

O-季铵化-*N*, *N*-双十二烷基壳聚糖/胆固醇 的混合单分子膜性质研究*

明如镜 辛梅华 李明春 刘决照

(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 厦门 361021)

摘要 制备*O*-季铵化-*N*,*N*-双十二烷基壳聚糖,用 FTIR、EA、¹H NMR 对其进行表征,并研究其与胆固醇的混合单分子膜性质。结果表明,随着胆固醇的摩尔分数从 0.2 增加到 0.8,*O*-季铵化-*N*,*N*-双十二烷基壳聚糖/胆固醇混合单分子膜的极限分子占据面积 A_{ex} 及崩溃压 π_c 逐渐减小。混合单分子膜两组分子间的作用力从相互吸引作用转变为相互排斥作用的转折点出现在胆固醇的摩尔分数为 0.4 时。胆固醇的摩尔分数为 0.2 时,混合单分子膜的相容性最好,体系最稳定。

关键词 有机高分子材料,壳聚糖衍生物,胆固醇,单分子膜

分类号 O636

文章编号 1005-3093(2010)03-0254-05

Mixed Monolayers of *O*-Quaternized -*N*, *N*-Dilauryl Chitosan with Cholesterol

MING Rujing XIN Meihua LI Mingchun** LIU Juezhao

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, The Key Laboratory for Functional Materials of Fujian Higher Education, Xiamen 361021)

* Supported by National Natural Science Foundation of China No.20274013 and No.20574024, the Key Science Projects of Fujian Province No.2002I004 and No.2009H0030, the Natural Science Foundation of Fujian Province No.E0810019 and No.2009J01029, and the Open Topics of the Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Ministry of Education, Fudan University.

Manuscript received December 7, 2009; in revised form March 30, 2010.

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

ABSTRACT *O*-quaternized-*N*,*N*-dilauryl chitosan was prepared and characterized by FTIR, EA and ¹H NMR. The behaviors of mixed monolayers of *O*-quaternized-*N*,*N*-dilauryl chitosan and cholesterol were studied. It showed that the limiting molecular area A_{ex} and collapse pressure π_c of mixed monolayers gradually decreased as the cholesterol molar ratio increased from 0.2 to 0.8. The values of ΔG_{exc} changed from an attractive interaction to a repulsive interaction between *O*-quaternized-*N*,*N*-dilauryl chitosan and cholesterol with a critical point of cholesterol molar ratio 0.4 added in the mixed system, and the most stable state of mixed monolayers was observed at molar ratio of cholesterol 0.2.

KEY WORDS organic polymer materials, chitosan derivative, cholesterol, monolayer

Langmuir 膜是在气液界面形成的单层分子膜,这种结构排列较为有序,在一定程度上可以看作是生物膜的一种模拟^[1]。通过对 Langmuir 膜 π -A 等温线的研究可以获得单分子膜的极限分子占据面积、崩

溃压、可压缩性等信息,它们能反映分子的成膜性质,给出混合膜中组分间相互作用等微观信息,为成膜分子的进一步应用提供依据^[2]。

近年来,壳聚糖及其衍生物在生物材料方面的应用显示出了广阔的应用前景^[3]。胆固醇是生物体内天然存在的生理活性物质,是构成细胞膜的重要组成部分。壳聚糖与胆固醇单分子膜之间的相互作用已有文献报道^[4]。Hilda Parra-Barraza 等^[5]以水溶性壳聚糖为亚相制备了胆固醇单分子膜,研究表明胆固醇可以在该亚相上形成稳定的单分子膜,壳聚糖与胆固

* 国家自然科学基金 20274013 和 20574024、福建省重大科技项目 2002I004 和 2009H0030、福建省自然科学基金 E0810019 和 2009J01029 及复旦大学聚合物分子工程教育部重点实验室开放课题。

