

含L-缬氨酸双层分子膜的合成、形态 和相转移作用的研究

江纪修

(中山大学化学系)

Toyoki Kunitake

(日本九州大学工学部)

摘 要

研究了含 L-缬氨酸和偶氮苯的单链手性两性化合物 $C_{12}\text{-L-Val-Azo-CmN}^+(\text{I})$ 和 $C_8^F C_2\text{-L-Val-Azo-CmN}^+(\text{II})$ ($m = 6, 10$) 的合成及其自发形成双层分子膜的形态和相转移作用。电子显微镜观察显示 I 和 II 能自发组织形成棒状结构, 差示扫描热量法测试结果表明双层分子膜具有较高的热力学稳定性, 并且 II > I。

关键词 双层分子膜, L-缬氨酸, 形态, 相转移

脂双层分子膜是生物膜的主要结构成分, 在生物体内具有隔室作用、能量传导、物质运输和信息传递等重要生理功能。生物膜双层分子有磷脂、胆固醇、糖脂和其它脂类, 其中主要是磷脂。它们在水溶液中能自发地形成双层分子膜, 具有良好的自组织能力。双层分子膜在一定的条件下又具有膜兴奋、膜融合、膜催化、相转移和相分离作用等物理化学特性, 这些特性与其生理功能密切相关^[1,2]。1977年Kunitake^[3]发现人工合成的长脂链两性化合物和生物膜的磷脂一样, 在水溶液中亦能自发形成双层分子膜。随后, Kunitake研究室^[4~6]合成了200多种单链、双链和叁链脂质两性化合物, 发现这些化合物的分子结构与这些分子自组织形成分子膜的形态和相转移作用存在一定的关系, 有些单链手性两性化合物能自发形成类似DNA的螺旋结构, 对双层分子膜的流动性和相分离作用显示敏感的圆二色特性, 可作为双层分子膜微环境特性研究的分子探针。国外其它研究室^[7,8]也相继合成各种结构脂质两性化合物, 这些化合物不仅具有生物膜的基本生理功能和物理化学特性, 而且可通过改变分子结构来调节分子的自组织、膜兴奋、相转移等物理化学作用程度, 及其形成的脂质体对生物体内的巨噬细胞的活化、与靶细胞的融合和对遗传基因、酶、疫苗和药物的运载能力等生理活性。

自然界的生物脂和人工合成的两亲性脂能自发形成单相、多相、螺旋、管状、棒状或叠层状等双层分子膜的形态及其相转移作用已有不少报道, 但含缬氨酸和偶氮苯的单链两性化合物自组织形成的形态和相转移作用的研究还未见报道。

本文报道含缬氨酸、偶氮苯发色团的手性单链两性化合物 $C_{12}\text{-L-Val-Azo-CmN}^+(\text{I})$ 和 $C_8^F C_2\text{-L-Val-Azo-CmN}^+(\text{II})$ ($m = 6, 10$) 的合成, 并用透射电子显微镜

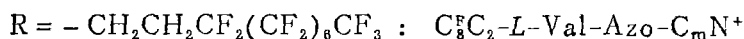
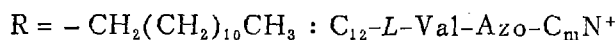
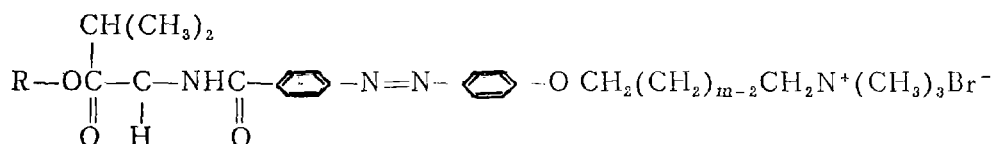
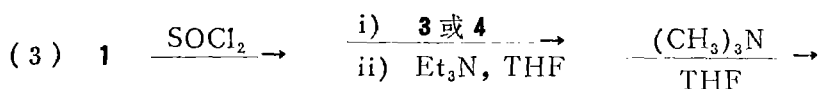
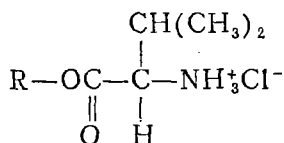
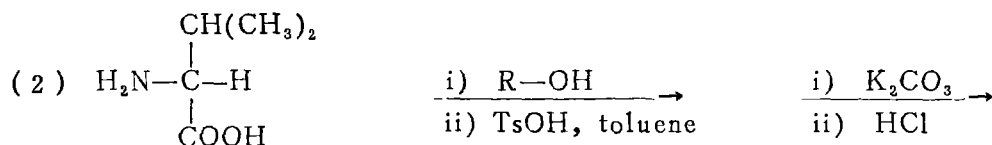
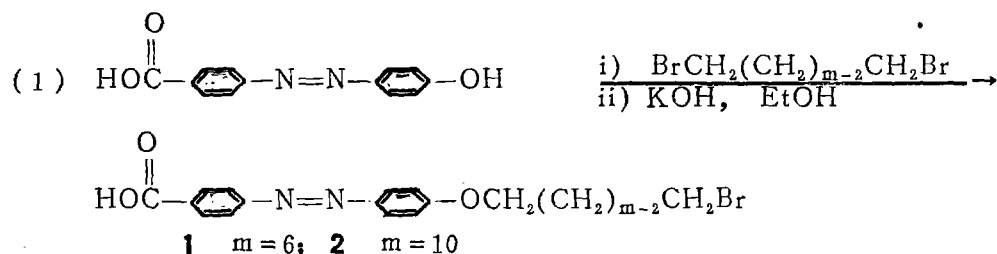
本文1989年11月14日收到

