

研究简报

卵磷脂 - 水体系中草酸钙模拟生物矿化的研究

李霞 姚松年*

(武汉大学化学与分子科学学院分析测试中心, 武汉 430072)

关键词: 卵磷脂 草酸钙 一水草酸钙 二水草酸钙
 分类号: O614.23

草酸钙通常以三种水化物的形式存在: 热力学稳定的一水草酸钙(以下简称 COM), 亚稳态的二水草酸钙(以下简称 COD) 和三水草酸钙(以下简称 COT)。前人研究已经表明引起草酸钙不同水化物成核、生长以及聚集的因素, 不仅仅在于钙离子和草酸根离子浓度的过量, 而且与晶体成长所处环境包括离子种类、浓度、环境等有关。有关表面活性剂对草酸钙结晶过程的影响, 例如 Skritic D. 小组做了大量的研究工作^[1~3]。他们指出草酸钙晶体的成核、生长、组成以及晶体结构同表面活性剂水溶液的状态间存在着复杂的相关性^[1]。本文选用卵磷脂(PC)这一与细胞膜组成有关的生物表面活性物质, 它可与水形成胶束、囊泡、层状液晶相等各种不同的有序结构, 研究其中反应生成的草酸钙晶体的结构、形貌等。由此来考察微环境的有序状况对草酸钙晶体的晶型、生长、聚集等方面的影响。对揭示生物矿化的机理有参考价值。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

卵磷脂为上海生化试剂厂产品, CaCl_2 、 $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 均为分析纯, 水为二次蒸馏水。草酸钙的结构分析在日本理学公司 D/max-rA 型 12kW 旋转阳极 X 射线衍射仪上进行, 形貌分析在贵州光学仪器厂 XP1 型偏光显微镜下和日本日立 X-650 型扫描电子显微镜(SEM)上进行。pH 值在梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司 Delta 320-S 型 pH 计上测定。

1.2 实验方法

1.2.1 卵磷脂 - 水有序结构对 CaC_2O_4 晶型的影响

取 PC 适量于烧杯中, 用氯仿溶解, 待氯仿蒸发后, 分别加入一定体积的 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液, 经超声处理后形成含表 1 所列不同浓度的卵磷脂与氯化钙的有序体, 使卵磷脂浓度正好处于: (1) 低于临界胶束浓度(CMC); (2) 高于 CMC 而低于临界囊

表 1 卵磷脂浓度对 CaC_2O_4 晶体结构的影响Table 1 Influence of the Concentration of PC on the Crystal Structure of CaC_2O_4

No.	1	2	3	4
		($C_{PC} < \text{CMC}$)	($\text{CMC} < C_{PC} < \text{CVC}$)	($C_{PC} > \text{CVC}$)
$0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2/\text{mL}$	30	30	30	30
$\text{PC}/\text{CaCl}_2/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	0	5.25×10^{-6}	2×10^{-4}	2.5×10^{-3}
$0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4/\text{mL}$	30	30	30	30
$I_{h^{(100)}}/I_{h^{(100)}}^*$	(1)	9.67	1.73	2.26
	(2)	8.50	2.19	3.67
	(3)	8.20	1.95	3.35

*Three experimental results are listed.

收稿日期: 2001-09-17。收修稿日期: 2001-12-03。

国家自然科学基金资助项目(No. 29473113)。

*通讯联系人。E-mail: xrd@whu.edu.cn

第一作者: 李霞, 女, 27岁, 硕士; 研究方向: 生物液晶。

泡浓度(CVC); (3) 高于 CVC。在 $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 下将与 CaCl_2 等量的 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 溶液沿杯壁倒入与之混合(时间不超过 30 秒), 混合前将所有反应液的起始 pH 值均调到 6.5 ± 0.05 。

反应生成物经离心分离后, 取其湿样在 X 射线衍射仪作相分析(结果见表 1)。以 COM 最强线(100), d 值为 0.593nm (PDF 卡 20~231) 的强度 I_M (100) 和 COD 的最强线(200), d 值为 0.618nm (PDF 卡 17~541) 的强度 I_D (200) 作测量线对求算 I_M/I_D 。