2009 年 12 月 7 日收到初稿;2010 年 3 月 30 日收到修改稿。

本文联系人:李明春,教授,博士生导师

醇之间形成了较强的氢键作用。Pawel Wydro 等^[6]研究结果也表明了以壳聚糖为亚相时, 改变壳聚糖的含量和种类, 可以显著影响胆固醇单分子膜性质。上述报道都局限在以壳聚糖水溶液为亚相的基础上研究壳聚糖对胆固醇单分子膜性质的影响, 这是由于壳聚糖不溶于一般有机溶剂, 不能选用氯仿等常用溶剂制备单分子膜。本课题组通过对壳聚糖的疏水改性, 成功制备了一系列溶于氯仿的 *N,N*-双烷基化壳聚糖并对它们的单分子膜性质进行了研究^[7,8]。本文进一步制备了双亲性更为平衡的 *O*-季铵化 -*N,N*-双十二烷基壳聚糖, 并研究添加胆固醇对 *O*-季铵化 -*N,N*-双十二烷基壳聚糖单分子膜性质的影响, 为进一步研究 *O*-季铵化 -*N,N*-双十二烷基壳聚糖的自组装性质提供依据。

1 实验方法

1.1 主要仪器及试剂

JML04S 型双驱动膜天平, 上海中晨数字技术设备有限公司; Milli-Q Gradient 纯化系统, 美国 Millipore 公司; NEXUSU 470 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司; Vario MICRO 元素分析仪, 德国 Elementar 公司; UNITY-500 核磁共振仪 (CDCl_3 为溶剂)。

壳聚糖 (CS , $\overline{M}_w=1 \times 10^5$, $\text{DD}=95.6\%$), 山东海得贝海洋生物工程有限公司; 苯甲醛, 上海化学试剂公司; 3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵, 实验室自制^[9]; 月桂醛 (Alfa Aesar); 十二烷基磺酸钠、硼氢化钠、胆固醇, 上海化学试剂公司; 其它试剂均为市售分析纯。

1.2 *O*-季铵化 -*N,N*-双十二烷基壳聚糖的制备

参照文献方法^[9], 主要制备过程如下: 2.0 g CS 分散于 50% 甲醇 - 水溶液中, 将 7.9 g 苯甲醛溶于 20 mL 甲醇后滴加到上述溶液中, 在 $\text{pH}=4.8$ 下, 50°C 反应 4 h, 抽滤, 洗涤, 得 *N*-苯亚甲基壳聚糖 [CS(BA)]。2.0 g CS(BA) 溶于 100 mL 甲醇, 以 $m_{\text{NaOH}}/m_{\text{CS(BA)}}=2.0$ 的比例加入 NaOH 溶液, 低温碱化过夜, $-\text{OH}$ 得到充分活化后, 50°C 时缓慢滴加含 9 g CTA 的甲醇溶液, 反应 8 h, 得 *O*-季铵化 -*N*-苯亚甲基壳聚糖 [QACS(BA)]。2.0 g QACS(BA) 溶于 0.5 mol/L 的盐酸/乙醇溶液, 反应 24 h, 抽滤, 用乙醇多次洗涤, 得 *O*-季铵化壳聚糖 [QACS]。2.0 g QACS 溶于 60 mL 水溶液, 调节 pH 为 4.5, 加入月桂醛和 SDS, 98°C 反应 8 h, NaBH_4 还原至 $\text{pH} \geq 13$ 。重复以上步骤, 进行第二次反应和还原。产物用热丙酮和热水洗涤至中性, 丙酮索氏提取 48 h 以上至索提液无色, 干燥, 用氯仿萃取得 *O*-季铵化 -*N,N*-双十二烷基壳聚糖 [QADCS]。制备路线如图 1 所示。

1.3 QADCS/胆固醇混合单分子膜 π -*A* 等温线测定

将 *O*-季铵化 -*N,N*-双十二烷基壳聚糖和胆固醇分别配成 10^{-6} mol/L 的氯仿溶液, 将它们按胆固醇所占摩尔分数为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1 充分混合。然后用微量进样器取 30 μL 混合溶液铺展在亚相上, 亚相为 Milli-Q Gradient 纯化系统纯化的二次水。待氯仿溶液在亚相表面上铺展并挥发约 30 min 后进行压膜, 记录 π -*A* 等温线, 压膜速率为 20 mm/min, 温度 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

