

# 反相囊泡在乙醛酸修饰碳纤维上的快速构建和简易表征

李轶<sup>1</sup> 谢宝荣<sup>1</sup> 王浩<sup>1</sup> 展思辉<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>天津大学化学系, 天津 300072, <sup>2</sup>南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071)

**摘要:** 本文利用乙醛酸修饰碳纤维成功制备了蛋黄卵磷脂反相囊泡。与之前文献报道的制备方法相比, 此方法成功消除了传统方法中外加蒸馏水的干扰, 并可通过倒置生物光学显微镜实现反相囊泡的原位表征。研究发现, 乙醛酸和蛋黄卵磷脂分子之间的氢键作用对双分子层磷脂膜的构建和反相囊泡的形成起着至关重要的作用。

**关键词:** 反相囊泡; 氢键; 乙醛酸

中图分类号: O648 文献标识码: A 文章编号:

## Efficient formation of reverse vesicles on modified carbon fibers and easy characterization

LI Yi<sup>1</sup> XIE Bao-rong<sup>1</sup> WANG Xin-cheng<sup>1</sup> WANG Hao<sup>1</sup> ZHAN Si-hui<sup>2</sup>

(1.School of Science, Chemistry Department of Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2.College of Environmental Science and Engineering of Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** Glyoxylic acid modified carbon fibers were used to prepare egg phosphatidyl choline (EggPC) reverse vesicles. It is simple and efficient to form reverse vesicles. Compared with previous methods, this method successfully eliminates the interferences of water-in-oil droplets and realizes in-situ easy characterization of reverse vesicles by an inverted optical microscope. The hydrogen bond interaction between the glyoxylic acid and the EggPC molecules is the domain force, which play an important role in the organization of the phospholipids film and the formation of reverse vesicles.

**Key Words:** reverse vesicle; hydrogen bond; glyoxylic acid

---

**基金项目:** 国家自然科学基金 (批准号: 21377061); 天津市自然科学基金(批准号: 15JCYBJC48400); 天津大学自主创新基金(批准号: 2015XRG-0020); 胶体与界面化学教育部重点实验室(山东大学)开放课题 (编号: 201401) 资助。

**作者简介:** 李轶 (1979-), 女, 河北人, 副教授, 博士, 电话: (022) 27403475, E-mail: liyi@tju.edu.cn。

**通讯联系人:** 展思辉, 教授, 博士, 电话: (022) 23502756, E-mail: sihuizhan@nankai.edu.cn。

## 1 引言

囊泡是由两亲分子构筑的，由单层或者多层膜包裹而成的有序聚集体。<sup>1</sup> 正相囊泡的水腔能负载水溶性物质并通过外壁的双分子层结构控制负载物的释放<sup>2</sup>，因此其在生命科学领域和基因药物运输领域受到广泛关注<sup>3,4</sup>。与正相囊泡不同，反相囊泡是两亲分子在非极性溶剂中形成的具有闭合双分子层结构的有序聚集体，其亲水基指向双分子层的内部，疏水基指向双分子层的外部<sup>5-9</sup>。与正相囊泡相比，反相囊泡的两亲性分子取向完全相反<sup>10</sup>。在1991年之前，没有在非极性溶剂中生成反相囊泡的报道<sup>11-14</sup>。直到1991年，Kunieda等<sup>15</sup>首次发现并报道了在十二烷中，非离子表面活性剂四甘醇十二烷醚体系形成反相囊泡的现象。之后，研究报道了在磷脂类、阳离子和阴离子表面活性剂的混合物、蔗糖酯、聚氧乙烯醚以及鞘氨醇类等体系都可以成功制备反相囊泡<sup>16-24</sup>。反相囊泡是一种独特的反相超分子聚集体，具有多方面用途：（1）其亲水双分子层可捕捉酶和无机离子等目标分子<sup>25</sup>；（2）其内部为油相空腔，能够包封和负载油溶性物质<sup>26,27</sup>；（3）与活有机体内极性/非极性的界面结构相似，可用于蛋白质的物化特性的研究，尤其是酶反应，还可用于蛋白质与膜之间相互作用的研究<sup>28</sup>；（4）作为理想的微米和纳米级反应中心可用于生物分子的检测和无机纳米材料的合成<sup>29</sup>。

