

· 研究论文 ·

## 壳聚糖-京尼平纳米凝胶体系交联动力学与应用

赵欣悦<sup>1,2</sup> 李培通<sup>1,2</sup> 刘砚华<sup>3</sup> 胡冰<sup>3</sup> 刘勇刚<sup>1\*</sup> 陈全<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院长春应用化学研究所 高分子物理与化学国家重点实验室 长春 130022)

(<sup>2</sup>中国科学技术大学应用化学与工程学院 合肥 230026)

(<sup>3</sup>南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

**摘要** 天然交联剂京尼平交联壳聚糖稀溶液可得到具有生物相容性的纳米凝胶. 利用非对称流场流分离(AF4)对该纳米凝胶交联过程中的尺寸分布及结构演化进行系统研究, 发现纳米凝胶分子量分布很宽, 跨越3个数量级, 但尺寸分布较窄. 为探究该规律的普适性, 系统研究了预聚物链的分子量以及交联剂浓度对于凝胶行为的影响. 发现: (1)不同分子量预聚物得到的纳米凝胶具有相似的尺寸与分子量分布特征, 其中相同分子量产物的特征尺寸会随着预聚物分子量的降低而减小, 这一现象是由于达到相同尺寸时, 低分子量预聚物形成凝胶支化程度更高造成的, 这一结论也进一步通过分析比较反应程度与链内密度得到证实; (2)随着交联浓度的提高, 凝胶特征尺寸先逐渐降低再逐渐升高. 这是由于京尼平具有2个交联位点, 交联分两步进行, 尺寸降低是由于链内交联密度增加造成纳米凝胶网络结构塌缩, 后续尺寸升高是由于第一步交联过度后, 反而不利于第二步交联的进行; (3)制备的壳聚糖-京尼平纳米凝胶由于其尺寸的均一性和亲疏水平衡性, 可作高效乳化剂制备Pickering乳液: 仅需要0.57 wt%的壳聚糖纳米凝胶就可以制备稳定的含油量可高达90%的Pickering乳液.

**关键词** 壳聚糖, 京尼平, 交联, 纳米凝胶, 场流分离, 高内相乳液

**引用:** 赵欣悦, 李培通, 刘砚华, 胡冰, 刘勇刚, 陈全. 壳聚糖-京尼平纳米凝胶体系交联动力学与应用. 高分子学报, 2024, 55(3), 275-286

**Citation:** Zhao, X. Y.; Li, P. T.; Liu, Y. H.; Hu, B.; Liu, Y. G.; Chen, Q. Crosslinking kinetics and application of chitosan-genipin nanogel. *Acta Polymerica Sinica*, 2024, 55(3), 275-286

纳米凝胶颗粒是由高分子链交联形成的三维网络颗粒. 在不同溶剂中, 凝胶颗粒会随着溶剂质量和交联密度的不同发生不同程度的溶胀, 而达到几十纳米到100 nm的尺寸. 当尺寸达到微米级别时, 通常被称为微凝胶<sup>[1,2]</sup>. 近年来, 微纳凝胶在药物输送、组织工程和生物医药植入等领域的应用日益受到关注<sup>[3-6]</sup>.

壳聚糖基的微纳凝胶由于其生物相容性、无毒性、稳定性和生物可降解性, 在生物医药领域具有广泛的应用前景<sup>[7-9]</sup>. 壳聚糖微纳凝胶通常会由多官能团试剂如三聚磷酸钠、戊二醛、二异氰

酸酯和环氧化合物交联而成<sup>[10-12]</sup>. 然而上述这些交联剂均具有一定的细胞毒性, 降低了交联得到的壳聚糖纳米凝胶的生物相容性.

使用天然交联剂京尼平交联壳聚糖可解决生物相容性的问题<sup>[13,14]</sup>. 京尼平是由从梔子花中提取出来的京尼平苷水解得到的. 除了可以交联壳聚糖, 京尼平还具有一定药理性能. 传统中医会将其应用在缓解II型糖尿病、头痛、炎症以及肝功能紊乱等方面<sup>[12,15,16]</sup>. 京尼平在食品方面也有所应用, 其在有氧气加热的条件下与仲胺基团反应呈蓝色, 可作为天然的食品色素添加剂<sup>[17,18]</sup>.

特约论文; 2023-10-24收稿, 2023-11-28录用, 2024-01-17网络出版; 国家重点研发计划“政府间国际科技创新合作”重点专项(项目号 2018YFE0121400)资助.

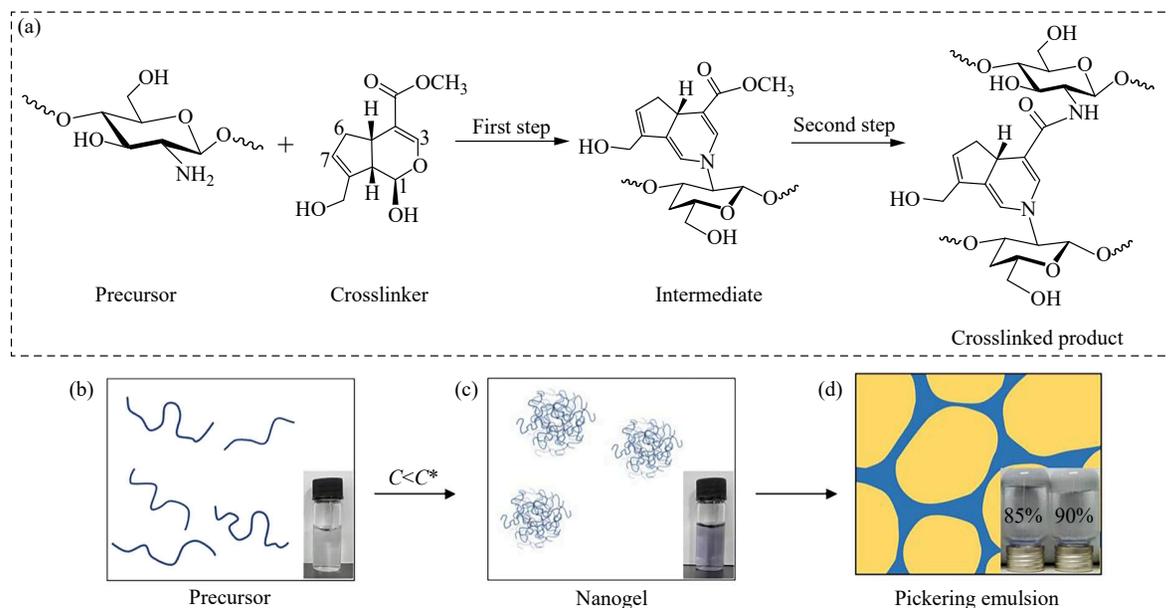
\* 通信联系人, E-mail: yonggang@ciac.ac.cn; qchen@ciac.ac.cn

doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2023.23253

由京尼平交联壳聚糖得到的纳米凝胶还保留了壳聚糖凝胶原有的可降解等特性<sup>[19-23]</sup>. 除此之外, 近期 Hu 等发现, 由于京尼平具有一定的疏水性在与壳聚糖交联形成纳米凝胶后, 可以用来制备食品级的高内相 Pickering 乳化剂, 乳化程度高达 90%<sup>[24]</sup>.

京尼平交联壳聚糖的化学反应(图 1(a))简单

可控, 每一个京尼平分子可以和两个相同链上或不同链上的氨基发生链内或链间交联反应, 该反应在 37 °C 下即可发生, 且反应条件比较温和, 当反应物稀释到低温溶剂中时, 交联反应几乎停止, 因此很容易通过升降温将交联反应终止在不同的阶段. 因此该体系可作为研究基于生物大分子微纳凝胶交联动力学的模型体系<sup>[25]</sup>.



