

含氨基酸分子膜的合成、相转移作用 及与生物脂协同组织形态的研究

江纪修

(中山大学化学系)

摘要 研究了含L-亮氨酸及L-异亮氨酸和偶氮苯的单链手性两性化合物 C_{12} -L-Leu-Azo- $C_mN^+(I)$ 和 C_{12} -L-Ile-Azo- $C_mN^+(II)$ ($m=6,10$)的合成及其双层分子膜的相转移作用与卵磷脂和脑磷脂协同自发组织形成的形态。差示扫描热量法测试结果表明:由于手性中心空间位阻的影响,双层分子膜的热力学稳定性: $II > I$; 分子间隔长度(C_m)增长,相转移温度提高。透射电子显微镜观察显示: I 或 II 能与生物脂协同自组织形成单层和多层中空球形的双层分子膜,形态类似生物细胞。含发色团的 I 和 II 可作为研究生物膜相转移、相分离、和流动性的分子探针。

关键词 双层分子膜, L-亮氨酸, L-异亮氨酸, 相转移, 形态

人工合成的单链、双链和叁链脂质两性化合物象生物体的磷脂一样,在水溶液中能自发形成双层分子膜^[1],而且可通过改变分子结构形成螺旋、棒状、管状、叠层状和球状等形态的双层分子膜^[2],制备具有化学催化、光能响应、分子识别、选择性分子运输和分离等物理化学性质的新材料^[3],开发具有细胞识别、免疫响应调节、靶向性药物运输等生理活性的人工细胞(脂质体)^[4]。

国武教授通过合成各种分子结构的两性化合物并研究其相转移特性,得到一些分子结构与其膜相转移作用关系的规律性^[5]。但当含亮氨酸或异亮氨酸和偶氮苯的手性单链两性化合物,使分子中间体积增大时,其相转移作用和与生物脂协同自组织形态的研究还未见报道。

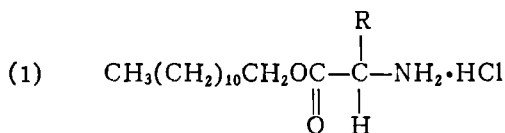
本文报道含亮氨酸(Leu)及异亮氨酸(Ile)和偶氮苯手性单链两性化合物 C_{12} -L-Leu-Azo- $C_mN^+(I)$ 和 C_{12} -L-Ile-Azo- $C_mN^+(II)$ ($m=6,10$)的合成,并用差示扫描热量法(DSC)研究其双层分子膜的相转移作用和用电子显微镜(TEM)观察其与磷脂协同自组织形成双层分子膜的形态。

1 结果与讨论

1.1 C_{12} -L-Leu-Azo- C_mN^+ 和 C_{12} -L-Ile-Azo- C_mN^+ ($m=6,10$)的合成

本文1991年8月18日收到

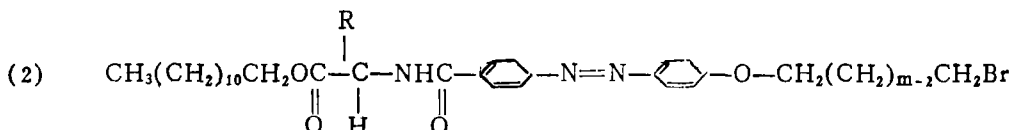
按实验部份合成如下化合物:



R:

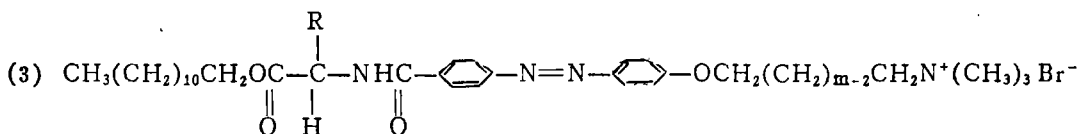
1 R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (手性中心为亮氨酸, Leu)

