性粘弹性的主要原因。通过荧光共振能量转移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 光谱技术检测标记在同一根聚苯乙烯 (Polystyrene, PS) 链上的荧光供体和受体基团间的荧光共振能量转移效率, 考察高分子链构象的转变。不同剪切速率下的原位荧光检测结果显示, 在剪切流 (Couette) 场中, 随着剪切速率的增加, 荧光共振能量转移效率显著上升, 表明荧光供、受体基团间的距离减小, 意味着 PS 链在高剪切速率下变形加剧, 线团塌缩。FRET 还检测到了剪切速率在  $500\text{ s}^{-1}$  附近时 PS 的链取向变化行为与剪切速率在  $1000\text{ s}^{-1}$  附近亚浓溶液中 PS 链伴随着缠结点保留率的降低而发生的构象变化, 表明 FRET 方法可以灵敏地检测高分子链构象的转变, 为高分子流体非线性流变学理论和模拟研究提供直观的实验证据。

**关键词:** 高分子溶液, 剪切流场, 构象转变, 荧光共振能量转移

中图分类号: O631

文献标识码: A

## The conformational transitions of polymer chains in shear flow measured by FRET

Qu Zhichao, Zhang Junsheng, Chen Wei\*

(State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Department of Polymer Science and Engineering,  
School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing, 210023, China)

**Abstract:** Since the large deformation of polymers under flow is the source of nonlinear viscoelasticity, understanding the conformational changes of polymeric chains in solutions is an essential and integral part of polymer physics. A fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique, which is considered as a “spectroscopic ruler” for characterizing the distance between fluorescent donor and acceptor, has been applied to measure the FRET efficiency between donor and acceptor labeling on single polymer molecules in shear flow (Couette flow). Chromophore pairs are grafted randomly onto polystyrene (PS) chains, and real-time rheo-fluorescence measurements on polymers in solution, a PS system of dilute and semidilute solution, are reported at different shear rates. The PS in Couette flow shows a systematic increase of FRET efficiency at high shear rate, which indicates the decrease of distances between fluorescent donor and acceptor chromophores, corresponding to a deformation of the polymer molecules with shear exposure. The conformational transitions of PS, such as the orientation of chains at a shear rate around  $500\text{ s}^{-1}$ , have also been detected by FRET. These results indicate that FRET is sensitive for the detection of conformational transitions of polymer

基金项目: 国家自然科学基金 (21790342, 21790345)

收稿日期: 2019-04-08

\* 通讯联系人, E-mail: weichen@nju.edu.cn

chains. FRET technique provides direct experimental evidence for the theory and simulation researches of nonlinear rheology of polymers.

**Key words:** polymer solution, shear flow, conformational transition, fluorescence resonance energy transfer

高分子材料加工成型时,处于剪切流场中的高分子链因发生拉伸、取向、解缠等变化而表现出丰富和独特的流动形变特性<sup>[1]</sup>. 传统的珠链模型、哑铃模型<sup>[2-3]</sup>在低剪切速率直至平衡态的行为和线性粘弹性行为等方面得到广泛成功,但高剪切速率下高分子链的非线性粘弹性行为的分子机理仍存在争论,实验中也缺乏灵敏的对剪切场中高分子链构象变化的直接检测手段.

荧光共振能量转移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)光谱技术提供了一种灵敏检测纳米尺度距离变化的方法<sup>[4-6]</sup>. FRET是荧光供体和受体基团之间通过长程偶极作用发生非放射性能量转移的现象<sup>[6]</sup>,能量转移效率与供体、受体之间距离的关系见式(1):

