

①341-346

胆固醇对卵磷脂有序体中生成 CaCO_3 晶型的影响

吴冰 姚松年 童华 钟桂荣

(武汉大学分析测试科学系, 武汉 430072)

0614.23/
0628-21

报道了在卵磷脂、胆固醇、橄榄油、电解质溶液组成的分子有序组合体中,胆固醇的加入影响了有序体的膜结构、表面特性,从而也影响到有序体微环境中所生成的 CaCO_3 晶体结构。随着胆固醇含量增加,在一定范围内球霏石的相对含量增大;油包水体系中生成的球霏石相对含量远大于水包油体系中生成的球霏石相对含量。

关键词: 卵磷脂 胆固醇 方解石 球霏石
分类号: O614.23

碳酸钙
晶体结构

分子有序组合体(简称有序体)^[1]是指具有一端亲水的极性基团和一端亲油(长烃链)的非极性基团组成的两亲性分子经自组织形成的有序缔合体。它在不同条件下可形成多种聚集态如胶束、微乳、脂质体(囊泡)、液晶态、单、双分子层膜等。生物体中的化学反应大多在有序介质如生物膜的参与下进行,它与溶液中的化学反应不同。自然界中碳酸钙大量地以方解石形式存在,而霏石、球霏石则比较稀少,但生物矿化的产物如珍珠和贝壳的内层均为霏石碳酸钙,鸡胚发育过程球晶状物质是球霏石,而鸡蛋壳、贝壳的外层则为方解石,因此探讨在何种条件下易形成霏石或球霏石型碳酸钙无疑对研究晶体的受控生长、生物矿化的机理有现实意义。

Birchall^[2]等人观察到墨鱼骨中形成的柱层状的球霏石碳酸钙,Heywood^[3]等人研究了空气/水界面上形成的硬脂酸单层膜中方解石晶体的成核取向生长,Mann^[4]等人则研究了溴化双十二烷基二甲基铵(DDAB)在十四烷及 Ca^{2+} 溶液中形成的双连续相微乳体系中生成碳酸钙的结构形貌及晶型,我们曾报道^[5]利用卵磷脂与水组成的囊泡中制备超细颗粒碳酸钙,且发现随着卵磷脂的含量增加,隔室化效应越显著,球霏石的含量也增加,也曾报道卵磷脂在庚烷-水中形成 W/O、O/W 型乳状液对碳酸钙晶型的影响^[6]。本文旨在讨论当胆固醇加入卵磷脂-水-橄榄油体系中以后,更易形成油包水(W/O)型结构的乳液体系,考察由卵磷脂和胆固醇极性头部形成凹曲面的微环境对碳酸钙晶体的结构有何影响。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

卵磷脂为华东师范大学生化厂产品,橄榄油为上海化学试剂站分装厂产品,胆固醇、 CHCl_3 、 CaCl_2 、 Na_2CO_3 、 CaCO_3 均为分析纯,水为二次蒸馏水。 CaCO_3 的相分析,胆固醇/卵磷脂

收稿日期:1998-04-05。 收修改稿日期:1998-07-06。

国家自然科学基金资助项目(No. 29473113)。

通讯联系人。

第一作者:吴冰,女,27岁,硕士,研究方向:生物液晶。

液晶态层状结构测定在 D/Max-rA 型 12 kW 旋转阳极 X 射线衍射仪及其小角散射附件上进行, Zeta 电位在 DXD-2 电视显微电泳仪上测定, 电导率在 DDS-12A 型数字电导率仪上测定, 钙离子浓度在 pH 5-2C 型精密酸度计上测定, 钙离子选择电极由江苏泰县电分析仪器厂制造, 在 721 型分光光度计上测定水相中磷脂及胆固醇含量, JEOL JEM-100 型透射电镜及 XPT-7 型偏光显微镜下观察有序体的形态与结构。

