仅内部使用，严禁商用 www.hanlin.io

参赛队员姓名：嵇杰、高彤、谢佩蓉

中学：南京外国语学校

省份：江苏省

国家/地区：中国

指导教师姓名：陈静、倪恨美教授

论文题目：明胶/$CaHPO_4$自组织多脉冲药物释放系统的研制

仅内部使用，严禁商用 www.hanlin.io

明胶/$CaHPO_4$自组织多脉冲药物释放系统的研制

秘杰、高彤、谢佩蓉

南京外国语学校，南京 210005，江苏

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

【论文摘要】

受自然界常见的自组织规则性图案的启发，本文提出了一个新的制备多脉冲药物释放系统的方法，将自组织 Liesegang 图案转变成多脉冲药物释放装置。选用生物相容性和降解性俱佳的明胶及磷酸氢钙($CaHPO_4$)作为 Liesegang 图案主要材料，油溶性胆固醇作为模板药物，采用乳化-溶剂蒸发技术将胆固醇制成纳米微胶囊后分散到明胶水溶液中，利用 $CaHPO_4$ 晶体沉淀带对明胶的酶解和纳米微胶囊扩散的阻隔作用形成阶梯式明胶酶解动力学曲线，即多脉冲药物释放曲线。

研究了阴离子型表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)、十二烷基苯磺酸钠(SDBS)以及阳离子型表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(HTMAB)对明胶粘度以及凝固点的影响，发现添加阴离子型表面活性剂增加明胶粘度，而阳离子型表面活性剂降低明胶粘度，在超过临界胶束浓度(CMC)后，增加 SDS 及 SDBS 浓度可以更有效地提高明胶粘度，另外 SDBS 比 SDS 的增粘效果更好，因此 SDBS 被选择为胆固醇的微胶囊化表面活性剂。研究结果表明添加 SDBS 对 $CaHPO_4$/明胶 Liesegang 图案影响很大，随着 SDBS 浓度的增大，形成的 Liesegang 环数增加，环间距及环厚度均减小。当 SDBS 初始浓度 $[SDBS]_0$ 达 15 mM 时，正则 Liesegang 图案转变成反则 Liesegang 图案，即环间距不再随环的个数增加而增加，而是出现等距环图案。但是当$[SDBS]_0 \geq 18$ mM 时后，不能形成 Liesegang 图案。另外用胆固醇/SDBS 微胶囊取代 SDBS 不改变上述结果，这是因为$[SDBS]_0$远远高于其 CMC(5 mM)。利用胰蛋白酶将上述含胆固醇/SDBS 纳米微胶囊的等距 Liesegang 图案进行酶解，通过胆固醇/SDBS 纳米微胶囊的紫外最大吸收波长观察酶解过程，得到了阶梯状胆固醇/SDBS 纳米胶囊浓度变化曲线。说明明胶中的 $CaHPO_4$ 晶体沉淀带能够有效地阻止明胶的酶解和胆固醇/SDBS 纳米胶囊的自发扩散。以上结果证明 Liesegang 图案形成的化学过程是可控的，通过控制 Liesegang 图案制备多脉冲药物释放装置完全可行。

【关键词】自组织 Liesegang 图案，多脉冲药物释放，明胶，酶解

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

【目录】

1. 绪论.....5
1.1 自组织 Liesegang 图案.....5
1.2 药物释放系统研究进展.....7
2. 研究方案及其工作原理.....8
3. 实验部分.....10
3.1 材料及试剂.....10
3.2 制备方法.....11
3.2.1 表面活性剂浓度的配制.....11
3.2.2 含表面活性剂的明胶溶液的配制.....11
3.2.3 胆固醇/十二烷基苯磺酸钠微胶囊的制备.....11
3.2.4 含表面活性剂的 Liesegang 图案的制备.....11
3.3 表征方法.....12
3.3.1 表面活性剂存在条件下明胶粘度的测定.....12
3.3.2 不同成分明胶的差热分析.....12
3.3.3 动态光散射测定粒径.....12
3.3.4 紫外可见光测定物质浓度.....12
3.3.5 Liesegang 图案中环间距及带宽的测量.....14
3.4 明胶酶解动力学测试.....14
4. 结果和讨论.....14
4.1 胆固醇/十二烷基苯磺酸钠微胶囊的粒径.....14
4.2 明胶浓度与明胶粘度的关系.....15
4.3 pH 对明胶粘度的影响.....15
4.4 表面活性剂对明胶粘度的影响.....16
4.5 添加物对明胶凝固点的影响.....17
4.6 明胶中 Liesegang 图案的制备.....18
4.6.1 明胶交联度的影响.....18
4.6.2 pH 值的影响.....19
4.6.3 十二烷基苯磺酸钠浓度的影响.....20
4.6.4 外电解质磷酸氢钠浓度的影响.....22
4.6.5 内电解质氯化钙浓度的影响.....23
4.6.6 上层无序部分的消除方法.....24
4.7 酶解实验.....25
4.7.1 非图案化明胶的酶解动力学.....25
4.7.2 Liesegang 图案化明胶的酶解动力学.....25
5. 结论.....26
参考文献.....28
致谢及组员实验分工.....31

仅内部使用,严禁商用 www.hanlin.io

1.绪论

1.1 自组织 Liesegang 图案

漫步海边，徒步山溪，甚至了解我们身体结构的时候，我们可能都会被一些大自然造化的美丽图案所吸引，例如海边的贝壳、风化的岩石、人的牙齿和胆囊结石结构等。图 1 展示的贝壳就是这类美丽图案的代表。那完美的螺旋状结构、规则排列的条纹、交替出现的色彩如此迷人，以至于在古代，他们一度被当作珍品，用于服饰，甚至被当成钱币。与此同时，人类与生俱来的好奇心也被唤起：他们是如何形成的？然而，由于生物系统的复杂性，迄今为止这仍是个谜，仍在不断挑战人类的好奇心。

图 1 贝壳的规则性图案

大自然的启发一直是人类开发新材料的动机之一。直到一个世纪前，德国化学家和摄影师 Rapheal E. Liesegang 偶然注意到把一滴硝酸银溶液滴到含有重铬酸钾的凝胶薄层上，几个小时后，凝胶中产生了大量境界分明的同心环[1]。如图 2 所示，这些在凝胶中形成的规则性图案与那些自然界中产生的规则性图案非常相似 [1, 2]，而且实验方法和反应系统也简单。因此，Liesegang 实验惊动了世界，为研究像贝壳那样复杂生物系统的图案形成打开了大门，于是这种现象便被称作为 Liesegang 环 (LRs)。

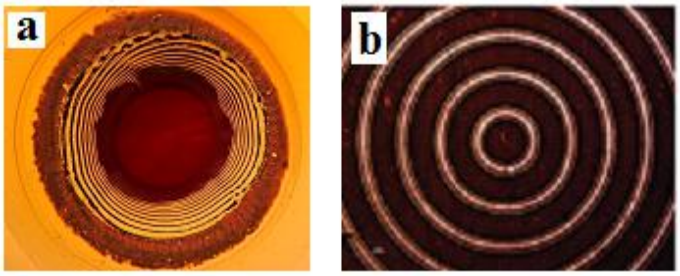


图 2 胶体中的 $Ag_2Cr_2O_7$ (a, Ref 1)和 Ag_2O(b, Ref 2）同心圆图案

自此以后，Liesegang 现象的研究全面展开，发现了大量的 Liesegang 图案[2-11]。 总的来说，Liesegang 图案是一种自发的时空自组织图案，典型的形成过程是两种离子在扩散锋面发生化学反应，反应产物沉淀后自组织形成环。例如重铬酸根离子扩散到凝胶中遇到银离子，反应形成重铬酸银沉淀，这些沉淀物自组织形成重铬酸银晶体沉淀带。然而，进一步的研究表明凝胶并非是不可或缺的介质，Liesegang 环可以在各种介质中形成[3]，除了常用的凝胶，在液滴、软而多孔的物质、石英和硫类的硬物质[3]、气体[4] 和纯净水[5]中都可以形成 Liesegang 环。此外，成环材料也不局限于难溶盐，在凝胶中扩散的有机物质 [6] 和纳米颗粒或微球 [7]也能成环。Liesegang 图案的形成也不受空间大小和几何形状的限制，如图 3 所示，在超薄凝胶膜 [8,9]、极度被限制的空间里 [10]和纳米粒子 [11] 内都可形成 Liesegang 图案。最后，Liesegang 图案形成的驱动力各式各样，除了扩散，热波和 pH 值波也可作为驱动力。

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

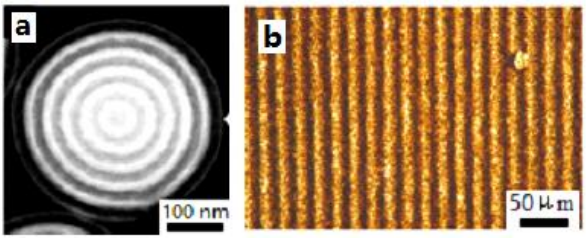


图 3　在纳米粒子内 (a, Ref 11) 和超薄凝胶膜内 (b, Ref 8)形成的 Liesegang 图案

然而，Liesegang 图案的形成机理，迄今尚不清楚。目前有几种不同的理论来解释环的形成[8]。奥斯特瓦尔德认为，离子浓度超过溶度积时难溶盐分子不是立刻从水中析出沉淀，而是首先产生过饱和区域，在此过饱和区域内产生沉淀，形成晶体种子[12]，然后其它区域内的难溶盐分子或离子向沉淀区域扩散，吸附到沉淀物上，从而形成某些区域有难溶盐沉淀，而其他区域没有沉淀的图案。一个明确的区域形成扩散锋前因为离子扩散到沉淀。然而这个理论的缺点很明显，按照该理论如果预先在凝胶中添加晶体种子，那么应该无法形成 Liesegang 图案，但是实验证明 Liesegang 图案的形成与种子无关。另一种理论被称为“吸附理论”，它所关注的是离子在早期形成的难溶盐胶体颗粒上的吸附作用[13]。如果有大量的小颗粒存在，那么巨大的比表面积所产生的吸附力会阻碍离子的扩散，直至颗粒增大导致比表面积减小到某种程度，吸附力不足以阻碍离子扩散为止。与之相反，絮凝理论认为，离子反应首先产生大量的尺寸很小的胶体颗粒[14]，由于区域外大量离子迁入导致这些小的胶体颗粒发生絮凝，从而产生了空间分布不均的絮凝区域。

机理方面的争议来源于 Liesegang 图案的多样性，但是尽管如此，宏观上大部分 Liesegang 图案的形成遵守以下几个规则。

空间规则[15]：$p = \frac{X_{n+1}}{X_n}$，其中 p 为空间因子，X_n 为从两种离子开始接触的界面到第 n 个环的距离。

时间规则[16]：$t_n \propto X_n^2$，t_n 为第 n 个环开始形成时的时间。

厚度规则[17,18]：$W_n \approx X_n^{\alpha}$，其中 W_n 为第 n 个环的厚度，α 为常数。

Matalon-Packter 规则[19]：$p(C_{0,in},C_{0,out}) = F(C_{0,in}) + G(C_{0,in})/C_{0,out}$，其中 C_0 为离子的初始浓度，in 和 out 分别指内外电解质，F 和 G 为衰减函数。

Jablczynski 指出当 n 足够大时，空间因子 p 趋向于一个常数[15]。Matalon 和 Packter 进一步指出 p 可以用两个衰减函数 $F(C_{0,in})$ 和 $G(C_{0,in})$ 来表达[19]。但是不符合这些规则的 Liesegang 现象也有大量报道[20-25]。例如根据空间规则，环间距实际上随着环的序数 n 增加而不断增大的，但是在第三种离子的干扰下环间距随着环序数 n 增加反而减小[24,25]。因而，符合上述规则的 Liesegang 现象被称为正则 Liesegang 图案，不符合的被统称为反则 Liesegang 图案。

