

自组装囊泡的结构与单分子膜的性质*

苏 盛 辛梅华 李明春

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建省高校功能材料重点实验室 泉州 362021)

摘 要 研究了具有不同主链分子量和侧链长度的 N,N-双烷基化壳聚糖单分子膜的性质. 结果表明, 主链分子量越大, 所形成的 N,N-双烷基壳聚糖单分子膜的结构越紧密. 在主链分子量相同的条件下, N,N-双烷基壳聚糖单分子膜的致密度随着侧链长度的增大而增大, 表明 N,N-双烷基化壳聚糖分子间的缠结嵌套和疏水相互作用力的增大. 比较 N,N-双烷基化壳聚糖单分子膜与相应自组装囊泡的性质发现, 囊泡的药物平衡释放率随着其相应材料单分子膜压缩模量的增大而减小, 呈现出一定的线性关系. 单分子膜压缩模量的大小反映囊泡膜结构的紧密程度.

关键词 有机高分子材料, N,N-双烷基壳聚糖, 单分子膜, 压缩模量, 囊泡, 药物释放

分类号 O636, O648

文章编号 1005-3093(2008)01-0063-05

The structure of self-assembled vesicle and the property of monolayer

SU Sheng XIN Meihua LI Mingchun**

(College of Materials Science and Engineering, Huaqiao University,

The Key Laboratory of Functional Materials for Fujian Higher Education, Quanzhou 362021)

* Supported by National Natural Science Foundation of China No.20274013 and No.20574024, the Key Science Projects of Fujian Province No.2002I004, and the Natural Science Foundation of Fujian Province No.C0310009 and No.E0540001. Manuscript received November 6, 2006; in revised form August 26, 2007.

** To whom correspondence should be addressed, Tel:(0595)22690819, E-mail: mcli@hqu.edu.cn

ABSTRACT The properties of N,N-dialkyl chitosan monolayers have been studied by LB technique. With increasing molecular weight of chitosan backbone and/or length of alkyl chain, both the compressibility and collapse pressure of N,N-dialkyl chitosan monolayer are enhanced. The experiments on drug release behaviors of N,N-dialkyl chitosan vesicles show that the drug-release rate and the equilibrium drug-release ratio are decreased with increasing the compressibility of corresponding monolayer. There is a linear relationship between the compressibility of N,N-dialkyl chitosan monolayers and the equilibrium drug-release ratio of the vesicles.

KEY WORDS organic polymer materials, N,N-dialkyl chitosan, monolayer, compressibility modulus, vesicle, drug-release

囊泡是具有类似细胞膜双分子层结构的超分子组装体, 在仿生学研究、基因载体和药物控制释放以及膜模拟化学等方面有广泛的应用^[1-3]. 囊泡可通过磷脂或双亲性表面活性剂自组装形成. Israelachvili 等^[4]提出了临界堆积参数的概念, 研究分子形状对自组装结构的影响. Helfrich 和欧阳钟灿等^[5]引入自发曲率的概念, 导出了普适的囊泡形状

方程. 但是, 囊泡的直径一般只有几十到几百纳米, 难以用常规实验方法进行研究^[6]. 因此, 对囊泡结构进行模拟是一种有效的研究方法. 可通过所组成的双亲性分子在界面上的组装行为解释囊泡的一些重要性质, Jähnig 等^[7]认为建立一定的关系, 可通过对双亲分子单分子膜的研究认识和预测囊泡的结构与性质. 在此基础上 Feng^[6,8]和 Marsh^[9]分别推导出囊泡与单分子膜之间有关表面压等热力学参数的关系方程.

Feng 和 Marsh 认为, 在温度和分子密度相等的条件下囊泡与单分子膜的表面压相等, 说明单分子膜的 π -A 等温线在一定条件下可以间接反映囊泡的某些性质. 这为通过单分子膜研究囊泡结构与性质提供

* 国家自然科学基金 (20274013 和 20574024)、福建省重大科技项目 (2002I004)、福建省自然科学基金 (C0310009 和 E0540001) 资助项目.

2006 年 11 月 6 日收到初稿; 2007 年 8 月 26 日收到修改稿.