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

1.2.2 卵磷脂-水体系中不同反应条件下生成的 CaC_2O_4 晶体的形貌研究

进行三组对照实验:

No. 1-1 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{CaCl}_2 + 0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$

No. 1-2 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 ($0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)
+ $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ($0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)

No. 2-1 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 ($C_{\text{PC}} = 5.25 \times 10^{-6}$
 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$

No. 2-2 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 ($C_{\text{PC}} = 5.25 \times 10^{-6}$
 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) + 0.01
 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ($0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)

No. 3-1 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 ($C_{\text{PC}} = 2.5 \times 10^{-3}$
 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$

No. 3-2 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 ($C_{\text{PC}} = 2.5 \times 10^{-3}$
 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) + 0.01
 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ($0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)

为了接近生理环境, 我们在溶液中加入 $0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl , 并与未加 NaCl 的反应体系作比较。

形貌分析的测试条件为 20kV , 束流 $5 \times 10^{-9}\text{mA}$, 工作距离 15mm 。样品喷金处理。相分析的测试条件同前。

$\text{PC}-\text{CaCl}_2$ 有序体系按前述同样方法制得, 反应条件和方法同前。反应过程中, 取样在偏光显微镜下观察并拍照。反应产物经透析、离心后, 取其沉淀在扫描电镜上作形貌分析, 并在 X 射线衍射仪上作相分析。结果见表 2。

2 结果与讨论

2.1 卵磷脂-水有序结构对 CaC_2O_4 晶型的影响

在实验条件下我们得到了两种水化物: 一水草酸钙 COM 和二水草酸钙 COD。水溶液中生成的 CaC_2O_4 晶体的 X 射线衍射谱图见图 1。由表 1 可知, 当体系中 PC 浓度低于 CMC 时, COM(100) 晶面的峰强与 COD(200) 晶面的峰强之比 I_M/I_D 明显低于水溶液中的。根据 K 值法^[4], 沉淀中 COM 和 COD 的相对含量比 $W_M/W_D = K \cdot I_M/I_D$, 由此可见少量 PC 的加入利于 COD 的生成。而当 PC 浓度达到 CMC 后, 产物的 I_M/I_D 比值又明显地增加, 表明 COM 相对含量增加, 但仍低于水溶液中的。当 PC 浓度增大至 CVC 后, I_M/I_D 值又下降, 利于 COD 生成。由此可见生成何种含水草酸钙晶体与卵磷脂在溶液中所处的状态有密切的关系。

前人工作^[5-7]表明草酸钙晶体生长的抑制物的抑制机理有两种: (1) 与钙离子形成络合物从而有效地降低沉淀时的相变驱动力; (2) 吸附于晶体表面的活性生长点上从而抑制晶体生长。我们认为除上述两种机理外, 抑制物在溶液中所处聚集状态对草酸钙晶体的形成同样起着重要作用。

体系中 PC 分子在浓度低于 CMC 时, 不足以形成胶束。它作为两亲性分子, 有一个既有带负电荷的磷酸酯基又有带正电荷的三甲胺基团的极性头

表 2 $\text{PC}-\text{H}_2\text{O}$ 体系中不同反应条件下生成的草酸钙晶体的形貌和相分析结果

Table 2 Morphology and Phase Analysis Results of CaC_2O_4 Obtained in Different $\text{PC}-\text{H}_2\text{O}$ Systems under Different Reaction Conditions by SEM and XRD

No.	SEM	XRD
1-1	thin, platelike crystals with serrated edges (fig. 4a)	preferential epitaxy along (020) face (fig. 3a)
1-2	oriented clusters (fig. 4b)	the same as No. 1-1
2-1	crystal with two layers arrangement (fig. 4c)	the (020) face epitaxy disappear (fig. 3b)
2-2	the same as No. 1-2	the same as No. 1-1
3-1	erose, thin, plate-like crystals	the same as No. 2-1
3-2	clusters with butterfly-like shape (fig. 4d)	the same as No. 2-1