1.2 实验方法

1.2.1 含不同比例胆固醇/卵磷脂的油包水型(W/O)和水包油型(O/W)囊泡的制备

按表 1 所列配比分别准确移取溶于适量氯仿中的卵磷脂、胆固醇数份、溶剂自然挥发, 制得复配胆固醇/卵磷脂的薄层, 然后分别加入橄榄油、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 溶液或 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液, 超声处理后得到胆固醇/卵磷脂- CaCl_2 -橄榄油、胆固醇/卵磷脂- Na_2CO_3 -橄榄油乳液。将上述体系静置后分为两层, 用分液漏斗分开。由电导测量表明上层为 W/O 型乳液、下层为 O/W 型乳液, 并在偏光显微镜中观察 W/O、O/W 型乳液的形貌。

为了确定卵磷脂与胆固醇在 W/O、O/W 型乳液中的实际含量, 我们分别用磷钼兰及磷钨铁比色法测定卵磷脂、胆固醇在 O/W 乳液中的含量, 并依此计算胆固醇/卵磷脂分别在 W/O、O/W 型乳液中的摩尔含量比 C/P 列于表 1。

1.2.2 CaCO_3 的生成及相结构测定

将含胆固醇/卵磷脂- CaCl_2 -橄榄油的上层和下层乳液分别与含胆固醇/卵磷脂- Na_2CO_3 -橄榄油的上层和下层乳液在 15℃ 反应, 各自的反应生成物经离心分离后取其沉淀在 X 射线衍射仪上作相分析(结果见表 1)。

相分析的测试条件为 $\text{CuK}\alpha$ 辐射, 管压 40 kV, 管流 50 mA, 石墨弯晶单色器, 狭缝 DS、SS 1° , RS 0.15 mm, Rsm 0.45 mm, 扫速 $8^\circ \cdot \text{min}^{-1}$, 时间常数 0.5 sec, 量程 1~2 kcps。

表 1 W/O、O/W 体系中不同比例的胆固醇/卵磷脂对 CaCO_3 晶型的影响

Table 1 Effects of Different Cholesterol/Lecithin Ratios in W/O and O/W Systems on the Crystal Structure of CaCO_3

No.	before reaction								after reaction		
	PC [*] /μmol	Ch [*] /μmol	CaCl ₂ /mL	Na ₂ CO ₃ /mL	Oil [*] /mL	C/P ^{**} (molar ratio)		conductivity (ms • m ⁻¹)		I _v /I _c ^{***} /%	
						W/O	O/W	W/O	O/W	W/O	O/W
1 [#] CaCl ₂	20	—	5	—	5	0 : 1	0 : 1	0.057	>2		
1 [#] Na ₂ CO ₃	20	—	—	5	5	0 : 1	0 : 1	0.022	>2	30.9	0
2 [#] CaCl ₂	20	2	5	—	5	0.10 : 1	0.10 : 1	0.047	>2		
2 [#] Na ₂ CO ₃	20	2	—	5	5	0.07 : 1	0.16 : 1	0.093	>2	28.1	2.2
3 [#] CaCl ₂	20	4	5	—	5	0.16 : 1	0.27 : 1	0.596	>2		
3 [#] Na ₂ CO ₃	20	4	—	5	5	0.24 : 1	0.12 : 1	0.493	>2	80.9	0.8
4 [#] CaCl ₂	20	10	5	—	5	0.72 : 1	0.15 : 1	0.648	>2		
4 [#] Na ₂ CO ₃	20	10	—	5	5	0.63 : 1	0.24 : 1	0.594	>2	100	42.2
5 [#] CaCl ₂	20	20	5	—	5	1.55 : 1	0.17 : 1	0.531	>2		
5 [#] Na ₂ CO ₃	20	20	—	5	5	1.37 : 1	0.39 : 1	0.682	>2	140	60.7
6 [#] CaCl ₂	20	40	5	—	5	3.18 : 1	0.28 : 1	0.946	>2		
6 [#] Na ₂ CO ₃	20	40	—	5	5	3.07 : 1	0.39 : 1	0.969	>2	17.3	59.5