**Fig. 1** (a) Crosslinking reaction of chitosan using genipin as a crosslinker. Schematic illustration of (b) the precursor solution, (c) the solution of nanogels, and (d) the Pickering high internal phase emulsions stabilized by the nanogels. The images of the corresponding samples are shown as inset in panels (b) and (c) respectively.

近期 Zhao 等发展了通过非对称流场分离 (AF4) 与多检测器联用的方法来表征不同交联阶段的纳米凝胶颗粒的尺寸和结构演变<sup>[26]</sup>. 他们选择重均分子量  $M_w=192 \text{ kg/mol}$  的壳聚糖链为预聚物 (precursor), 配制远低于重叠浓度 ( $\sim 0.1 \text{ wt\%}$ ) 的无色透明的水溶液 (如图 1(b) 所示), 壳聚糖溶液可通过京尼平交联反应生成纳米凝胶颗粒, 交联后的溶液变成蓝灰色 (如图 1(c) 所示). 为了分离不同尺寸的凝胶, 他们使用了非对称流场分离技术. 该技术相较于常规的体积排除色谱技术的最明显的优势是不使用固定相, 因此不会受到因高分子与色谱填料之间发生相互作用导致的吸附等效应的影 响, 适合于研究具有极性或者含有离子的生物大分子体系<sup>[27-29]</sup>. 将非对称流场分离设备与示差折光检测器 (RI)、多角度激光光散射 (MALLS)、紫外光谱 (UV) 联用, 可以分别测得不同级分高分子的含量、分子量、尺寸和反应程度 (即交联程度). 同时, 根据不同交联时间所得

样品的场流分离级分的链结构差异可以分析出交联反应的动力学特征. 他们发现京尼平交联壳聚糖体系一个突出的特点就是随着交联的进行, 高分子上的电荷数会随着氨基的交联反应而减少, 因此形成的溶胶或者凝胶的疏水性会增加, 进而导致复杂的链尺寸和分子量分布.

此外, Zhao 等<sup>[26]</sup>还发现有别于传统合成高分子形成的纳米凝胶, 京尼平交联壳聚糖反应后形成的凝胶颗粒的分子量虽跨越了 3 个数量级 (从  $10^5 \sim 10^8 \text{ g/mol}$ ), 但是其尺寸的分布却相对更均匀: 即纳米凝胶分子量的急剧增加并未引起尺寸的显著增大, 90 wt% 以上的凝胶颗粒的尺寸低于 40 nm. 为了解释该现象, 他们提出了纳米凝胶尺寸的控制机制: 一方面, 由于壳聚糖的高分子链的具有较高的刚性, Kuhn 链段的长度  $l_k$  为 20 nm, 因此当尺寸大于 20 nm 的预聚物发生链内交联时, 高分子链的折叠会受到链弯曲势能的限制, 使得纳米凝胶颗粒的尺寸下限大于 20 nm.

另一方面,在链间交联的作用下,纳米颗粒的分子量会不断增加,大尺寸的纳米颗粒受到的链弯曲势能的影响较小,可以发生链内的交联.在链内和链间交联的共同作用下,更大尺寸的凝胶链上的电荷密度会降低,这导致了链的疏水性和柔顺性的增加,因此得到的纳米凝胶更容易发生体积塌缩,使得纳米凝胶尺寸增幅远小于分子量的增幅,最终导致跨越3个数量级的分子量的纳米凝胶颗粒具有近似的尺度,其内部的平均浓度从接近于预聚物溶液的浓度(~0.1 wt%)增加到接近于壳聚糖本体的浓度(~45 wt%).

我们认为,上述机制可能具有一定的普适性.据此,本工作进一步拓展和深化了京尼平交联壳聚糖的动力学机制的研究,从三个方面展开:一是研究不同的预聚物链分子量对于最终形成的纳米凝胶颗粒的尺寸分布的影响;二是研究不同交联剂含量对于交联程度和形成的纳米凝胶颗粒的尺寸分布的影响;三是探索了上述制备的纳米凝胶颗粒在Pickering乳液中的应用(如图1(d)所示).

## 1 实验部分

### 1.1 原料

在此前的工作中,Liu等研究了一系列的商业化的脱乙酰度~95%的壳聚糖10个样品,样品均购于德国Heppe Medical Chitosan (HMC+)公司<sup>[30,31]</sup>.在本文中我们分别选取分子量较低、中等和最高的CS95-20、CS95-200、CS95-3000样品来研究,其中95代表壳聚糖的脱乙酰度约为95%,20,200,3000分别代表在20℃下,1 wt%壳聚糖溶液的黏度(单位mPa·s)数值.醋酸(CH<sub>3</sub>COOH,分析纯)和醋酸铵(CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>,分析纯)购于美国Sigma-Aldrich公司,京尼平(纯度>98%)购于中国江西临川之信生物科技有限公司.

### 1.2 非对称流场流分离与多角激光光散射联用实验(AF4-MALLS)

AF4实验使用Wyatt公司的Eclipse DualTec系统(Dernbach,德国),该系统包括153 mm长,350 μm厚的梯形流道和截留分子量为10 kg/mol的再生纤维素半透膜.该系统配置的检测器包括DAWN HELEOS II型18角度激光光散射检测器、DynaPro Nanostar动态光散射检测器(DLS)、Optilab T-Rex型示差检测器和紫外分光光度检

测器.实验过程中的流动相采用265 mmol/L CH<sub>3</sub>COOH/200 mmol/L CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (pH=4.5)的缓冲溶液,测试前利用0.22 μm的微孔滤膜过滤2遍.首先进行淋洗模式,后切换至聚焦模式,流动相流经检测器的流速和聚焦流速分别为1和1.5 mL/min,维持2 min,之后在聚焦模式下进样200 μL并维持3 min,随后由聚焦模式切换回淋洗模式,交叉流速在10 min内由2.0 mL/min呈指数衰减到0.1 mL/min,并在10 min内一直维持0.1 mL/min.最后在无交叉流速的情况下进一步洗脱,将流道冲洗干净,从而保证下一次实验基线的稳定<sup>[30,31]</sup>.

首先,利用AF4与多检测器联用设备对3种不同分子量的壳聚糖进行分子量与链构象的表征.样品先通过AF4进行分离,得到不同级分的单分散样品.分离后的各个级分流经静态光散射检测器和示差检测器,得到不同级分在不同角度散射下的散射光强以及各级分的浓度.在Wyatt Astra软件上对数据进行收集和分析,利用Berry公式 $\sqrt{\frac{Kc}{R_{\theta}}} = \frac{1}{\sqrt{M}} \left( 1 + \frac{8\pi^2 n^2}{3\lambda^2} R_g^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \right)$ 进行线性拟合<sup>[32-34]</sup>,各级分在不同角度的散射光强下对散射角度作图,通过直线的截距可得到样品的分子量 $M$ ,通过斜率可得到样品的回转半径 $R_g$ .表1列出了本文所用3种壳聚糖的基本信息.