$$E = \left( 1 + \left( \frac{r}{R_0} \right)^6 \right)^{-1} \quad (1)$$

其中, $E$ 是荧光共振能量转移效率, $r$ 是荧光供体和受体之间的距离, $R_0$ 是供体和受体的特征距离,仅与选取的荧光供体和受体的种类相关. 由式(1)可知, $E$ 随着 $r$ 的增大而下降,在 $R_0$ 附近 $r$ 的微小变化将引起 $E$ 的极大改变<sup>[7]</sup>. 在荧光测量光谱中FRET的效率 $E$ 正比于受体和供体基团的荧光峰强度的比值,因此该比值可作为两种生色团之间距离的“光谱尺”. FRET效率在0.5~10 nm随着供体与受体间距离的变化而迅速改变<sup>[6]</sup>,由于上述敏感距离正好对应大分子聚集行为的转变尺度,所以FRET方法为大分子内部结构和分子间相互作用的测定提供了一条直接、简便、灵敏的途径<sup>[8-9]</sup>. 当将荧光供体和受体基团同时标记在同一根高分子链上,便可以通过简单的测量能量转移效率的变化来反映高分子单链整体构象的变化<sup>[10-12]</sup>,这种方法称作分子内FRET光谱法.

Farhangi and Duhamel<sup>[8]</sup>在聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA,  $M_n=2.0 \times 10^5$ )链末端标记了荧光供体蒽(An)和受体二巯基苯甲酰基(Dithiol-benzoyl). 通过分子内FRET光谱法研究发现,在较高的剪切速率作用下,高分子亚浓溶液中链的均方末端距变小了,但该实验体系采用的PMMA溶液的高分子末端距为12.0 nm,明显比荧光供体和受体的特征距离 $R_0$ (1.34 nm)要大,这在一定程度上限制了FRET实验方法的灵敏度.

针对上述缺陷,本文选择特征距离为2.85 nm的咪唑(Cz)和蒽(An)作为荧光供体和受体<sup>[13]</sup>,将咪唑基团和蒽基团随机标记在PS链上,采用分子内FRET光谱法研究高分子在剪切流场作用下的链构象转变.

## 1 实验部分

### 1.1 药品 实验使用的药品见表1.

聚苯乙烯  $M_n=1.23 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $PDI$  (Polymer Dispersity Index)=1.59,甲苯需加入

表1 实验药品及其规格和厂家

Table 1 Specifications of materials

序号	药品名称	规格	厂家
1	聚苯乙烯	分析纯	Aldrich(中国)
2	9-蒽醇	分析纯	阿拉丁试剂(美国)
3	氯化锡	分析纯	阿拉丁试剂(美国)
4	咪唑	分析纯	阿拉丁试剂(美国)
5	甲基咪唑	分析纯	阿拉丁试剂(美国)
6	N,N'-二甲基 甲酰胺	分析纯	百灵威的超干溶剂 (中国)
7	四氯化碳	分析纯	安耐吉的超干溶剂 (中国)
8	氯甲基甲醚	分析纯	西亚试剂(中国)
9	十氢萘	色谱纯	阿拉丁试剂(美国)

钠丝回流除水,二氯乙烷为色谱纯,使用前未经特殊处理.其他试剂均为市售分析纯.

**1.2 荧光标记高分子的合成与实验溶液样品的配制** 按照 Morawetz<sup>[7]</sup>的方法,对聚苯乙烯进行氯甲基化处理后,加入脱除质子的咪唑和蒽醇,合成链内随机标记(PS-An-Cz)的聚苯乙烯分子,分子量为 $1.23 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . 聚合物分子量通过 Photon Technology International (PTI)公司的 PL-GPC 120 型凝胶色谱仪测得,流动相为四氢呋喃,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . 合成产物的荧光基团接枝含量可以通过紫外可见分光光度计测量,具体参数见表2.

表2 聚苯乙烯样品参数

Table 2 The parameters of PS samples

样品名称	$M_n$ ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$PDI$	咪唑 含量	蒽醇 含量
PS	$1.23 \times 10^5$	1.59	—	—
PS-An-Cz	$1.23 \times 10^5$	1.59	0.567%	0.565%

FRET作为一种灵敏的光谱学方法,在配制荧光样品时需将荧光基团浓度控制在较低范围内,避免荧光自吸收效应(self-absorption)和荧光重吸收效应(ab-absorption)对实验结果产生影响,因此吸光度 $A$ 的值需控制在0.05之下<sup>[14]</sup>. 根据朗伯比尔定律计算可知,荧光标记的PS溶液浓度不能超过 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

本研究以十氢萘为溶剂,配制浓度为 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的链内标记的PS稀溶液.在配制亚浓溶液时,为避免自吸收的影响,在 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品溶液中加入未标记荧光基团的PS( $1.23 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )样品以提高PS溶液浓度,配制成 $10.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的亚浓溶液样品.高分子样品溶解后,在检测前需避光静置48 h以上.

