

胆固醇/卵磷脂/壳聚糖体系中碳酸钙模拟生物矿化的研究

王静梅 姚松年*

(武汉大学分析测试中心, 武汉 430072)

本文采用 X 射线衍射、红外光谱和扫描电子显微镜等方法研究了胆固醇/卵磷脂/壳聚糖体系中碳酸钙模拟生物矿化过程。通过改变有机基质的组成, 使有机基质的模板作用也发生改变, 从而使生成方解石型碳酸钙的模板可生成球霏石型的碳酸钙。文中还进一步探讨了体系中壳聚糖、卵磷脂、胆固醇三者的协同作用对生成碳酸钙晶型的影响。

关键词: 碳酸钙 壳聚糖 生物矿化

分类号: O614. 23

0 引 言

壳聚糖又名甲壳质, 是自然界广泛存在的天然粘多糖, 是以 N-乙酰基-D-葡萄糖胺为结构单元的葡聚糖。许多研究工作表明, 虾、蟹、贝壳中的壳聚糖与蛋白质是共价结合, 以蛋白壳聚糖的形式存在, 同时还伴生着方解石型碳酸钙^[1]。这种碳酸钙在晶型上不同于在贝壳中外套膜上生成的球霏石型的碳酸钙(珍珠), 这说明不同的生物矿化模板中, 生物矿化的进程和产物都是不相同的。Lowenstam 和 Weiner^[2,3]通过研究提出了生物矿化过程中的“有机基质调制”过程, 即有机大分子(如磷脂类、粘多糖、蛋白质、胶原等)在为无机生物矿化提供框架的同时, 也通过与无机矿物离子在界面处的相互作用, 在分子水平上控制无机矿物的成核和长大, 从而实现控制矿化材料的显微结构和性能。本文通过加入卵磷脂和胆固醇改变有机基质壳聚糖原有的生物矿化模板结构, 可以得到球霏石型碳酸钙的实验事实, 从另一侧面证实了生物矿化的有机基质模板调制理论。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

试剂: 壳聚糖即脱乙酰甲壳素(以下简称为 CS), 广东南星甲壳素公司产品, 经测定脱乙酰度为 84%。卵磷脂(以下简称为 PC)为华东师范大学生化工厂产品。胆固醇(以下简称为 CH)、乙酸、氯仿、氯化钙、碳酸钠均为分析纯。水为二次蒸馏水。

仪器: D/max-rA 型 X 射线衍射仪(XRD), 日立 X-650 型扫描电子显微镜(SEM), Nicolet 170ST 型傅立叶红外光谱仪(FT-IR), NDJ-79 型旋转式粘度计, DDS-12A 型数字电导率仪。

1.2 实验方法

1.2.1 壳聚糖复合膜的制备

取一定量的 1% 乙酸溶液按表 1 所示的比例配置不同浓度和配比的壳聚糖乙酸溶液, 卵

收稿日期: 2000-08-12。收修改稿日期: 2000-11-22。

国家自然科学基金资助项目(No. 29473113)。

* 通讯联系人。

第一作者: 王静梅, 女, 24 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物液晶与结晶。

表1 CH/PC/CS/CaCl₂ 铸膜液成分配比表Table 1 Proportion of CH/PC/CS/CaCl₂ in Membrane Forming Liquid

CS/(g · L ⁻¹)	2			4			6			8			10		
PC/(mg · L ⁻¹)	2	6	10	2	6	10	2	6	10	2	6	10	2	6	10
CH/(mg · L ⁻¹)	10	6	2	10	6	2	10	6	2	10	6	2	10	6	2
CH:PC	1:5	1:1	5:1	1:5	1:1	5:1	1:5	1:1	5:1	1:5	1:1	5:1	1:5	1:1	5:1
CaCl ₂ /g	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

磷脂和胆固醇溶于少量氯仿中,待其自然挥发干,成为胆固醇/卵磷脂的复合薄层,加入不同浓度的壳聚糖溶液经超声处理,得到胆固醇/卵磷脂/壳聚糖复合溶液,再分别加入 2g CaCl₂ 晶体,待其充分溶解,经超声波处理均匀后除去气泡,得到所需的铸膜液,将铸膜液倒在洁净、干燥的玻璃板上,使其自然流延成膜,置于红外灯下烘烤 12 小时,得到胆固醇/卵磷脂/壳聚糖/CaCl₂ 膜。