2 R = $-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{CH}_3$ (手性中心为异亮氨酸, Ile)



3 m = 6, R = R₁ 4 m = 10, R = R₁

5 m = 6, R = R₂ 6 m = 10, R = R₂



R = R₁: C₁₂-L-Leu-Azo-C_mN⁺, 7 m = 6; 8 m = 10

R = R₂: C₁₂-L-Ile-Azo-C_mN⁺, 9 m = 6; 10 m = 10

合成化合物 7、8、9 和 10 的元素分析结果列于表 1。

表 1 化合物 7、8、9 和 10 的分析结果*

Tab.1 Analytical results of compounds 7,8,9 and 10

Compds. Formula	Elemental Analysis (%)			m.p.** (°C)	
	C	H	N		
7 C ₄₀ H ₆₅ N ₄ O ₄ Br ₁ · (1 H ₂ O)	calcd.	62.89	8.84	7.33	r.t→122
	obsd.	62.90	8.75	7.28	
8 C ₄₄ H ₇₃ N ₄ O ₄ Br ₁ · (0.50H ₂ O)	calcd.	65.16	9.20	6.91	r.t→95
	obsd.	64.91	9.10	6.64	
9 C ₄₄ H ₆₅ N ₄ O ₄ Br ₁ · (1.50H ₂ O)	calcd.	62.16	8.87	7.25	118.0→122.0
	obsd.	62.02	8.57	7.48	
10 C ₄₄ H ₇₃ N ₄ O ₄ Br ₁ · (1 H ₂ O)	calcd.	64.45	9.22	6.83	106.0→110.0
	obsd.	64.01	9.01	6.98	

* 元素分析数据是日本九州大学分析中心分析得出的结果。

** r.t, 室温, 箭头表示液晶范围

1.2 相转移作用

化合物 7、8、9 和 10 的 DSC 图和相转移参数列于图 1 和表 2。上述化合物的分子结构由四个单元组成：长脂链（尾段）、氨基酸连接偶氮苯（刚性段）、偶氮苯到亲水基头之间（间隔段）和季胺亲水基（头部）。有报道尾段和间隔段的长度对非手性单链偶氮苯季胺盐两性化合物双层分子膜的相转移作用影响较大⁽⁶⁾，当尾段长度大于 7 个碳单元时，间隔段长度起主要作用，长度越长相转移温度 (T_c) 越高，而且分子膜构型（分子在膜中的定位）趋向于平行的 H 型。化合物 7、8、9 和 10，在尾段与偶氮苯之间连接上氨基酸，亮氨酸或异亮氨酸，使分子具手性，而且增大分子中间段的体积，它们的相转移作用表现如下特点：

① 中间连接异亮氨酸的 9 和 10，空间位阻比连接亮氨酸的 7 和 8 小。空间位阻小有利于分子在膜中的定向排列，当膜分子从胶态到液晶态相转移时，相同定向排列的分子集合体，又称分子构型畴 (domain)，同时发生相转移，因此在 DSC 图上显示峰面积大，而且峰高与半峰宽的比值较大，也就是说，相转移的 ΔH 和 ΔS 较大。化合物 9 与 7 之比， ΔH 和 ΔS 分别高出 3.56 和 3.86 倍；化合物 8 与 10 之比， ΔH 和 ΔS 同时高出 17 倍（表 2）。仅仅分子中间氨基酸侧链基团的改变（同分异构），分子中侧链位阻 Ile 略小于 Leu，就使其 ΔH 和 ΔS 高于含 Leu 分子的 3.6 倍 ($m=6$)，或 17 倍 ($m=10$)。因此，分子中段的空间位阻对于分子在膜中的定向排列影响较大，空间位阻稍微减小，就明显提高分子的定向排列作用。

② 分子间隔段长度从 6 到 10，增加 4 个碳单位，并不改善分子的有序定向排列，相反 ΔH 和 ΔS 值都略为降低（表 2，化合物 7 和 8，及 9 和 10），而且 DSC 图的峰高与峰宽比值减小，说明间隔段增长（4 个碳单位），使相转移过程包含的亚相复杂，而且亚相能级之间增大。但是，间隔段的生长，使相转移温度 (T_c) 提高，对含 Leu 分子提高 19℃，对 Ile 分子提高 14℃，每增加 1 个碳单位长度， T_c 升高分别约 4.8 和 3.5℃。即，间隔段长度主要影响相转移温度。