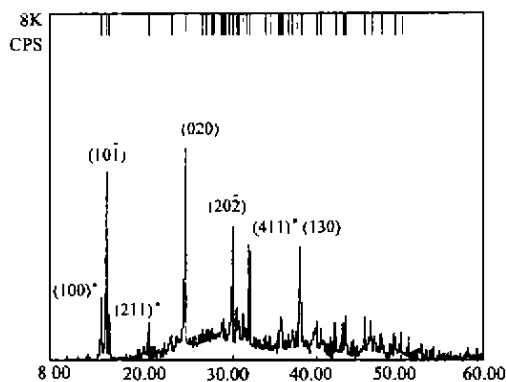


图1 水溶液中生成的草酸钙的X射线衍射谱图

Fig. 1 XRD spectrum of CaC_2O_4 in H_2O system

(): COM, (*): COD

部^[5]。它对 Ca^{2+} 和 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 都有力场作用,从而可与位于晶体表面活性生长点上的 Ca^{2+} 和 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 结合,进而被选择性地吸附于晶体表面。由于该种吸附降低了晶体生长的相变驱动力 $-\Delta G$,因而抑制了晶体生长。Sikes C. S. 等人发现 COM 晶格呈现出两个特殊的晶面,它们垂直于液体表面,从而晶面上的钙离子可以同抑制物分子的阴离子集团发生最有效地结合作用^[9]。而 COD 的晶体结构则不存在有这样特殊的晶面。于是造成了 PC 对二者吸附性能的显著差异。因此少量 PC 分子是 COM 生长的抑制物,于是 COD 相对含量增加。早先 Nancollas G. H. 等人就已经指出了 COM 晶体生长的抑制物利于 COD 从草酸钙过饱和溶液中的沉淀析出^[6]。

当体系中 PC 浓度达到 CMC 后,形成了大量的胶束,游离的单个 PC 分子减少,从而对 COM 生长的抑制能力减弱,使得 COM 相对含量有一定程度的增加。但由于 PC- H_2O 有序结构的形成,使反应的微环境发生了很大的变化。胶束中 PC 分子的极性头部对溶液中的 Ca^{2+} 和 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 有局部富集作用,使较近的溶液中的草酸钙的过饱和浓度 S 增大,进而相变驱动力 $-\Delta G = RT \cdot \ln(S/\delta)$ 增大,式中 S 、 δ 分别为过饱和度、饱和度,比较利于能量较高的 COD 生成。前人研究已经表明 COD 与 COM 的 $-\Delta G$ 相差 $2.06\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ^[5]。而离胶束较远处的溶液环境与未形成胶束的溶液相仿。所以,PC- H_2O 胶束有序体系中,沉淀产物的 COM 相对含量虽有增加,但较水溶液中的要少。

当 PC 浓度增大至 $2.5 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,产物中 COD 相对含量又显著增加。此时,将 PC- CaCl_2 -

H_2O 体系取样在偏光显微镜下观察,于暗场下看到了马耳他十字,表明溶液中形成了脂质体。脂质体将 CaCl_2 溶液分隔为许多脂双层的球形小空间,一层 PC 分子极性头部围成凹曲面形成内相,另一层 PC 分子极性头部围成凸曲面朝向外相。脂质体内相的 Ca^{2+} 与 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 作用时,由于双分子层膜的存在,隔室化效应改变了草酸钙晶体的生成环境。文献^[10]中指出对于晶体-溶液体系,溶质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,利于能量较高的晶型生成。因而卵磷脂形成脂质体后,在由 PC 分子极性头部围成的凹曲面所包围的内相中,能量较高的 COD 易于生成。外相的 Ca^{2+} 与 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 作用时,由于 PC 分子的极性头部对它们的局部富集作用,也较利于能量较高的 COD 生成。由此,PC- H_2O 脂质体有序体系中生成的草酸钙晶体 COD 的相对含量有明显地增加。

总之,我们的研究表明,随着体系中加入 PC 量的变化,PC- H_2O 体系所处的聚集状态不同,进而引起该体系中生成的含不同结晶水的草酸钙晶体量的变化。由此可见,PC- H_2O 体系中生成的草酸钙晶体的组成与该体系所处的状态密切相关。