1.2.2 碳酸钙晶体的制备

将所制备的膜浸泡在 1mol · L⁻¹ 的 Na₂CO₃ 溶液中三天,膜内逐渐形成大量白色的结晶物,表面多次淋洗后得到 CaCO₃-CH-PC-CS 膜。

1.2.3 含碳酸钙复合膜结构与形貌分析

取不同的成品膜在 X 射线衍射仪上做定性相分析。测试条件为: Cu 的 K α 辐射, 40kV, 50mA, 石墨弯晶单色器。狭缝: DS/SS, 1 $^\circ$, RS, 0.15mm, RSm, 0.45mm。扫描速度: 8 $^\circ$ · min⁻¹。时间常数: 0.5s, 量程: 1kCPS。

取不同的成品膜在扫描电子显微镜下观察其形貌, 实验条件: 高压: 20kV, 电流: 5 × 10⁻¹⁰A, 工作距离: 15mm, 样品镀金处理。

取不同的成品膜于红外光谱仪下进行测试, 实验条件: 波数范围: 300 ~ 3500cm⁻¹。

2 结果与讨论

Mann S. 和 Falini G. 的研究表明, 从贝壳霏石层提取的有机大分子在体外实验中诱导形成霏石, 从方解石层中提取的有机大分子在体外实验中诱导形成方解石^[3,4]。我们的实验也表明在只有壳聚糖存在的基质诱导下, 所得到的仍然是方解石型碳酸钙(见图 1a), 这与 Mann S. 和 Falini G. 的结论是一致的, 但当壳聚糖基质被不同比例的卵磷脂和胆固醇改性修饰后, 其中生成的碳酸钙晶型却发生了显著变化(见图 1b)。对此结果我们做如下讨论。

2.1 卵磷脂/胆固醇不同配比对于碳酸钙晶型的影响

由广角 X 射线衍射(WXD)测定表明: 当 PC: CH = 5: 1 时, 可以生成大量的球霏石型的碳酸钙, 球霏石 110 面和方解石 104 面的衍射峰的强度之比可达到 123: 100; 当 PC: CH = 1: 1 时, 球霏石的含量明显减少, 但两者衍射峰强度之比最高仍可达到 85.4: 100; 当壳聚糖基体中 PC: CH 的比例为 1: 5 时, 其中生成的碳酸钙几乎全部是方解石型, 二者的比例约为 1/10, 如表 2 所示。由此可见 PC/CH 高比较有利于球霏石的生成。

由于在该体系中, 卵磷脂、胆固醇相对于壳聚糖的量很少(仅为 1/1000 ~ 5/1000), 因此在红外谱图上, 卵磷脂和胆固醇的特征吸收峰都比较微弱, 谱图的主要变化体现在壳聚糖和碳酸钙特征吸收峰的变化和位移, 从图 2 中可以看到 ~ 874cm⁻¹ 和 ~ 746cm⁻¹ 碳酸钙的 O-C-O 的面外弯曲振动谱带向高波数略有移动, 2800 ~ 3000cm⁻¹ 谱带吸收较强, 为有机基质壳聚糖中

表 2 球霏石/方解石在不同反应体系中的相对强度比

Table 2 Vaterite/Calcite Relative Intensity in Different Reaction Systems*

CS concentration / (g · L ⁻¹)	2	4	6	8	10
CH: PC = 1: 5	83. 7	123	107	105	91
CH: PC = 1: 1	54	85. 4	56. 4	44	36. 7
CH: PC = 5: 1	6	10	8	5	3

*: The relative intensity is taken from the ratio between the peak strength of (110) for vaterite and the peak strength of (104) for calcite, and that of (104) is taken as 100.