本文联系人: 李明春, 教授

了基础. 通过对 N, N- 双十二烷基壳聚糖五聚体的单分子膜及 LB 膜性质研究, 可论证其形成自组装囊泡的可能性^[10,11]. 本文在此基础上改变 N, N- 双烷基壳聚糖的结构, 考察结构对其单分子膜性质的影响, 比较相应自组装囊泡的药物释放行为, 并建立 N, N- 双烷基壳聚糖单分子膜与其自组装囊泡性质之间的联系.

1 实验方法

实验用原料有: 壳聚糖 (分子量分别为 3000Da, 10000Da, 脱乙酰度为 (80±5)%); 辛醛 (分析纯); 癸醛 (分析纯, Acros); 月桂醛 (分析纯, Fluka); 十二烷基磺酸钠 (分析纯); 硼氢化钠 (分析纯); 维生素 B₁₂ (生化试剂). 其它试剂均为分析纯.

将 6.0 g 壳聚糖放入 180 mL 5% 的醋酸溶液中, 搅拌使其溶解, 在适当温度下加入过量醛和一定量的相转移催化剂十二烷基磺酸钠. 在 100 °C 搅拌反应 8 h 后, 用 NaOH 溶液调节 pH 至 7 左右, 缓慢加入过量的 10% NaBH₄ 溶液, 继续加热搅拌 2-3 h. 然后用冰醋酸调节 pH 至弱酸性, 第二次加入醛, 重复上述反应步骤. 当二次还原完毕后, 用 NaOH 溶液调节 pH 至 9-10, 将沉淀出来的产物用蒸馏水洗至中性, 用丙酮除去过量的醛和还原产物醇, 再用索氏提取器和 Milli-Q Gradient 纯化系统纯化 48 h. 将产物在真空干燥箱中烘干至恒重, 用氯仿萃取出高取代度的 N, N- 双烷基壳聚糖.

将 N, N- 双烷基化壳聚糖配成 10⁻³ mol/L 的氯仿溶液, 用微量进样器取 30 μL 将其缓慢、均匀地滴加在纯水亚相表面上, 待溶液在亚相表面上铺展并挥发约 30 min 后进行压膜, 得到 N, N- 双烷基壳聚糖单分子膜, 用 Wilhelmy 吊片法和 KSV-5000 型 LB 膜分析仪测定其 π-A 等温线. 压膜速率为 10 mm/min, 温度 (25±1) °C. 所有实验均重复 2 次.

使用逆相蒸发法制备 N, N- 双烷基壳聚糖囊泡. 将 0.1g 的 N, N- 双烷基壳聚糖溶于 24 mL 氯仿, 与

8 mL 浓度为 4 mg/mL 的含药 (维生素 B₁₂) 水溶液混合, 浴式超声形成 W/O 乳液. 将所得乳液减压蒸发除去氯仿至半固体胶状, 在真空干燥器室温放置 12 h, 进一步除去剩余的氯仿, 然后在超声波仪中超声 3 min, 得到 N, N- 双烷基壳聚糖囊泡. 将得到的 N, N- 双烷基壳聚糖囊泡用冷冻离心机分离, 除去未包封的药物. 将载药 (维生素 B₁₂) 的 N, N- 双烷基壳聚糖囊泡放入透析袋中, 每隔一定的时间, 用日本岛津 UV-2401 紫外-可见分光光度计测定维生素 B₁₂ 的释放量. 根据所得数据绘载药囊泡的释放量和时间的关系曲线, 测定其药物释放行为.

2 结果与讨论

2.1 N, N- 双烷基壳聚糖单分子膜性质

N, N- 双烷基壳聚糖可在纯水亚相上形成稳定的单分子膜, 图 1 和图 2 分别为 25 °C 下不同主链分子量和不同侧链长度 N, N- 双烷基壳聚糖单分子膜 π-A 等温线, 表 1 列出了这些单分子膜的一些特性参数.