正是由于 Liesegang 图案的复杂性和多样性使得形成机理成为迄今研究的主流，而遗憾的是同样由 Liesegang 图案的多样性引发的、丰富的潜在应用的想象却没有引起足够的重视。

仅内部使用，严禁商用 www.hanlin.io

迄今有关 Liesegang 图案的应用研究报道极少[26,28]，这为我们首次开发 Liesegang 图案的应用研究提供了宝贵的机会。

1.2 药物释放系统研究进展

众所周知，药剂的类型对疾病治疗的效果有非常大的影响[28]。药有一定的毒副作用。图 4 展示了当一个人吃了一颗药丸后血浆中药物浓度的变化。如果药物没有经过缓释方法处理，那么血浆中的药物浓度按红线 1 变化，即在相当长的时间内药物浓度处于有毒区域，对人体产生毒副作用，而有效浓度保持得很短。为了改变这种状况，自上世纪 80 年代起，开发了大量缓释技术，使得血浆中的药物浓度按蓝线 2 变化。这意味着产生毒副作用的问题被解决了，药物的有效时间被尽可能地延长。

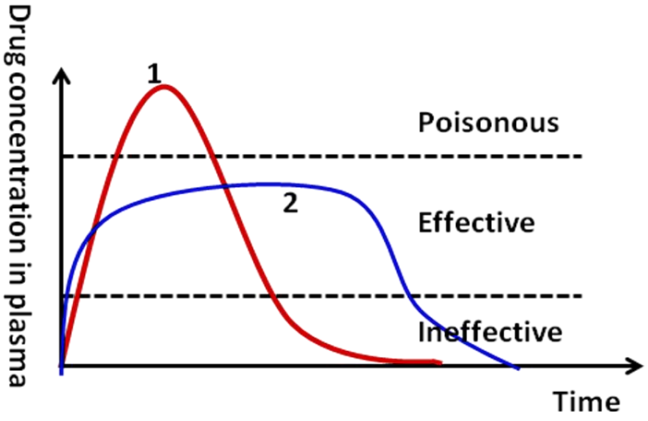


图 4　服药后血浆中药物浓度随时间的变化

但是对于一个慢性病患者来说，频繁地服药，甚至有些需要频繁地在往来于医院与家庭或工作单位之间是一件非常痛苦的事。不仅如此，最新的研究表明在大脑的视交叉上核(SCN)中存在着一个生理节奏钟[29-32]。它像一个多功能计时器，以 24 小时为一个周期，调节控制着诸如休眠和活动、荷尔蒙量、食欲以及其他身体功能，从而导致身体机能和疾病病理产生 24 小时波动的节律。因此许多药物的毒性和有效性与服药的时间关系很大。如果能够准确地预测疾病的病理节律，那么适时服药才是最好的治疗方法。例如采用早上一次性服用皮质类胆固醇片剂的方法只能轻微地抑制肾上腺皮质，而采用一日剂量分四次服用，并与每日三餐和就寝时间相配合，那么可以明显抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴[29]。当然很多疾病的病理节律很难预先知道，更何况对于药物的最佳耐性时间也因人而异。但是尽管如此，从药剂学发展方向来看，开发一种在床头或门诊部可以使用的精确时间控制的药物投放装置具有重大的意义，尤其对那些有节律要求的药，比如具有节奏性、昼夜内源性分泌模式的某些荷尔蒙[33]，按细胞周期投放的治癌化疗试剂[34]，在毒性和有效性方面具有耐性和昼夜变化特征的药[35]。

回顾多年来在适时投药方法方面的研究进展，可以归结为两种策略，即被动投放和主动投放[37-43]模式。被动投放的模式是把药剂制成层状[38-41]，使得每层的释放时间不同，或者使药剂的不同部分在一系列指定的时间内破裂[44]。主动模式是采用外界刺激的方法，即在需要的时候用外界刺激驱动药剂使之释放药物。外界刺激主要包括压力[45]、电场[40,46] 、磁场[47]、电磁脉冲[48]、超声波[49] 以及化学震荡反应[50] 等。但是这些方法要么制造工艺复杂，要么很难实际应用。例如 Langer 等人提出了一个被动投药方法，该方法首先在一张聚乳酸膜（PLLA）上打上很多锥形微孔用来储存成长荷尔蒙，然后在每个孔上覆盖生物降解速度不同的乳酸/乙醇酸共聚物（PLGA）以防止成长荷尔蒙泄露[42,43]。将这个装置移植体内，那么

仅内部使用，严禁商用 www.hanlin.io

PLGA 在体内酶的作用下降解，由于降解速度不同，每个微孔中的成长荷尔蒙被释放出来的时间不同。显而易见，这种方法需要微制造技术，而且在疏水的 PLLA 微孔中注入水性溶液也是一个困难的操作（表面张力大）。Kwon 等发明了另一种主动方式[46]。在聚乙基噁唑啉(PEOx)与聚甲基丙烯酸(PMAA)或聚丙烯酸(PAA)混合物中噁唑啉与羧基间形成氢键，因而两种聚合物在水溶液中不溶解，呈固态。但是氢键作用的大小可以用羧基的离解度来调节。当给两种聚合物的混合物施加微小的电场后，羧基在电场作用下离解度增大，产生大量的氢离子和羧基阴离子，这样不仅解除了 PEOx 与 PMAA 间的氢键作用，而且使 PMAA 分子间产生静电排斥，于是聚合物的混合物开始溶解于水，形成水溶液。电场消失后，聚合物的混合物重新恢复到不溶于水的状态。Kwon 等将胰岛素混合到两种聚合物的混合物中进行了体外释放实验，在电脉冲的作用下实现了胰岛素的脉冲式释放[46]。由于体液不是纯水，而是盐溶液。盐溶液中离子会破坏聚合物中的氢键作用，盐溶液导电，外界电场无法附加到埋植于体内的聚合物装置上，因此这种方法显然没有实用价值。

因此，开发出制造工艺简单，而且实用的脉冲式药物释放系统仍然有很多工作要做。

2. 研究方案及其工作原理

受 Liesegang 图案的启发，我们提出了一种新的被动策略来制备多脉冲药物释放系统，即利用 Liesegang 图案中无机盐晶体沉淀带的阻隔作用实现多脉冲药物释放。

首先，采用生物相容性好且生物可降解的明胶和钙磷酸氢作为系统的材料，选用不溶水性药物胆固醇作为药物模型。如图 5 所示，为了将胆固醇加入到明胶中，采用了乳化-溶剂挥发技术将胆固醇纳米微胶囊化。然后将固体明胶和内电解质氯化钙加入到胆固醇乳液中溶解，制备明胶水凝胶。

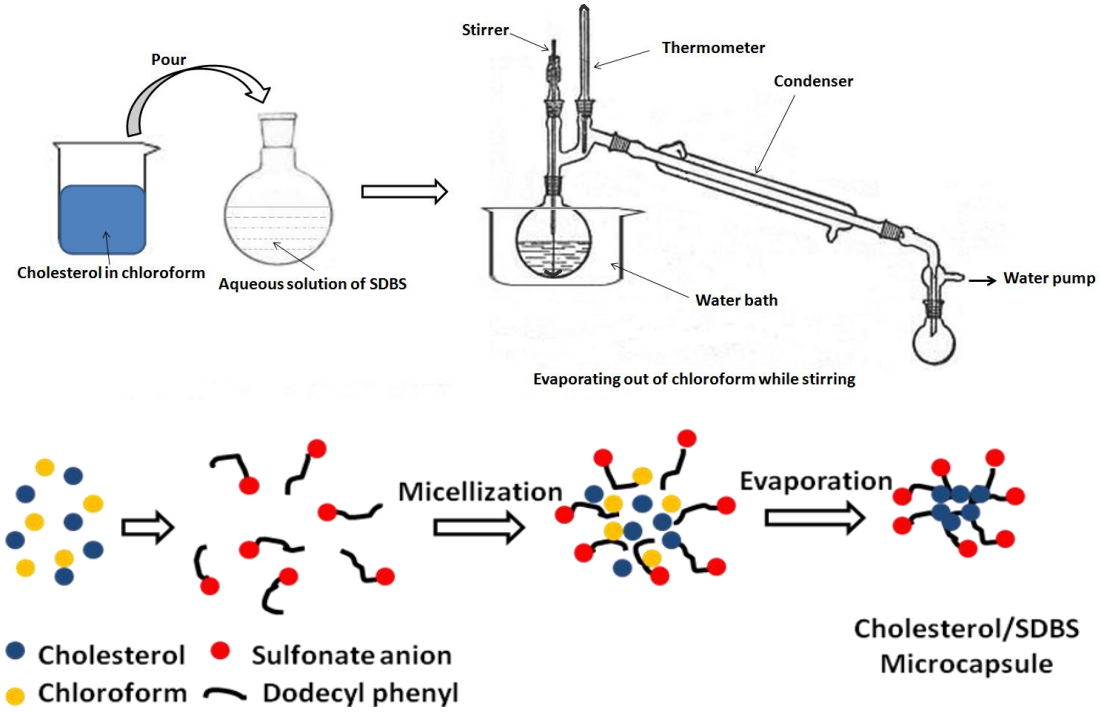


图 5 乳化-溶剂挥发技术（上图）及胆固醇微胶囊化原理（下图）

图 6 展示了 Liesegang 图案的形成过程。当然明胶溶于水，为了防止明胶在以后的酶

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

解过程中溶解，采用化学交联的办法将明胶转变成水可溶胀，但不溶解的水凝胶。众所周知，明胶中含有大量胺基，可以和醛发生 Mannich 反应 (1)，因此可以用戊二醛交联。

$$R_1\text{-}NH_2+R_2\text{-}COH\rightarrow R_1\text{-}HN=CH\text{-}R_2+H_2O \quad (1)$$

如图 6 所示，置于顶端的 HPO_4^{2-} 阴离子向含 Ca^{2+}明胶水凝胶中扩散，在两者相遇的界面发生反应，生成 $CaHPO_4$ (2)。然后 $CaHPO_4$ 沉淀形成晶体沉淀带，在沉淀带中，$CaHPO_4$ 晶体占据了明胶中可能存在的空穴，同时也将一部分明胶分子挤出，因而这些晶体沉淀带起到三方面作用：（1）降低胰蛋白酶向内扩散的速度；（2）降低酶解速度（因为带内明胶浓度低）；（3）阻止胆固醇纳米微胶囊的自由扩散。

$$HPO_4^{2-} + Ca^{2+} \rightarrow CaHPO_4\downarrow \quad (2)$$

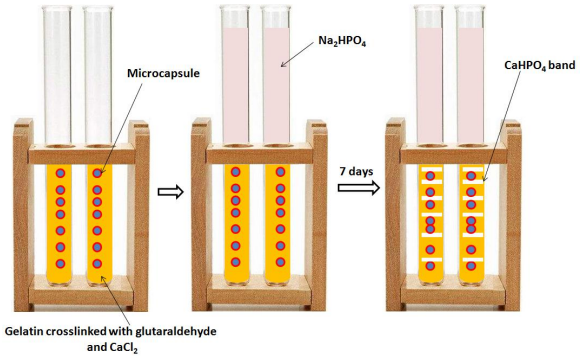
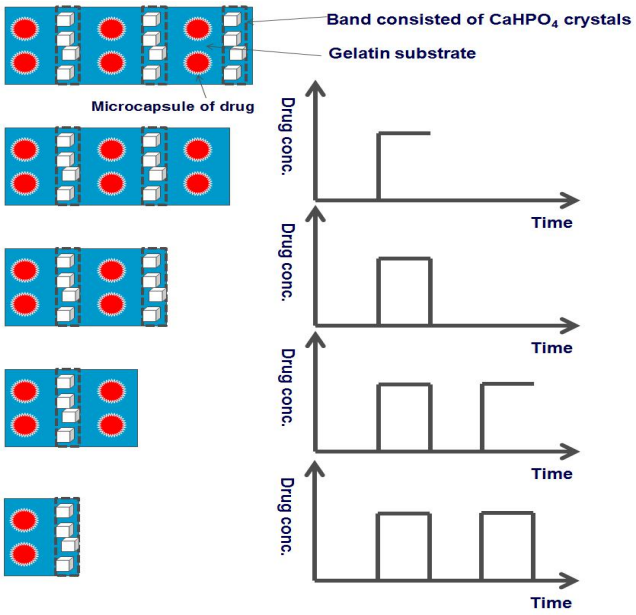