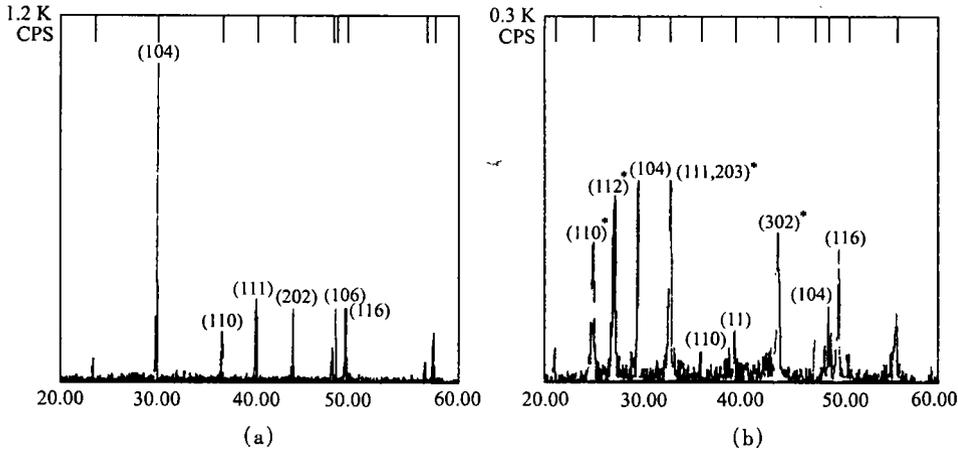


图 1 被修饰前后壳聚糖膜中生成 CaCO₃ 的 XRD 谱图

Fig. 1 XRD Spectra of CaCO₃ after reaction in different content system

a: CS system, b: CS-PC-CH system

(): diffraction peak of calcite, ()*: diffraction peak of vaterite

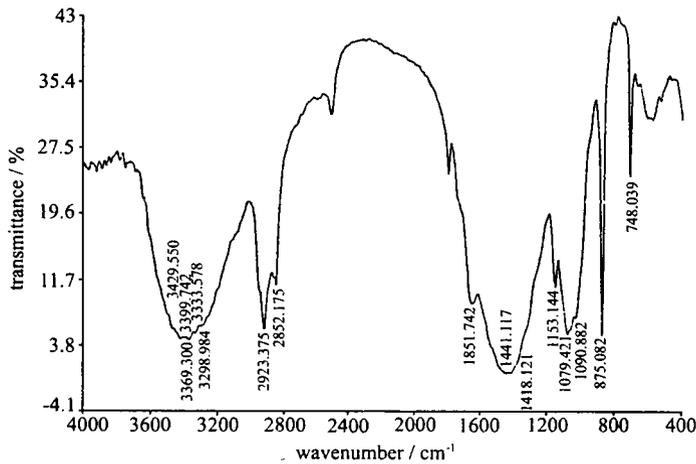


图 2 CS-PC-CH-CaCO₃ 膜的红外光谱图

Fig. 2 FT-IR Spectrum of CS-PC-CH-CaCO₃

CH 对称和不对称伸缩振动的谱带,同壳聚糖的标准谱图^[1]相比有微弱的蓝移,而集中在 3200 ~ 3600cm⁻¹ 的有机基质壳聚糖和胆固醇的 CH 及 OH 的伸缩振动吸收谱带变宽,出现许多的微弱小峰,表明了卵磷脂、胆固醇的加入影响了壳聚糖的分子间的弱相互作用,改变了分子间

的聚集方式,使之有利于形成较多的亚稳态球霏石型的碳酸钙。

再之,从分子的荷电特性来看,壳聚糖在溶液中是以带正电荷的聚电解质形式存在的,卵磷脂的极性头部中带负电的磷氧酯键与壳聚糖 NH_3^+ 产生较强的静电吸引,改变了壳聚糖膜内的荷电分布及 CaCO_3 晶核形成和粒子的堆积方式。说明有机基质壳聚糖同卵磷脂和胆固醇之间存在着分子水平上的弱相互作用。而胆固醇的加入则起到了坚膜的作用^[5],即有一个刚性甾环的楔型分子胆固醇可以使壳聚糖膜的流动性保持相对稳定。根据文献^[7,8]对 PC、CH、 H_2O 三相体系物化性质 ξ 电位的研究表明,当 CH:PC > 1:1 的时候,该体系将发生析相,多余的胆固醇与壳聚糖相互作用,使晶体生长的固液界面比较稳定,能量较高的球霏石型碳酸钙含量也趋于减少。