(TEM) 和差示扫描热量法(DSC)研究了这些化合物在水溶液中自发组织形成分子膜的形态和相转移特性。

1 结果与讨论

1.1 C_{12} -L-Val-Azo- C_mN^+ 和 C_8C_2 -L-Val-Azo- C_mN^+ ($m=6, 10$)的合成

合成路线如下:



按上述合成路线,合成化合物**5**、**6**、**7**和**8**符合元素分析结果,见表1。

1.2 分子自组织形成的形态

生物脂(biolipid)主要是双脂链的磷脂,能自发形成双层分子膜的脂质体而不是球状的胶束形态。很多合成的双脂链两性化合物也具有生物脂的性质,且还可通过改变分子结构来调节其形成的形态、稳定性和生物功能。但合成的单链脂质两性化合物却很难形成稳定的双分子层结构而是形成流动性较大和稳定性较差的胶束形态。而本文合成的4种单链,含缬氨酸和偶氮苯,带手性和刚性结构的两性化合物(**5**~**8**),TEM

表1. 化合物5、6、7和8的分析结果*

Tab. 1 Analytical results of compounds 5, 6, 7 and 8

Compounds	Formula		Elemental Analysis (%)			m.p. (°C)
			C	H	N	
5	$C_{39}H_{63}N_4O_4Br(1H_2O)$	calcd.	62.48	8.74	7.47	192→215
		obsd.	62.27	8.16	7.57	
6	$C_{43}H_{71}N_4O_4Br(1H_2O)$	calcd.	64.08	9.13	6.95	118→123
		obsd.	64.04	8.75	6.82	
7	$C_{37}H_{42}N_4O_4F_{17}Br(0.5H_2O)$	calcd.	43.63	4.25	5.50	165→170
		obsd.	43.52	4.30	5.48	
8	$C_{41}H_{50}N_4O_4F_{17}Br(1H_2O)$	calcd.	45.43	4.71	5.17	195→205
		obsd.	45.40	4.68	5.13	

* 元素分析数据是日本九州大学分析中心分析得出的结果

观察表明它们能自发形成棒状分子膜(图1), 而且还发现它们的热力学稳定性与圆二色性的增强成正相关, 可利用其圆二色特性研究细胞膜的流动性¹⁾。

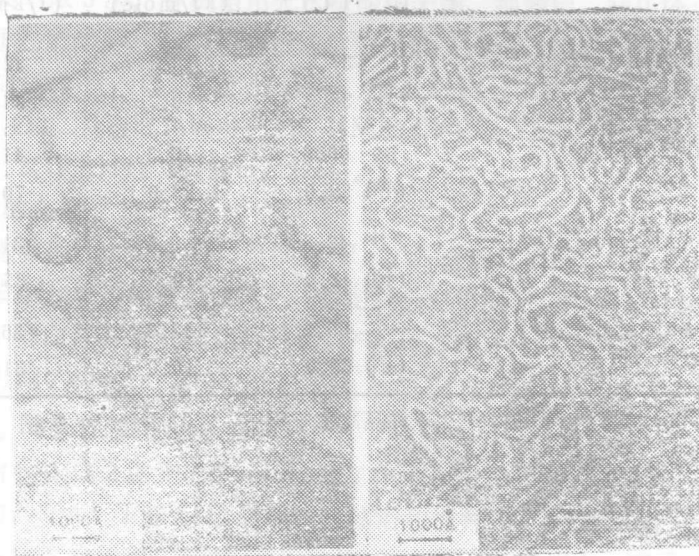


图1 透射电子显微镜 (TEM) 照片 (负染色)