如何更快地制备出稳定的反相囊泡以及对其简便有效地表征是反相囊泡研究中的两个重要方面，这两个问题也一直困扰着科学家们。到目前为止，为了使反相囊泡保持较好的稳定性，主要通过向体系中添加小比例蒸馏水的方法实现<sup>4,29</sup>。这种方法最大的缺点是水和非极性溶剂不能互溶，在体系中有很多油包水的小液滴存在。在倒置生物光学显微镜下，油包水液滴与反相囊泡容易混淆，很难区分。因此，利用倒置生物光学显微镜对反相囊泡进行观测和表征的准确度较低。乙醛酸在香料、医药、化妆品等行业是

一种重要的中间体<sup>30</sup>。本文利用乙醛酸对碳纤维进行修饰,通过使用乙醛酸修饰碳纤维可实现反相囊泡的快速有效构建,形成的反相囊泡直径范围在几微米到一百多微米之间,可有效地利用倒置生物光学显微镜原位观察反相囊泡的生成以及结构演变过程。乙醛酸修饰碳纤维对制备蛋黄卵磷脂反相囊泡来说是一种有效的媒介,完全取代了蒸馏水的加入,可消除油包水液滴的干扰。本研究实现了反相囊泡的简易、快速、原位构建和表征。

## 2 实验部分

### 2.1 试剂与仪器

蛋黄卵磷脂和一水合乙醛酸,购于百灵威科技有限公司;氯仿、甲醇和环己烷,购于天津市江天化工技术有限公司;碳纤维获得于北京化工大学碳纤维与复合材料研究所。碳纤维在使用前需要进行预处理,首先将碳纤维在丙酮溶液中浸泡36 h,然后在乙醇中超声15 min后并用蒸馏水洗涤。

在配有数字图像处理系统的倒置生物光学显微镜(OPTEC BDS200,中国)下原位观察反相囊泡的形成及其结构演变过程。利用共聚焦荧光显微镜(Olympus X71,日本)对反相囊泡的结构进行确认。用荧光素对样品标记,激发波长为488 nm。使用型号为S-4800的扫描电子显微镜(SEM)对碳纤维以及乙醛酸修饰碳纤维的形貌进行观察。利用表面积和孔径分析仪(Quantachrome Autosorb iQ-MP)在77 K测得碳纤维的氮气吸附脱附等温线。采用UV-9100型紫外可见分光光度计(中国,北京,TU-1901)进行氢键的表征。

### 2.2 乙醛酸修饰碳纤维和磷脂膜的制备

通过浸渍法制备乙醛酸修饰碳纤维,图1为乙醛酸修饰碳纤维及磷脂膜的制备过程。为了方便实验操作,将碳纤维一端粘在铜导电胶带上,将碳纤维浸泡在一定浓度的乙醛酸溶液中一定时间,取出后干燥,得到乙醛酸修饰碳纤维。实验时将乙醛酸修饰碳纤维

固定在玻璃池底部进行反相囊泡的构建。

称取 5 mg 蛋黄卵磷脂并溶解于 0.25 mL 氯仿/甲醇（体积比 9:1）的溶液中。用微量注射器量取 20  $\mu\text{L}$  上述混合溶液并均匀地滴涂在附有乙醛酸修饰碳纤维的玻璃池底部，在氮气环境下干燥 1 h 后得到蛋黄卵磷脂膜。最后在玻璃池中加入 2 mL 环己烷。所有实验均在室温下进行( $23\pm 2^\circ\text{C}$ )。