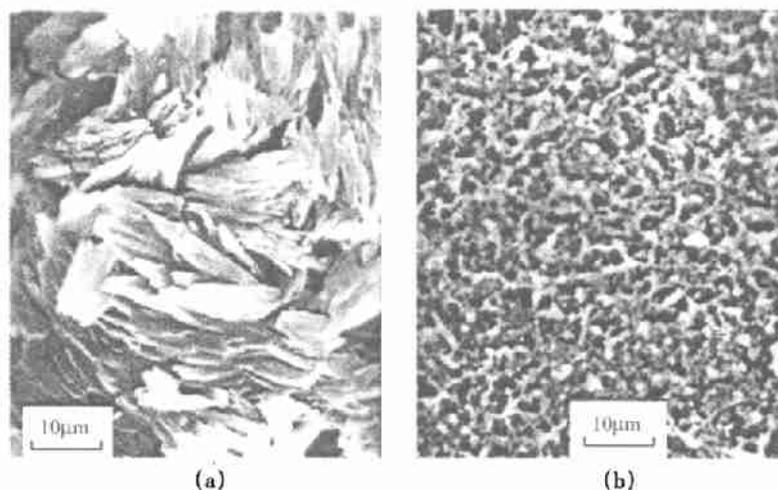


图3 CaCl_2 -CH-PC-CS 膜和 CaCl_2 -CS 膜的扫描电镜照片

Fig. 3 Scanning electron micrograph of CaCl_2 -CH-PC-CS membrane and CaCl_2 -CS membrane
a: CaCl_2 -CS membrane, b: CaCl_2 -CH-PC-CS membrane

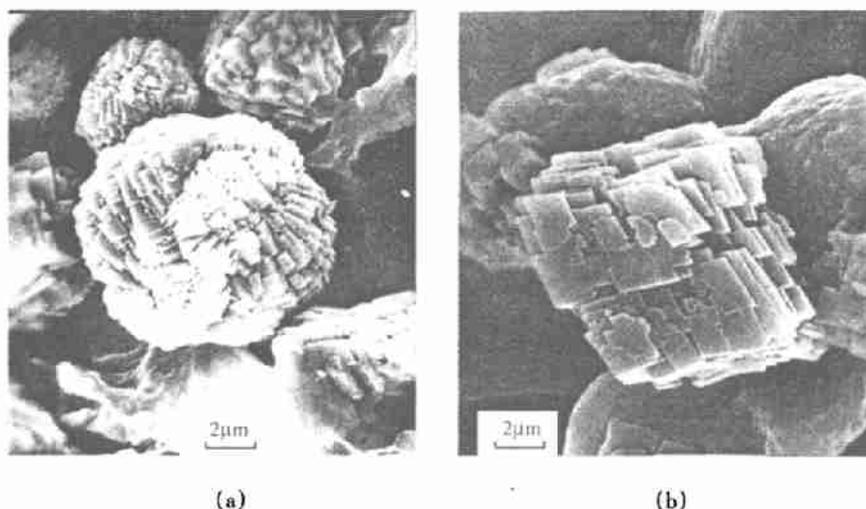


图4 不同体系中碳酸钙不同晶型的扫描电镜图片

Fig. 4 Scanning electron micrograph of CaCO_3 different crystal structure type in different system
a: vaterite, b: calcite

由此我们设想壳聚糖-卵磷脂-胆固醇三者的生物矿化模板, 带有极性头部的卵磷脂吸附在壳聚糖上, 疏水尾链相互缠绕, 形成了一个有利于高能态碳酸钙晶体成长的界面, 从扫描电镜的照片中我们可以看到, 未反应前的 $\text{CaCl}_2\text{-CH-PC-CS}$ 膜呈现出密布的网织状结构 (如图 3b), 而单纯的 $\text{CaCl}_2\text{-CS}$ 膜上则看不到这样的结构 (如图 3a), 即卵磷脂和胆固醇在碳酸钙晶体成长的固液界面上造成了凸缘, 增加了界面的总表面积, 体系表面能的增加, 有利于能量较高的球霏石型碳酸钙的生成^[7]。这种不稳定也造成了晶体堆积方式的不同, 从上述试样的电镜照片中可以看到能量较高的球霏石是大量的片层状小晶体在堆积时不断改变方向最终形成较规则的球形 (如图 4a), 而方解石型碳酸钙则是小晶体向一个方向不断堆积造成的一种结晶多面体 (如图 4b)。