**Table 1** Information of precursor chitosan chain.

Sample	DD <sup>a</sup> (%)	$M_w$ <sup>b</sup> (kg/mol)	$M_n$ <sup>b</sup> (kg/mol)	$N_n$ <sup>b</sup>	$R_{gz}$ <sup>c</sup> (nm)
CS95-20	95.4	64.7	49.4	303	25.5
CS95-200	95.2	191.7	107.7	660	52.1
CS95-3000	93.5	378.0	189.9	1160	77.6

<sup>a</sup> Degree of deacetylation (DD) obtained from <sup>1</sup>H-NMR on a Bruker 400 MHz spectrometer; <sup>b</sup> Average number of monomers per chain calculated from 163.1 g/mol per monomer; <sup>c</sup> Weight-average molar mass  $M_w$ , number-average molar mass  $M_n$ , and z-average radius of gyration  $R_{gz}$  of chitosan precursor determined by AF4-MALLS.

随后用AF4与多检测器联用设备检测交联反应不同阶段的凝胶颗粒的结构与分布.将京尼平的甲醇溶液逐滴加入壳聚糖溶液(0.2 mg/mL)中,在搅拌5 min后,用0.45 μm的亲水PES过滤膜过滤出溶液(先混合后过滤而非先过滤后混合是为了防止混合搅拌过程中引入杂质,混合过程在室温下

迅速进行, 交联反应几乎不发生), 随后在 37 °C 恒温自动进样器中进行交联反应. 在不同反应阶段, 将 200  $\mu\text{L}$  样品注入室温运行的 AF4 分离系统中. 该交联反应持续 48 h, 每 43 min 进样 1 次.

### 1.3 单机动态光散射实验(DLS)

使用 Wyatt DynaPro Nanostar 动态激光光散射仪, 在 658 nm 波长下进行测试, 散射光角度为 90°. 将京尼平甲醇溶液逐滴加入壳聚糖溶液中, 得到混合溶液中包含 0.2 mg/mL 壳聚糖和不同浓度的京尼平. 将混合溶液进行搅拌并脱气, 然后利用 0.45  $\mu\text{m}$  孔径的滤膜过滤注入石英池中, 实验温度为 37 °C, 反应时间为 48 h, 每 10 min 收集 1 次动态光散射数据.

### 1.4 壳聚糖纳米凝胶稳定高内相乳液的制备

与 1.3 节中的实验方法类似, 制备得到 500 mL 包含 0.2 mg/mL 壳聚糖和 54.5  $\mu\text{g/mL}$  京尼平的纳米凝胶溶液, 在油浴锅中 37 °C 搅拌加热 48 h, 得到深蓝色纳米凝胶溶液. 将由 CS95-200 为预聚物制备得到纳米凝胶溶液利用超滤杯进行浓缩, 由原本的 0.02 wt% 浓缩至 0.57 wt%. 将浓缩后的壳聚糖纳米凝胶溶液与葵花籽油进行混合, 在分散机(IKA T18 均质机, 德国)上, 以 5000 r/min 转速分散溶液 1 min, 形成均一的乳液. 按照上述方法, 调整混合溶液中油相浓度为 75%~95%, 进行 5 组对照实验.

## 2 结果讨论

### 2.1 分子量和交联剂含量对纳米凝胶平均链尺寸的影响

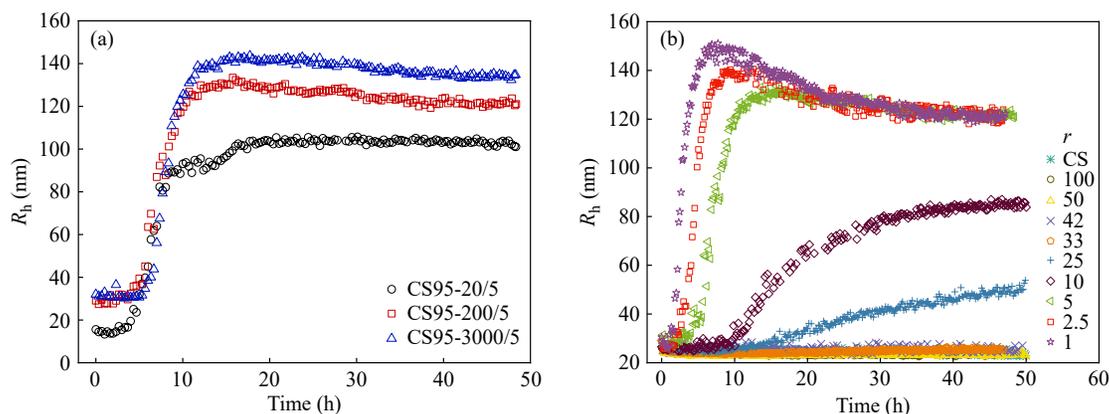
首先选取了 3 种不同分子量的壳聚糖 CS95-

20, CS95-200 和 CS95-3000 作为预聚物, 研究预聚物分子量对纳米凝胶平均尺寸的影响. 3 个样品初始溶液浓度均控制在  $c=0.2$  mg/mL, 京尼平的浓度为 54.5  $\mu\text{g/mL}$ . 对于 CS95-200, 我们此前的研究表明其重叠浓度为  $c^*=1.3$  mg/mL, 因此其  $c/c^*=0.15$ , 对于 CS95-20 和 CS95-3000, 可以利用 Gauss 链(预聚物构象满足 Gauss 链的假设会在后续图 4 中得到证实)  $c^*\sim M_n^{-1/2}$  的标度计算 CS95-20 和 CS95-3000 溶液的  $c/c^*$  分别为 0.10 和 0.20, 表明 3 个样品的溶液浓度均远小于重叠浓度.

为了更直观地表明实验的参数, 利用壳聚糖单体的分子量 163.1 g/mol 可计算出壳聚糖单体在溶液中的物质的量浓度为 1.2 mmol/L, 而京尼平的浓度为 54.5  $\mu\text{g/mL}$ , 利用京尼平的分子量 226.2 g/mol 可计算出其物质的量浓度为 0.24 mmol/L, 因此壳聚糖单体和京尼平的摩尔比为  $r=5$ . 分别命名 3 个样品为 CS95-20/5、CS95-200/5 和 CS95-3000/5.

随后, 选取了分子量居中的壳聚糖 CS95-200, 在很宽的范围内(2.7~272.2  $\mu\text{g/mL}$ )改变京尼平的浓度, 对应的  $r=100$  到 1, 跨越了 2 个数量级, 样品命名为 CS95-200/ $r$ . 由于京尼平为双官能度, 而脱乙酰度为 95% 壳聚糖可以看成具有 0.95 的官能度, 因此等当量点发生在  $0.95r/2 = 1$ , 即  $r=2.1$  的位置, 因此  $r=100$  到 1 跨越了等当量点.

图 2(a)和 2(b)分别展示了改变分子量和改变京尼平含量得到的纳米凝胶的流体学半径  $R_h$  随着反应时间的变化. 图 2(a)中可见, 不同分子量预聚物形成纳米凝胶的过程中,  $R_h$  均经历了 3 个阶段的变化: 其中阶段 I 为 0~4 h, 此时纳米



**Fig. 2** (a) Average hydrodynamic radius  $R_h$  of (a) CS95-20, CS95-200 and CS95-3000 crosslinked by genipin with fixed  $r=5$  at 37 °C, and (b) CS95-200 crosslinked by genipin with varied  $r = 1-100$  as indicated and CS indicates the sample of pure chitosan unreacted with genipin.