③ 分子中部空间位阻增大，不仅使 ΔH 和 ΔS 显著降低，而且相转移温度也明显降

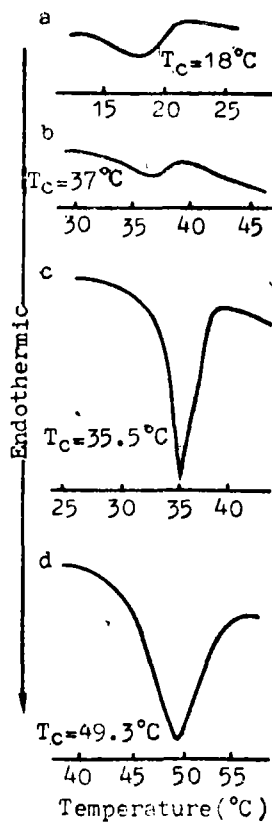


图 1 化合物 7、8、9 和 10 的 DSC 图
(冰冻 -20℃ 后升温)

Fig.1 DSC thermograms of
compounds 7,8,9 and 10
(heating after freezing, -20℃)

Curves a,b,c and d are compounds
7,8,9 and 10, respectively.

All samples: 56μl, 20 mmol/L,
scanning rate: 1.2℃/min

低。化合物 9 比 7 和 10 比 8, 相转移温度 (T_c) 分别降低 17.5 和 12.3 $^{\circ}\text{C}$ (表 2)。

表 2 化合物 7、8、9 和 10 的相转移参数*

Tab.2 Phase transition parameters of compounds 7, 8, 9 and 10

		T_c ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (KJ/mole)	ΔS (J/Kmole)
7	$\text{C}_{12}\text{-L-Leu-Azo-C}_6\text{N}^+$	— (F) 18	— 8	— 28
8	$\text{C}_{12}\text{-L-Leu-Azo-C}_{10}\text{N}^+$	— (F) 37	— 1.6	— 5.0
9	$\text{C}_{12}\text{-L-Ile-Azo-C}_5\text{N}^+$	35.5 (F) 35.5	33.8 30.9	109 100
10	$\text{C}_{12}\text{-L-Ile-Azo-C}_{10}\text{N}^+$	48.0 (F) 49.3	30.2 28.0	94.1 86.9

*表中化合物 7 和 8 冰冻前未检出, 其它数据均为 2 次测量的平均值, F 表示样品冰冻至零下 -20°C 后测得的数据

1.3 化合物 7、8、9 和 10 与磷脂自组织形成双层分子膜的形态

自然界的生物脂 (biolipid) 在水溶液中能自发组织形成构成生物膜的双层分子膜。很多合成的脂质两性化合物也具有生物脂自组织形成双层分子膜的功能。但绝大多数脂质两性化合物, 例如, Tritonx-100、Tween、Span、十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、溴化十六烷基三甲胺等, 并不能自发形成稳定的双层分子膜结构, 也不能与生物脂 (磷脂, 胆固醇等) 协同形成双层分子膜, 相反, 当这些两性化合物 (表面活性剂) 与生物膜相互作用时, 便破坏生物膜的双层分子膜结构, 形成胶束。而本文合成的化合物 7、8、9 和 10, 同样是脂质两性化合物, 仅在分子中段插入手性基团和偶氮苯, 它们不仅能自发形成双层分子膜, 而且还能与生物脂 (磷脂) 协同自发形成结构稳定的单层和多层中空球状的双层分子膜的结构 (图 2)。形态类似生物细胞。

化合物 7、8、9 和 10 自身形成的双层分子膜在相转移过程显示灵敏的圆二色特性¹⁾。利用这特性, 将它们镶嵌到生物细胞膜中 (图 2), 可作为研究生物膜的流动性、相转移和相分离作用的分子探针。

2 实验部份

2.1 仪器与测试

日立 R-24B 核磁共振仪, Daini-Seikosha SSC-560 差示扫描量热仪, JASCO DR-403G 红外光谱仪, Yanaco MP-SI 熔点测定仪, JEOL LTD/JEM-100 CX I 透射电子显微镜和 CQ250 探针式超声仪。