图 6　Liesegang 图案形成的示意图

将以上形成的 Liesegang 图案放在胰蛋白酶水溶液中酶解，如图 7 所示，应该可以得到多脉冲胆固醇释放曲线。大多数胆固醇微胶囊应该存在于带间明胶中，因而随着明胶的酶解被释放到酶解液中。另一方面 $CaHPO_4$ 晶体沉淀带之所以能够保持形态，那是因为有两边的明胶层支撑着。因此，如果一边的明胶层全部被降解，那么 $CaHPO_4$ 晶体沉淀带将垮塌，$CaHPO_4$ 也将在酶解液中溶解（酶解液体积大，降低了 Ca^{2+}和 HPO_4^{2-}的浓度）。$CaHPO_4$ 晶体沉淀带垮塌后，胰蛋白酶可以自由地扩散进入到下一层明胶中对明胶进行分解。如此重复，即可实现胆固醇的多脉冲释放。



仅内部使用，严禁商用 www.hanlin.io

图 7　Liesegang 图案多脉冲释放药物的示意图

3. 实验部分

3.1 材料与试剂

本研究所用所有材料及化学试剂列于表 1。

表 1，实验所用材料及化学试剂

名称	分子式	纯度	制造商
明胶	-	CP	国药集团化学试剂股份有限公司
胰蛋白酶	-	活性成分：>99%	阿拉丁
胆固醇	$C_{27}H_{46}O$	AR	阿拉丁
无水氯化钙	$CaCl_2$	AR	国药集团化学试剂股份有限公司
磷酸氢钠	Na_2HPO_4	AR	国药集团化学试剂股份有限公司
戊二醛	$CHO(CH_2)_3CHO$	CP	国药集团化学试剂股份有限公司
盐酸	HCl	AR	国药集团化学试剂股份有限公司
氢氧化钠	NaOH	AR	国药集团化学试剂股份有限公司
十二烷基硫酸钠	$CH_3(CH_2)_{11}SO_4Na$	AR	国药集团化学试剂股份有限公司
十二烷基苯磺酸钠	$CH_3(CH_2)_{11}C_6H_4SO_3Na$	活性成分：>99%	西格玛
十六烷基三甲基溴化铵	$CH_3(CH_2)_{15}(CH_3)_3NBr$	活性成分：>95%	西格玛
氯仿	$CHCl_3$	AR	国药集团化学试剂股份有限公司

以上所有材料和化学试剂都未进行再纯化或其他处理，直接用于实验。实验所用的水均为二次蒸馏水。

3.2 制备方法

3.2.1 表面活性剂浓度的配制

用称量纸称取 27.8733g 十二烷基苯磺酸钠（SDBS），倒入盛有 300mL 二次蒸馏水的 500mL 烧杯中，电磁搅拌至全部溶解。然后将溶液倒入 500mL 容量瓶中，用 50mL 二次蒸馏水荡洗烧杯三次，荡洗液倒入容量瓶。最后用滴管将容量瓶加至刻度，即得 16mM 的十二烷基苯磺酸钠溶液。

除了称量的物质量不同外，其他浓度的表面活性剂溶液以及磷酸氢钠溶液等的制备方法与之相同。

3.2.2 含表面活性剂的明胶溶液的配制

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

称取 8.0g 明胶，倒入盛有 100mL 规定浓度的表面活性剂溶液的 250mL 圆底烧瓶中。然后将烧瓶放入水浴锅中加热至 45℃，电磁搅拌 3 小时，至明胶全部溶解。冷却至室温后，将圆底烧瓶与水泵连接，脱气至溶液中气泡消失。

含氯化钙或氯化钙和表面活性剂的明胶的制备方法与此相同，均是将氯化钙或氯化钙和表面活性剂浓度配置好后再溶解明胶。

3.2.3 胆固醇/十二烷基苯磺酸钠微胶囊的制备

称取 100mg 胆固醇溶于 100mL 氯仿中，搅拌溶解完毕后，倒入盛有 300mL，16mM 的十二烷基苯磺酸钠溶液（SDBS）的 500mL 三颈烧瓶中，然后将三颈烧瓶放入水浴锅中，配置机械搅拌和冷凝管。一边搅拌（300rpm），一边将水浴锅升温至 40℃。等没有氯仿馏出为止，将冷凝管尾端与水泵连接，减压蒸馏 30 分钟。冷却至室温，即得到胆固醇/十二烷基苯磺酸钠微胶囊的乳液。

3.2.4 含表面活性剂的 Liesegang 图案的制备

实验配方列于表 2，$[SDBS]_0$, $[CaCl2]_0$ 和 $[Na_2HPO_4]_0$ 表示初始浓度。从前面的浓度配制部分看出，明胶体系中实际的物质浓度与初始浓度是有区别的。这既涉及到配制准确浓度的难度，又涉及到一些无法回避的困难。例如明胶中 SDBS 的实际浓度是无法知晓的，因为 SDBS 的临界胶束浓度(CMC)为 5 mM，因此$[SDBS]_0$=16 mM 时已经有大量的 SDBS 形成了胶束。同时还有一部分 SDBS 与明胶分子相互作用，形成缔合物。

称取 8.0g 明胶，倒入盛有 100mL 配制好的含氯化钙和表面活性剂溶液的 250mL 圆底烧瓶中。然后将烧瓶放入水浴锅中加热至 45℃，电磁搅拌 3 小时，再加入戊二醛（0.0816 g，约为明胶量的 1 wt%），搅拌 30 分钟。

用注射器将上述明胶液注入到一根直立玻璃试管中（内径：14 mm，长：150 mm），至约一半高度。然后将玻璃试管放入超声洗涤器中超声 10 分钟，使明胶液充实试管。最后将试管放入圆底烧瓶中用水泵脱气，去除明胶液顶部和内部可能存在的气泡。脱完气后，将试管放入 5℃冰箱中储存 12 小时，使明胶充分交联和固化。

将含明胶的试管垂直立于试管架上，在 18℃静置 2 小时，然后用滴管轻轻地沿管壁将 18℃的磷酸氢钠溶液流入到试管中，直至管口。用塑料簿膜封口后，在 18℃静置 7 天。Liesegang 图案自动生成。

表 2　实验配方

明胶	内电解质	外电解质	SDBS	戊二醛
w/w	$[Ca^{2+}]_0$:M	$[HPO_4^{2-}]_0$: M	mM	w/w
8	0.05-0.15	0.20-0.60	0-16	1

注：戊二醛的浓度是基于明胶量的百分比

3.3 表征方法

3.3.1 表面活性剂存在条件下明胶粘度的测定

明胶粘度是勃氏粘度测试仪(ND-2，上海精密仪器仪表有限公司)在 25℃测定的。将 3.2.2 节配制好的明胶溶液在 5℃冰箱中放置 12 小时后取出，在 25℃静置 4 小时，使明胶内外达到温度平衡。用手指堵住勃氏粘度测试仪的毛细管出口，将 110mL 明胶溶液倒入玻璃管的

仅内部使用，严禁商用 www.hanlin.io

漏斗里，2 分钟后放开堵管手指，然后开启计时开关。原理上，动态粘度η (mPa·s)可以用方程式（3）计算，但实际上粘度值由机器自动计算给出。

$$\eta = \frac{t_s}{t_0} \qquad (3)$$

其中 t_s 是样品流出时间，t_0 是纯水流传时间。

测定 pH 对明胶粘度的影响时，pH 的测定是直接将 pH 计的探头(PHS-3E，上海雷磁科学仪器有限公司)插入约 150mL 明胶中，然后一边用滴管往明胶溶液中滴入 1.0 M HCl 或 1.0 M NaOH，一边搅拌，至 pH 计读数接近规定数值时停止滴加盐酸或氢氧化钠。

3.3.2 不同成分明胶的差热分析（DSC）

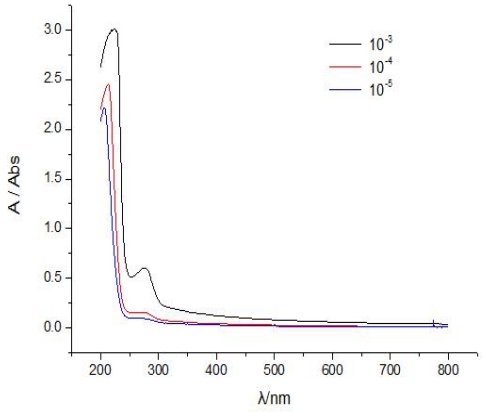
用镍匙挖取约 10 mg 明胶放入 DSC (DSC 3, Mettler-Toledo Ltd., China)专用铝杯中，盖上铝盖，压力密封后，将铝杯放入 DSC 仪器的热台上。设置扫描速度为 3℃/分，温度测试范围为 -10 ℃ - 30℃，在氮气保护下，测试明胶的热学性质。

3.3.3 动态光散射（DLS）测试粒径

用滴管直接取 3.2.3 节制备的胆固醇/SDBS 纳米微胶囊乳液约 10mL，注入洗涤干净的 DLS 专用石英管中，液面低于管口 1-2mm 为止。然后将石英管放入 DLS 测试架里（90plus Particle Sizer/BI-MAS, Brookhaven Instruments Co., US），在 20℃恒温 5-10min 后开始测试。DLS 测试粒径范围为 0-500nm，测试结果由机器自动给出。

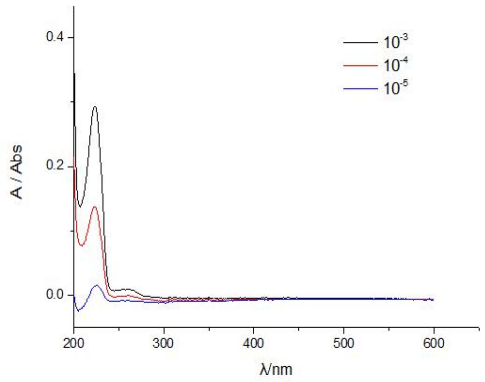
3. 3.4 紫外可见光测试物质浓度

为了测定胆固醇的释放速度，对明胶/胰蛋白酶混合液以及胆固醇/SDBS 纳米微胶囊乳液进行了紫外可见光（UV）(UV-2450, 日本岛津股份有限公司)测试，测试在室温下进行。首先测定了最大吸收波长。在 100mL 8wt%的明胶溶液中加入 10mg 胰蛋白酶，室温下搅拌 4 小时，然后取样稀释后进行 UV 测试。直接取 3.2.3 节制备的胆固醇/SDBS 乳液稀释后进行 UV 测试。图 8 显示了两种溶液的紫外可见光吸收图谱，图中的浓度是分别按明胶和胆固醇的量换算而来的浓度值。可以发现两者的最大吸收波长不同。明胶酶解混合物的最大吸收波长在 215 nm (图 8 a)，而胆固醇/SDBS 的 UV 最大吸收波长在 245 nm。因此，用 UV-245nm 波长可以用来检测明胶酶解产物中胆固醇的浓度。



a) 明胶酶解产物的 UV 吸收图谱

仅内部使用,严禁商用 www.hanlin.io



b) 胆固醇/SDBS 乳液的 UV 吸收图谱

图 8 胆固醇/SDBS 的 UV 最大吸收波长的确定

根据比色定律（Lambert-Beer），

$$A = \varepsilon bc \qquad (4)$$

其中 A 为光吸收强度，ε 为摩尔衰减因子，b 为光程，c 为物质浓度，可以得到浓度与最大吸收波长处的吸收强度的相关关系（图 9），即浓度校正曲线，由该曲线可以通过 UV 吸收强度得到胆固醇在水中的浓度。