* PC is Lecithin, Ch is cholesterol, Oil refer to Olive Oil

** C/P is the actual molar ratio of Cholesterol/Lecithin

*** I_v is the peak intensity of vaterite, I_c is the peak intensity of calcite

1.2.3 含不同比例胆固醇/卵磷脂囊泡 Zeta 电位的测定

将一定量不同摩尔比的胆固醇/卵磷脂混合物溶于氯仿,加热减压蒸发去水及溶剂,加入一定量的电解质溶液,超声后制成不同浓度的胆固醇/卵磷脂囊泡在显微电泳仪上测定,囊泡的 Zeta 电位按 Helmholtz-Smoluchowski 公式计算。

测试条件:泳池深:1.2 mm、泳池宽:12 mm、电极:铂黑、电极距离:11 mm、静止层 S 值:0.181、微调测距起始圈数:4、微调测距终止圈数:16。

1.2.4 含不同比例胆固醇/卵磷脂囊泡中 CaCO_3 溶度积 K_{sp} 的测定

按文献^[7]所述方法采用钙离子选择电极测定体系中过饱和 CaCO_3 在不同配比的胆固醇/卵磷脂-水体系中游离 Ca^{2+} 的浓度,并依此求算 CaCO_3 在其中的溶度积 K_{sp} 。

1.2.5 电镜观察样品的制取采用将反应后含有 CaCO_3 微粒的上层乳液滴在铜网上抽干干燥后观察。电镜工作条件为:高压 100 kV,电流 10 μA ,倍率 7200 倍。

2 结果与讨论

由表 1 中,导率数据表明各组反应体系上层均为 W/O 型乳液,下层均为 O/W 型乳液,且在偏光显微镜,暗场下观察均有消光现象(如图 1 箭头所示马耳他十字),说明上述各组体系中卵磷脂与胆固醇在电解质溶液与橄榄油的界面形成有序排列。

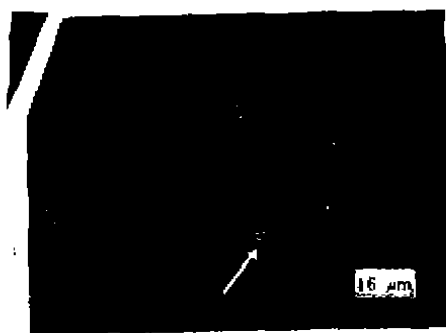


图 1 胆固醇/卵磷脂有序体的偏光显微镜形貌像(暗场像)

Fig. 1 Picture of polarization microscope for cholesterol/lecithin vesicle, scale bar, 16 μm

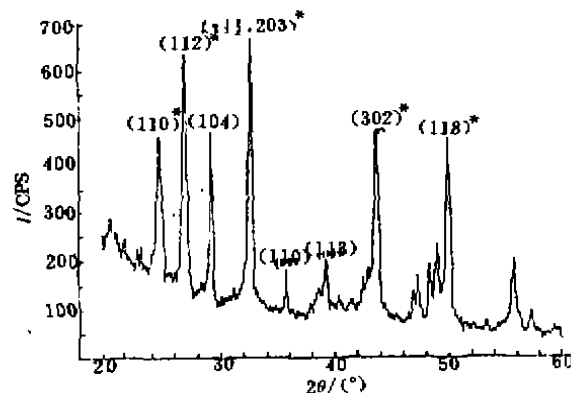


图 2 表 1 中 5 号样品 W/O 反应体系中生成的 CaCO_3 的 X 射线衍射谱图

Fig. 2 XRD spectra of CaCO_3 after reaction of No. 5 in W/O in table 1

(): diffraction peak of calcite

(*) : diffraction peak of aragonite

含 CaCl_2 溶液的上层及下层磷脂有序体分别与含 Na_2CO_3 溶液的上层及下层磷脂有序体混合反应所得 CaCO_3 的晶型经广角 X 射线衍射(WXD)测定(择其一见图 2)表明,随胆固醇含量的增加,球霏石(112)晶面的峰强与方解石(104)晶面的峰强比(I_1/I_2)明显增加,根据 K 值法^[11],沉淀中球霏石和方解石的相对含量比 $W_1/W_2 = K \cdot I_1/I_2$,由此可见随胆固醇含量增加有利于球霏石碳酸钙的生成。但当体系胆固醇与卵磷脂摩尔含量比增加到超过 1.5 : 1 时,在 W/O 型乳液中反应产物球霏石的相对含量明显下降;在 O/W 型乳液中随着胆固醇加入量的增加,胆固醇/卵磷脂实际摩尔含量比趋于恒定,反应产物球霏石的相对含量也基本趋于稳定。