**1.3 荧光光谱测量** 荧光参数设置如下:光谱激发波长294 nm,激发狭缝宽度0.5 nm,发射狭缝宽度1.0 nm,扫描范围300~460 nm,检测温度20℃.依据文献[8]在荧光分光光度计基础上搭建了检测设备,定制石英比色皿结构与荧光检测光路如图1所示.

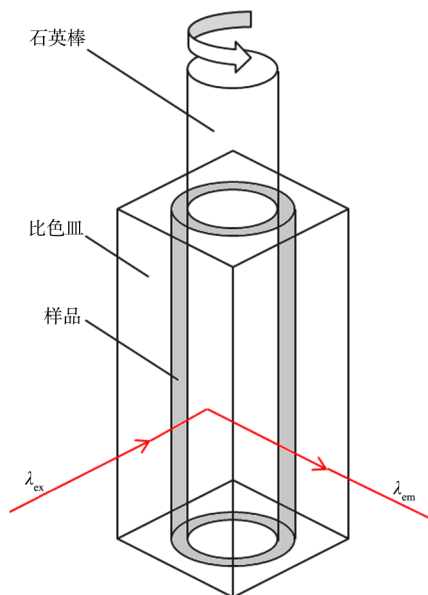


图1 荧光实验样品池示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the couette rheofluorescence cell

石英比色皿圆柱形样品槽直径8 mm,石英棒直径6 mm,石英棒可以为1 mm厚的高分子溶液样品提供 $0 \sim 1696 \text{ s}^{-1}$ 的剪切流场作用.与此同时,荧光分光光度计会实时记录样品产生的荧光信号.

## 2 结果与讨论

FRET可以灵敏地反映荧光供体和受体间距离的变化<sup>[7]</sup>,本文把荧光供体咪唑和受体蒽的峰分别简写为 $I_c$ 和 $I_a$ , $I_a/I_c$ 的大小则反映了能量转移效率 $E$ 的大小<sup>[9]</sup>.由式(1)可知,当检测到 $I_a/I_c$ 增大时,则能量转移效率 $E$ 增大,荧光供体和受体间距离 $r$ 减小.

荧光供体咪唑和受体蒽的特征距离 $R_0$ 约为3 nm<sup>[13]</sup>,由式(1)可知,荧光供体和受体间的距离在1~5 nm范围内FRET才具有很高的灵敏度.本文配制的PS稀溶液浓度远低于临界交叠浓度<sup>[10]</sup>,因此链间的荧光共振能量转移可以忽略,而加入未标记荧光基团的PS可以进一步屏蔽链间的荧光共振能量转移,所以本文测试的荧光光谱中的荧光信号主要来自单链上的

供体和受体的 FRET 效应. 通过分析  $I_a/I_c$  的数值变化可以表征出链整体构象的变化.

将浓度为  $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PS 溶液注入图 1 所示的检测装置中, 在不同的剪切速率下, 随着剪切时间的增加,  $I_a/I_c$  的变化如图 2 所示.

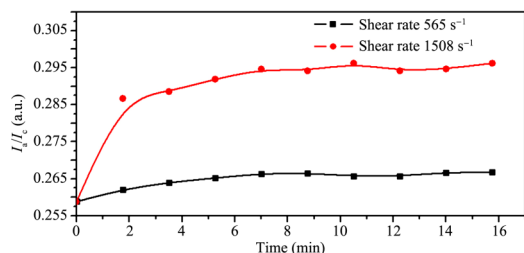


图 2  $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PS 溶液剪切时间与  $I_a/I_c$  的关系曲线  
Fig. 2 Plot of  $I_a/I_c$  over time for PS solution at  $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  polymer concentration exposed to different shear rate