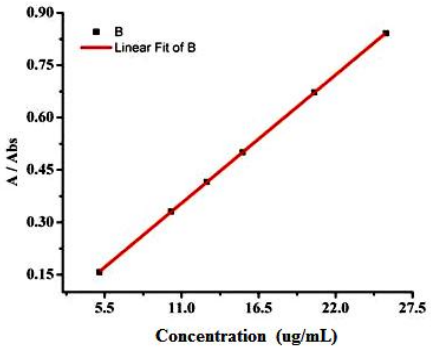


图 9 胆固醇/SDBS 纳米微胶囊浓度与 UV 吸收强度的相关关系

3. 3.5 Liesegang 图案中环间距及带宽的测量

Liesegang 图案中的环间距与带宽是通过电子成像设备(SPIP, 上海博悦电子仪器有限公司)来测量的，误差为±0.01mm。首先用电子照相机将 Liesegang 图案拍摄成图像，然后导入到 SPIP 中，利用该设备的软件对图像进行测量。在测量时将图像放大，然后在第 n 环的边缘取一个点，再在垂直对应的第 n+1 环的边缘取一个点，两个点之间的距离即为环间距。在环的边缘平均取点，测量 20 个环间距后再平均，即为本论文中的环间距。

3.4 明胶酶解动力学的测试

由于在 3.2.4 节中制备 Liesegang 图案时用的试管太长（150mm），不适合于做酶解动力学实验，因而酶解动力学实验的 Liesegang 图案制备采用了如下变通方法：将含氯化钙和表面活性剂明胶注入小塑料试管（内径：7mm，长度：40mm）中，然后将试管平躺在 300mL

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

烧杯底部。将 100mL Na_2HPO_4 溶液缓慢加入到烧杯中淹没试管，4 天后形成 Liesegang 图案。根据文献报道[51]，容器尺寸的改变除了影响成环个数外并不影响 Liesegang 图案形成的规律。

酶解动力学实验是在一个高压液相色谱设备(HLPC) (EasySepTM 1020, Unimicro Techn. Co. Ltd., Shanghai, China)内进行的。如图 10 所示，将成环的试管放在一个 500mL 烧杯中，然后加入 300mL 水及 0.75g 胰蛋白酶，利用 HLPC 的动力系统将酶解液泵入 UV 检测器中，然后泵回酶解液（HLPC 的色谱柱被卸掉了）。酶解温度为 20℃。利用 UV 245 nm 检测流动相中的胆固醇/SDBS 浓度。由此可见，检测到的胆固醇/SDBS 浓度是积分浓度。

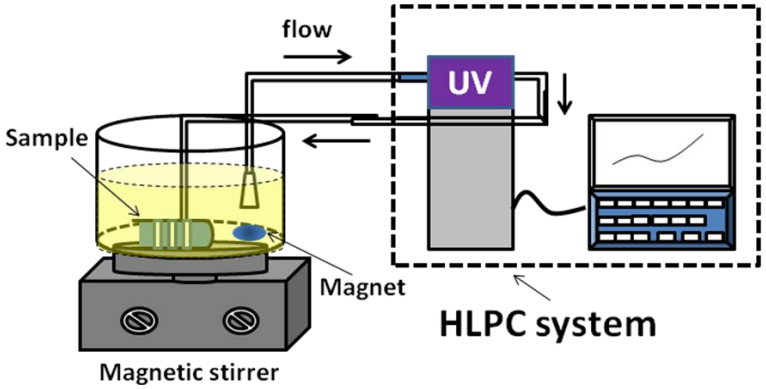


图 10　酶解动力学实验装置

4. 结果和讨论

4.1 胆固醇/SDBS 纳米微胶囊的粒径

胆固醇/SDBS 纳米微胶囊的 DLS 图谱显示在图 11。由图可见，所制备的纳米微胶囊粒径是单分散的。数量平均粒径为 65nm。由于实验时间短，未能研究不同粒径的微胶囊对 Liesegang 图案形成的影响以及酶解动力学。

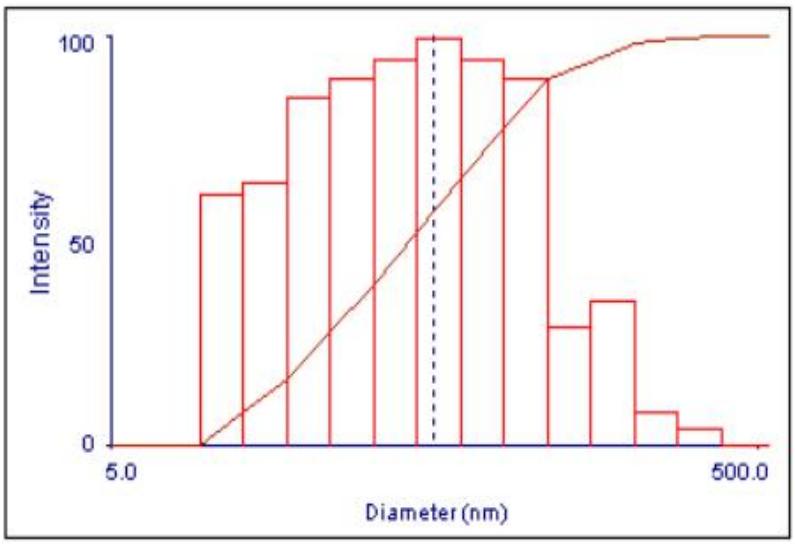


图 11　胆固醇/SDBS 纳米微胶囊乳液的 DLS 图谱

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

4.2 明胶浓度对明胶粘度的影响

明胶粘度对 Liesegang 图案的形成至关重要[51]。但凡能够提高明胶粘度的因素都有利于 Liesegang 图案的形成，如果粘度太低，则 Liesegang 图案不能形成。因此研究了明胶浓度对粘度的影响。如图 12 所示，明胶粘度随明胶浓度的增加而增大，当明胶浓度从 1 wt%增加到 10 wt%时，粘度由 1.86 mPa·s 增加到 17.82 mPa·s。虽然高浓度更有利于 Liesegang 图案的形成。然而，当浓度达到 10 wt%时，因粘度太高，将明胶注入试管变得困难，另外在搅拌过程中产生的气泡也很难消除。本实验选用了 8 wt%的浓度。

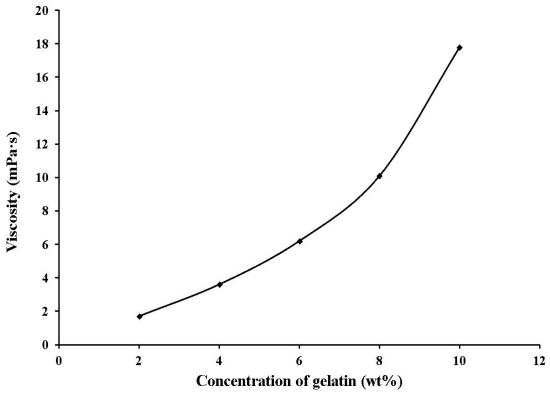
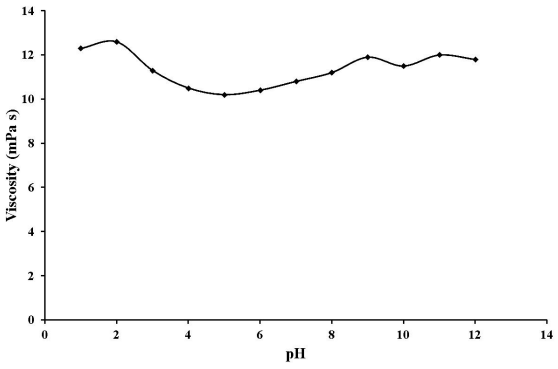


图 12　明胶粘度随浓度的变化

4.3 pH 值对明胶粘度的影响

pH 值也是影响 Liesegang 图案形成的主要因素。明胶的等电点为 pH 5，因此，pH 值的改变会改变明胶的结构，从而进一步影响明胶的粘度。图 13 显示了明胶粘度随 pH 值的变化。由图可见，当 pH 在等电点 pH 5 附近时明胶的粘度最低，而在 pH 较小或较大的地方，粘度较大。这是因为在等电点附近，明胶中的氨基和羧基是一对一相互作用，形成两性盐，降低了明胶分子的活动性和亲水性。在等电点附近明胶溶液的浊度变大也是这个原因，说明有些明胶分子由于亲水性降低而从水中析出。但是在远离等电点的低或高 pH 值范围，明胶分子均被极化。例如在低 pH 值，氨基与氢离子结合形成正电性季胺盐，这一方面增大了明胶分子的亲水性，另一方面使得明胶分子间产生静电排斥，从而增加了明胶分子的活动性，因而粘度增大。但是这里必须指出，尽管较高/低的 pH 值都能增加明胶粘度，但是并不适合 Liesegang 图案的形成，因为 $CaHPO_4$ 的溶度积也受 pH 的影响。在较高 pH 值，明胶中的钙离子会和氢氧根离子反应生成 $Ca(OH)_2$ 沉淀，而在很高 pH，$CaHPO_4$ 可能会转变成溶度积较高的 $Ca(H_2PO_4)_2$。因此综合考虑，适当低于等电点的 pH 更适合 Liesegang 图案的形成。



www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

图 13　pH 对明胶粘度的影响

4.4 表面活性剂对明胶粘度的影响

众所周知，表面活性剂分子与蛋白质分子相互作用形成缔合物，从而破坏蛋白质的结构，尤其是蛋白质的凝固点[52]。但是在本研究中，表面活性剂是必须使用的，因此表面活性剂对明胶的粘度、凝固点以及 Liesegang 图案形成的影响必须考虑。

有三种表面活性剂可供选择作为胆固醇的包覆材料，即阴离子、阳离子及非离子型表面活性剂。由于离子型表面活性剂分子对油滴的分散稳定性要优于非离子型表面活性剂，本文选择了两个阴离子型表面活性剂，十二烷基硫酸钠(SDS)和十二烷基苯磺酸钠（SDBS），以及一个阳离子型表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(HTMAB)作为研究对象。图 14 展示了表面活性剂对明胶粘度的影响。HTMAB 阳离子表面活性剂的影响与 SDS 和 SDBS 不同，只要加一点 HTMAB，明胶的粘度立即下降。原因是加入 HTMAB 后明胶会发生破裂，由原来的连续性水溶液变成了明胶块的悬浮液，因此随着 HTMAB 浓度的增加，明胶粘度急剧下降。与 HTMAB 的影响相反，如图 14 所示，加入阴离子型表面活性剂后，明胶的粘度提高，而且在大于临界胶束浓度（CMC）之后提高得更明显。例如 SDBS 的 CMC 为 5 mM，因此当 SDBS 浓度超过 5 mM 后粘度随 SDBS 浓度变化的斜率明显大于 CMC 之前的斜率（图 14，虚线）。SDS 的 CMC 为 1.2 mM。从图 14 看也有这种现象。这个结果可能与作用物种有关。低于 CMC，表面活性剂分子与明胶分子相互作用形成缔合物，而高于 CMC 后，除了表面活性剂分子的作用之外，胶束也与明胶分子相互作用，使得明胶分子之间的静电排斥更强。因而粘度更大。