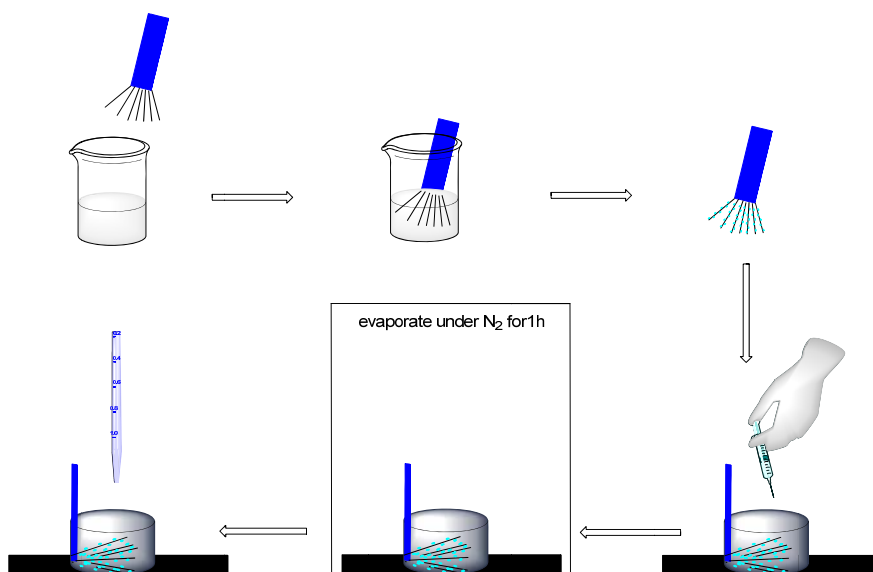


Fig.1 乙醛酸修饰碳纤维及磷脂膜的制备过程

Fig.1 Preparation of the GA-CF and lipid film

### 3 结果与讨论

#### 3.1 碳纤维和乙醛酸修饰碳纤维的表征

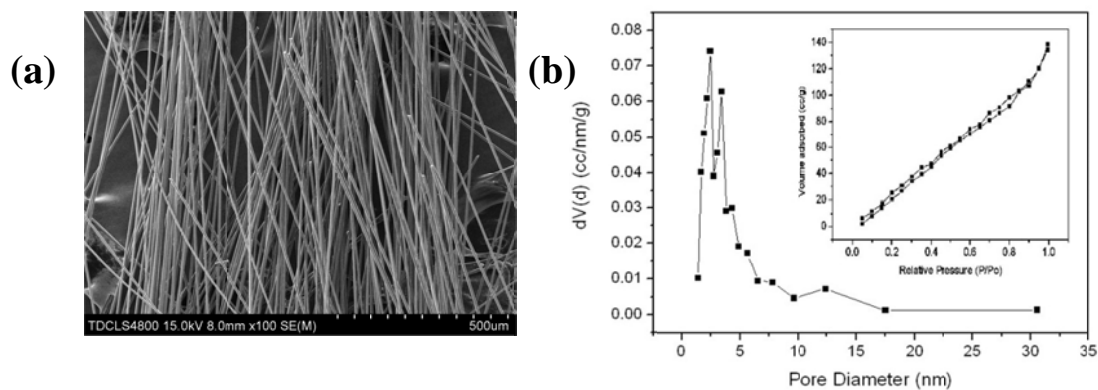
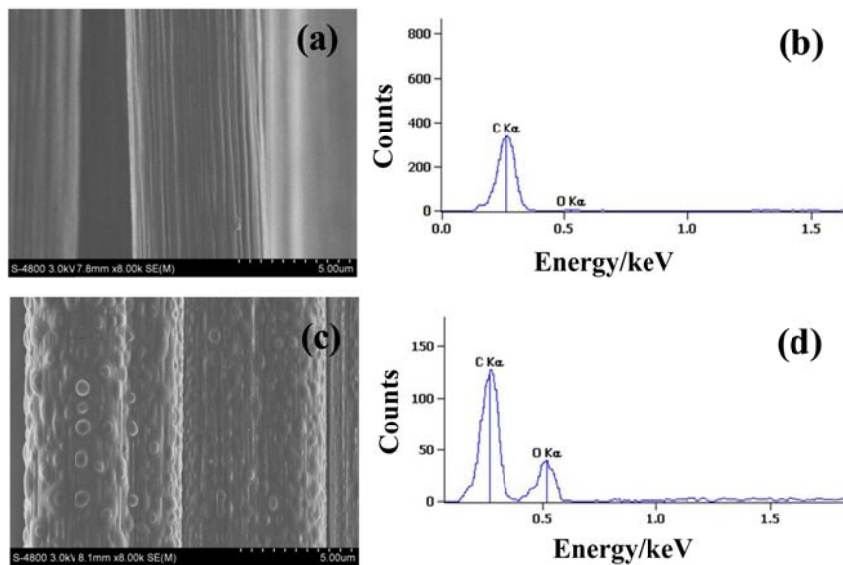