2.2 壳聚糖、卵磷脂、胆固醇三者对碳酸钙晶型影响的协同作用

无论如何改变卵磷脂和胆固醇的配比对壳聚糖膜进行修饰改性, 体系的粘度和电导增加的总趋势无多大改变。从图 5 数据可以看出, 每条曲线中壳聚糖浓度为 $4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 者所生成的球霏石型碳酸钙为最多。这一实验事实不仅表明 PC、CH 的加入改变了以壳聚糖为有机基质对碳酸钙结晶过程的模板作用, 而且说明当壳聚糖、卵磷脂、胆固醇三者合适配比的协同作用下, 可以使原来生成方解石的模板成为有利于生成球霏石的模板。对上述不同配比体系的粘度和电导实验数据分析 (见图 6、图 7) 表明, 体系的粘度随壳聚糖浓度增大而增加表明体系中粒子的内摩擦增大, 壳聚糖大分子形成为包含有一定量溶剂的无规则线团, 阻碍了钙离子与碳酸根离子的结

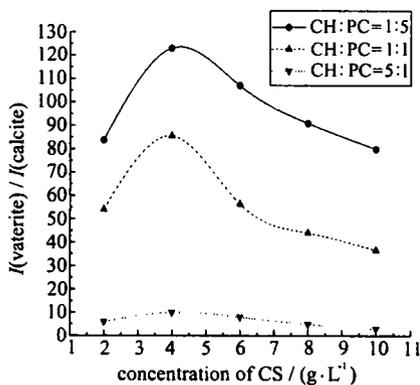


图 5 球霏石/方解石在 CS-CH-PC-CaCO_3 膜中的相对强度比

Fig. 5 Relative intensity ratio of vaterite and calcite in the CS-CH-PC-CaCO_3 membrane