我们认为这与胆固醇加入改变了卵磷脂在电解质溶液中形成的有序结构,改变了由卵磷脂极性头部围成的膜表面的电荷密度,改变了体系的粘度和微环境的性质,从而也改变了碳酸钙晶体形成的驱动力和生长有关。

胆固醇具有一个刚性结构的甾环及一个短且灵活的尾部,嵌入囊泡的疏水区域改变了多层囊泡的层间距,这由 X 射线小角散射方法(SAXS)测定表明,胆固醇的加入使含水脂双层厚度从 5.83 nm 变到 6.27 nm,且随胆固醇/卵磷脂比值的增大稍有增加(表 2 为不同摩尔比值的胆固醇/卵磷脂在 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 溶液中经 SAXS 测定得到的含水脂双层厚度 d, d_1 为采用 LeNeveu 脂水分层模型^[9]计算出的脂层厚度),但当胆固醇/卵磷脂摩尔比超过 1:1 时含水脂双层厚度又降为 6.08 nm,且在 3.5 nm 处出现了胆固醇的特征峰,说明在大于此比值时体系发生胆固醇的析相。又根据 Tanford 两亲分子聚集方式的有关理论^[10],胆固醇小头大尾的楔形特征使其易于形成极性头部向内的 W/O 型结构,由此可见,加入适量胆固醇有利于形成更为稳定的 W/O 型反应微环境。

表 2 胆固醇对脂双层厚度的影响

Table 2 Effects of Cholesterol on the Bilayer Thickness of Ch-PC- CaCl_2 Vesicle

R^*	0:10	3:7	1:1	7:3
d/nm	5.83	6.04	6.27	6.08
d_1/nm	4.30	4.96	5.18	5.05

R^* is the molar ratio of cholesterol/lecithin

同时由囊泡在 CaCl_2 和 Na_2CO_3 溶液中的 Zeta 电位测定(图 3 列出了 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 溶液中囊泡 Zeta 电位的测定值)表明在相同 CaCl_2 溶液浓度下随胆固醇/卵磷脂比值的增大,Zeta 电位下降,说明胆固醇的极性头部 OH 基团进入卵磷脂的极性区增加了膜表面的负电效应,使磷脂分子极性头部吸附更多的 Ca^{2+} ,从图 4 也可以看到 CaCO_3 在由卵磷脂—胆固醇形成的囊泡膜附近生成(图 4 是表 1 中 5 号样品 W/O 体系反应后直接滴在铜网上抽空干燥的电镜照片,从中可观察到 CaCO_3 结晶微粒位于脂层膜之间,排列成环状,它保留了多层囊泡坍塌后的形貌)。

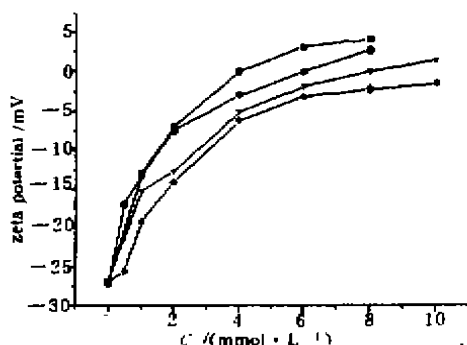


图 3 胆固醇含量变化对胆固醇/卵磷脂囊泡表面电位的影响

Fig. 3 Effects of different cholesterol/PC ratios on the zeta potential in vesicle

图 4 胆固醇/卵磷脂囊泡中形成的 CaCO_3 结晶微粒的透射电镜形貌像Fig. 4 TEM image showing ring-like crystals of CaCO_3 formed in Chol/PC multicompartiment vesicle, scale bar, 1.4 μm