Fig.2 (a) 碳纤维的扫描电子显微镜照片，(b) 碳纤维的氮气吸附等温线和孔径分布曲线

Fig.2 (a) SEM image of carbon fibers, (b)  $\text{N}_2$  adsorption-desorption isotherm and the calculated pore-size

### distribution of the carbon fibers

图 2 为碳纤维的扫描电子显微镜照片以及氮气吸附脱附等温线和孔径分布曲线。碳纤维的直径约  $7\ \mu\text{m}$ 。由图 2b 可知,碳纤维的比表面积和孔体积分别为  $263.9\ \text{m}^2/\text{g}$  和  $0.280\ \text{cm}^3/\text{g}$ 。根据 BJH 理论计算出其平均孔径为  $2.5\ \text{nm}$ 。碳纤维具有较高的比表面积和微孔结构的特性,极大地促进纤维上位点的活性,提高了其吸附能力。研究表明碳纤维的吸附效应是正相囊泡形成的原始动力。<sup>31</sup> 因为碳纤维具有较大的比表面积和较强的吸附作用,推断可能也会直接影响反相囊泡的形成<sup>32</sup>,因此选择碳纤维为基础材料负载乙醛酸。另外,碳纤维的拉伸强度和拉伸模量碳纤维分别为  $2800\ \text{mpa}$  和  $400\ \text{gpa}$ ,断裂伸长为  $0.7\%$ ,碳纤维较好的柔韧性保证其在使用过程中的完整性。



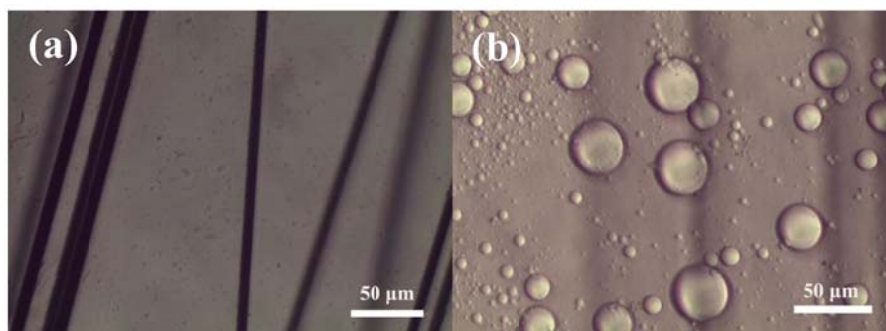
**Fig.3** 扫描电子显微镜照片及其 EDS 能谱, (a)和(b): 碳纤维, (c)和(d): 乙醛酸修饰碳纤维

**Fig.3** SEM images and the corresponding EDS spectra, (a) and (b): carbon fibers, (c) and (d): the GA-CF

图 3 为碳纤维和乙醛酸修饰碳纤维的扫描电子显微镜照片以及相应的 EDS 能谱。从图 3a 中可以看到,碳纤维的表面光滑。与碳纤维不同的是,乙醛酸修饰碳纤维表面粗糙(如图 3c 所示)。从乙醛酸修饰前后的 EDS 能谱可以看出,修饰乙醛酸之前,碳