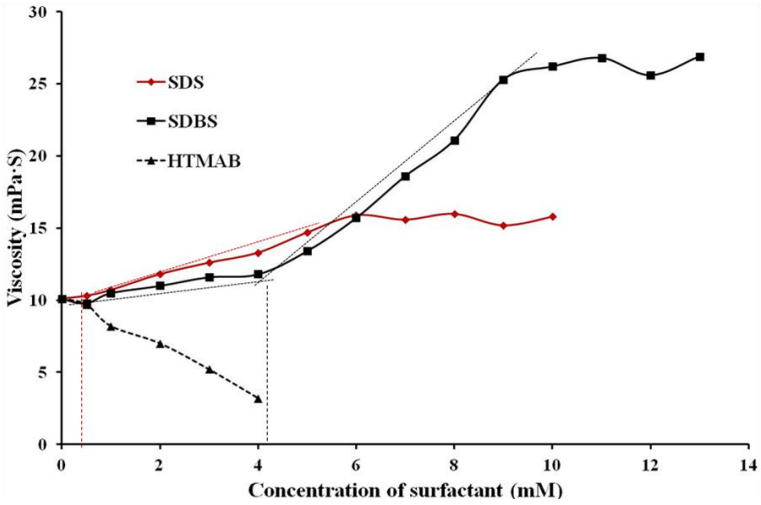


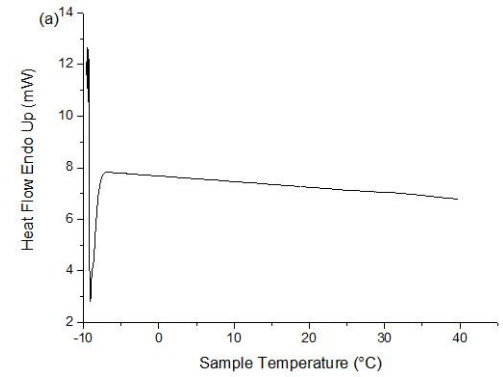
图 14　表面活性剂浓度及类型对明胶粘度的影响

比较 SDS 和 SDBS 对明胶粘度的影响效果，可以发现 SDBS 影响更大。当 SDS 浓度增加到 10mM 时明胶粘度只有 15.8 mPa·s，而 SDBS 浓度增加到 10mM 时明胶粘度到达 26.4 mPa·s。这个结果很可能与 SDBS-明胶间的疏水作用有关[53]。由于粘度越高越有利于 Liesegang 图案的形成，因此，我们选用 SDBS 作为胆固醇的包覆材料。

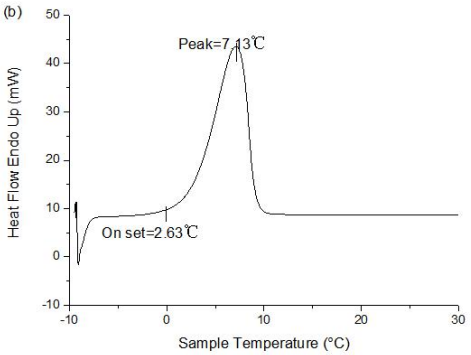
4.5 添加成分对明胶凝固点的影响

添加表面活性剂对明胶的粘度影响大，为了了解其中的原因，用差热扫描仪（DSC）对明胶热学性能进行了研究，结果展示在图 15。

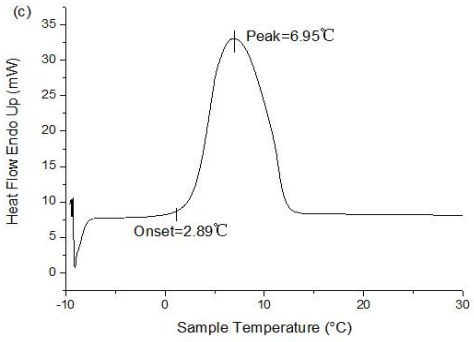
仅内部使用，严禁商用 www.hanlin.io



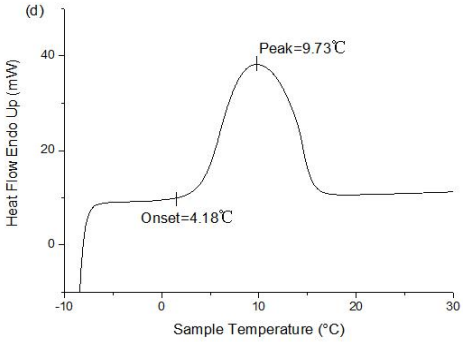
(a) 8 wt% 明胶



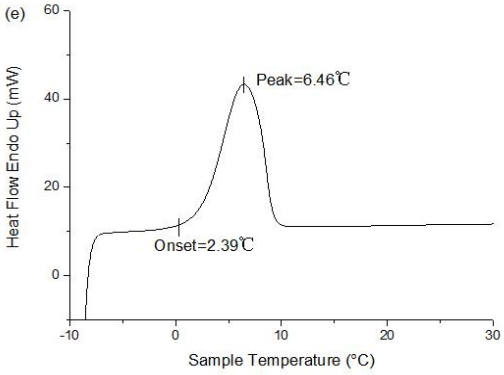
(b) 8 wt% 明胶 + 0.10 M $CaCl_2$



(c) 8wt% 明胶 + 4 mM [SDS]



(d) 8wt% 明胶 + 10 mM [SDBS]



(e) 4 wt% 明胶 + 1 mM[HTMAB]

图 15 不同添加物对明胶热学性能的影响

DSC 图谱上的放热峰为明胶晶体的熔融峰。（图 15 (a)，明胶的 DSC 曲线上没有峰，而其他 DSC 曲线上均有一个放热峰。可能是制备明胶样品时出了问题，由于实验时间紧，DSC 测试预约不上，没能来得及补测）

从图 15 可以看出添加 SDBS 时明胶晶体熔点最高，达到 9.73℃，而添加其他成分时明胶的熔点均在 7℃左右，其中添加 HTMAB 时明胶的熔点最低，只有 6.46℃。这个结果与各组分对明胶粘度的影响结果相一致，说明 SDBS 对明胶的结晶性影响较小。另外明胶的熔点越高意味着明胶的凝固点越高。实验事实也佐证了这一点，使用纯明胶可以在 20℃形成 Liesegang 图案，但是当添加 SDS 时，只有在 10℃以下才能形成 Liesegang 图案，而添加 SDBS，在 18℃可以形成 Liesegang 图案。

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

4.6 明胶中 Liesegang 图案的制备

4.6.1 明胶交联度的影响

由于在后续的工作中明胶要被酶解，因此为了防止在酶解的过程中明胶溶解，将明胶转变成水可溶胀，但不溶于水的水凝胶是较好的办法，而且交联也可以提高明胶的粘度。选用戊二醛通过 Mannich 反应将明胶交联。比较了交联度对 Liesegang 图案形成的影响，结果显示在图 16。由图可见，当加入戊二醛时，明胶由透明变成了淡黄色，这是 Mannich 反应产物的颜色，说明戊二醛起到了交联剂的作用。同时还可以发现，没有交联的明胶中 Liesegang 图案的带宽比交联后的带宽略微宽一点，这是由于环靠上下明胶的支撑，交联后明胶密度增大，分子链的活动性较低，因而在成环时明胶分子链网能够支撑磷酸氢钙晶体颗粒的重量，而没有交联的明胶分子在磷酸氢钙晶体的重压下下移。将戊二醛浓度由 0.75 wt%提高到 1.5 wt%并没有对 Liesegang 图案的形成带来明显的影响。因此，本文选择了 1 wt% 戊二醛浓度。

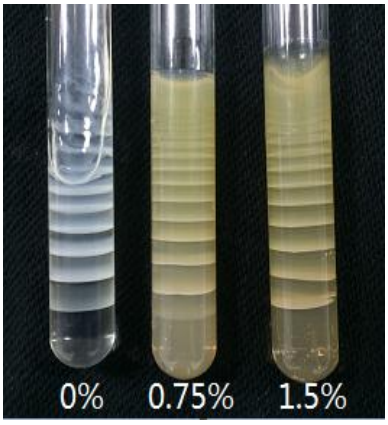


图 16　交联度对 Liesegang 图案形成的影响

($[CaCl_2]_0$=0.050 M; $[Na_2HPO_4]_0$=0.50 M; $[gel]_0$=8%w/w; T=18℃, t= 7 days)

4.6.2 pH 值的影响

在 4.3 节研究了 pH 值对明胶粘度的影响，发现在 pH 远离明胶等电点 pH 5 时明胶粘度明显增大，似乎有利于 Liesegang 图案的形成，为此比较了不同 pH 值时 Liesegang 图案形成的情况。图 17 展示了在三个不同 pH 值条件下形成的 Liesegang 图案。图 17 M 和 N 中明胶的颜色有点浑浊，而图 17 O 中明胶很透明。另外，带宽的变化很明显，M 的带宽 ＞N 的带宽 ＞O 的带宽。随着 pH 值的升高，明胶的浊度增加，带宽也增大。这个结果是由下面两个原因造成的：

首先在碱性条件下 $CaCl_2$ 发生水解（5）生成 $Ca(OH)_2$。$Ca(OH)_2$，的溶度积为 5.5×10^{-6}，在 HPO_4^{2-}离子扩散进入明胶体系之前，体系中就产生了 $Ca(OH)_2$ 沉淀，虽然 $CaHPO_4$ 的溶度积为 1×10^{-7}，比 $Ca(OH)_2$ 低，体系中仍然可以产生 $CaHPO_4$ 的沉淀环，但是机理变得更为复杂。另外，在碱性条件下，$CaHPO_4$ 也会与 OH^-发生反应，如反应方程式（6）所示，生成溶度积更低的 $Ca_3(PO_4)_2$（2.0×10^{-29}），从而促进沉淀的生成。与之相反，在酸性条件下，部分 $CaHPO_4$ 反应生成溶度积更高的 $Ca(H_2PO_4)_2$。

$$CaCl_2 + 2NaOH = Ca(OH)_2\downarrow + 2NaCl \quad (5)$$

$$3CaHPO_4\downarrow + 3NaOH = Ca_3(PO_4)_2\downarrow + Na_3PO_4 + 3H_2O \quad (6)$$

$$2CaHPO_4\downarrow + 2HCl = Ca(H_2PO_4)_2 + CaCl_2 \quad (7)$$

仅内部使用,严禁商用 www.hanlin.io

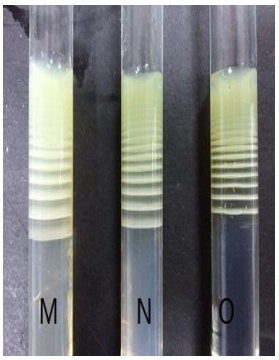


图 17　不同 pH 值下形成的 Liesegang 图案

(M: pH=8.5; N: pH=5.5; O: pH=2.5)

其次根据以前的研究成果[51]，Ca^{2+}与氨基的相互作用在 Liesegang 图案中起了关键性的作用。这种相互作用使得大部 Ca^{2+}被限制在明胶分子链的附近，$CaHPO_4$ 生成后不会立即沉淀，当超过一定浓度时才沉淀形成 $CaHPO_4$ 晶体种子，然后 $CaHPO_4$ 扩散吸附到种子上形成 Liesegang 图案，因此在制备 Liesegang 图案时 Ca^{2+}浓度很低，是 HPO_4^{2-}浓度的十分之一。增加 Ca^{2+}浓度会产生自由 Ca^{2+}，从而增加 Liesegang 图案的带宽，减少环的个数。因此，在碱性条件下， Ca^{2+}与氨基的相互作用受到 Ca^{2+}与 OH^-相互作用的竞争，HPO_4^{2-}介入后又导致 $CaHPO_4$ 与 $Ca_3(PO_4)_2$ 的溶度积竞争；而在酸性条件下，Ca^{2+}与氨基的相互作用虽然受到 H^+与氨基相互作用的竞争，但是 HPO_4^{2-}的介入会缓和这种竞争，并且 $CaHPO_4$ 在与 $Ca(H_2PO_4)_2$ 的溶度积竞争中占绝对优势。