再之,从图5显示的不同浓度的卵磷脂及不同摩尔比的胆固醇/卵磷脂中 CaCO_3 的溶度积的变化情况表明,胆固醇/卵磷脂的比值不同则 CaCO_3 的 K_{sp} 也不同,胆固醇/卵磷脂摩尔比小于 1:1 时,体系中 CaCO_3 的 K_{sp} 又明显降低,这与表1中胆固醇/卵磷脂摩尔比的变化对球霏石相对含量的影响过程一致。从结晶过程的热力学角度考虑,恒温恒压下单个溶质分子由溶液相转变为晶体相引起的系统 Gibbs 自由能变化为^[11]:

$$\Delta G = -kT \ln(C_1/C_0) \quad (1)$$

式中 C_1 、 C_0 分别为溶质的过饱和、饱和浓度。对于 CaCO_3 , 根据 $K_{\text{sp}} = [\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]$ 可知其 C_0 对应于 K_{sp} ^[12]。上式表明, K_{sp} 增大时 ΔG 增加, 即当胆固醇/卵磷脂摩尔比小于 1:1 时, 在胆固醇/卵磷脂形成的囊泡中, CaCO_3 分子由溶液相转变为晶体相所引起的 Gibbs 自由能的降低比在水溶液中的小, 即 CaCO_3 分子相变后在胆固醇/卵磷脂形成的囊泡体系中的能量比在水溶液中的能量高, 而球霏石能量比方解石高^[12], 从这个角度也说明适量摩尔比的胆固醇/卵磷脂所形成的有序体有利于球霏石的形成。

从表1还可知每组反应中上层油包水(W/O)体系的生成物中球霏石的相对含量都比相应下层水包油(O/W)体系明显的高, 我们认为这与体系中弯曲双层凹凸两侧界面自由能的变化、晶体生长的相变驱动力及电势分布等因素有关。在油包水的情况下, CaCO_3 晶体更多的处于由胆固醇/卵磷脂分子极性头部围成的凹曲面结构中, 而在水包油的情况下, CaCO_3 晶体则更多的处于水溶液中。对于晶体-溶液体系, Gibbs-Thomson^[11]公式表明了弯曲界面与溶质饱和浓度等平衡参量之间的定量关系:

$$\gamma_{\text{st}} \Omega_c (1/r_1 + 1/r_2) = kT \ln(C_e/C_0) \quad (2)$$

式中 γ_{st} 为晶体与溶液界面之间的比表面能, Ω_c 是每单个分子的体积, r_1 、 r_2 为弯曲界面上所考虑点的主曲率半径, C_e 、 C_0 是界面分别为曲面和平面时溶质的平衡饱和浓度。而根据(1)式有 $\Delta G_e - \Delta G_0 = kT \ln(C_e/C_0)$, 式中 ΔG_e 、 ΔG_0 是晶体与溶液界面分别为曲面和平面时溶质由溶液相转变为晶体相引起的系统 Gibbs 自由能变化, 则可得:

$$\Delta G_e - \Delta G_0 = \gamma_{\text{st}} \Omega_c (1/r_1 + 1/r_2) \quad (3)$$

而晶体生长的相变驱动力 $f = -\Delta G/\Omega_c$, 对于每单个分子 $f = -\Delta G/\Omega_c$, 则有

$$f_e - f_0 = -\gamma_{\text{st}} (1/r_1 + 1/r_2) \quad (4)$$

而晶体的界面为凹形, 或者说当 CaCO_3 晶体处于由卵磷脂/胆固醇分子极性头部围成的凹曲面结构之中时, $r < 0$, $\Delta G_e < \Delta G_0$, $f_e > f_0$, 即当 CaCO_3 分子在凹曲面结构中时由溶液相转变为晶体相所需的相变驱动力比在平面结构中时大, 则能量较高的球霏石 CaCO_3 比方解石 CaCO_3 易于在由卵磷脂/胆固醇分子极性头部围成的凹曲面体系中生长, 因此体系为油包水结构时更易形成能量较高的球霏石 CaCO_3 。