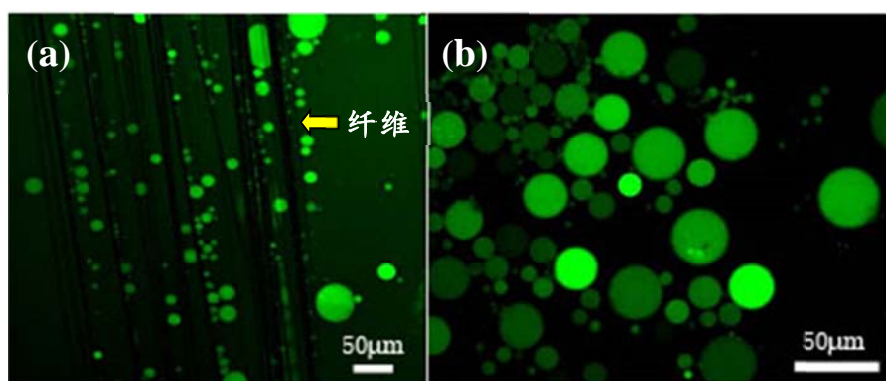
纤维的主要化学成分是碳元素；而乙醛酸修饰后，纤维的主要成分为碳和氧两种元素。其中，由于碳纤维和乙醛酸中都含有碳元素，从图 3d 可知，碳元素含量比氧元素多。EDS 能谱结果说明通过浸渍的方法制备的乙醛酸修饰碳纤维上乙醛酸能够有效地保留在碳纤维上。

### 3.2 乙醛酸和蛋黄卵磷脂之间的相互作用.



**Fig.4** 倒置生物光学显微镜下，不同材料上反相囊泡的构建情况(a) 碳纤维 (b) 乙醛酸修饰碳纤维

**Fig.4** The optical micrographs of reverse vesicles built around (a) carbon fibers, (b) GA-CF



**Fig.5** 共聚焦荧光显微镜照片，(a) 乙醛酸修饰碳纤维周围，(b) 溶剂内部

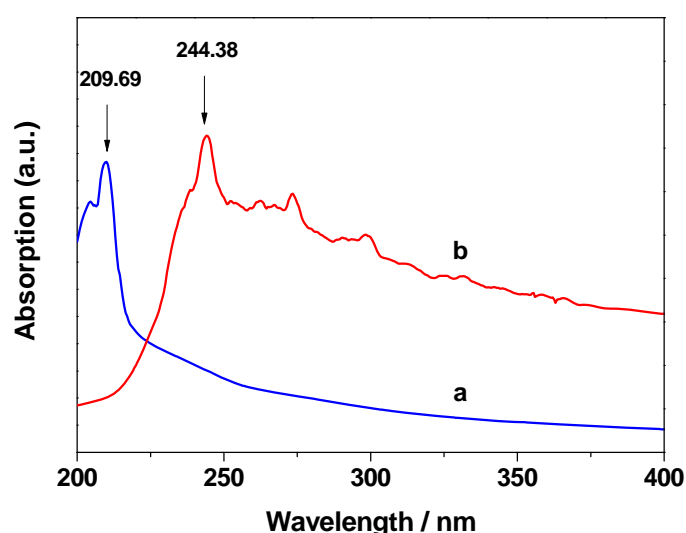
**Fig.5** Typical images of reverses vesicles in cyclohexane under confocal fluorescence microscopes.

(a) around carbon fibers, (b) in the cyclohexane

分别在碳纤维和乙醛酸修饰碳纤维上制备蛋黄卵磷脂双分子层磷脂膜，观察反相囊泡的形成情况（如图 4 所示）。图 4 分别是碳纤维和乙醛酸修饰碳纤维上反相囊泡形成

的倒置生物光学显微镜照片。从图中可以看出，蛋黄卵磷脂反相囊泡可以自发的在乙醛酸修饰碳纤维上产生，产量较大。而未修饰的碳纤维上没有观察到反相囊泡的形成。因此，我们认为乙醛酸是诱导反相囊泡形成的主要因素。

为了进一步证实蛋黄卵磷脂反相囊泡在乙醛酸修饰碳纤维上的自发形成，我们利用共聚焦荧光显微镜对反相囊泡做了进一步表征，如图 5 所示。从图 5a 可以看出，反相囊泡形成于乙醛酸修饰碳纤维的周围，并且向溶液内部扩散，这一点和倒置生物光学显微镜观察的结果一致。