由图 1 可以看出, 主链分子量较大 N, N- 双烷基壳聚糖单分子膜的 π-A 等温线较为陡直, 膜的崩溃压 π_c 较高, 极限分子占据面积 A_{ex} 较小; 此外, 较小主链分子量的 N, N- 双烷基壳聚糖单分子膜随着膜压的增大, 出现一个明显的液态扩张相-液态凝聚相转变 (LE-LC 转变)^[12], 而较大主链分子量的双烷基壳聚糖这一相转变并不明显. 这表明, 主链分子量较大的 N, N- 双烷基壳聚糖的成膜性能比较好, 形成的单分子膜更为紧密.

压缩模量 (compressibility modulus, C_s⁻¹= -A(dπ/dA)) 反映单分子膜的静态弹性^[13], 由膜面分子的凝聚性决定, C_s⁻¹ 越大说明膜的凝聚性和抗形变能力越强. 本文根据单分子膜 π-A 等温线换算成单分子膜的 C_s⁻¹-A 曲线, 来描述单分子膜在压缩过程中的相变和成膜特征 (图 1 中的插图). 在图中可

表 1 不同 N, N- 双烷基壳聚糖单分子膜的崩溃压 (π_c), 极限分子占据面积 (A_{ex}) 及最大压缩模量 (C_s⁻¹, max)
Table 1 Collapse pressure (π_c), extrapolated area (A_{ex}), and maximum compressibility modulus (C_s⁻¹, max) of the surface pressure-area isotherms at water-air interface for different N,N-dialkyl chitosans

M _w of Chitosan(Da)	N-alkyl	Code	π _c /(mN/m)	A _{ex} /nm ²	C _s ⁻¹ , max/(mN/m)
3000	octyl	a1	37.3	0.75	88.5
	decyl	b1	39.2	0.81	94.2
	dodecyl	c1	41.6	0.90	96.4
10000	octyl	a2	38.9	0.74	112.4
	decyl	b2	41.7	0.80	143.3
	dodecyl	c2	43.5	0.83	165.1

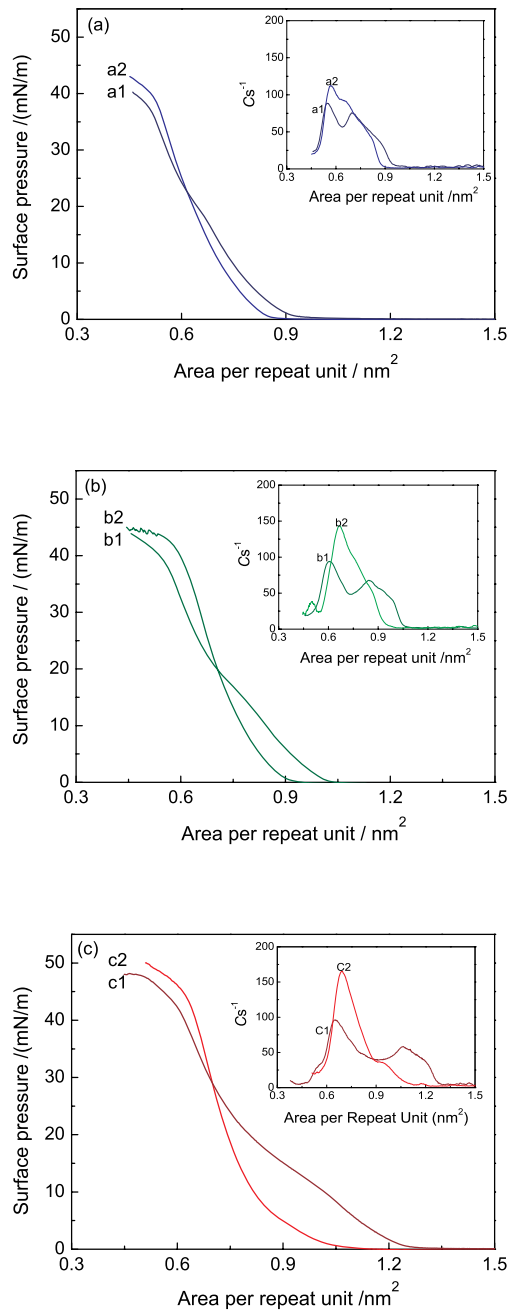


图 1 不同主链分子量 N,N -双烷基壳聚糖单分子膜 π - A 等温线和 C_s^{-1} - A 曲线 (图中符号对应表 1 中的材料)