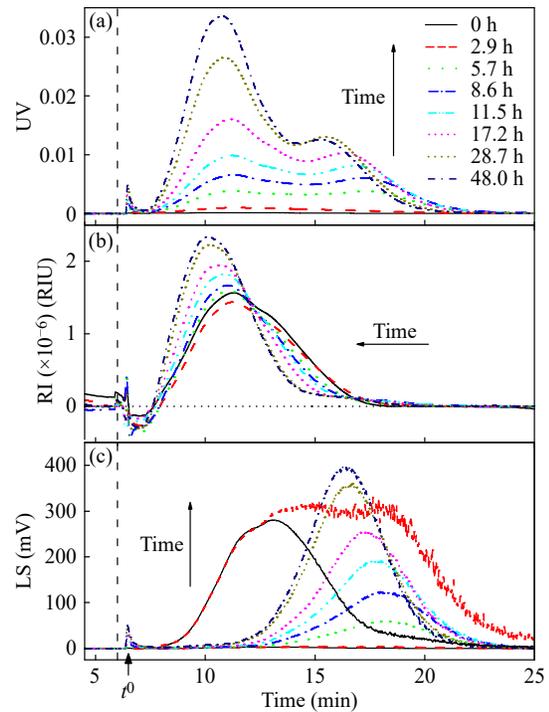
凝胶的尺寸仅发生缓慢增长,为交联反应的诱导期;阶段II为4~12 h,此时凝胶尺寸迅速增长;阶段III为12 h后纳米凝胶尺寸趋近于稳定,并有轻微的下陷趋势,这意味着在这一阶段纳米凝胶的结构通过链内的交联变得更加紧凑.从图2(b)可见,交联过程仅在 $r=5$ 、2.5、1,3种情况下才与图2(a)中 $r=5$ 的情况类似出现3个阶段,其中阶段I和II都会随着京尼平浓度的增加(即 $r$ 降低)而加速,但是最终在阶段III达到的平均尺寸近似.然而,一旦继续降低京尼平的浓度,即增加 $r$ 到10和25后,可以看到尺寸增长明显放缓,且达到平衡时的尺寸明显更小,这可能说明随着交联剂含量降低,链间交联的概率减小.继续增加 $r$ 到33或42后,几乎看不到 $R_h$ 的明显增加,表明链间交联很难发生.利用壳聚糖 Kuhn 链段的分子量  $M_K=6330$  g/mol 可计算得到每个 Kuhn 链段含有约 39 个单体,因此当  $r$  增加到 39 或者更高的时候,交联分子的含量小于了体系中的 Kuhn 链段的数量.此时链内交联可消耗大多数的交联剂,使得链间交联的概率大大降低.

DLS 实验所得到的  $R_h$  仅仅是体系中平均的尺寸变化,为了了解其结构的多分散性,需对纳米凝胶进行分离表征.接下来将分别讨论交联过程的动力学和交联完成后的尺寸分布细节,进一步厘清交联过程的结构演变机制.

## 2.2 交联反应的动力学

利用非对称流场流分离技术(AF4)对样品进行分离处理,表征分子量与尺寸分布随着交联过程的变化.由于图2中展示了链间交联仅在足够小的 $r$ 下才能够发生,而我们制备纳米凝胶一定需要足够量的链间交联,因此选择 $r=5$ 研究不同分子量壳聚糖样品的交联过程.

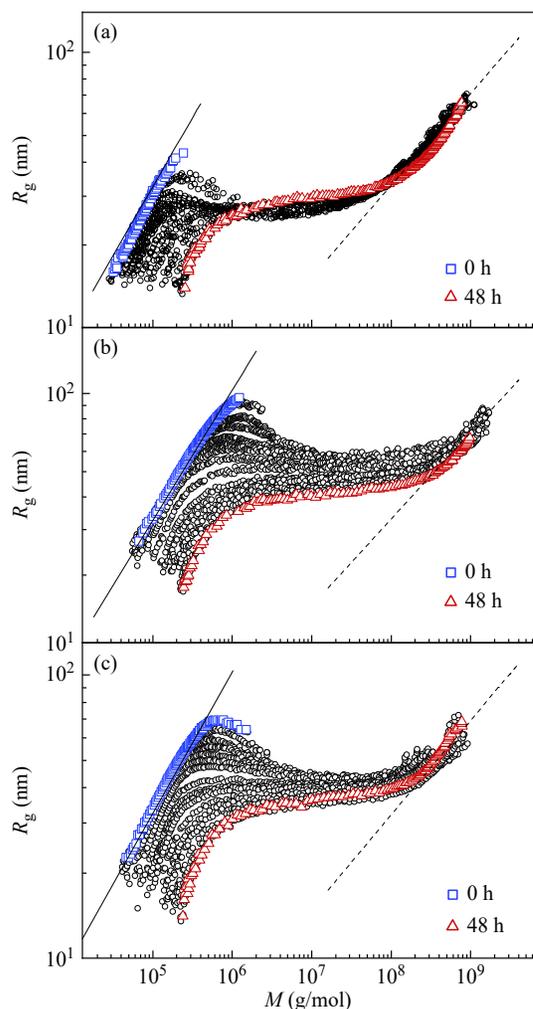
图3为37 °C下无重叠的CS95~200壳聚糖链(浓度为0.2 mg/mL~ $c^*/6$ )和京尼平分子(浓度为54.5  $\mu$ g/mL)在反应48 h过程中的AF4-UV-LS-RI色谱图.在聚焦过程中,未反应的京尼平小分子已由截留分子量为10 kg/mol的半透膜滤掉.壳聚糖上的氨基葡萄糖单元与京尼平反应后有明显的紫外吸收峰.图3(a)为280 nm下样品的紫外吸收信号峰,随着反应的进行紫外信号峰面积迅速增长,逐渐在保留时间为11与16 min位置形成2个比较强的吸收峰,反映出壳聚糖与京尼平反应程度的增强.图3(b)的RI信号为单峰,保留时间为



**Fig. 3** (a) UV, (b) RI and (c) LS response during the reaction of the mixed solution of chitosan and genipin for 48 h are obtained respectively. The dotted line in (b) is value of 0 for the baseline. The vertical dashed line at 6 min marked the starting time of the elution step, and the retention time  $t^0$  of the void peak located at ~6.5 min is indicated by an arrow.

10~11 min,随着反应的进行RI峰位置向低分子量区域移动,相比之下在分子量保留时间为15~16 min区域的信号弱很多,呈现肩峰状态至多占总峰面积的5%.由于RI和UV信号分别与反应后的纳米凝胶的浓度和交联位点(Glu-GNP)的浓度成正比,因此壳聚糖纳米凝胶的摩尔质量越高,交联位点的密度就越高.图3(c)为LS信号吸收峰,由于反应前后的LS信号强度差异明显,0和2.9 h的结果与基线无异,因此我们利用图右侧的新坐标将0和2.9 h的结果放大了100倍.反应进行初期,在分子量保留时间处会出现新的LS信号峰,随着反应的进行新出现的信号峰逐渐增强,并向低分子量保留时间位置移动,在进行到48 h后会停留在16 min保留时间处.

图4展示了3种不同分子量预聚物在48 h交联反应过程中,纳米凝胶回转半径 $R_g$ 相对于分子量 $M$ 的曲线随着反应时间的演变.其中实线是 $R_g = 1/\sqrt{6}l_k(M/M_K)^{1/2} = 0.103M^{1/2}$ 计算得到的壳聚糖在缓冲液中的链尺寸随着分子量的变化.1/2为Gauss链的标度,选择此标度的依据是Zhao等<sup>[26]</sup>



**Fig. 4** Plots of radius of gyration  $R_g$  against  $M$  for (a) CS95-20, (b) CS 95-200 and (c) CS95-3000 obtained after different reaction time as indicated. The solid line is  $R_g = 0.103M^{1/2}$ , while the dashed line is  $R_g = 0.071M^{1/3}$ .