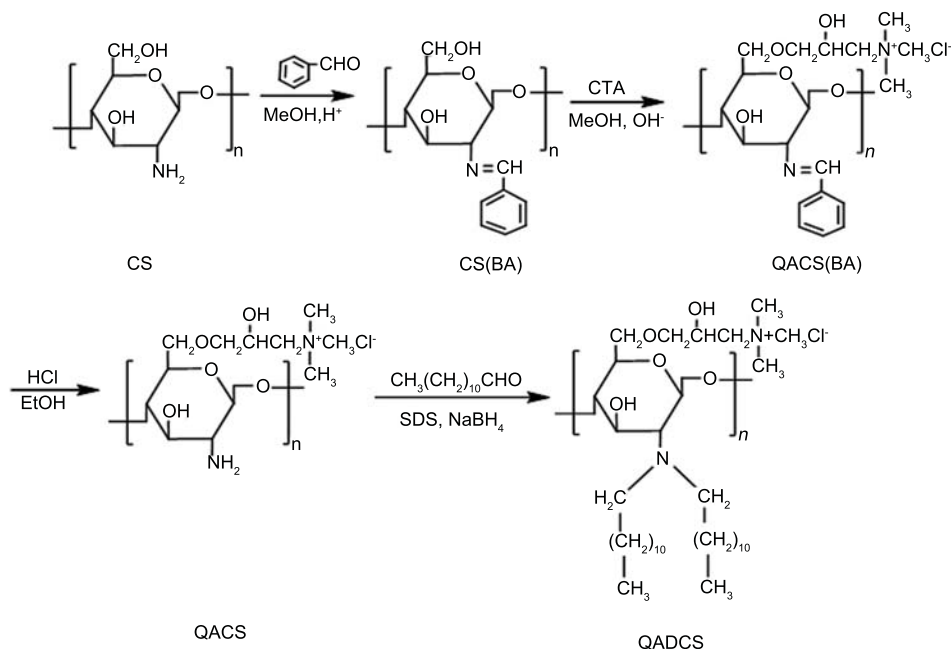


图 1 *O*-季铵化 -*N,N*-双十二烷基壳聚糖的合成路线

Fig.1 Synthesis route of *O*-quaternized -*N,N*-dilauryl chitosan

2 结果与讨论

2.1 产物的结构表征

2.1.1 产物的红外光谱分析 各中间产物及最终产品的红外光谱图见图 2。与 CS 谱线相比, a 和 b 谱线在 693 cm^{-1} 、 757 cm^{-1} 处出现的新峰为苯环单取代的双吸收峰, 1581 cm^{-1} 的新峰为苯环 C-C 骨架吸收峰, 1641 cm^{-1} 处的吸收峰强度增大并且发生红移, 为 C=N 伸缩振动峰与酰胺 I 谱带吸收峰重叠所致, 这说明苯甲醛与壳聚糖形成了西佛碱。b 和 c 谱线在 1481 cm^{-1} 出现的吸收峰是季铵盐中 CH_3 、 CH_2 的 C-H 弯曲振动峰, c 和 d 谱线在 1639 cm^{-1} 出现的吸收峰是季铵盐的反对称伸缩振动峰, 说明了季铵盐基团的引入^[10]。d 谱线在 2920 cm^{-1} 、 2850 cm^{-1} 出现的吸收峰为 CH_3 、 CH_2 的 C-H 伸缩振动峰, 与 CS 在此处的吸收峰相比明显增强, 同时 721 cm^{-1} 处出现 $n \geq 4$ 的 $(\text{CH}_2)_n$ 基团的骨架振动峰, 说明烷基长链已接到壳聚糖上。

2.1.2 QADCS 的 ^1H NMR 分析 图 3 为 QADCS 的 ^1H NMR 谱图, 其中化学位移 $\delta=3.5\text{--}4.5$ 处的峰为壳聚糖分子骨架质子吸收峰; $\delta=3.299$ 的吸收峰与季铵盐氮上的三个甲基质子相对应; $\delta=0.88$ 和 $\delta=1.25$ 附近出现 2 个尖峰, 分别对应于 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-$ 的质子峰, 并且 CH_2 的峰面积明显大于 $-\text{CH}_3$ 的峰面积, 说明有脂肪长链的存在。而其余 $\delta=2.054$ 与壳聚糖中可能残留的少量乙酰基质子对应。结合红外光谱分析结果, 说明产物为 O-季铵化-N,N-双烷基壳聚糖。