2.2 卵磷脂-水体系中不同反应条件下生成的 CaC_2O_4 晶体的形貌研究

偏光显微镜观察表明:(1)水溶液中,无论高、低离子强度下生成的 CaC_2O_4 晶体颗粒均粗大且不均匀,易聚集在一起(图 2a);(2)低离子强度下,PC 加入后生成的 CaC_2O_4 晶粒变小、分散性也变得很好(图 2b)。

我们认为在 PC- H_2O 体系中所观察到的 PC 对 CaC_2O_4 晶体聚集的阻止作用,在低 PC 浓度时是由于 PC 分子在晶体/溶液界面的吸附。PC 分子吸附在 CaC_2O_4 晶体表面的活性生长点上,形成局部的离散包覆膜,改变溶液的表面张力和固、液的接触角,产生防止草酸钙晶体聚集的效果。当 PC 浓度高时,由于脂质体所提供的各个隔室化的反应微环境,从而防止了草酸钙晶体的聚集。

由图 3a CaC_2O_4 的 X 射线衍射谱图可知, CaC_2O_4 晶体在水溶液中的成核和生长是高度选择性的、有利于 (020) 晶面的形成,从而易形成了锯齿边、狭长形的薄片状晶体(见图 4a)。而在高离子强度下得到的却为一些晶体通过宽晶面互相平行的方式叠合而形成的定向簇状物(见图 4b)。这是因为在

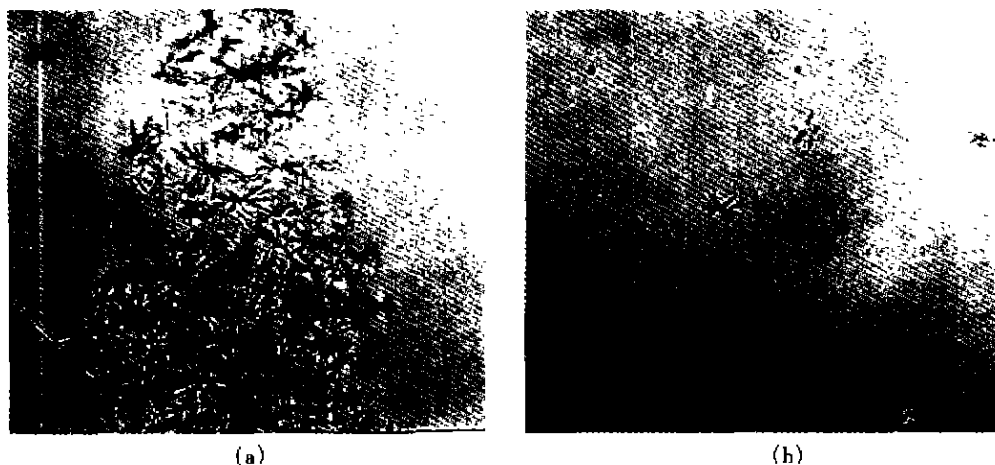
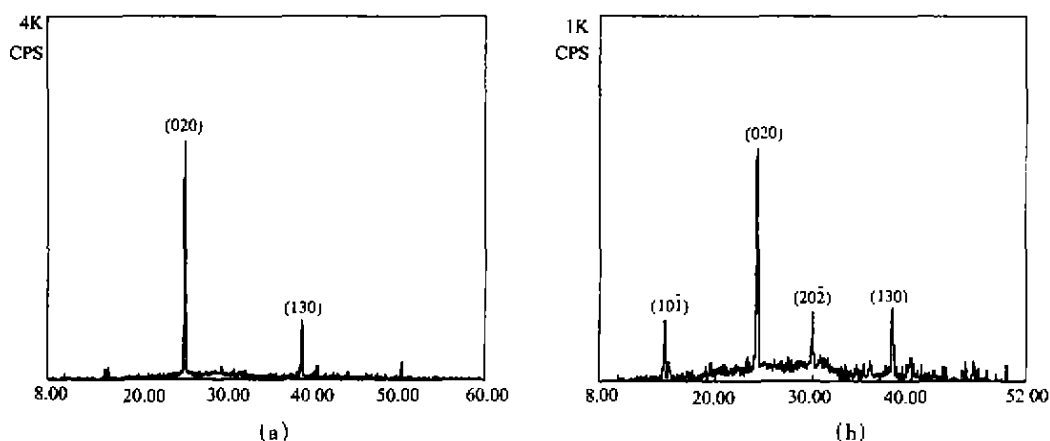