此前的工作，他们根据缓冲液的离子强度计算得到了体系的德拜长度  $r_D = 0.67$  nm，远小于  $l_k = 20$  nm，因此在 Kuhn 链段尺度之上，可以认为高分子为近似的 Gauss 链，该计算结果很好地反应了交联之前预聚物的高分子链(蓝色)的  $R_g$  随  $M$  的变化。

图4中虚线是  $R_g = (3M/4\pi N_{AV}\rho)^{1/3} = 0.071M^{1/3}$  计算得到的尺寸，其中  $N_{AV}$  为阿伏伽德罗常数， $\rho = 1.1$  g/cm<sup>3</sup> 为壳聚糖的密度， $3/4\pi$  来自颗粒是球形的假设，因此虚线为实心球颗粒对应的行为。从图中可以看出，随着交联的进行，第I个阶段中  $R_g$  相对  $M$  曲线的高  $R_g$  部分的链首先发生弯折，此时对应链内交联优先发生在尺寸较大预聚物链上，进入第II阶段，曲线整体向右移动，表明发生了较多的链间交联，使得体系的分子量整体

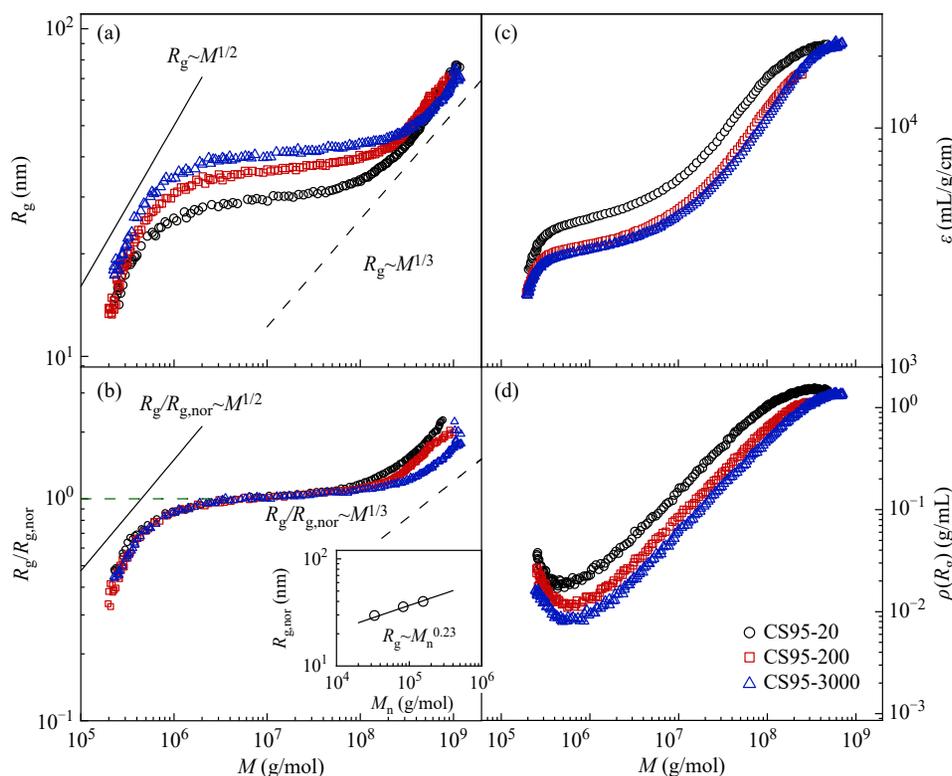
增加。然而，分子量  $10^6$  g/mol 以上(远大于预聚物的重均分子量，见表1)的纳米凝胶的尺寸增加却并不明显。这表明虽然链间的交联能够导致分子量的大幅增加，但是链尺寸增加的幅度远低于分子量增加的幅度。

我们在此前的工作中讨论了这种特殊的分子量和尺寸演变的机制：分子量的增加伴随着氨基的消耗，链上离子数的减少和链内氢键被破坏，直接的后果是高分子链的疏水性的增加和链刚性的降低，两者都会抑制尺寸的增加。随着反应的持续进行，高分子量部分链尺寸又发生上翘，这主要由于当壳聚糖颗粒内部的密度逐渐接近壳聚糖本体密度后，链内交联几近饱和，但由于颗粒疏水性的增加，颗粒间会发生一定程度的聚集从而形成更大尺寸聚集体。此前的研究表明，聚集体的含量在整个体系中的含量不到5%，体系中的主体还是尺寸较为均匀，但分子量分布很宽的凝胶颗粒。

### 2.3 交联反应完成后的产物尺寸分布的 $M$ 依赖性

虽然我们在此前的工作中报道过图4(b)结果，但没有讨论尺寸分布对于预聚物分子量的依赖性。图5(a)对比了48 h反应完成后，基于不同预聚物的纳米凝胶回转半径  $R_g$  相对分子量  $M$  的曲线。从图中可以观察到，即使预聚物链的分子量不同，但最终得到的产物的  $R_g \sim M$  曲线行为非常近似，都是链尺寸先随分子量的升高而增大，在分子量  $10^6 \sim 10^8$  g/mol 范围内  $R_g$  出现平台，最后在  $10^8$  以上尺寸显著增加。对于 CS95-200，我们此前工作提出 CS95-200 产生 40 nm 左右的  $R_g$  平台主要与链刚性有关。由于壳聚糖链的 Kuhn 链段长度为 20 nm，当链内的交联反应发生时，链弯曲势能会限制链的弯曲与折叠，限制了链内交联发生的尺度。

该机制在本工作中得到了进一步地证实。首先，我们注意到，虽然预聚物的分子量从 CS95-20 到 CS95-3000 增加了6倍，其  $R_g$  平台的尺寸仅小幅度地增加，为了进一步定量说明  $R_g$  平台增加的幅度，在图5(b)中采用了归一化(normalization)的方法，即选取平台值  $R_{g,nor}$  将  $R_g$  归一化，并将  $R_g/R_{g,nor}$  重新对  $M$  作图。从图5(b)中可见，归一化后3条曲线在  $R_g$  平台到左侧的区域几乎完全重合，说明其整体的尺寸分布非常近似。同时，将  $R_{g,nor}$  对预聚物  $M_n$  作图5(b)内部的插图， $R_{g,nor}$  的



**Fig. 5** Plots of (a) radius of gyration  $R_g$  after 48 h reaction, (b)  $R_g$  normalized by  $R_{g,nor}$  with inset plots of  $R_{g,nor}$  against  $M_n$  and the dashed line represents  $R_g/R_{g,nor} = 1$ , (c) UV adsorption coefficient  $\varepsilon$  and (d) chain density  $\rho(R_g)$ . All parameters are plotted against  $M$ .