**Fig.6** 紫外-可见吸收光谱: a)水和蛋黄卵磷脂; b) 水，蛋黄卵磷脂及乙醛酸

**Fig.6** The UV-vis absorption spectrum: a) water and EggPC; b) water, EggPC and glyoxylic acid

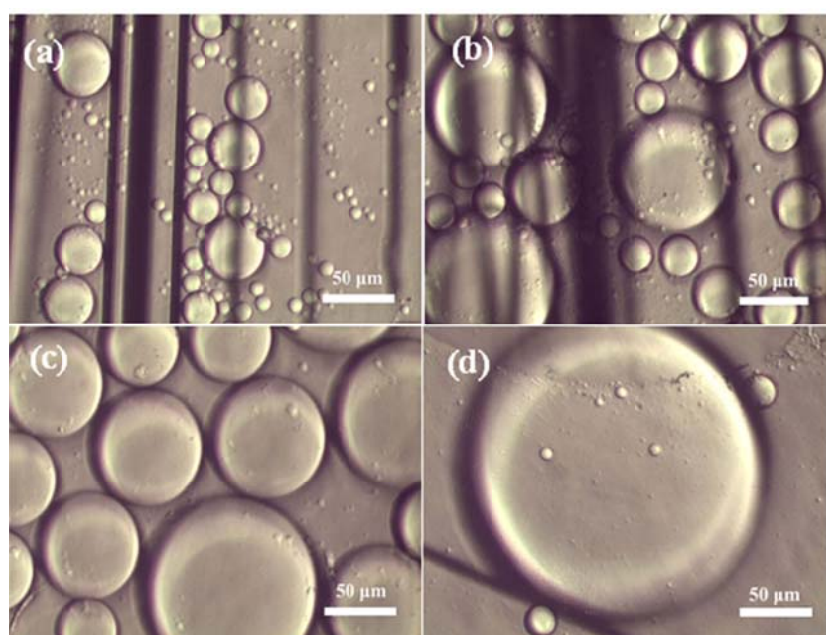
众所周知，合理控制非共价作用，如氢键、 $\pi$ - $\pi$ 堆积、静电相互作用和范德华力等可以构建有序的自组装结构。在这些非共价相互作用中，因为氢键具有高强度和显著的目标靶向能力，引起了人们的广泛注意。氢键的形成会导致最大吸收峰发生红移或蓝移<sup>34</sup>。图 6 为不同混合溶液的紫外-可见吸收光谱。如图 6a 所示，蛋黄卵磷脂水溶液的最大吸收峰 ( $\lambda_{\max}$ ) 出现在 209.69 nm 处，但在图 6b 中，蛋黄卵磷脂和乙醛酸混合水溶液



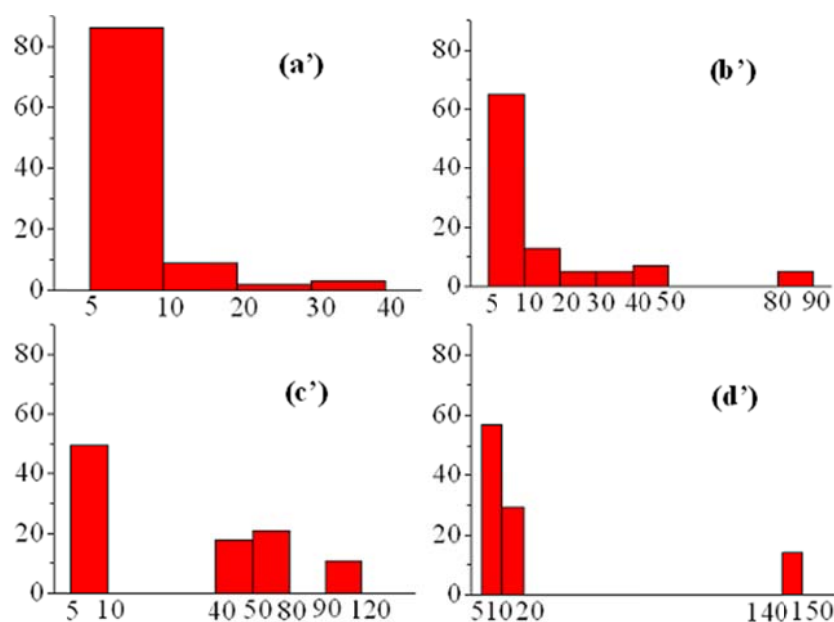
的最大吸收峰红移至 244.38 nm。最大吸收峰发生红移。这一结果证实了乙醛酸与蛋黄卵磷脂分子之间存在氢键作用。