从阻碍纳米微胶囊自由扩散的角度看，环带宽大具有优势。由于明胶等电点约为 pH 5，因此在以后的实验中不再调节明胶的 pH 值。

4.6.3 $[SDBS]_0$ 的影响

在前面一节讨论了 Ca^{2+}与 H^+或 OH^-的竞争关系，而事实上表面活性剂分子与明胶分子之间也存在的相互作用[52,53]。虽然表面活性剂分子与蛋白质分子的相互作用机理很复杂，尚未研究清楚，但是两者之间形成缔合物从而改变蛋白质性质的事实众所周知。因此，添加表面活性剂对明胶- $CaHPO_4$ 体系 Liesegang 图案形成产生何种影响是本研究首先要回答的问题。

图 18 展示了不同$[SDBS]_0$下制备的 Liesegang 图案。显而易见，$[SDBS]_0$对 Liesegang 图案的形成产生了巨大的影响。首先环的个数随着$[SDBS]_0$的升高而增加(图 18 A - E)，其次$[SDBS]_0$<16 mM，可以形成 Liesegang 图案，但是$[SDBS]_0$ ≥18 mM，得不到 Liesegang 图案，而是随着 HPO_4^{2-}向下扩散整个明胶体系慢慢变白(图 18 M)。数据化分析结果展示在图 19A），可以发现一个临界$[SDBS]_0$。当$[SDBS]_0$=14 mM 时 p 接近 1.12，但当$[SDBS]_0$= 15 mM 时，p 突然下降至 1.05，这暗示着$[SDBS]_0$的细微变动导致了环间距的剧烈变化。以此推理，如果图 18M 被视作环间距无限小，那么$[SDBS]_0$=18 mM 也可以视作一个临界浓度，因为随着扩散前沿的推移明胶体系慢慢变白，因此可以视为形成无数个环间距趋于 0 的环，即 p→1。总之，p 的减小意味着随$[SDBS]_0$的升高环间距减小。

图 19 B)显示了环的序数与环间距的关系。可以发现$[SDBS]_0$< 15 mM 时，环间距随环序数增加而增大，这符合正则 Liesegang 图案的空间规则。但是 $[SDBS]_0$= 15 和 16 mM 时，分别从 8th 和 7th 环开始，环间距几乎不变，也即形成了等距 Liesegang 图案，这是反则 Liesegang 图案。通过掺杂的方法制备反则 Liesegang 图案已经屡有报道[20-25]，但是通过调节

仅内部使用,严禁商用 www.hanlin.io

表面活性剂浓度的方式制备反则 Liesegang 图案尚未见任何报道。

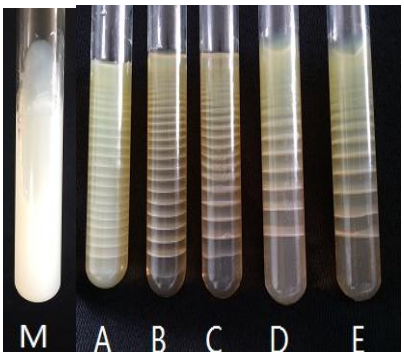
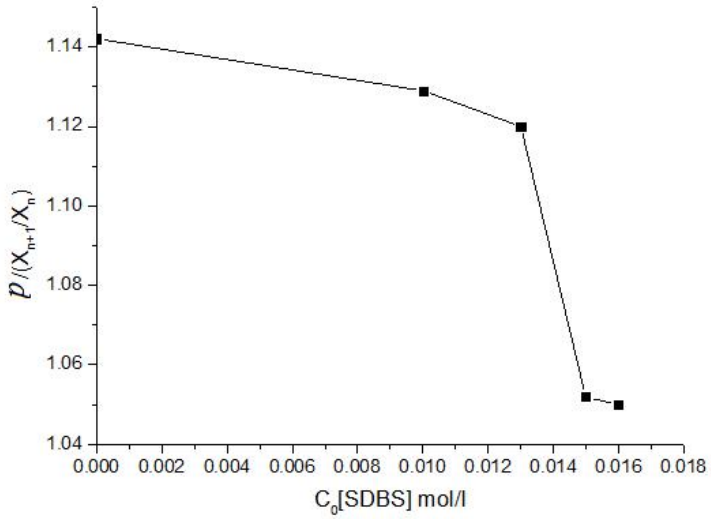


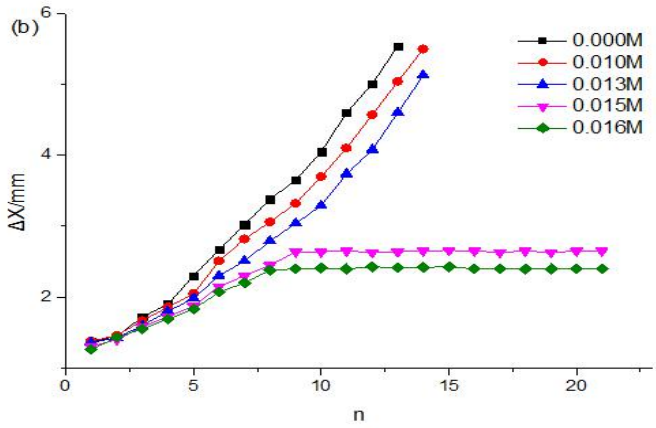
图 18　不同 $[SDBS]_0$ 下形成的 Liesegang 图案

A,$[SDBS]_0$= 16 mM; B, $[SDBS]_0$= 15 mM; C, $[SDBS]_0$= 14 mM; D, $[SDBS]_0$= 10 mM; E, $[SDBS]_0$=0; M, $[SDBS]_0$= 18 mM; ($[CaCl_2]_0$=0.050 M; $[Na_2HPO_4]_0$=0.50 M; $[gel]_0$=8%w/w; T=18℃, t= 7 days)



A)　"*p*" vs. $[SDBS]_0$

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用



B) 环序数与环间距的关系

图 19 $[SDBS]_0$ 对 Liesegang 图案的影响

SDBS 存在条件下 Liesegang 图案形成的时间规则展示在图 20。从图 20（黑线）可以看出，与 SDBS 无关，基本上遵从正则 Liesegang 图案形成的时间规则，$X^2_n \propto t_n$。但是 SDBS 存在条件下成环的速度明显快于没有 SDBS（图 20，红线），这个结果说明 SDBS 促进 Liesegang 图案的形成。按照表面活性剂-蛋白质相互作用模式[53]，浓度表面活性剂较高时自由表面活性剂分子与蛋白质相互作用形成缔合物，而胶束填充蛋白质分子间的空隙。因此除了钠离子和氯离子，明胶内部所有的物种均带负电，这使得 Ca^{2+}离子的自由扩散受到约束，而 HPO_4^{2-} 可以通过与 Cl^-交换的方式加速扩散。因此 SDBS 存在下不仅可以加速 Liesegang 图案的形成，而且形成的 Liesegang 图案带宽簿、环间距短。

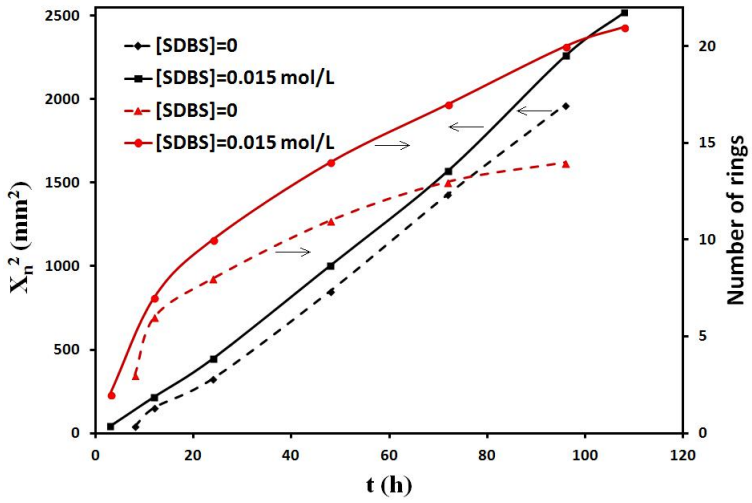


图 20 SDBS 存在条件下 Liesegang 图案形成的时间规则

4.6.4 外电解质磷酸氢钠浓度的影响

在$[SDBS]_0$ (16 mM)和$[CaCl_2]_0$ (0.05 M)恒定的条件下，外电解质$[Na_2HPO_4]_0$的变化给 Liesegang 图案带来的影响展示在图 21。可以发现增加$[Na_2HPO_4]_0$的效果与增加$[SDBS]_0$的效果很相似。环的个数随$[Na_2HPO_4]_0$的升高而增大（图 21 F-I），当$[Na_2HPO_4]_0$=0.50 M 时

仅内部使用,严禁商用 www.hanlin.io

出现反则 Liesegang 图案。当$[Na_2HPO_4]_0$>0.60 M 时，得到的不是 Liesegang 图案，而是整个明胶体系变白。图 22 描述了环序数与环间距的关系。当$[Na_2HPO_4]_0$<0.50 M 时得到正则 Liesegang 图案。当$[Na_2HPO_4]_0$=0.50 M 时 7th 环之前仍然是正则 Liesegang 图案，但从 7th 环开始出现等距 Liesegang 图案，ΔXn=2.65 mm。$[Na_2HPO_4]_0$=0.60 M 时等距 Liesegang 图案从 6th 环开始，且ΔXn=2.27 mm。这个结果说明对于 Liesegang 图案的形成来说升高$[SDBS]_0$与升高$[Na_2HPO_4]_0$是等效的。其原因在上一节讨论过，添加 SDBS 可以促进HPO_4^{2-}的扩散，升高$[Na_2HPO_4]_0$同样促进了HPO_4^{2-}的扩散。

图 21 不同外电解质浓度制备的 Liesegang 图案

F, $[Na_2HPO_4]$=0.60 M; G, $[Na_2HPO_4]$=0.50 M; H, $[Na_2HPO_4]$=0.30 M; I, $[Na_2HPO_4]$=0.20 M. ($[CaCl_2]_0$=0.05 M; $[SDBS]_0$=16 mM; [gel]=8% w/w. T=18℃, t=7 days).

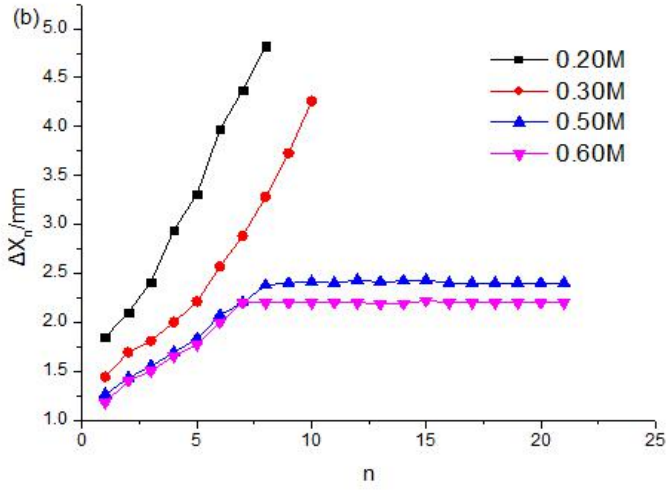


图 22 不同外电解质浓度下环间距ΔX_n与 环序数的关系

($[CaCl_2]_0$=0.05 M; $[SDBS]_0$=16 mM; [gel]=8% w/w. T=18℃, t=7 days).

4.6.5 内电解质氯化钙浓度的影响

图 23，24 反映了内电解质 $[CaCl_2]_0$的变动给 Liesegang 图案带来的影响。从图 23 可以看出升高$[CaCl_2]_0$也可以增加环的个数，但是增加$[SDBS]_0$和$[Na_2HPO_4]_0$不同。当$[CaCl_2]_0$=0.05 M 时，环的个数达到一个极大值(图 23 K)，此后再增加$[CaCl_2]_0$环的个数反而减少，并且不像增加$[SDBS]_0$和$[Na_2HPO_4]_0$那样出现整个明胶变白的现象，相反如图 23 L 所示，环的个数减少，但带宽变大，体系变得清澈。环间距ΔXn 与环序数的关系与前面讨论

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

的也不相同。如图 24 所示，$[CaCl_2]_0$=0.05 M 时出现等距 Liesegang 图案，但当$[CaCl_2]_0$= 0.10 M 时，虽然同样形成反则 Liesegang 图案，但是环间距与环序数变得非常复杂。

这些结果支持前几节的结论，即过多的自由钙离子可以增加带宽，HPO_4^{2-}的扩散支配了 Liesegang 图案的形成过程。

图 23　不同内电解质浓度形成的 Liesegang 图案

J, $[CaCl_2]_0$=0.03 M; K, $[CaCl_2]_0$=0.05 M; L, $[CaCl_2]_0$= 0.10 M.