Fig. 1 Electron micrographs (TEM, negative staining)

a. amphiphile 5, 2mmol/L

b. amphiphile 6, 2mmol/L

这4种两性化合物脂链体积和偶氮苯与亲水基团间长度($C_6 \sim C_{10}$)的改变对自发形成的形态影响不大, 但其相转移特性却有较大差异。

1) 江纪修, 合成手性双层分子膜的圆二色特性, 1989年全国光谱分析会议论文集, 广州, 19

1.3 相转移特性

双层分子膜的相转移 (get-to-liquid crystal) 作用直接支配膜的物理状态。相转移的临界温度(T_c), 及其对应的热焓(ΔH)和熵(ΔS)是衡量分子膜热力学稳定性的重要参数。用 DSC 测得两性化合物 **5**、**6**、**7** 和 **8** 的相转移参数列于表 2。表中数据说明: ①偶氮苯与亲水基团之间从 C_6 到 C_{10} 增加 4 个碳单位的长度, T_c 、 ΔH 和 ΔS 都升高, 稳定性增加, 其中每增加 1 个碳单位长度, T_c 升高约 5.5°C ; ②尾部脂链长度, 化合物 **5** 和 **6** 比 **7** 和 **8** 长 2 个碳单位, 但其相转移参数值却较小, 这可能是缬氨酸侧链体积较大, 而脂链体积较小, 空间位阻较大引起。 **7** 和 **8** 碳氟脂链的体积较 **5** 和 **6** (碳氢脂链) 的大, 较大体积的脂链与侧链体积较大的缬氨酸键合的同一分子, 空间位阻小, 有利于分子的紧密组织, 也就是说, 分子的自组织作用直接受分子的位阻影响; ③自然界 12 个碳单位长度的双脂链磷脂酰胆碱 (双月桂酰磷脂酰胆碱) 的相转移温度为 -2°C , 比化合物 **5** 和 **6** 低, 说明含缬氨酸和偶氮苯的单链两性化合物比相同脂链长度的双链磷脂酰胆碱具有较高的热力学稳定性。

表 2 化合物 **5**、**6**、**7** 和 **8** 的相转移参数*

Tab. 2 Phase transition parameters of compounds 5, 6, 7 and 8

		T_c ($^\circ\text{C}$)	ΔH (kJ/mole)	ΔS (J/kmole)
5	$C_{12}\text{-L-Val-Azo-C}_6\text{N}^+$	37.2	10.1	32.2
		(F) 38.0	10.7	34.4
6	$C_{12}\text{-L-Val-Azo-C}_{10}\text{N}^+$	60.3	13.3	41.0
		(F) 59.0	23.0	70.0
7	$C_8^F\text{C}_2\text{-L-Val-Azo-C}_6\text{N}^+$	42.5	9.5	31.5
		(F) 42.0	12.3	25.0
8	$C_8^F\text{C}_2\text{-L-Val-Azo-C}_{10}\text{N}^+$	65.3	12.3	36.7
		(F) 65.0	10.0	31.0

* 表中数据均为 3 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

2 实验部分

2.1 仪器与测试

JASCO DR-403G 红外光谱仪, 日立 R-24B 核磁共振仪, 日立 H-500 透射电子显微镜, Daini-Seikosha SSC-560 差示扫描量热仪, Branson Cell Disruptor 185 探杆式超声仪和 Yanaco MP-SI 熔点测定仪。

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 2mmol/L 饱和醋酸铀水溶液 1.0ml , 按文献 [9] 的方法 A, 制备碳膜铜网 (150mesh), 用微量注射器将样品溶液滴在碳膜铜网上, 真空干燥。

DSC 测试时, 用超声法制备 20mmol/L 样品水溶液 $500\mu\text{l}$, 用微量注射器吸取 $56\mu\text{l}$ 样品溶液置于银皿中, 升温速率 $1.2^\circ\text{C}/\text{min}$ 。

2.2 试剂

对-(对-羟基苯基偶氮)苯甲酸按文献〔10〕方法合成, m.p. 247→267°C(dec.) (箭头表示液-晶范围), lit.〔10〕m.p. 268°C, L-缬氨酸、1,6-二溴代己烷、1,10-二溴代癸烷、1H, 1H, 2H, 2H-全氟代癸醇、月桂酸、对甲苯磺酸、氯化亚砷和三乙胺从日本 OSAKA Chemical Co. 获得, 三甲胺为 Aldrich Chemical Co. 试剂。除三甲胺外, 所用主要试剂用前提纯。

2.3 化合物 1 和 2 的合成

4.00g 对-(对-羟基苯基偶氮)苯甲酸, 2.17g 85%氢氧化钾和 12.0g 1,6-二溴代己烷(合成 1), 或 14.9g 1,10-二溴代癸烷(合成 2) 加到 300ml 乙醇中, 在搅拌下加热回流 5 h, 减压除去溶剂, 用石油醚提取未反应的原料, 得固体粗产物, 用醋酸-醋酸乙酯(1:1)重结晶 2 次, 得橙红色固体。化合物 1: 2.20 g, 产率 32.0%, m.p. 190→209°C(dec.); 化合物 2: 2.27g, 产率 29.8%, m.p. 140→183°C(dec.), 波谱数据略。