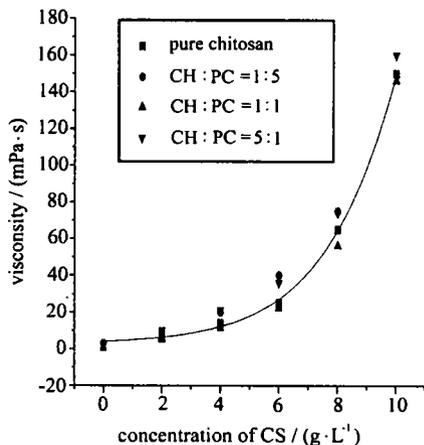


图 6 壳聚糖浓度不同时体系的粘度曲线

Fig. 6 Viscosity of different concentrations of chitosan solution

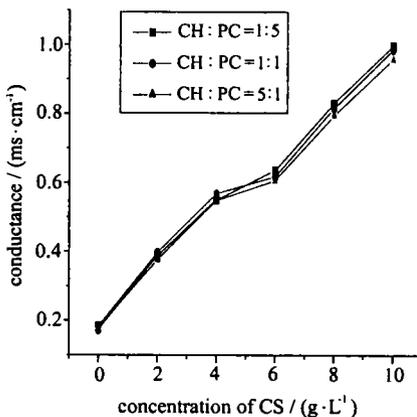


图 7 壳聚糖浓度不同时体系的电导曲线

Fig. 7 Conductance of different concentrations of chitosan solution

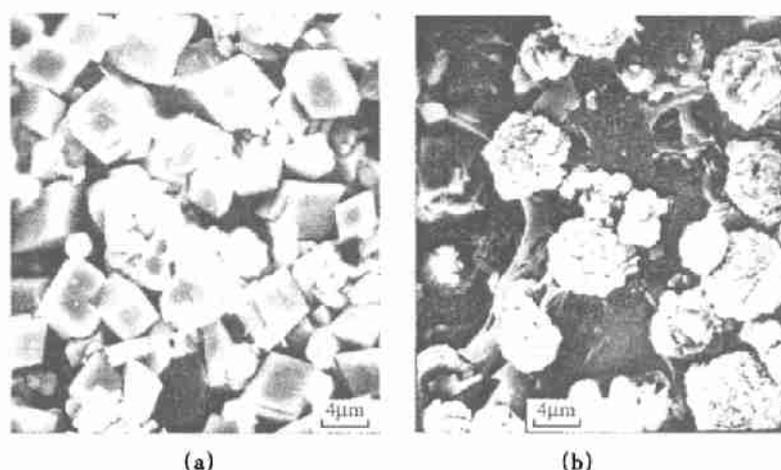


图8 在不同体系中碳酸钙的扫描电镜照片

Fig. 8 Scanning electron micrographs of CaCO_3 in different systems

a: CS membrane, b: CS-PC-CH membrane

合,也不利于所生成的碳酸钙的成核和长大,有利于生成能量较高的球霏石型碳酸钙。但从电导数据(图7)观察,随着壳聚糖浓度的增加,带正电荷的聚电解质壳聚糖使体系的电导增加,更容易吸附碳酸根离子,有利于稳定的方解石型碳酸钙的生成。两种相反因素共同作用的结果造成仅当壳聚糖浓度为 $4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,球霏石与方解石相对含量比最大,至于更深一层的结晶热力学和动力学因素的讨论尚待进一步深入的研究。

在扫描电镜照片中(如图8)我们也看到,壳聚糖为 $4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时球霏石型碳酸钙是生成在卵磷脂、胆固醇和壳聚糖基质之间形成的分支状凸缘上,这也证明了在这个浓度下,壳聚糖与卵磷脂、胆固醇三者之间的协同作用。

参 考 文 献

- [1] JIANG Ting-Da(蒋挺大) *Chitosan(甲壳素)*, Beijing: Chinese Environment Press, 1996, p117.
- [2] Mann S., Webb J. *Biomaterialization: Chemical and Biochemical Perspectives*, VCH Publishers, 1989, p124.
- [3] Falini G., Albeck S., Addadi L. *Science*, 1996, 271(5), 67.
- [4] Belcher A. M., Wu X. H., Christensen R. J., Hansma P. K., Stucky G. D., Morse D. E. *Nature*, 1996, 381(4), 56.
- [5] George R., McElhaney R. N. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 107(2), 111.
- [6] TONG Hua(董 华), YAO Song-Nian(姚松年) *Wuli Huaxue Xuebao(Acta Physico-Chimica Sinica)*, 1998, 10(5), 713.
- [7] WU Bing(吴 冰), YAO Song-Nian(姚松年) *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, 1999, 15(3), 3.
- [8] YAO Lian-Zeng(姚连增) *Crystal Growth Basis(晶体生长基础)*, Hefei: Chinese Science and Technology University Press, 1995, p412.

The Study on Calcium Carbonate Mimetic Biomineralization in the Chitosan/Phospholipid/Cholesterol System

WANG Jing-Mei YAO Song-Nian

(Center of Analytical and Measurement, Wuhan University, Wuhan 430072)

The process of calcium mimetic biomineralization in the chitosan-phospholipid-cholesterol system is reported in this paper, and is characterized by using XRD, SEM and IR. The model action is changed through changing the composition of organic base. Vaterite can be created in organic base in which calcite was created before. Keeping the ratio of phospholipid and cholesterol constant, the largest quantity of vaterite can be gained as chitosan concentration is $4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. When chitosan concentration is constant, with the ratio of phospholipid and cholesterol increasing, more vaterite can be gained. The template of biomimeralization can be assumed due to that the action of chitosan could be modified by phospholipid and cholesterol, and the surface of forming crystal is changed to higher energy surface. So the vaterite with high energy can be gained easily. At last we think that the largest quantity of vaterite can be gained when chitosan, phospholipid and cholesterol are in existence with a proper ratio.

Keywords: calcium carbonate chitosan biomimeralization