Fig.1 Surface pressure-area isotherms and C_s^{-1} - A curves of N,N -dialkyl chitosans with different molecular mass (codes corresponding material are shown in table 1) (a) N,N -dioctyl chitosan, (b) N,N -didecyl chitosan, (c) N,N -didodecyl chitosan

见, 小分子量 N,N -双烷基壳聚糖单分子膜在压缩过程中 C_s^{-1} 出现了两个最大值, 分别对应单分子膜的扩张液态-凝聚液态转变点 (LE-LC 相变点) 和凝聚

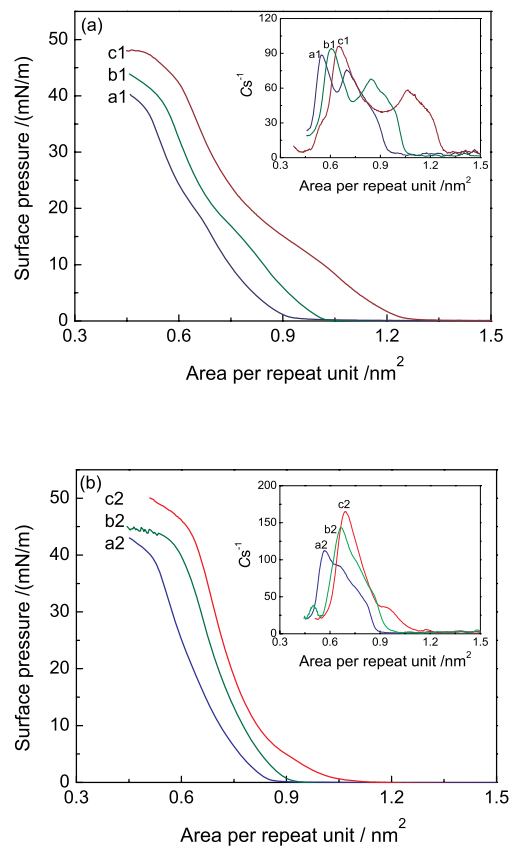


图 2 不同侧链长度 N,N -双烷基壳聚糖单分子膜 π - A 等温线和 C_s^{-1} - A 曲线 (图中标记符号对应的材料见表 1)

Fig.2 Surface pressure-area isotherms and C_s^{-1} - A curves of N,N -dialkyl chitosans with different length of alkyl side-chain (codes corresponding material are shown in table 1) (a) M_w of N,N -dialkyl chitosan backbone is 3000, (b) M_w of N,N -dialkyl chitosan backbone is 10000

液态-固态转变点 (LC-C 相变点); 而大分子量 N,N -双烷基壳聚糖单分子膜在压缩过程中没有明显的 LE-LC 相变, 其 C_s^{-1} 只有一个最大值, 且这个值明显较大. 这说明, 在压缩过程中大分子量 N,N -双烷基壳聚糖的分子构象较难改变, 且其单分子膜具有较强的凝聚性和抗形变性.

图 2 为具有不同侧链长度 N,N -双烷基化壳聚糖的 π - A 等温线和 C_s^{-1} - A 曲线. 不同侧链长度的 N,N -双烷基化壳聚糖 π - A 等温线形状相似; 随着侧链长度的增长, 单分子膜的崩溃压 π_c 和极限分子占据面积 A_{ex} 都增加. C_s^{-1} - A 曲线表明, N,N -双烷基壳聚糖单分子膜的压缩模量随着侧链长度的增长而增大.

π - A 等温线和 C_s^{-1} - A 曲线表明, 主链分子量越

大, 所形成的 N, N- 双烷基壳聚糖单分子膜结构更为紧密. 原因可能是由于分子较长, 更容易与其它分子链发生链嵌套或缠结等作用, 使分子链间的吸引力增强. 这与其它体系中分子量对单分子膜影响规律的报导相似^[14,15]. 根据该结果可以预测, 大分子 N, N- 双烷基壳聚糖所形成的囊泡可能具有更为紧密的膜结构.