图 2 不同体系中生成的草酸钙晶体的偏光显微照片

Fig. 2 Polarization microphotographs of CaC_2O_4 crystals obtained in different systemsa: CaC_2O_4 obtained in H_2O system ($\times 5000$), b: CaC_2O_4 obtained in $\text{PC-H}_2\text{O}$ system ($\times 5000$)图 3 表 2 中 1-1 号与 2-1 号 CaC_2O_4 样品的 X 射线衍射谱图Fig. 3 XRD spectra of CaC_2O_4

a: No. 1-1, b: No. 2-1

高离子强度下晶体/溶液界面的电解质浓度变大使得表面张力增大, 于是晶体便通过宽晶面互相叠合的方式聚集在一起以最大限度地减少比表面, 从而尽可能降低吉布斯自由能所至。对在低 PC 浓度、低离子强度下所观察到的两层晶体的现象 (见图 4c), 我们认为这是由于 PC 分子吸附在第一层晶体之上从而引起 CaC_2O_4 晶体二次成核引起的。Khan S. R. 等人曾指出细胞膜的磷脂成分, 尤其是酸性磷脂可以充当 CaC_2O_4 晶体的异相成核的模板^[11]。且相分析的结果也证实了此观点有一定的合理性, 图 3b 中 (020) 晶面择优取向的消失即表明该 $\text{PC-H}_2\text{O}$ 体系中 CaC_2O_4 晶体成核和生长机理的改变。鉴于由 PC 分子引起的第二次晶体成核而生成的 CaC_2O_4 晶体在形态上同文献^[12]在电子显微镜下所观察到的

$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 结石的晶体形态的一致性, 我们认为 PC 分子等一些磷脂分子可能参与了草酸钙结石形成的病理学过程。研究发现: 高 PC 浓度、高离子强度下得到的 CaC_2O_4 晶体形态与相同条件下水溶液中生成的晶体形态完全不同, 为外形似蝴蝶状的簇晶 (见图 4d); 对产物所做的相分析结果表明于 (020) 晶面的择优取向消失。这应该在于脂质体有序结构的形成, 由脂双分子层膜所提供的隔室化的反应微环境改变了 CaC_2O_4 晶体的成核和生长机理所致。

本文的研究结果表明草酸钙晶体的成核、生长、聚集以及晶型、形貌等对 $\text{PC-H}_2\text{O}$ 体系所处的状态存在着复杂的依存性。前人的大量研究表明草酸钙晶体的生长、聚集、二次成核等是尿结石形成过程中