2.1.3 合成的产物的元素分析 合成产物的元素分析结果见表 1, 由 C/N 计算^[11] 得到各产物的取代度为: N-苯亚甲基壳聚糖取代度为 0.80, 在此基础上的季铵化取代度为 0.44, 最终烷基化的取代度是 1.87。

2.2 QADCS/胆固醇混合单分子膜的性质

2.2.1 QADCS/胆固醇混合单分子膜的 π -A 等温线 QADCS/胆固醇 (Cholesterol, CH) 混合单分子膜的 π -A 等温线如图 4 所示, 胆固醇的崩溃压为 44.7 mN/m , 由外推法得到的分子极限面积 A_{ex} 为 0.52 nm^2 , 与其它文献所得结果基本一致^[5]。不同摩尔比的 QADCS/胆固醇的混合单分子膜的 π -A 等

温线与单组分的 QADCS 和胆固醇的 π -A 等温线相比有较大不同。其中, 单组分胆固醇的 π -A 等温线最为陡直, A_{ex} 最小, 表明其分子排列最为紧密。随着 X_{CH} 从 0.2 逐渐增加到 0.8, QADCS/胆固醇混合分子膜的崩溃压 π_c 和极限分子占据面积 A_{ex} 均减小, 说明 QADCS 与胆固醇分子间存在着相互作用。

为进一步研究混合单分子膜的成膜性能, 对混合单分子膜的 π -A 等温线作一次微分, 再乘以分子平均占据面积 A , 得到单分子膜的压缩模量 (Compressibility modulus, C_s^{-1})

$$C_s^{-1} = -A \frac{d\pi}{dA}$$

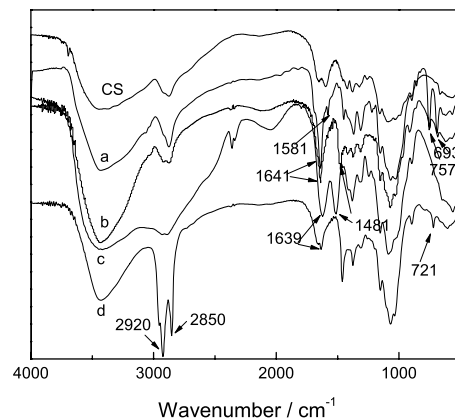


图 2 合成产物的 FTIR 图

Fig.2 FTIR spectra of the modified chitosan. (a) CS(BA); (b) QACS(BA); (c) QACS; (d) QADCS

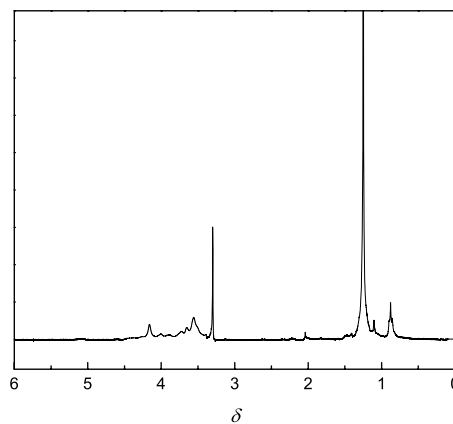


图 3 QADCS 的 ^1H NMR 分析

Fig.3 ^1H NMR spectrum of QADCS

表 1 合成产物的元素分析结果

Table 1 The elemental analysis results of the modified chitosan

Sample	C/%	N/%	$n(\text{C})/n(\text{N})$	Degree of N-substitution	Degree of O-substitution
CS(BA)	55.96	5.62	11.62	0.80	—
QACS(BA)	50.83	5.96	9.95	—	0.44
QADCS	59.56	3.21	21.65	1.87	—

作 $C_s^{-1} - A$ 关系图如图 5。混合单分子膜的最大压缩模量 ($C_{s,max}^{-1}$) 越大, 膜的凝聚性就越强 [12]。表 2 列出了不同 QADCS/胆固醇配比单分子膜的崩溃压 π_c 、极限分子占据面积 A_{ex} 及最大压缩模量 $C_{s,max}^{-1}$ 。