总之, 我们的研究表明, 胆固醇加入卵磷脂后影响了有序体的结构, 从而也影响到在有序

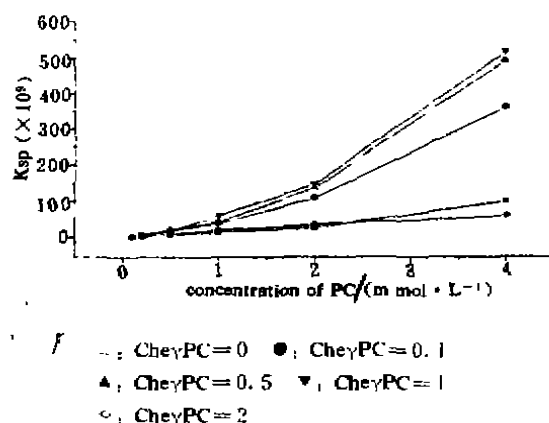


图5 不同比例的胆固醇/卵磷脂-水囊泡中 CaCO_3 的溶度积

Fig. 5 Product of solubility of CaCO_3 in the Chol-PC- H_2O vesicle at 15 °C

体微环境中所生成的 CaCO_3 晶体结构,适量的胆固醇/卵磷脂比例及有序体形成凹曲面结构均有利于球霏石 CaCO_3 的生成,并且从有序体膜结构、表面特性、晶体生长的热力学等角度分析了改变的原因。

参 考 文 献

- [1] ZHAO Guo-Yin(赵国玺) *Wuli Huaxue Xuebao (Chinese Acta Physico-Chemica Sinica)*, **1992**, *8*(1), 136.
- [2] Birchall J. D., Thomas N. L. *J. Mater. Sci.*, **1983**, *18*, 2081.
- [3] Heywood B. R. et al *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1981**, *87*, 735.
- [4] Walsh D., Mann, S. *Nature*, **1995**, *377*(28), 320.
- [5] YAO Song-Nian(姚松年) et al *Wuli Huaxue Xuebao (Chinese Acta Physico-Chemica Sinica)*, **1997**, *13*(3), 270.
- [6] YAO Song-Nian(姚松年) et al *Wuli Huaxue Xuebao (Chinese J. Inorg. Chem.)*, **1998**, *14*(2), 222.
- [7] YAO Song-Nian(姚松年) et al *Wuli Huaxue Xuebao (Chinese Acta Physico-Chemica Sinica)*, **1993**, *9*(5), 713.
- [8] HUANG Sheng-Tao(黄胜涛) *Solid State X-Ray Theory(固体X射线学)*, Beijing: Higher education Press, **1985**.
- [9] LeNeveu D. M., Rand R. P. *Biophysical Journal*, **1982**, *37*, 657.
- [10] Tanford C. et al *The Hydrophobic Effect*, Wiley-Interscience: New York, **1973**.
- [11] YAO Liang-Zeng(姚连增) *Crystal Growth Basis(晶体生长基础)*, Hefei: Chinese Science and Technology University Press, **1995**.
- [12] McCauley J. W., Roy R. *American Mineralogist*, **1974**, *59*, 947.

EFFECTS OF CHOLESTEROL ON THE STRUCTURE OF CaCO_3 IN LECITHIN ORGANIZED ASSEMBLY

WU Bing YAO Song-Nian TONG Hua ZHONG Gui-Rong

(Department of Analysis and Measurement Science, Wuhan University, Wuhan 430072)

The effects of cholesterol on the structure of CaCO_3 grown in the organized molecular assembly composed by Lecithin, cholesterol, olive oil and electrolyte has been studied as a biomembrane mimetic system. Result shows that cholesterol has a powerful influence on the membrane's structure and the Zeta potential in vesicle, and the structure of CaCO_3 . With the increase of mole concentration of cholesterol, the relative concentration of vaterite CaCO_3 is increased. The amount of vaterite CaCO_3 is formed in the system of W/O more than in the system of O/W.

Keywords: lecithin cholesterol calcite vaterite