在我们的体系中,乙醛酸具有缺电子的氢原子,蛋黄卵磷脂分子中具有富电子  $\text{PO}_2^{2-}$  基团,由于供体和受体之间电荷迁移,两者形成氢键,从而导致蛋黄卵磷脂分子在乙醛酸修饰碳纤维表面富集。另一方面,氢键的形成降低了蛋黄卵磷脂分子的头部基团间的静电斥力,使蛋黄卵磷脂分子更好地在乙醛酸修饰碳纤维周围有序紧密排列,形成双分子层结构。因此,氢键作用在磷脂膜的形成和反相囊泡的构建中起着至关重要的作用。

### 3.3 反相囊泡的结构演变







**Fig.7** 乙醛酸的浓度是 0.5 g/mL，观察时间：(a) 立即，(b) 4 h，(c) 48 h，(d) 72 h。其相应的尺寸大小的分布: (a')-(d')

**Fig.7** The concentration of glyoxylic acid solution is 0.5g/mL, the observation time: (a) immediately, (b) 4h, (c) 48h, (d) 72h. The corresponding size distribution histogram: (a')-(d')

就应用方面而言，最重要的是要控制反相囊泡的尺寸大小分布。随着时间的推移，形成的反相囊泡容易与邻近的囊泡发生融合形成更大的反相囊泡，直到完全消失。磷脂膜的融合影响着反相囊泡的稳定性。如图 7 所示，反相囊泡的融合速度反映了囊泡的稳定性大小。

为了考察融合速率，我们在不同时间进行了观察。当将 2 mL 环己烷加入到带有蛋黄卵磷脂薄膜的玻璃池中，立即形成直径为 5-40  $\mu\text{m}$  的反相囊泡，主要集中在乙醛酸修饰碳纤维周围（图 7a 和 7a'）。4 h 后，平均直径明显增大（图 7b 和 7b'），反相囊泡直径分布在 5-50 $\mu\text{m}$ ，部分反相囊泡直径达到 80-90 $\mu\text{m}$ 。在 48 h 时，大部分的反相囊泡的直径为 5-10  $\mu\text{m}$  和 40-80  $\mu\text{m}$ ，有的甚至达到了 120  $\mu\text{m}$ （图 7c 和 7c'）。72 h 后，最大直径接近 150  $\mu\text{m}$ （图 7d 和 7d'），此时玻璃池中加入的 2 ml 环己烷几乎完全挥发。

随着时间的延长,得到的反相囊泡发生融合,形成巨型反相囊泡(直径> 100  $\mu\text{m}$ )。因此,在 2-3 天较长时间内,在乙醛酸碳纤维上构建的反相囊泡结构能够较好地保持,有利于反相囊泡多方面应用的进行。

#### 4 结论

我们成功的在乙醛酸修饰碳纤维上构建了反相囊泡。与其他方法相比,该方法可以简便、快速、高效地形成反相囊泡。而且制备过程中,取代了蒸馏水的加入,消除了油包水液滴的干扰,可利用倒置生物光学显微镜对反相囊泡的形成进行原位观察,使表征方法简单化。研究表明,乙醛酸和蛋黄卵磷脂分子之间的氢键作用是磷脂膜和蛋黄卵磷脂反相囊泡形成的主要驱动力,在反相囊泡的构建中起着非常重要的作用。