由图 5 和表 2 可见, 胆固醇单分子膜的 $C_{s,max}^{-1}$ 明显比 QADCS 大, 说明胆固醇单分子膜的凝聚性较强。QADCS/胆固醇在不同摩尔配比下的 $C_{s,max}^{-1}$ 与单组分的 QADCS 相比均有一定程度的变化。胆固醇含量较低时, QADCS/胆固醇混合单分子膜的压缩模量变化不大, 直到 $X_{CH}=0.8$ 时, 混合单分子膜的 $C_{s,max}^{-1}$ 有较大程度升高, 说明此时混合单分子膜以胆固醇之间的凝聚作用为主。

2.2.2 QADCS/胆固醇混合单分子膜的相容性

混合单分子膜组分的相容性可用超额自由能 ΔG_{exc} 来判别, 二组分混合单分子膜在一定表面压下的 ΔG_{exc} [12] 可由对 $\pi - A$ 等温线积分得到:

$$\Delta G_{exc} = \int_0^\pi (A_{12} - X_1 A_1 - X_2 A_2) d\pi$$

其中 A_{12} 是二元混合物的平均分子面积, X_1 和 X_2 分别是组分 1, 2 的摩尔分数, 而 A_1 和 A_2 分别是组分 1, 2 在一定的表面压下的分子面积。 $\Delta G_{exc}=0$, 说明两组分理想混合或完全不相容; $\Delta G_{exc} > 0$, 说明混合膜中两组分分子之间主要表现为相互排斥作用, 两组分的混合不能自发进行; $\Delta G_{exc} < 0$, 则说明混合膜中两组分分子之间主要表现为相互吸引作用, 两组分的混合能自发进行。并且 ΔG_{exc} 越小, 混合单分子膜的相容性越佳, 混合单分子膜越稳定。

图 6 是表面压为 5、10、20 和 30 mN/m 时 QADCS/胆固醇混合单分子膜的 ΔG_{exc} 与 X_{CH} 之间的关系。可以看出, $0.4 < X_{CH} < 1$ 时的 QADCS/胆固醇混合单分子膜 $\Delta G_{exc} > 0$, 说明异种分子之间表现为相互排斥, 两组分的互溶不能自发进行, 而且随着表面压增高, 自由能增大; $X_{CH}=0.4$ 时, 混合膜的超额自由能在低表面压时为正值, 随着表面压的升高

由正值转变为负值, 说明胆固醇的摩尔分数 0.4 是异种分子间的作用力从吸引作用转变到相互排斥作用的转变点; $0 < X_{CH} < 0.4$ 时, $\Delta G_{exc} < 0$, 两组分是热力学自发过程, 异种分子之间相互作用主要是吸引力, 并且随着表面压增加自由能增大。而且, 任何膜压下, $X_{CH}=0.2$ 时的 ΔG_{exc} 都为最小值, 这意味着