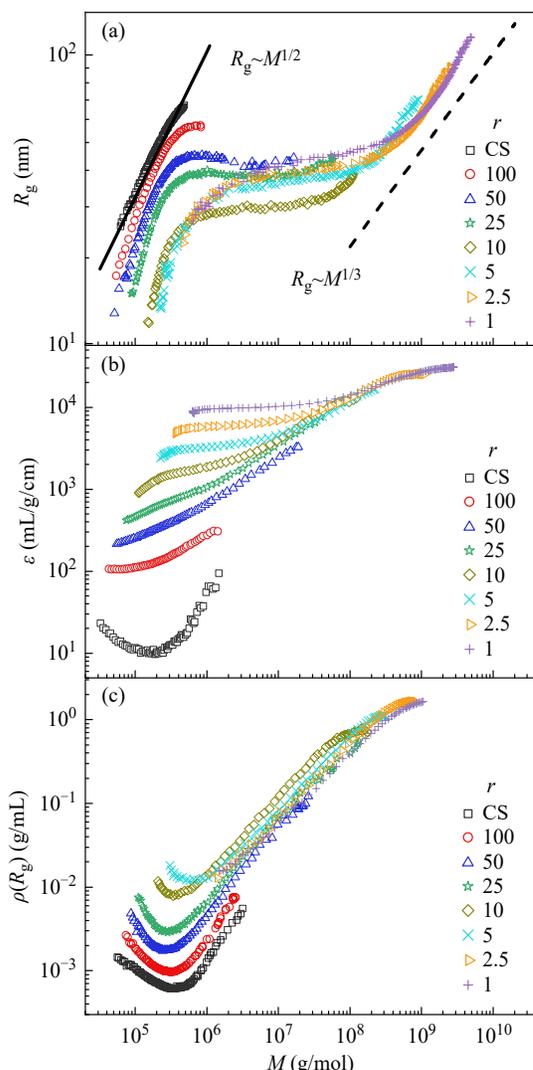
$M_n$  依赖性非常弱, 可以用  $R_{g,nor} \sim M_n^{0.23}$  的标度近似地表示. 需要指出的是, 该标度关系并不表示纳米凝胶尺寸的分子量依赖性, 而是表示在不同的预聚物分子量条件下, 相同分子量的纳米凝胶的尺寸的区别, 这种尺寸的区别与体系中的超支化的拓扑结构相关: 由于 CS95-20、CS95-200 和 CS95-3000 的分子量之比近似于 1:3:6, 因此 CS95-20 和 CS95-200 可以分别看成 CS95-3000 经过 6 等分和 2 等分切割得到的链, 切割后的短链需要经过更多次的链间交联才能达到相同的分子量, 因此预聚物分子量越小, 得到的凝胶支化程度越高, 尺寸也越小.

为了进一步验证上述推论, 图 5(c) 和 5(d) 分别展示了纳米凝胶紫外吸收系数  $\varepsilon$  和链内的局部密度  $\rho(R_g)$ . 其中, 图 5(c) 中的紫外吸收系数可通过  $\varepsilon = \frac{A}{L \cdot c}$  计算, 其中  $A$  为壳聚糖与京尼平反应后在 280 nm 产生的紫外吸收峰的信号强度,  $L$  为样品池的厚度,  $c$  为壳聚糖浓度, 由于 3 个样品的单体和交联剂的浓度均相同, 使用的样品池尺寸也相同, 所以  $\varepsilon$  的差别主要源于  $A$  的差别, 可以

用  $\varepsilon$  来表明反应程度的高低. 图 5(d) 展示了通过  $\rho(R_g) = 3M/(4\pi N_{AV} R_g^3)$  计算得到的链内局部交联密度. 从图 5(c) 和 5(d) 同时也可以看出, 预聚物链的分子量越低, 在形成相同分子量  $M$  的产物的  $\varepsilon_{microgel}$  越大, 表明交联程度越高;  $\rho(R_g)$  也越大, 表明纳米凝胶颗粒支化程度更高, 内部密度更大, 因此尺寸更小, 该结果支撑了我们此前对于  $R_{g,nor} \sim M_n^{0.23}$  标度的讨论.

图 6(a) 展示了不同交联剂浓度下 ( $r = 1 \sim 100$ ), 壳聚糖 CS95-200 与京尼平经过 48 h 反应后得到的纳米凝胶的回转半径  $R_g$  与  $M$  的关系. 此前在图 2 中, 展示了通过平均流体力学半径  $R_h$  随着反应时间的变化可以将样品归为 3 类: 几乎不发生链间交联的  $r = 100$  和 50 样品, 过渡区域的  $r = 25$  和 10 样品和充分发生链间交联的  $r = 5, 2.5$  和 1 样品, 通过比较图 6(a) 中这些样品的尺寸分布, 可以进一步认识这些样品结构上的区别.

首先, 对于  $r = 100, 50$  的样品, 发现其与预聚物样品相比只是高  $M$  部分发生了弯折, 低  $M$  区域稍许向高  $M$  移动, 上述结果均表明样品内部仍以链内交联为主, 这是由于配制的溶液  $c/c^* =$



**Fig. 6** Plots of (a) radius of gyration  $R_g$ , (b) UV adsorption coefficient and (c) chain density  $\rho(R_g)$  against  $M$  for the samples obtained after 48 h reaction. The solid line in (a) is  $R_g = 0.103M^{1/2}$ , while the dashed line in (b) is  $R_g = 0.071M^{1/3}$ . Among them, CS represents the sample of pure chitosan unreacted with genipin.

0.15, 分子链重叠水平不高, 在交联初期以链内的交联为主. 由于体系中的链尺寸分布较宽, 大尺寸的预聚物可发生更多的链内交联, 使得高  $M$  部分尺寸下降. 其次, 对于  $r=25$  和 10 的样品,  $R_g$  平台逐渐凸显出来, 但是从  $r=50$  到 25 再到 10, 其平台随着交联剂的增加而降低. 虽然交联剂含量增多可以同时增加链内和链间交联, 但平台处的尺寸下降表明链内交联仍占主导. 当交联剂的含量继续增加时, 即当  $r=5, 2.5$  和 1 样品,  $R_g$  平台对应的链尺寸发生了反转, 即增加交联剂的含量, 平台的高度不降反增. 从图 2 中可见, 对于  $r=5, 2.5$  和 1, 3 个样品, 反应后期的平均  $R_h$  的演

变方式几乎一致, 但显然 3 个样品内部的链尺寸分布是不同的.

我们预测的等当量点在  $r=2.1$  的位置. 当体系达到等当量点附近时, 大量的氨基在反应初期被壳聚糖和京尼平的第一步交联反应消耗, 此时可供进一步发生第二步链内或者链间交联的位点随着交联剂的增加而减少. 因此, 平台尺寸的变化出现了翻转. 结合图 6(b) 和 6(c) 的结果可以进一步理解该转变, 图 6(b) 中, 随着交联点含量的增加, 反应的程度一直在增加, 表明与壳聚糖反应的位点数量仍随着交联点数量的增加而增加, 这是由于如果壳聚糖的氨基和壳聚糖数量相等时  $r=2.1/2=1.05$ , 因此即使  $r$  从 2.5 降低到 1.0 时, 仍然可以使得反应程度增加. 但如果从京尼平的角度来看, 可能单个位点悬挂交联剂的分子数量相较于双位点的有效交联的交联剂的分子数量也在上升. 该解释与 6(c) 中的结果一致, 当  $r$  从 100 降低到 10 的过程中, 相同  $M$  的  $R_g$  内的链内密度一直在增加, 但是当  $r$  继续从 10 降至 1 时, 相同  $M$  的  $R_g$  内的链内密度在高  $M$  的区域不增反降.

图 7 所示的过程进一步解释了上述机制: 当交联剂不足时, 增加交联剂的含量可以同时提高链内和链间的交联程度, 但是当交联剂将达到等当量点时, 由于大部分的氨基位点被占据, 反而让双位点的有效交联变得更加困难.