1) 江纪修, 合成手性双层分子膜的流动性与圆二色特性, 第三届原子光谱分析学术会议论文集, 广州, 1989

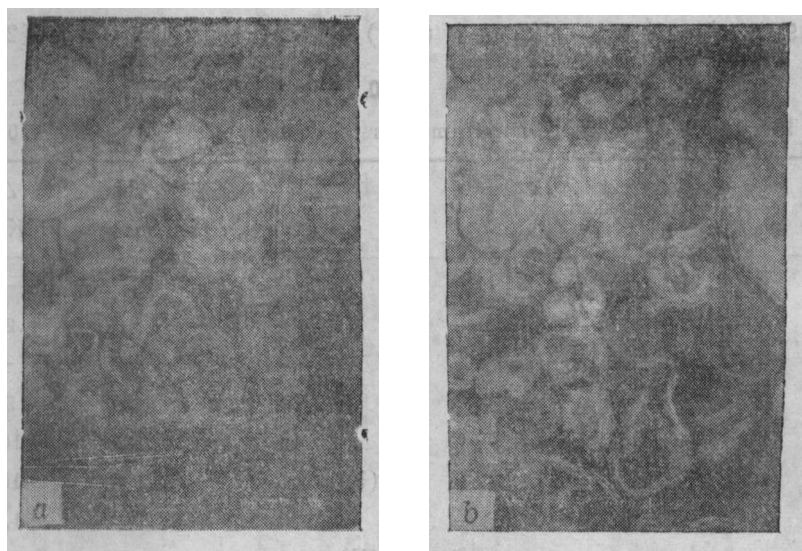


图2 透射电子显微镜照片(负染色)

Fig.2 Electron micrographs(TEM, negative staining)
Compound 8(A) or 10(B):egg lecithin:cephalin=1.5:7.0:1.5
(w/w), total concentration: 3 mmol/L

测DSC时,用二苯甲酮(m.p. 48.0°C)作参照样校准仪器,用热分散法制备20.0mmol/L样品水溶液500 μ l,用微量注射器吸取56.0 μ l样品溶液置于银皿中,密封,以升温速度1.2°C/min扫描测量。每个样品第一次测定后,自然降至室温,冷却到5°C,再测量,如此重复3次。最后将样品冰冻至-20°C,再测一次。

用于透射电子显微镜观察的样品制备方法为:用超声法制备卵磷脂:脑磷脂:化合物I或II=7.0:1.5:1.5(w/w)总浓度约3mmol/L的水溶液,用饱和醋酸铀负染色,用微量注射器将样品滴在火棉胶膜铜网上,干燥。

2.2 试剂

对-(对-溴代己烷基苯基偶氮)苯甲酸(AzoC₆)和对-(对-溴代癸烷基苯基偶氮)苯甲酸(AzoC₁₀)按文献[7]方法合成,熔点分别为190→209°C(dec.)和140→183°C(dec.)。L-亮氨酸和L-异亮氨酸从Janssen Chemica Co.,三甲胺从Aldrich Chemical Co.,月桂醇、氯化亚砷、对甲苯磺酸和三乙胺从SOAKA Chemical Co.获得。除三甲胺外,所用主要试剂用前提纯,电镜和DSC测试样品的配制均用重蒸水配制。

2.3 化合物1和2的合成

按表3投料比,称取L-亮氨酸(合成1)或L-异亮氨酸(合成2)、月桂醇(0.05mmHg, 97°C蒸馏得出)和对甲苯磺酸1水合物加到350ml甲苯中,搅拌下加热回流8h,冷却后,用含1.4%Na₂CO₃的饱和氯化钠水溶液萃取4次,分出有机相,用无水硫酸钠干燥,抽滤后,减压除去溶剂,残留油状物溶于100ml乙腈,冰浴中滴入浓盐酸,生成白色沉淀,抽滤,滤块用醋酸乙脂重结晶2次(合成1);用乙腈重结晶(合成2),得白色固体。化合物1:28.37g(白色粒状),产率84.5%,m.p.72→73.5°C;化合

物2: 17.56g (白色针状), 产率85.7%, m.p. r.t.→30°C, 1和2的红外光谱显示羰基吸收(1740cm⁻¹). ¹HNMR (CDCl₃, TMS) 数据略。

表3 合成1和2投料

Tab.3 Material amounts used for synthesizing 1 and 2

试 剂	L-亮氨酸	L-亮氨酸	月桂醇	对甲苯磺酸1合水	浓盐酸
1	31.12g		18.63g	39.94g	13.0ml
2		8.00g	11.36g	24.36g	10.0ml