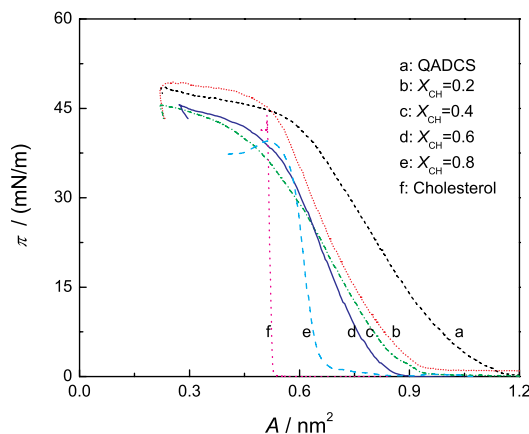


图 4 QADCS/胆固醇混合单分子膜的 $\pi - A$ 等温线

Fig.4 Surface pressure-area isotherms of mixed monolayers of QADCS/CH

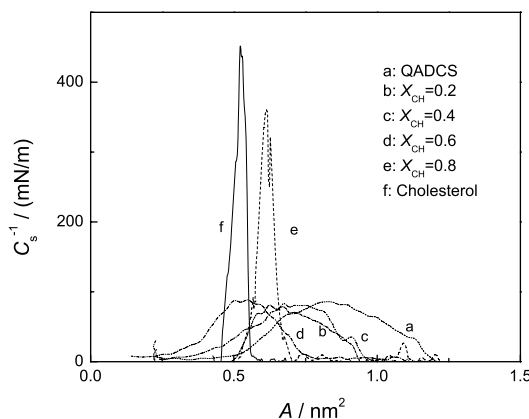


图 5 QADCS/胆固醇混合单分子膜 $C_s^{-1} - A$ 曲线

Fig.5 $C_s^{-1} - A$ curves of mixed monolayers of QADCS/CH

表 2 QADCS/胆固醇混合单分子膜的 π_c 、 A_{ex} 及 $C_{s,max}^{-1}$

Table 2 Collapse pressure (π_c), extrapolated area (A_{ex}), and maximum compressibility modulus ($C_{s,max}^{-1}$) of the $\pi - A$ isotherms at water-air interface for mixed QADCS/CH monolayers

Monolayer composition	π_c /(mN/m)	A_{ex} /nm ²	$C_{s,max}^{-1}$ /(mN/m)
QADCS	49.5	1.03	86
$X_{CH}=0.2$	51.3	0.87	80
$X_{CH}=0.4$	46.3	0.86	83
$X_{CH}=0.6$	45.4	0.80	88
$X_{CH}=0.8$	40.1	0.65	360
Cholesterol	44.7	0.52	452

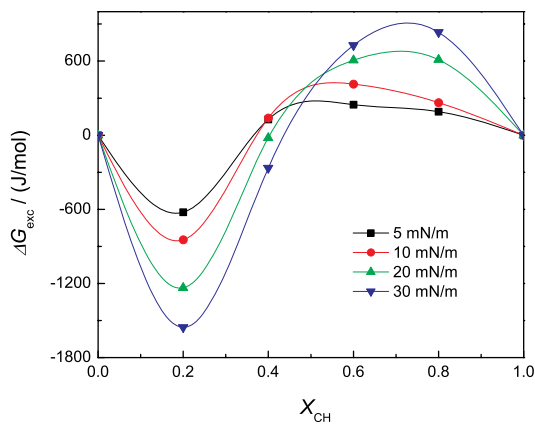


图6 QADCS/胆固醇混合单分子膜的超额自由能

Fig.6 Excess free energy of mixed monolayers of QADCS/CH

$X_{CH}=0.2$ 时混合单分子膜的相容性最好, 体系最稳定。因此可以推测混合单分子膜可能的凝聚态结构: 每四个 QADCS 与一个胆固醇通过相互作用形成一组紧密排列的“分子集团”^[13], 多余的胆固醇或 QADCS 对混合单分子膜的相容性产生不利影响。

实验结果表明, *O*-季铵化-*N,N*-双十二烷基壳聚糖/胆固醇混合单分子膜的超额自由能与各组分的摩尔分数及表面压的变化密切相关。当两者的混合为自发过程时, 增大表面压将使表面过剩自由能降低, 反之, 对不相容体系, 增加表面压则使表面过剩自由能增大。

3 结 论

在壳聚糖*O*-季铵化的基础上, 进行*N,N*-双十二烷基化改性, 制得*O*-季铵化-*N,N*-双十二烷基壳聚糖 (QADCS)。研究结果表明, 随着胆固醇的摩尔分数从 0.2 逐渐增加到 0.8, QADCS/胆固醇混合单分子膜的极限分子占据面积 A_{ex} 及崩溃压 π_c 均逐渐减小。QADCS/胆固醇在不同摩尔比时混合膜的最大压缩模量 $C_{s,max}^{-1}$ 与单组分的 QADCS 相比均有一定程度的变化, $X_{CH}=0.8$ 时, 混合单分子膜的 $C_{s,max}^{-1}$ 变化最大。胆固醇摩尔分数为 0.4 是混合单分子膜组分分子间的作用力从相互吸引转变到相互排斥作用的转变点; 在胆固醇的摩尔分数为 0.2 时混合单分子膜的超额自由能最低, 组分相容性最好, 体系最稳定。