2.4 化合物 3 的合成

5.00g L-缬氨酸、7.96g 月桂醇(0.05mmHg, 97°C 蒸馏得出)和 20.0g 对甲苯磺酸 1 水合物加到 250ml 甲苯中, 在搅拌下加热回流脱水 6 h, 冷却后, 用 1% Na₂CO₃ 饱和氯化钠水溶液萃取 3 次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 抽滤后, 减压除去溶剂, 残余油状液体用 100ml 乙腈溶解, 冰浴中慢慢滴加浓盐酸 4.5ml, 生成白色沉淀, 抽滤, 固体用醋酸乙酯重结晶 2 次, 得白色粒状结晶 5.65g, 产率 41.1%, m.p. 40.5°C, IR(KBr) $\nu_{C=O(-CH_2-COOR)}$ 1740 cm⁻¹. ¹H NMR(CDCl₃, TMS) δ (ppm): 0.9(m, 3H), 3.9(d, 1H), 4.1(t, 2H), 1.13(m, 27H).

2.5 化合物 4 的合成

0.76g L-缬氨酸、3.01g 1H, 1H, 2H, 2H-全氟代癸醇, 和 2.47g 对甲苯磺酸加到 150ml 甲苯中, 加热回流脱水 9 h, 生成白色糊状沉淀, 抽滤除去溶剂, 固体用乙醇重结晶 2 次, 得白色纤维状结晶 2.16g, 产率 49.4%, m.p. 148°C→150°C, IR(KBr) $\nu_{C=O(-CH_2COOR)}$ 1740 cm⁻¹.

2.6 化合物 5, 6, 7 和 8 的合成

1.00g 化合物 1 或 2 加到 3.00ml 80%氯化亚砷中, 加热回流 2 h, 减压除去过量的氯化亚砷, 加入 30ml 干燥 THF 溶解, 在冰浴和搅拌下, 将其慢慢滴入含与 1 或 2 等摩尔量的化合物 3 或 4 和 1.5 倍量三乙胺的 40ml THF 溶液中, 反应 2 h, 升温到室温, 再反应 1 h, 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 2 次, 得 4 种中间体。分别取 0.50g 溶于 30ml 干燥 THF 中, 加入 15 倍量三甲胺, 密封, 室温下反应 1 周, 加入 60 ml 正己烷, 滤出沉淀, 用氯仿-乙醚重结晶得橙黄色结晶: 5: 0.11 g (产率 12%); 6: 0.21g (28%); 7: 0.15g (23%) 和 8: 0.13 g (25%), IR 和 NMR 波谱数据略, 熔点和元素分析结果列于表 1。

致谢: 本文的研究过程得到 Y. Ishikawa 副教授和 R. Ando 助教的协助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Darnell J et al., *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books Inc., 1986
- [2] Silvea B L, *The Physical Chemistry of Membranes, An Introduction to the Structure and Dynamics of Biological Membranes*, Publishers Creative Services Inc., 1985
- [3] Kunitake T et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 99(1977), 3860, *
- [4] Kunitake T et al., *Memories of the Faculty of Engineering*, Kyushu University, Japan, 46 (1986), 221~263
- [5] Nakaseima N et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 57(1984), 3253
- [6] Kunitake T et al., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 9(1986), 655
- [7] Ringsdorf H et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 27(1988), 113~158
- [8] 野岛庄七等編, ソポソーム, 南江堂, 1988, 9
- [9] Kunitake T et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 102(1980), 549
- [10] Cohen P Q et al., *J. Biol. Chem.*, 166(1946), 261

The Synthesis, Aggregate Morphology and Phase Transition of the Bilayer Membranes Containing *L*-Valine

Jiang Jixiu* Toyohi Kunitake

Abstract

The synthesis of chiral, single-chain amphiphiles containing *L*-valine and azobenzene: C_{12} -*L*-Val-Azo- C_mN^+ (**I**) and C_8^F C_2 -*L*-Val-Azo- C_mN^+ (**II**) ($m=6, 10$), and their bilayer membrane morphologies aggregated by self-assembly and phase transition, were examined. Both **I** and **II** can self-organizationally form the rod-like structure observed by transmission electron microscope, and thermodynamically stable bilayer membranes measured by differential scanning calorimetry with stability of **II** > **I** and $m=10 > m=6$.

Keywords bilayer membrane, *L*-valine, morphology, phase transition

* Department of Chemistry, Zhongshan University