## 2.4 壳聚糖纳米凝胶溶液高内相乳液研究

利用 CS95-200/5 浓缩制备了高内相乳液. 壳聚糖纳米凝胶的尺寸为 40 nm 左右, 低于 Hu 等<sup>[24]</sup>制备的 200 nm, 因此比表面积更大. 图 1(d) 显示了高内相乳液的形态, 其中黄色和蓝色区域分别是内部油相和外部水相. 根据 Hu 等的工作, 壳聚糖纳米颗粒具有亲油性和亲水性的平衡, 可以在界面处驻留. 在本研究中制备的纳米凝胶颗粒亦具有很高的乳化性能. 图 8 中分别为不同油相比比例制备得到乳液的照片, 上图为刚制作完成的乳液, 下图为倒置 10 min 后的乳液. 从图中可知, 壳聚糖浓度为 0.57 wt% 的纳米凝胶溶液在含油量 90% 以下所制备出的乳液均可以倒置不流动, 表明内部的网络结构可以支撑自身重力, 本工作中制备的纳米凝胶可以作为稳定界面的乳化剂使用, 这是由于 (1) 壳聚糖与京尼平交联后, 纳米凝胶内部京尼平含量增加导致亲水性的降低和其亲油性的增强, 最终产物具有比较平衡的亲

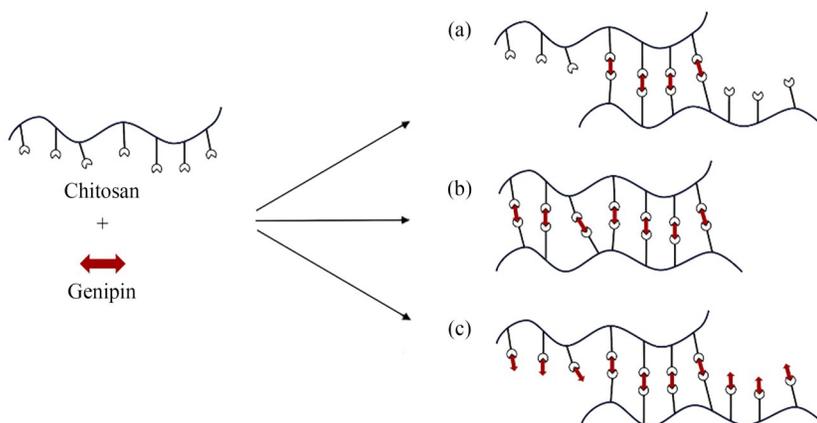


Fig. 7 The diagram shows three possible reaction of chitosan and genipin: (a) chitosan is excessive; (b) both chitosan and genipin react completely; (c) genipin is excessive.



Fig. 8 Photograph of the high internal phase emulsions (HIPEs) stabilized by the CS-GNP of 0.57 wt% with different oil volume fractions.

水和亲油性和相应的乳化功能; (2) 纳米凝胶尺寸小增加了其比表面积; (3) 尺寸的均一性让其在水油界面能够大面积稳定, 上述三方面性质均有利于改善乳化性能.

### 3 结论

我们研究了不同分子量(重均分子量从 64.7 kg/mol 增加到 378 kg/mol)的预聚物链的分子量对于交联反应动力学的影响. 发现预聚物分子量的变化不会改变交联产物基本的分布特征, 对于 3 种预聚物分子, 均可在反应完成后观察到宽分子量分布的纳米凝胶具有较窄的特征尺寸分布. 当预聚物和交联剂的浓度均相等时, 该特征尺寸随着预聚物分子量的减小而减小(图 5), 这

可能是由于低分子量的样品形成的凝胶具有更高度的支化结构. 该结论也通过比较产物的交联程度和链内密度得到了进一步证实, 随着预聚物分子量的减少, 相同分子量凝胶的交联程度和链内密度都得到提高.

对于预聚物相同的体系, 通过控制交联剂的含量可以控制反应的程度. 从动态光散射得到的平均尺寸的增长在交联剂含量足够时似乎达到了饱和. 然而, 通过尺寸随着分子量的变化图(图 6(a))可以发现, 当交联剂达到一定的浓度后, 继续增加交联剂含量反而会抑制第二步交联, 这可能是由于过量的交联剂通过第一步的交联反应过多地占据了交联位点, 抑制了第二步的交联反应, 使得产物链内的浓度不增反降.

最后, 选择了部分的纳米凝胶样品测试了其乳化效果. 发现仅使用 0.57 wt% 的纳米凝胶就可以得到稳定的 Pickering 乳液, 其中的含油量可以高达 90 wt%. 我们分析了纳米凝胶具有优异的乳化性能的几个关键因素: 一是尺寸比较均匀且比表面积大, 有利于纳米颗粒在比较清晰的水油界面的大面积聚集; 二是分子量的宽分布造成了亲疏水/油性的宽分布, 即分子量更大, 内部局部浓度更高的样品往往具有更高的疏水性和亲油性, 这种分布会造成界面处同时存在稳定水相和油相的纳米颗粒. 然而, 这种分布对于最终乳化性能的影响机制仍不完全明确, 值得更多的探索.

## REFERENCES

- 1 Ashfaq, A.; An, J. C.; Ulański, P.; Al-Sheikhly, M. On the mechanism and kinetics of synthesizing polymer nanogels by ionizing radiation-induced intramolecular crosslinking of macromolecules. *Pharmaceutics*, **2021**, 13(11), 1765.
- 2 Wang, Y.; Luo, Y. Y.; Zhao, Q. A.; Wang, Z. J.; Xu, Z. J.; Jia, X. R. An enzyme-responsive nanogel carrier based on PAMAM dendrimers for drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, 8(31), 19899–19906.
- 3 Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V. Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48(30), 5418–5429.
- 4 Sasaki, Y.; Akiyoshi, K. Nanogel engineering for new nanobiomaterials: from chaperoning engineering to biomedical applications. *Chem. Rec.*, **2010**, 10(6), 366–376.
- 5 Yadav, H. K.; Halabi, N. A. A.; Alsalloum, G. A. Nanogels as novel drug delivery systems: a review. *J. Pharm. Pharma. Res.*, **2017**, 1, 5.
- 6 Huynh, U.; Wu, P. D.; Qiu, J. Y.; Prachyathipsakul, T.; Singh, K.; Jerry, D. J.; Gao, J. J.; Thayumanavan, S. Targeted drug delivery using a plug-to-direct antibody-nanogel conjugate. *Biomacromolecules*, **2023**, 24(2), 849–857.
- 7 Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Q. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2010**, 62(1), 83–99.
- 8 Hamed, H.; Moradi, S.; Hudson, S. M.; Tonelli, A. E. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: a review. *Carbohydr. Polym.*, **2018**, 199, 445–460.
- 9 Wu, T. P.; Li, Y.; Lee, D. S. Chitosan-based composite hydrogels for biomedical applications. *Macromol. Res.*, **2017**, 25(6), 480–488.
- 10 Sacco, P.; Borgogna, M.; Travan, A.; Marsich, E.; Paoletti, S.; Asaro, F.; Grassi, M.; Donati, I. Polysaccharide-based networks from homogeneous chitosan-tripolyphosphate hydrogels: synthesis and characterization. *Biomacromolecules*, **2014**, 15(9), 3396–3405.
- 11 Nishi, C. K.; Nakajima, N.; Ikada, Y. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *J. Biomed. Mater. Res.*, **1995**, 29(7), 829–834.
- 12 Manickam, B.; Sreedharan, R.; Elumalai, M. ‘Genipin’-the natural water soluble cross-linking agent and its importance in the modified drug delivery systems: an overview. *Curr. Drug Deliv.*, **2014**, 11(1), 139–145.
- 13 Muzzarelli, R. A. A.; El Mehtedi, M.; Bottegoni, C.; Aquili, A.; Gigante, A. Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone. *Mar. Drugs*, **2015**, 13(12), 7314–7338.
- 14 Muzzarelli, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr. Polym.*, **2009**, 77(1), 1–9.
- 15 Touyama, R.; Takeda, Y.; Inoue, K.; Kawamura, I.; Yatsuzuka, M.; Ikumoto, T.; Shingu, T.; Yokoi, T.; Inouye, H. Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. I. Structures of the brownish-red pigments, intermediates leading to the blue pigments. *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, 42(3), 668–673.
- 16 Li, Q.; Wang, X. L.; Lou, X. X.; Yuan, H. H.; Tu, H. B.; Li, B. Y.; Zhang, Y. Z. Genipin-crosslinked electrospun chitosan nanofibers: determination of crosslinking conditions and evaluation of cytocompatibility. *Carbohydr. Polym.*, **2015**, 130, 166–174.
- 17 Ramos-de-la-Peña, A. M.; Renard, C. M. G. C.; Wicker, L.; Montañez, J. C.; García-Cerda, L. A.; Contreras-Esquivel, J. C. Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). *Ultrason. Sonochem.*, **2014**, 21(1), 43–49.
- 18 Neri-Numa, I. A.; Pessoa, M. G.; Paulino, B. N.; Pastore, G. M. Genipin: a natural blue pigment for food and health purposes. *Trends Food Sci. Technol.*, **2017**, 67, 271–279.
- 19 Mi, F. L.; Sung, H. W.; Shyu, S. S. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **2000**, 38(15), 2804–2814.
- 20 Mi, F. L.; Sung, H. W.; Shyu, S. S.; Su, C. C.; Peng, C. K. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. *Polymer*, **2003**, 44(21), 6521–6530.
- 21 Moura, M. J.; Faneca, H.; Lima, M. P.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. *In situ* forming chitosan hydrogels prepared via ionic/covalent co-cross-linking. *Biomacromolecules*, **2011**, 12(9), 3275–3284.
- 22 Dimida, S.; Demitri, C.; de Benedictis, V. M.; Scalera, F.; Gervaso, F.; Sannino, A. Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: reaction kinetics and structure-related characteristics. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2015**, 132(28), Doi: 10.1002/app.42256.