以上结果表明, 在主链分子量相同的条件下, N, N- 双烷基壳聚糖单分子膜的致密度随着侧链长度的增大而增大. 这是侧链长度的增长导致了分子间疏水相互作用力的增强造成的. 由此可以推论, 较长侧链的 N, N- 双烷基壳聚糖所形成囊泡的膜结构更为紧密.

2.2 N, N- 双烷基壳聚糖囊泡的药物释放行为

用逆相蒸发法制备的 N, N- 双烷基壳聚糖囊泡

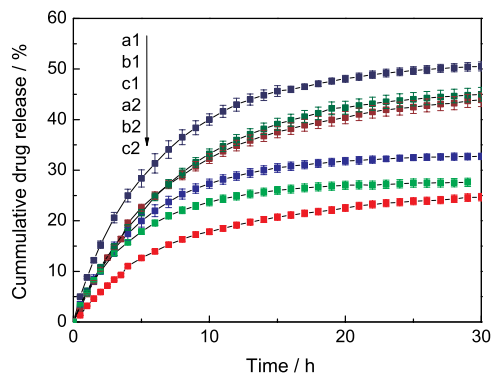


图 3 N,N- 双烷基壳聚糖自组装囊泡的药物释放曲线 (图中标记符号对应的材料见表 1)

Fig.3 Drug release behaviors of different N, N-dialkyl chitosan self-assembled vesicles (codes corresponding material are shown in table 1)

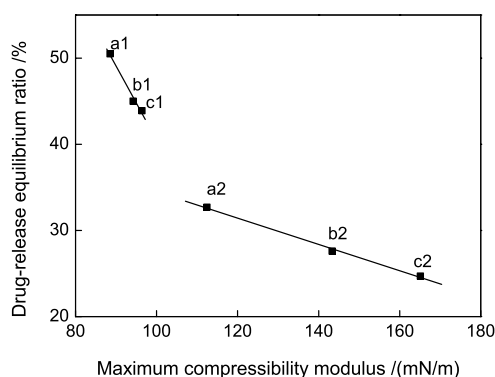


图 4 N,N- 双烷基壳聚糖单分子膜最大压缩模量与其自组装载药囊泡平衡释放率关系 (表 1 中的材料)

Fig.4 Relationships between monolayer maximum compressibility and drug-release equilibrium ratio of corresponding vesicle (codes corresponding material are shown in table 1)

粒径为 100-200 nm. 图 3 表明, 对于烷基侧链相同的 N, N- 双烷基壳聚糖囊泡, 主链分子量较大的自组装囊泡的药物释放速率较慢, 达到平衡的释放百分率也较小; 而对于相同主链分子量的自组装囊泡, 烷基侧链越长, 药物释放速率较低, 达到平衡的释放百分率也低. 这表明主链分子量的增大或烷基侧链长度的增加导致了分子间相互作用力的增强, 从而提高了囊泡膜结构的致密度, 降低了囊泡的药物通透性.

2.3 N,N- 双烷基壳聚糖单分子膜性质与其相应囊泡性质的关系

载药囊泡的药物释放有扩散、蚀解(酶消化)和溶解三种机理. N, N- 双烷基壳聚糖不溶于纯水, 且在纯水中较为稳定, 因此 N, N- 双烷基壳聚糖囊泡的药物释放作用主要是药物在囊泡内外的物理扩散, 其释放行为取决于囊泡分子膜的通透性^[16]. 图 4 反映了 N,N- 双烷基壳聚糖单分子膜最大压缩模量与其自组装囊泡的药物平衡释放百分率之间的关系. 结果表明, 自组装囊泡的药物平衡释放百分率随其相应材料单分子膜最大压缩模量的增大而减小, 且这种变化规律呈现一定的线性关系. 说明 N, N- 双烷基壳聚糖结构的改变导致囊泡分子膜凝聚性的改变, 进而改变其相应囊泡膜结构的通透性.

单分子膜最大压缩模量与其自组装囊泡的药物平衡释放百分率的线性关系, 证实了单分子膜压缩模量的大小可以反映相应囊泡膜结构的紧密程度, 说明可通过测定单分子膜压缩模量预测所形成囊泡膜结构的紧密程度.