2.4 化合物3、4、5和6的合成

按表4投料量, 称取A₂₀C₆或A₂₀C₁₀加到3.3ml氯化亚砷中, 加热回流2h, 减压除去过量氯化亚砷, 加入30ml干燥THF溶解(A液)。取化合物1和2溶于50ml干燥THF中, 冰浴中加入三乙胺(用NaOH干燥), 再在搅拌下缓慢滴入A液, 约30分钟滴完, 继续反应1h, 升至室温再反应4h, 减压除去溶剂, 固体残留物溶于40ml氯仿, 水洗, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 残留固体用醋酸乙酯重结晶4次, 得化合物3、4、5和6(橙黄色粒状), 收量、产率熔点和R_f(TLC)值列于表4。四种化合物都有如下红外吸收峰: IR ν_{max}^{IR} (cm⁻¹) 3310, 1740, 1650, 1600, 1540, 650。

表4 合成化合物3、4、5和6的投料量

Tab.4 Material amounts used for synthesizing 3, 4, 5, and 6

试 剂	3	4	5	6
A ₂₀ C ₆ (g)	1.50		1.50	
A ₂₀ C ₁₀ (g)		1.50		1.50
化合物1(g)	1.24	1.09		
化合物2(g)			1.24	1.09
三乙胺(g)	0.56	0.49	0.56	0.49
收 量(g)	1.12	0.80	0.70	1.24
产 率(%)	44.1	33.1	27.5	51.4
R _f (TLC-FID, CHCl ₃)	0.40	0.43	0.40	0.55

2.5 化合物7、8、9和10的合成

分别取化合物7、8、9和10 1.00、0.70、0.65和1.20g溶于35ml干燥THF中, 通入15倍摩尔量三甲胺, 密封, 室温下搅拌反应14天, 减压除去溶剂, 残留固体用氯仿—乙醚重结晶3次, 深橙黄色固体化合物7、8、9和10, 得率分别为: 0.61g(56%), 0.40g(53%), 0.37g(52%)和0.74g(57%); 熔点分别为: r.t.→122°C, r.t.→95°C, 118→122°C和106→110°C。TLC、IR和NMR数据略, 元素分析结果列于表1。

致谢: 本文的研究得到日本九州大学国武丰喜教授、石川雄一副教授和安藤玲子助教的指导和协助。

参 考 文 献

- 1 Kunitake, T. J Macromol Sci -Chem, 1979, A13(5):587~602
- 2 Nakasima N, Asaka S, Kim J M., Kunitake T. Chem Lett, 1984, 1709~1712
- 3 Kunitake T. Ann N Y Acad Sci, 1986, 47:70~82
- 4 砂本顺三. 病态生理, 1987, 6(10):771~780
- 5 Kunitake T et al. DSC Studies of the Phase Transition Behavior of Synthetic Membranes Memories of the Faculty of Engineering, Kyushu University, Japan, 1986, 46:221~263
- 6 Shimomura M, Ando R, Kunitake T. Ber Bunsenges Phys Chem, 1983, 87:1134
- 7 Okahata Y, Ariga K. J Chem Soc, Chem Commun, 1987, 1535

Synthesis and Phase Transition of Bilayer Membranes Containing Amino Acid and Their Co-organizing Morphologies with Biolipids

Jiang Jixiu*

Abstract Chiral single-chain amphiphiles containing L-leucine or L-isoleucine and azobenzene: C_{12} -L-Leu-Azo- $C_mN+(I)$ and C_{12} -L-Ile-Azo- $C_mN+(II)$ ($m=6,10$) were synthesized. Phase transitions of their bilayer membranes and co-organizing morphologies with egg lecithin and cephalin were examined by differential scanning calorimetry and transmission electron microscope respectively. The results show that thermodynamical stability of the membranes $II > I$ due to steric hindrance in chiral centre, that phase transition temperature(T_c), $m=10 > m=6$, that I or II with biolipids can spontaneously, co-organizationally form single-walled and multi-walled vesicles like biological cell and that I and II could be as candidates of molecular probes in investigation of phase transition, phase separation and fluidity of biomembrane.

Keywords Bilayer membrane, L-leucine, L-isoleucine, phase transition, morphology

* Department of Chemistry, Zhongshan University