- 23 Hu, K. P.; Jia, E. N.; Zhang, Q. M.; Zheng, W.; Sun, R. J.; Qian, M. G.; Tan, Y.; Hu, W. L. Injectable carboxymethyl chitosan-genipin hydrogels encapsulating tea tree oil for wound healing. *Carbohydr. Polym.*, **2023**, 301, 120348.
- 24 Hu, B.; Li, Y. Q.; Chen, Q.; Zhang, Z. J.; Shi, C.; Li, W. Facile preparation of biocompatible polymer microgels with tunable properties and unique functions to solely stabilize high internal phase emulsions. *Chem. Eng. J.*, **2017**, 315, 500–508.
- 25 Heimbeck, A. M.; Priddy-Arrington, T. R.; Sawyer, B. J.; Caldorera-Moore, M. E. Effects of post-processing methods on chitosan-genipin hydrogel properties. *Mater. Sci. Eng. C*, **2019**, 98, 612–618.
- 26 Zhao, X. Y.; Tang, J.; Liu, Y. H.; Hu, B.; Chen, Q.; Liu, Y. G. Reaction kinetics of chitosan nanogels crosslinked by genipin. *J. Chromatogr. A*, **2023**, 1710, 464427.
- 27 Wahlund, K. G. Flow field-flow fractionation: critical overview. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1287, 97–112.
- 28 Wagner, M.; Holzschuh, S.; Traeger, A.; Fahr, A.; Schubert, U. S. Asymmetric flow field-flow fractionation in the field of nanomedicine. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(11), 5201–5210.
- 29 González-Espinosa, Y.; Sabagh, B.; Moldenhauer, E.; Clarke, P.; Goycoolea, F. M. Characterisation of chitosan molecular weight distribution by multi-detection asymmetric flow-field flow fractionation (AF<sub>4</sub>) and SEC. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2019**, 136, 911–919.
- 30 Kang, Y.; Wu, X. X.; Ji, X. L.; Bo, S. Q.; Liu, Y. G. Strategy to improve the characterization of chitosan by size exclusion chromatography coupled with multi angle laser light scattering. *Carbohydr. Polym.*, **2018**, 202, 99–105.
- 31 Kang, Y.; Wu, X. X.; Chen, Q.; Ji, X. L.; Bo, S. Q.; Liu, Y. G. Adsorption of poly(vinyl alcohol) on gel permeation chromatography columns depends on the degree of hydrolysis. *J. Chromatogr. A*, **2019**, 1585, 138–143.
- 32 Andersson, M.; Wittgren, B.; Wahlund, K. G. Accuracy in multiangle light scattering measurements for molar mass and radius estimations. Model calculations and experiments. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(16), 4279–4291.
- 33 Liu, Y. G.; Radke, W.; Pasch, H. Coil-stretch transition of high molar mass polymers in packed-column hydrodynamic chromatography. *Macromolecules*, **2005**, 38(17), 7476–7484.
- 34 Berry, G. C. Thermodynamic and conformational properties of polystyrene. I. Light-scattering studies on dilute solutions of linear polystyrenes. *J. Chem. Phys.*, **1966**, 44(12), 4550–4564.

## Research Article

## Crosslinking Kinetics and Application of Chitosan-Genipin Nanogel

Xin-yue Zhao<sup>1,2</sup>, Pei-tong Li<sup>1,2</sup>, Yan-hua Liu<sup>3</sup>, Bing Hu<sup>3</sup>, Yong-gang Liu<sup>1\*</sup>, Quan Chen<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

(<sup>2</sup>School of Applied Chemistry and Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

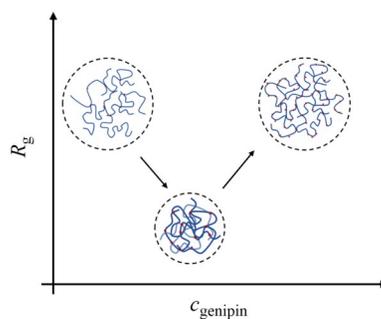
(<sup>3</sup>College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract** The natural crosslinking agent genipin can crosslink chitosan in a dilute solution to obtain biocompatible nanogel particles. The particles can be used as the emulsifier of Pickering emulsion. This study examines the conformation and structural evolutions using asymmetric flow field-flow fractionation (AF<sub>4</sub>) combined with multiple detectors. The nanogel particles show an extremely wide molecular weight distribution but a much narrower size distribution. To explore the universality of this behavior, we adjusted the molecular weight of the prepolymer chain and the crosslinker concentration, respectively. The nanogels obtained from prepolymers with different molecular weights exhibit similar molecular weight and size distributions, but the characteristic size decreases with decreasing  $M$  of the prepolymers. This latter trend is due to the higher crosslinking density and accordingly the higher internal density for the nanogel based on prepolymer of the lower  $M$ . For a given prepolymer, the characteristic size first decreases and then increases with the crosslinker concentration. The

\* Corresponding authors: Yong-gang Liu, E-mail: yonggang@ciac.ac.cn

Quan Chen, E-mail: qchen@ciac.ac.cn

former decrease is caused by the enhancement of intrachain crosslinking, whereas the later increase is attributable to the excessive crosslinkers that attach to the polymer chain as dangling molecules, which suppresses the further intra- or interchain crosslinking reaction. Finally, the nanogel particles obtained in this study turn out to be an efficient emulsifier in preparing high internal phase emulsion due to its uniform size, high specific surface area and balance between hydrophilicity and lipophilicity: a Pickering emulsion with oil content of up to 90% can be stabilized using only 0.57 wt% of the nanogel particles.



**Keywords** Chitosan, Genipin, Crosslinking, Nanogel, Field-flow fractionation, High internal phase emulsion