由图 2 可知, 随着剪切时间的增加, 两个剪切条件下的  $I_a/I_c$  值均增大, 并在 7 min 后趋于稳定, 体系达到平衡. 平衡后  $I_a/I_c$  数值波动很小, 数据标准差只有  $4.2171 \times 10^{-4}$  和  $8.8447 \times 10^{-4}$ , 如果取 7 min 后数据的平均值作为该剪切条件下的  $I_a/I_c$  值, 那么误差均小于 0.2%. 因此, 对剪切作用 7 min 后的五个数据取平均值, 测得了聚苯乙烯亚浓溶液 ( $10.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和稀溶液 ( $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 在不同剪切速率作用下的  $I_a/I_c$  数据, 如图 3 所示.

由图 3a 可知, PS 亚浓溶液在剪切速率大于  $1150 \text{ s}^{-1}$  后,  $I_a/I_c$  随着剪切速率的提高明显增大, 这支持了 Chan et al<sup>[10]</sup> 的实验结论, 即在较大剪切速率下, 剪切流场使得高分子线团变形塌缩, 且剪切速率越高, 这种变化越明显.

根据 Rouse<sup>[3]</sup> 和 Kuhn<sup>[2]</sup> 的理论模型, 高分子构象转变产生的熵弹力、剪切应力与链尺寸参数关系如下:

$$f_{\text{elastic}}(r) = \frac{3K_b T r}{N b^2} \quad (2)$$

$$f_{\text{hyd}}(R) = 6\pi\eta x \dot{\gamma} R \sin 2\theta \quad (3)$$

其中,  $K_b$  是波尔兹曼常数,  $T$  是温度,  $N$  是自由链段数,  $b$  是自由链段长度,  $r$  是高分子链末端

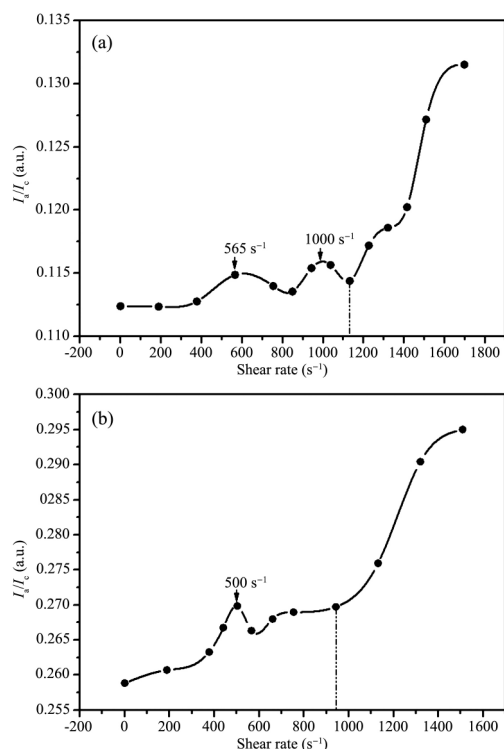


图 3 (a)  $10.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  链内随机标记 PS 溶液  $I_a/I_c$  与剪切速率的关系; (b)  $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  链内随机标记 PS 溶液  $I_a/I_c$  与剪切速率的关系

Fig. 3 (a) Plot of  $I_a/I_c$  for PS solution at  $10.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  polymer concentration exposed to different shear rate, (b) plot of  $I_a/I_c$  for PS solution at  $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  polymer concentration exposed to different shear rate

距,  $\dot{\gamma}$  是剪切速率, 哑铃模型的珠间距离为  $R$  ( $r$  的线性函数), 它与剪切方向的夹角为  $\theta$ ,  $\eta$  是半径为  $x$  的珠的粘度. 由式 (2) 和式 (3) 可知, 剪切应力和熵弹力都是  $r$  的线性函数, 高分子溶液体系在剪切流场作用下达到平衡时, 剪切应力与高分子熵弹力相等. 因此, 剪切速率增大时, 剪切应力随之增大, 则平衡状态下高分子构象的转变越大.