#### 参考文献

- [1] Voskuhl, J.; Ravoo, B.; J. Chem. Soc. Rev. 2009, 38, 495.
- [2] Imura, T.; Morita, T.; Fukuoka, T. J. Oleo Sci. 2014, 63, 141.
- [3] Pinazo, A.; Petrizelli, V.; Bustelo, M.; Pons, R.; Vinardell, M. P.; Mitjans, M.; Manresa, A.; Perez, L. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016, 141, 19.
- [4] Evans, K. O.; Compton, D. L.; Laszlo, J. A.; Appell, M. Chem. Phys. Lipids, 2016, 195, 1.
- [5] Kunieda, H.; Nakamura, K.; Evans, D. F. J. Am. Chem. Soc 1991, 113, 1051.
- [6] Kunieda, H.; Nakamura, K.; Infante, M. R.; Solans, C. AdV. Mater. 1992, 4, 291.
- [7] Boettcher, C.; Schade, B.; Fuhrhop, J. H. Langmuir 2001, 17(3), 873.
- [8] Mollee, H.; De Vrind, J.; De Vringer, T. J. Pharm. Sci. 2000, 89(7), 930.
- [9] Dominguez-Gutierrez, D.; Surtchev, M.; Eiser, E.; Elsevier, C. J. Nano Lett. 2006, 6(2), 145.
- [10] Rao, K. S.; So, S.; Kumar, A. Chem. Commun. 2013, 49(73), 8111.
- [11] Tung, S. H.; Lee, H. Y.; Raghavan, R. S. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130(27), 8813.
- [12] Xu, X. N.; Wang, L.; Li, Z. T. Chem. Commun. 2009, No.43, 6634.
- [13] Boettcher, C.; Schade, B.; Fuhrhop, J. H. Langmuir, 2001, 17(3), 873.
- [14] Li, H. G.; Xin, X.; Kalwarczyk, T.; Kalwarczyk, E.; Niton, P.; Holyst, R.; Hao, J. Langmuir 2010,

26(19), 15210.

- [15] Kunieda, H.; Nakamura, K.; Davis, H. T.; Evans, D. F. *Langmuir* 1991, 7(9), 1915.
- [16] Kunieda, H.; Makino, S.; Ushio, N. *J. Colloid Interface Sci.* 1991, 147(1), 286.
- [17] Kunieda, H.; Yamagata, M. *J. Colloid Interface Sci.* 1992, 150(1), 277.
- [18] Kunieda, H.; Nakamura, K.; Olsson, U.; Lindman, B. *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 9525.
- [19] Kunieda, H.; Kamei, N.; Uemoto, A.; Tobita, I. *Langmuir* 1994, 10, 4006.
- [20] Nakamura, K.; Uemoto, A.; Imae, T.; Solans, C.; Kunieda, H. *J. Colloid Interface Sci.* 1995, 170(2), 367.
- [21] Olsson, U.; Nakamura, K.; Kunieda, H.; Strey, R. *Langmuir* 1996, 12, 3045.
- [22] Shrestha, L. K.; Kaneko, M.; Sato, T.; Acharya, D. P.; Iwanaga, T.; Kunieda, H. *Langmuir* 2006, 22(4), 1449.
- [23] Li, Y.; Wang, X.; Li, Y.; Cao, J.; Zhan, S. *China Surfactant Detergent & Cosmetics* 2014, 44(6), 336.
- [24] Gu, W.; Yang, Y.; Wen, J.; Gao, H. *J. Control Release*, 2015, 213, e115.
- [25] Sanchez-Ferrer, A.; Garcia-Carmona, F. *Biochem. J.* 1992, 285, 373.
- [26] Adamala, K.; Szostak, J. W. *Science* 2013, 342(6162), 1098.
- [27] Zhu, Y. Q.; Fan, L.; Yang, B.; Du, J. Z. *ACS. Nano.* 2014, 8(5), 5022.
- [28] Song, J. B.; Pu, L.; Zhou, J. J.; Duan, B.; Duan, H. W. *ACS. Nano.* 2013, 7(11), 9947.
- [29] Li, H.; Hao, J.; Wu, Z. *J. Phys. Chem. B.* 2008, 112, 3705-3710.
- [30] Li, J.; Hu, X.H.; Su, Y.Z., and Li, Q.B. *Chem. Eng. Sci.* 2007, 62, 6784-6793.
- [31] Jing, J.; Li, Y.; Zhang, X. J.; Cao, J.; Li, Y. W.; Zhan, S. H. *Electrochem. Commun.* 2012, 25, 151.
- [32] Li, Y. W.; Seekell, R.; Zhan, S. H.; Cao, J.; Jing, J.; Li, Y. J. *Disper. Sci. Technol.* 2014, 35(5), 672.
- [33] Joseph, J.; Jemmis, E.D. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129(15), 4620.