3 结 论

相同烷基化条件下, 随着主链分子量的增大, N, N- 双烷基壳聚糖单分子膜的致密度增大; 相同主链分子量条件下, N, N- 双烷基壳聚糖单分子膜的致密度随着侧链长度的增大而增大. 比较研究表明, 囊泡的药物平衡释放百分率随其相应材料单分子膜最大压缩模量的增大而减小, 且这种变化规律呈现一定的线性关系. 说明单分子膜压缩模量的大小可以反映相应囊泡膜结构的紧密程度.

感谢郑州大学李铁生教授和许文俭博士协助测定单分子膜的 π -A 等温线

参 考 文 献

- 1 D.D.Lasic, Novel applications of liposomes, Trends Biotechnol., **16**, 307(1998)
- 2 WANG Shaoqing, HUANG Jianbin, Study and application of liposomes, Daxue Huaxue, **21**(3), 1(2006)
(王绍清, 黄建滨, 磷脂囊泡的研究与应用, 大学化学, **21**(3), 1(2006))

- 3 YANG Heqing, ZHANG Liangying, YAO Xi, On the applications of membrane mimetic chemistry to nanostructured materials, *Chinese Journal of Materials Research*, **13**(6), 561(1999)
(杨合情, 张良莹, 姚 熹, 膜模拟化学在纳米材料中的应用研究, *材料研究学报*, **13**(6), 561(1999))
- 4 J.N.Israelachvili, The science and applications of emulsions – an overview, *Colloids Surf. A*, **91**, 1(1999)
- 5 Z.C.Ouyang, W.A.Helfrich, General equation of mechanical equilibrium of fluid membranes subject to bending elasticity, *Phys. Rev. Lett.*, **59**, 2486(1987)
- 6 S.S.Feng, Interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure–area measurement of the monolayer at the air–water or oil–water interface, *Langmuir*, **15**, 998(1999)
- 7 F.Jähnig, Lipid exchange between membranes, *Biophys. J.*, **46**, 687(1984)
- 8 S.S.Feng, Reply to comment on interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure–area measurement of the monolayer at the air–water or oil–water interface, *Langmuir*, **22**, 2920(2006)
- 9 D.Mash, Comment on interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure–area measurement of the monolayer at the air–water or oil–water interface, *Langmuir*, **22**, 2916(2006)
- 10 M.C.Li, M.H.Xin, T.Miyashita, Preparation of N, N–dilauryl chitosan Langmuir–Blodgett film, *Polymer International*, **51**, 889(2000)
- 11 M.C.Li, M.H.Xin, N, N–Dilauryl chitosan self–assembled vesicles for drug delivery, *Des. Monomers Polym.*, **9**, 89(2006)
- 12 J.T.Davies, E.K.Rideal, *Interfacial Phenomena*, (New York, Academic Press, 1963) p.71
- 13 S.L.Murov, I.Carmichel, G.L.Hug, *Handbook of Photochemistry*, (New York, Dekker, 1993) p.89
- 14 ZOU Gang, FANG Kun, HE Pingsheng, ZHANG Yanze, WU Decheng, Static and dynamic behavior of poly(styrene maleic anhydride) monolayer, *Acta Chimica Sinica*, **61**(8), 1246(2003)
(邹 纲, 方 坤, 何平笙, 张雁泽, 吴德成, 苯乙烯–马来酸酐共聚物单分子膜的静、动态性质, *化学学报*, **61**(8), 1246(2003))
- 15 FANG Kun, ZOU Gang, HE Pingsheng, Static and dynamic elasticities of PMMA monolayers, *Chemical Journal of Chinese Universities*, **23**(12), 2386(2002)
(方 坤, 邹 纲, 何平笙, 聚甲基丙烯酸甲酯单分子膜的静、动态弹性, *高等化学学报*, **23**(12), 2386(2002))
- 16 B.M.Discher, D.A.Hammer, F.S.Bates, D.E.Discher, Polymer vesicles in various media, *Curr. Opin. Colloid Interface*, **5**, 125(2000)