($[Na_2HPO_4]_0$=0.50 M; $[SDBS]_0$=16 mM ; [gel]=8 wt%. T=18℃.)

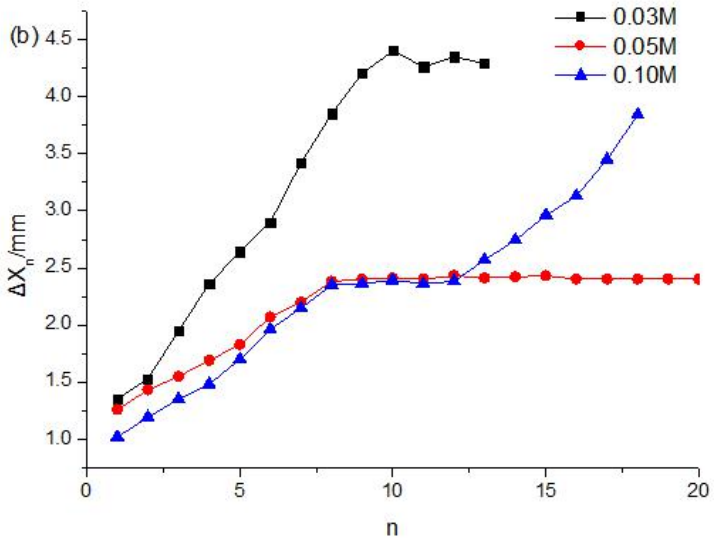


图 24 不同内电解质浓度$[CaCl_2]_0$下环间距ΔX_n 与环序数的关系

4.6.6 消除上层无序部分的方法

仔细观察前面的 Liesegang 图案，发现所有的 Liesegang 图案上层，即明胶与磷酸氢钠溶液的接触层，都是浑浊的。这是 Liesegang 图案的自然现象，因为两者的接触层 Ca^{2+}和 HPO_4^{2-} 的浓度都非常高，因而反应和沉淀很快发生，产生无序的晶体沉淀层。沉淀层对于制备多脉冲药物释放系统会产生不良影响。

为消除沉淀层，根据离子扩散的原理，采用了介入法，即将一片空白明胶（约 10mm）预先放置在明胶体系的顶部，然后再加磷酸氢钠溶液。空白明胶指的是无交联，不含任何盐和表面活性剂的明胶。如图 25 所示，一个完整的 Liesegang 图案呈现出来。由于空白明胶

仅内部使用,严禁商用 www.hanlin.io

中没有离子，因此 Ca^{2+}和 HPO_4^{2-}各自向内自由扩散，在扩散界面相遇反应沉淀，形成环。图 25 显示两个等距环出现在空白明胶的底部，这个结果反映了 HPO_4^{2-}的扩散速度比 Ca^{2+}的扩散速度大得多，与前面的解释相一致。另外在 Liesegang 图案的形成过程中，成环的空白明胶部分被保存了下来，而其余部分逐步溶解于 Na_2HPO_4 溶液中，这说明 $CaHPO_4$ 晶体沉淀带可以有效地抑制明胶分子的运动，与利用沉淀带阻碍纳米微胶囊扩散的期望相一致。

图 25　整体等距的 Liesegang 图案

（$[Na_2HPO_4]_0$=0.50 M; $[CaCl_2]_0$=0.05 M; $[SDBS]_0$=16 mM; [gel]=8%. T=18℃）

4.7 酶解实验

用胆固醇/SDBS 纳米微胶囊取代 SDBS 制备 Liesegang 图案没有发现两种 Liesegang 图案的差异，也即 SDBS 与胆固醇/SDBS 纳米微胶囊可以互换。一个可能的原因是实验用的 SDBS 浓度很高（16 mM），是其 CMC（5 mM）的三倍，在明胶中大多数 SDBS 都是以胶束的形式存在的。尽管 SDBS 胶束（5 nm）比胆固醇/SDBS 纳米微胶囊（65 nm）小得多，但是由于胶束和纳米微胶囊只是填充明胶中的自由空间，因此对 Liesegang 图案的形成影响不大。

4.7.1 非图案化明胶的酶解动力学

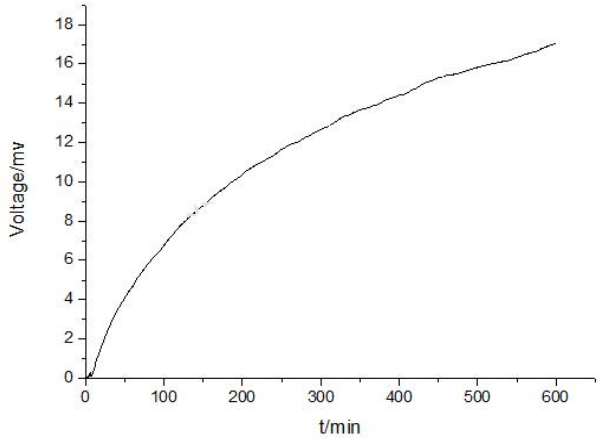


图 26 非图案化明胶在胰蛋白酶催化作用下的酶解动力学

图 26 展示了明胶与胆固醇/SDBS 纳米微胶囊混合物的酶解时间曲线。从图可以看出，

仅内部使用，严禁商用 www.hanlin.io

胆固醇/SDBS 纳米微胶囊在酶解液中的浓度随时间变化是一根平滑的上升曲线，这说明酶解过程中胆固醇的释放是连续性的。

4.7.2 Liesegang 图案化明胶的酶解动力学

图 27 B 展示了在胰蛋白酶催化作用下一个 Liesegang 图案化的明胶酶解过程中胆固醇/SDBS 纳米微胶囊在酶解液中浓度随时间的变化曲线。在图 27 中放入图 25 的图像，即图 27A，以此来说明所用 Liesegang 图案的形成条件。比较图 27 B 与图 26 的纵坐标，首先可以看出图 27 B 的胆固醇释放速度明显低于图 26，其次胆固醇的浓度随时间呈阶梯状上升。与期望相一致，这个结果说明了 $CaHPO_4$ 确实起到了阻碍明胶酶解和胆固醇/SDBS 纳米微胶囊自由扩散的作用。含胆固醇/SDBS 纳米微胶囊的明胶被 $CaHPO_4$ 晶体沉淀带分割成大小近似相等的块，由于 $CaHPO_4$ 晶体颗粒的空间排挤作用，$CaHPO_4$ 晶体沉淀带中明胶分子和胆固醇/SDBS 纳米微胶囊大部分被排挤到明胶块中。因此，胆固醇/SDBS 纳米微胶囊随着明胶块的酶解而扩散到酶解液中；明胶块酶解完以后，由于失去了明胶块的支撑，$CaHPO_4$ 晶体带开始垮塌，这时酶解和胆固醇/SDBS 纳米微胶囊的扩散被暂停，形成了图 27 B 曲线上的一个平台。由于酶解液体积很大，因此垮塌后的 $CaHPO_4$ 晶体会逐渐溶解。如此重复，形成了胆固醇的脉冲释放。

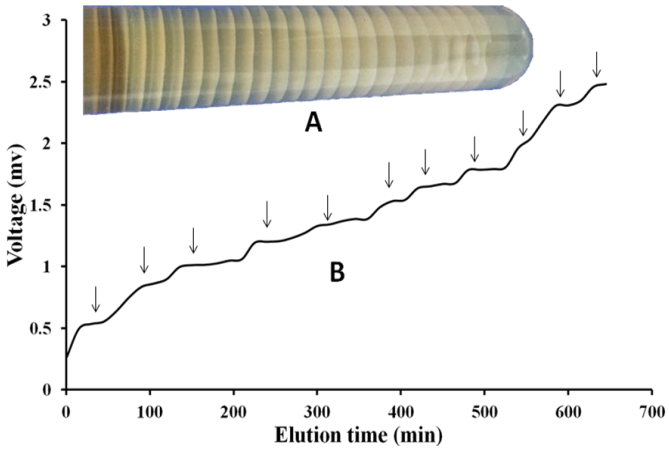


图 27　含胆固醇/SDBS 纳米微胶囊的 Liesegang 图案化明胶的酶解

（A，显示形成条件的图；B，胆固醇/SDBS 浓度随时间变化曲线）

需要指出的是，尽管得到了多脉冲释放曲线，但是还有很多工作要做。例如如何控制环间距、如何保证环的完整性等。鉴于时间和观测手段的限制，我们甚至尚不能明确带宽与平台时间的关联。

5. 结论

本文提出了一个全新的制备多脉冲药物释放系统的策略和方法，即利用 Liesegang 图案中无机盐晶体沉淀带对药物扩散和基质分解的阻隔作用实现多脉冲药物释放。为此选用了生物相容性和降解性俱佳的明胶/ CaHPO4 Liesegang 图案形成体系作为研究对象，以油溶性药物胆固醇作为释放对象，研究和讨论了实现多脉冲释放所遇到的各种问题，得到的具体结果

仅内部使用，严禁商用 www.hanlin.io

如下：

(1) 采用勃氏粘度测试仪对影响明胶粘度的诸因素，如明胶浓度，pH 值以及三种表面活性剂（SDS，SDBS 和 HTMAB），进行了评估，结合 DSC 对明胶热学性能的研究结果，确立了制备明胶/ $CaHPO_4$ Liesegang 图案的最佳条件：明胶浓度 8 wt%，pH 5，选用 SDBS 作为微胶囊化包覆材料。

(2) 为了将油溶性胆固醇分散进入明胶水溶液中，采用乳化-溶剂蒸发的微胶囊化技术，以氯仿为溶剂，十二烷基苯磺酸钠（SDBS）为包覆材料，成功地制备了胆固醇/SDBS 纳米微胶囊乳液。经 DLS 测试，纳米微胶囊数均粒径为 65nm，粒径是单分散分布。以胆固醇/SDBS 纳米微胶囊乳液为溶液制备了稳定且透明的明胶凝胶。

(3) 研究发现 SDBS 浓度对明胶/ $CaHPO_4$ Liesegang 图案的形成影响很大。Liesegang 图案的环个数随着$[SDBS]_0$的升高而增多，环间距和带宽却减小。$[SDBS]_0$=15 mM 时环个数达到最大值 23。当$[SDBS]_0 \geq 18$ mM 时，Liesegang 不再形成，明胶体系随着 HPO_4^{2-}的扩散逐渐全部变白。最重要的是$[SDBS]_0$=15 mM 是个转折浓度，低于这个浓度，形成正则 Liesegang 图案，等于或超过该浓度，形成反则 Liesegang 图案。反则 Liesegang 图案表现为从第 7 个环开始，以后的所有环间距都相等。因此，通过调节$[SDBS]_0$制备等距 Liesegang 图案的技术是本文的发明。

(4) 外电解质$[Na_2HPO_4]_0$和内电解质$[CaCl_2]_0$对 Liesegang 图案的形成影响也很大。其中$[Na_2HPO_4]_0$变动给 Liesegang 图案带来的影响与$[SDBS]_0$的影响非常相似。$[Na_2HPO_4]_0$= 0.50 M 为转折浓度，低于该浓度，形成正则 Liesegang 图案；反之，形成等距 Liesegang 图案。$[CaCl_2]_0$的影响则不同，过多的 Ca^{2+}会导致环个数减少，带宽增大。这些结果表明 HPO_4^{2-}的扩散速度主导了明胶/$CaHPO_4$ Liesegang 图案的形成过程。

(5) 在$[SDBS]_0$相同的情况下，用胆固醇/SDBS 纳米微胶囊乳液取代 SDBS 乳液不影响上述研究结果，因为本论文中所采用的 SDBS 浓度远高于其临界胶束浓度（CMC），而胶束和纳米微胶囊在明胶中的作用主要是填充明胶的自由空间。

(6) 采用空白明胶介入法可以有效地消除明胶体系与外电解质液接触面的无序晶体沉淀的浑浊层，从而得到整体等距的明胶/ $CaHPO_4$ Liesegang 图案。

(7) 利用胰蛋白酶的催化作用，对含胆固醇/SDBS 纳米微胶囊且 Liesegang 图案化的明胶进行酶解，得到胆固醇/SDBS 纳米微胶囊浓度随酶解时间呈阶梯状上升的曲线。证明本文提出的方案是可行的。

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

参考文献：

[1] R. E. Liesegang, Ueber einige Eigenschaften von Gallerten, *Naturwissenschaftliche Wochenschrift,* 1896, 11(30), 353-362.