根据上述模型, 剪切流场中链的尺寸变化与取向也是相关的<sup>[2]</sup>, 由式 (3) 可知, 链在  $\theta$  为  $\pi/4$  方向时发生最大拉伸, 在  $-\pi/4$  方向时发生最大压缩 (图 4a). 链在剪切流场作用前后的构象转变如图 4b 和图 4c 所示, 链发生了变形和取向, 流体动力学半径 ( $R_H$ ) 减小.

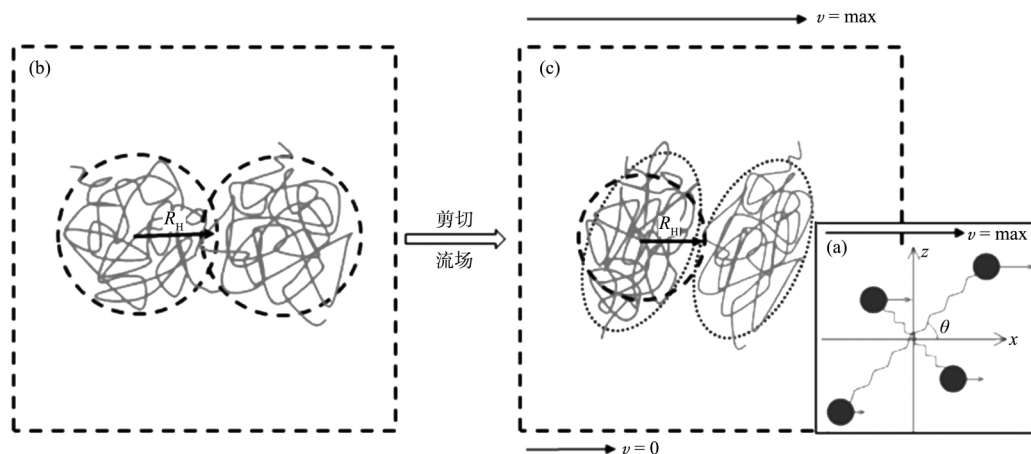


图4 (a)剪切流场中哑铃模型链构象变化预测<sup>[10]</sup>; (b)静止状态链的构象示意图; (c)高剪切流场中链的构象示意图  
Fig. 4 (a) Model of polymer bead-chain in a velocity gradient<sup>[10]</sup>; (b) schematic of the conformation of PS in semidilute solution before shear, (c) schematic of the conformation of PS in semidilute solution at high shear rate

偏振实验表明,剪切流场中链取向在小于  $500 \text{ s}^{-1}$  时与剪切方向平行,大于  $500 \text{ s}^{-1}$  时与剪切方向垂直<sup>[15-16]</sup>. 通过FRET实验同样观察到了这一转变(图3a),在  $500 \text{ s}^{-1}$  附近出现了极值. 同时,图3a在  $1000 \text{ s}^{-1}$  处也出现了一个极值. 刘冬梅等<sup>[17]</sup>通过理论计算模拟,发现当剪切速率大于  $\frac{1}{\tau_d}$  ( $\tau_d$  为松弛时间)时,高分子溶液缠结点数量会减少,链被拉伸. 根据PS溶液的浓度与分子量可以估算出良溶剂中链的  $\tau_d$  是毫秒级的<sup>[15]</sup>,因此剪切速率大于  $1000 \text{ s}^{-1}$  后  $I_a/I_c$  有所下降是高分子缠结点数量减少、链拉伸的结果.

图3b显示,PS稀溶液在较高的剪切速率下,剪切流场同样会使链发生变形和取向,流体力学半径减小,这与Dunstan and Wei<sup>[16]</sup>对极稀溶液中孤立高分子线团在高剪切流场作用下模拟预测的行为一致. 同时,因为在高分子稀溶液中,链彼此分离,没有缠结,所以对比图3a,图3b中  $I_a/I_c$  的值在剪切速率大于  $1000 \text{ s}^{-1}$  时迅速增大,没有极值,且  $500 \text{ s}^{-1}$  附近的极值也出现得更早. 这说明高分子亚浓溶液中链间的缠结与相互作用使得链在剪切流场中的变形和取向更难发生.