参 考 文 献

1 N.Nandi, D.Vollhardt, Chiral discrimination and recognition in Langmuir monolayers, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **13**(1-2), 40(2008)

2 W.H.Xu, Y.H.Wang, Y.X.Xiao, F.Liu, G.Y.Lu, Langmuir monolayer and Langmuir-Blodgett films formed by a melamine-headed zobenzeno-derived mphiphile: Interfacial assembly affected by host-guest interaction, *Langmuir*, **25**, 3646(2009)

3 B.Lu, C.C.Wang, D.Q.Wu, C.Li, X.Z.Zhang, R.X.Zhuo, Chitosan based oligoamine polymers: Synthesis, characterization, and gene delivery, *Journal of Controlled Release*, **137**(1), 54(2009)

4 F.J.Pavinatto, C.P.Pacholatti, E.A.Montanha, L.Caseli, Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and Langmuir-Blodgett films, *Langmuir*, **25**, 10051(2009)

5 H.Parra-Barraza, M.G.Burboa, M.Sa'nchez-Va'zquez, J.Jua'rez, F.M.Goycoolea, M.A.Valdez, Chitosan-cholesterol and chitosan-stearic acid interactions at the air-water interface, *Biomacromolecules*, **6**, 2416(2005)

6 P.Wydro, B.Krajewska, K.Hac-Wydro, Chitosan as a lipid binder: A Langmuir monolayer study of chitosan-lipid interactions, *Biomacromolecules*, **8**, 2611(2007)

7 SU Sheng, XIN Meihua, LI Mingchun, The structure of self-assembled vesicle and the property of monolayer, *Chinese Journal of Materials Research*, **22**(1), 63(2008) (苏盛, 辛梅华, 李明春, 自组装囊泡的结构与单分子膜的性质, *材料研究学报*, **22**(1), 63(2008))

8 M.C.Li, S.Sheng, M.H.Xin, Y.Z.Liao, Relationship between *N,N*-dialkyl chitosan monolayer and corresponding vesicle, *Journal of Colloid and Interface Science*, **311**(1), 285(2007)

9 ZHOU Jingrun, XIN Meihua, LI Mingchun, GU Dandan, Synthesis and properties of *O*-quaternary ammonium salt-*N,N*-dialkylated chitosan, *Chemical Industry and Engineering Progress*, **27**(10), 1654(2008) (周景润, 辛梅华, 李明春, 顾丹丹, *O*-季铵盐-*N,N*-双长链烷基壳聚糖的制备及其性能, *化工进展*, **27**(10), 1654(2008))

10 CAI Zhaosheng, WANG Jintang, YANG Chunsheng, Preparation and characterization of chitosan grafted with CTA, *Fine Chemicals*, **21**(1), 654(2004) (蔡照胜, 王锦堂, 杨春生, 2-羟丙基三甲氯化铵壳聚糖的制备及其表征, *精细化工*, **21**(1), 654(2004))

11 YAO Zhong, ZHANG Can, PING Qineng, Preparation and characterization of a series of pegylated amphipathic chitosan derivatives, *Polymer Materials Science & Engineering*, **23**(5), 250(2007) (姚忠, 张灿, 平其能, 聚乙二醇化两性壳聚糖衍生物的制备和表征, *高分子材料科学与工程*, **23**(5), 250(2007))

12 P.Wydro, K.Hac-Wydro, Thermodynamic description of the interactions between lipids in ternary Langmuir monolayers: the study of cholesterol distribution in membranes, *The Journal of Physical Chemistry B*, **111**(10), 2495(2007)

13 ZOU Gang, FANG Kun, HE Pinsheng, Study on the behavior of the mixed monolayer of arachidic acid and cerium 2,2,6,6-tetramethylheptanedionate, *Chinese Journal of Chemical Physics*, **16**(3), 227(2003) (邹纲, 方堃, 何平笙, 花生酸与铈 β -二酮络合物混合单分子膜的成膜特性, *化学物理学报*, **16**(3), 227(2003))