[2] C.J. Campbell, R. Klajn, M. Fialkowski, B. A. Grzybowski, One-step multilevel microfabraction by reaction - diffusion, *Langmuir,* 2005, 21, 418-423.

[3] E.S. Hedges *Ed*: *Liesegang Rings and Other Periodic Structure*, London, 1932.

[4] S. Thompson, P.D. Shipman, Patterns, oscillations, and microtornadoes: Extreme events in vapor-to-particle reaction zones, *Procedia IUTAM*, 2013, 9,138-164.

[5] K. Narita, K. Matsumoto, M. Igawa, Application of Liesegang Ring Formation on a Gelatin Film to the Determination of Sulfate Concentration in Individual Rain Droplets, *Anal. Sci.,* 2006, **22**, 1559.

[6] K.J. Diana, K.V. George, Urinary stone formation: Efficacy of seed extract of Ensete superbum (Roxb.) Cheesman on growth inhibition of calcium hydrogen phosphate dihydrate crystals, *J. Cryst. Growth*, 2013, 363, 164-170.

[7] R.M. Walliser, F. Boudoire, E. Orosz, R. Tóth, A. Braun, E. C. Constable, Z. Rácz, I. Lagzi, Growth of Nanoparticles and Microparticles by Controlled Reaction Diffusion Processes, *Langmuir*, 2015, 31, 1828−1834.

[8] P. Hantz, Pattern formation in a new class of precipitation reactions, Doctoral thesis, No 3747, University of Geneva, 2006.

[9] J.X. Jiang, K. Sakurai, Formation of Ultrathin Liesegang Patterns, *Langmuir,* 2016, 32, 9126−9134.

[10] Z.-Q. Lin, S. Granick, Patterns Formed by Droplet Evaporation from a Restricted Geometry, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 2816.

[11] T. Higuchi, K. Motoyoshi, H. Sugimori, H. Jinnai, H. Yobu, M. Shimamura, Phase transition and phase transformation in block copolymer nanoparticles, *Macromol. Rapid Commun.* 2010, 31, 1773–1778.

[12] W. Ostwald, Studies on the formation and inversion of solids. First paper: Supersaturation and supercooling, *Zeitschrift fur physikalische chemie-international*, 1897, 22, 289-330.

[13] M. Flicker, J. Ross, Mechanism of chemical instability for periodic precipitation Phenomena. *J. Chem. Phys.*, 1974, 60(9), 3458-3465.

[14] K. H. Stern, The Liesegang Phenomenon, *Chem. Rev.*, 1954, 54(1), 79-99.

[15] C.K. Jablczynski, Memoires presentes à la société chimique. Les anneaux de Liesegang. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1923, 33:1592-1602.

[16] H.W. Morse, G. W. Pierce Diffusion and super-saturation in gelatin. *J Phys. Rev. (Series I)*, 1903, 17(3), 129.

[17] K.M. Pillai, V.K.Vaidyan, M. A. Ittyachan, On the theory of Liesegang phenomena, *Colloid Polym. Sci.*,1980,258(7):831-838.

[18] S.C. Muller, S. Kai, J. Ross, Periodic Precipitation Patterns in the Presence of Concentration Gradients. 1. Dependence on Ion Product and Concentration Difference, *J. Phys. Chem.*, 1982, 86(20), 4078-4087.

[19] R. Matalon, A.Packter, The Liesegang Phenomenon. I. Sol protection and diffusion, *Colloid*

仅内部使用,严禁商用 www.hanlin.io

Sci., 1955, 10(1), 46-62.

[20] N. Kannith, F. D. Gnanam, P. Ramasamy, et al. Revert and direct type Liesegang phenomenon of silver iodide, *J Colloid Interf. Sci.*, 1981, 80(20), 369-376.

[21] P. B. Mathur, S. Ghost, Liesegang rings-Part I, *Kolloid-Zeitschrift*, 1958, 159(2), 143-146.

[22] T. Karam, H. El-Rassy, R. Sultan, Mechanism of revert spacing in a $PbCrO_4$ Liesegang system, *J. Phys. Chem. A*, 2011, 115(14), 2994-2998.

[23] L. Kalash, H. Farah, A. Z. Eddin, R. Sultan, Dynamical profiles of the reactive components in direct and revert Liesegang patterns, *Chem. Phys. Lett.* 2013, 590: 69–73.

[24] L.Jahnke, J.W.Kantelhardt, Equidistant band formation of precipitation in a reaction-diffusion process, *New J. Phys.*, 2010, 12(2), 023009.

[25] F.J. Molnar, F. Izsak, I. Lagzi, Design of equidistant and revert type precipitation patterns in reaction-diffusion systems, *J. Phys. Chem.,* 2008, 10(17), 2368-2373.

[26] B.Q. Li, Y.S. Gao, X. Li, Y.J. Feng, Y. Zhou, Chitosan hydrogels with 3D Liesegang ring structure for rifampicin release, *J. Contr. Release*, 2011,152, e47-e49.

[27] T. Narita, M.Tokita, Liesegang pattern formation in κ-carrageenan gel, *Langmuir*, 2006, 22(1), 349-352.

[28] A. M Lowman and N. A. Peppas, in : *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, E. Mathiowtz (Ed.), Vol. 1, Wiley , New York (1999).

[29] S. Ohdo, Chrono-therapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption, *Adv. Drug Del. Rev.* 2010, 62, 859–875.

[30] S. Ohdo, Changes in toxicity and effectiveness with timing of drug administration. Implications for drug safety, *Drug Safety* 2003, 26(14): 999–1010.

[31] S. Ohdo, Chronopharmaceutics: pharmaceutics focused on biological rhythm, *Biol. Pharm. Bull.* 2010, 33 (2): 159–167.

[32] S. Ohdo, Chronopharmacology focused on biological clock, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2007, 22 (1): 3–14.

[33] F. Halberg, G. Cornelissen, G. Katinas, D. Hillman and O. Schwartzkopff. *Neuroendocrinol. Lett.* 2001, 22, 53.

[34] R.Y. Moore, V.B. Eichler, Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat, *Brain Res.* 1972, 42, 201–206.

[35] G. Brabant, K. Prank, C. Schofl, Pulsatile patterns in hormone secretion, *Trends Endocrinol. Metab.* 1992, 3, 183-190.

[36] L. Cojocaru, Z. Agur, A theoretical analysis of interval drug dosing for cell-cycle-ase-specific drugs, *Math. Biosci.* 1992, 109, 85-97.

[37] U. Thadhani, Role of nitrates in angina pectoris, *Am. J. Cardiol.* 1992, 70. 43B–53B.

[38] B. Lemmer, Circadian rhythms and drug delivery, *J. Control. Release,* 1991, 16, 63–74.

[39] B.-B.C. Youan, Chronopharmaceutics: Chronopharmaceutical drug delivery systems: Hurdles, hype or hope, *Adv. Drug. Del. Rev.* 2010, 62: 898–903.

[40] S. Abdul, S. S. Poddar, A flexible technology for modified release of drugs: multi layered tablets*, J. Control. Rel.* 2004, **97(3)**, 393-405.

[41] S. Abdul, A. V. Chandewar, S. B. Jaiswa, A flexible technology for modified-release drugs: Multiple-unit pellet system (MUPS), *J. Control. Rel.* 2010, 147: 2–16.

[42] J. T. Jr Santini, M. J. Cima, R. Langer, *Nature* 1999, 397, 335–338.

[43] A.C.R. Grayson, I.S. Choi, B.M. Tyler, P.P. Wang, H.Y. Brem, M.J. Cima, R. Langer, *Nature*

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

Mater, 2003, 2, 213.

[44] A. Gopferich, Bioerodible implants with programmable drug release, *J. Control. Release*, 1997, 44, 271–281.

[45] P. Arunothayanun, T. Sooksawate, A. Florence, Extrusion of niosomes from capillaries: approaches to a pulsed delivery device, *J. Control. Release,* 1999, 60, 391–397.

[46] I.C. Kwon, Y.H. Bae, S.W. Kim, Electrically erodible polymer gel for controlled release of drugs, *Nature,* 1991, 354, 291–293.

[47] E.R. Edelman, J. Kost, H. Bobeck, R. Langer, Regulation of drug release from polymer matrices by oscillating magnetic fields, *J. Biomed. Mater. Res.* 1985, 19, 67–83.

[48] Y. Ly, Y.-L. Cheng, Electrically-modulated variable permeability liquid crystalline polymeric membrane, *J. Membr. Sci.* 1993, 77, 99–112.

[49] J. Kost, K. Leong, R. Langer, Ultrasound-enhanced polymer degradation and release of incorporated substances, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989, 86, 7663–7666.

[50] G.P. Misra, R.A. Siegel, Multipulse drug permeation across a membrane driven by a chemical pH-oscillator, J. Control. Rel. 2002, 79, 293-297.

[51] H. Zhang, K. Zhan, Y.L. Chen, G.X. Chen, X.M. Zhou, J.X. Liu, M. Wu, H.M. Ni. Three dimension Liesegang rings of calcium hydrogen phosphate in gelatin. *J Sol-Gel Technol*. 2014, 71:597-605.

[52] R. Miller, V.B. Fainerman, A.V. Makievski, J. Kragel, D.O. Grigoriev, V.N. Kazakov, O.V. Sinyachenko, Dynamics of protein and mixed protein/surfactant adsorption layers at the water/fluid interface, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2000, 86, 39-82.

[53] D. Muller, M. Malmsten, B. Bergenståhl, J. Hessing, J. Olijve, F. Mori, Competitive Adsorption of Gelatin and Sodium Dodecyl benzene sulfonate at Hydrophobic Surfaces, *Langmuir,* 1998, 14, 3107-3114.

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

致谢

本论文的研究方案、实验场所、材料和化学试剂均为东南大学化学化工学院倪恨美教授提供，除此之外，倪教授还提供了各种大型仪器测试方面的便利。南京外国语学校一级教师陈静老师参与了研究方案和研究结果的讨论，并给出了许多宝贵的意见。倪教授实验室的硕士研究生时凯和周金慧给予了大型仪器测试预约及操作方法、实验室安全以及实验操作等诸多方面的指导。最后，本论文写作过程中也得到了倪教授和陈静老师的悉心指导和修改。在此，我们表示衷心的感谢！

本论文由三名作者共同完成，其中嵇杰负责 **Liesegang** 环的制备、相关文献的检索和阅读以及相关论文部分的撰写；高彤负责药物缓释部分的实验工作、相关文献的检索和阅读，以及相关论文部分的撰写；谢佩蓉负责明胶物性以及各种成分影响的实验工作以及相关论文部分的撰写。

www.hanlin.io 仅内部使用,严禁商用

原创性声明

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处，本人愿意承担一切相关责任。

参赛队员： 嵇杰、高彤、谢佩蓉　　指导老师：陈静、倪恨美

2017 年 9 月 15 日