### 3 结 论

本研究用分子内FRET光谱技术实时检测剪切流场中高分子链的取向和变形行为. 实验结果表明,在高剪切速率下高分子线团变形塌缩,变形程度随剪切速率的提高而明显增大. 由于选用的测量体系FRET灵敏度非常高,还检测到剪切速率在  $500 \text{ s}^{-1}$  附近高分子链因取向而发生的构象转变,剪切速率在  $1000 \text{ s}^{-1}$  附近亚浓体系中高分子链伴随着缠结点保留率的降低而发生的构象转变. 这些检测结果为数值模拟研究的结果提供了直接的实验证据. 根据高分子链在变形的同时产生取向、流体力学半径减小的理论推导,本文还给出了高分子线团在较大剪切速率下的变形和取向的分子图像.

#### 参考文献

- [1] Ferry J D. Viscoelastic properties of dilute polymer solutions. Pure and Applied Chemistry, 1978, 50(4): 299—308.
- [2] Kuhn W. Dependence of the average transversal on the longitudinal dimensions of statistical coils formed by chain molecules. Journal of Polymer Science, 1946, 1(5): 380—388.
- [3] Rouse P E Jr. A theory of the linear viscoelastic properties of dilute solutions of coiling polymers.



- The Journal of Chemical Physics, 1953, 21(7): 1272—1280.
- [4] Yekta A, Xu B, Duhamel J, et al. Fluorescence studies of associating polymers in water: determination of the chain end aggregation number and a model for the association process. *Macromolecules*, 1995, 28(4): 956—966.
- [5] Duhamel J. Polymer chain dynamics in solution probed with a fluorescence blob model. *Accounts of Chemical Research*, 2006, 39(12): 953—960.
- [6] Förster T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 1948, 2(1—2): 55—75.
- [7] Morawetz H. Studies of synthetic - polymers by nonradiative energy - transfer. *Science*, 1988, 240 (4849): 172—176.
- [8] Farhangi S, Duhamel J. Long range polymer chain dynamics studied by fluorescence quenching. *Macromolecules*, 2016, 49(17): 6149—6162.
- [9] Chen J, Sha Y, Gao S Y, et al. Associated inter- and intrachain conformational transitions in polystyrene solutions. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2017, 55(18): 1373—1379.
- [10] Chan N Y, Chen M, Dunstan D E. Elasticity of polymer solutions in Couette flow measured by fluorescence resonance energy transfer (FRET). *The European Physical Journal E*, 2009, 30(1): 37—41.
- [11] Sha Y, Zhu Q, Wan Y X, et al. Synthesis of polymer with defined fluorescent end groups via reversible addition fragmentation transfer polymerization for characterizing the conformations of polymer chains in solutions. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2016, 54(15): 2413—2420.
- [12] Qin L L, Li L L, Sha Y, et al. Conformational transitions of polymer chains in solutions characterized by fluorescence resonance energy transfer. *Polymers*, 2018, 10(9): 1007.
- [13] Amrani F, Hung J M, Morawetz H. Studies of polymer compatibility by nonradiative energy transfer. *Macromolecules*, 1980, 13(3): 649—653.
- [14] Dharni S, De Mello A J, Rumbles G, et al. Phthalocyanine fluorescence at high concentration: dimers or reabsorption effect? *Photochemistry and Photobiology*, 1995, 61(4): 341—346.
- [15] Dunstan D E, Hill E K, Wei Y L. Direct measurement of polydiacetylene 4-butoxycarbonylmethylurethane segment orientation and distortion in shear: semidilute solutions. *Macromolecules*, 2004, 37(4): 1663—1665.
- [16] Dunstan D E, Wei Y. Compressive elasticity in polymer Couette flow. *The European Physical Journal Applied Physics*, 2007, 38(1): 93—95.
- [17] 刘冬梅, 刘茗竹, 卢宇源等. 近平衡态与快速启动剪切下缠结高分子流体流变行为研究. *高分子学报*, 2015(7): 858—866. (Liu D M, Liu M Z, Lu Y Y, et al. Studies of rheology for entangled polymer fluids in the near - equilibrium state and during startup shear. *Acta Polymerica Sinica*, 2015(7): 858—866.)

(责任编辑 杨可盛)