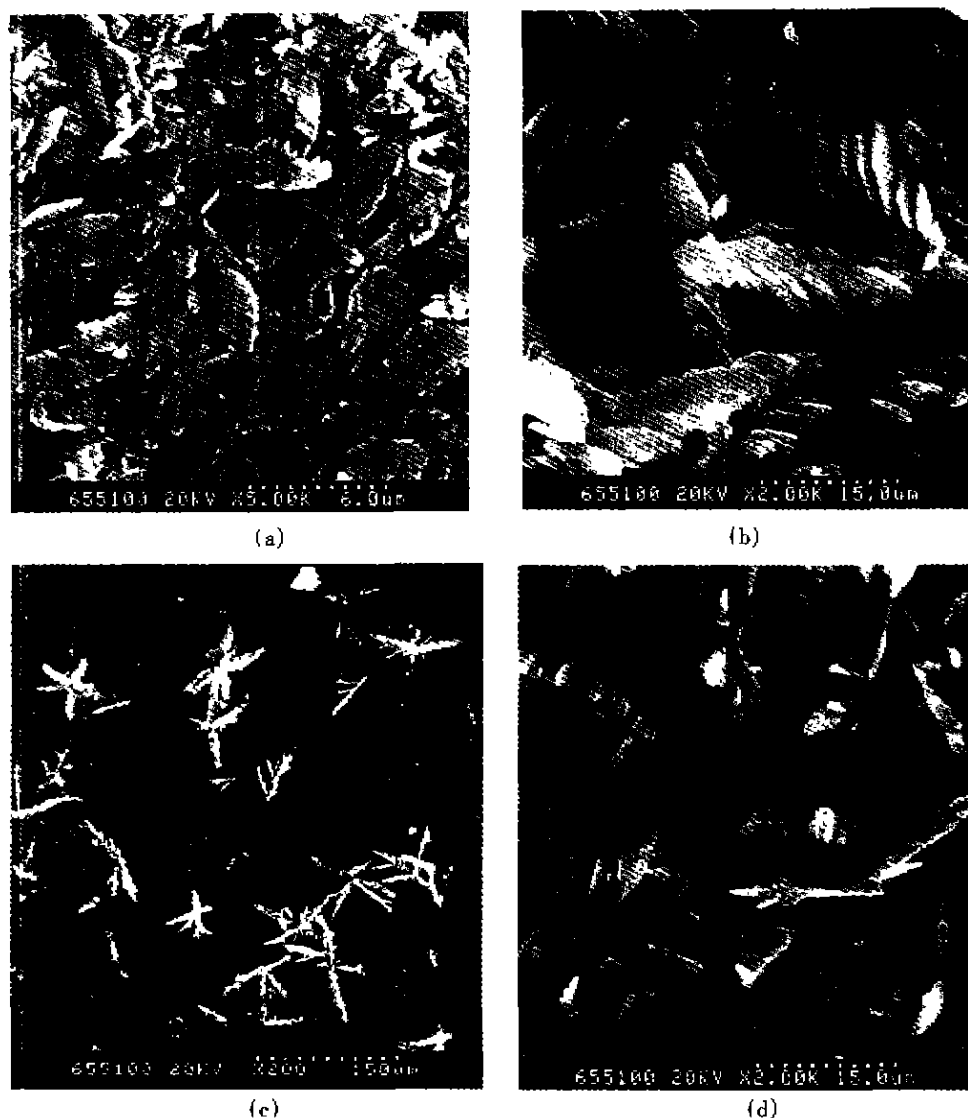


图4 不同体系中不同反应条件下生成的草酸钙晶体扫描电镜图片

Fig. 4 Scanning electron micrograph of CaC_2O_4 obtained in different systems under different reaction conditions

a: H_2O system (low ionic strength), b: H_2O system (high ionic strength),

c: PC- H_2O system ($C_{\text{PC}} < \text{CMC}$, low ionic strength), d: PC- H_2O system ($C_{\text{PC}} > \text{CMC}$, high ionic strength)

至关重要的几步,所以文中所观察到的 PC- H_2O 体系中对草酸钙晶体聚集的阻止作用、PC 分子引起草酸钙晶体二次成核的现象以及对草酸钙晶体尺寸的控制作用,从生物医学的观点看可能对于寻求治疗尿石病的新方法有一定帮助和启发。

参 考 文 献

- [1] Skrtic D., Filipovic-Vincekovic N. *J. Crystal Growth*, 1988, 88, 313.
- [2] Skrtic D., Filipovic-Vincekovic N., Babic-Ivancic V. *J. Crystal Growth*, 1992, 121, 197.
- [3] Skrtic D., Filipovic-Vincekovic N., Babic-Ivancic V., Tusek-Bozic Lj. *J. Crystal Growth*, 1993, 133, 189.
- [4] HUANG Sheng-Tao (黄胜涛) *X-Ray Diffractometry of Solid* (固体 X 射线衍射学(一)), Beijing: Higher Education Press, 1985, p214.
- [5] Tomazic B., Nancollas G. H. *J. Colloid Interface Sci.*, 1980, 75, 149.
- [6] Sung-Tsuen Liu *J. Urol.*, 1982, 127, 351.
- [7] Sheehan M. E., Nancollas G. H. *J. Urol.*, 1984, 132, 158.
- [8] YAO Song-Nian (姚松年), CAO Lian-Xin (曹连欣), PAN Dong-Jun (潘东俊) *Wuli Huaxue Xuebao (Acta Physico)*

- Chimica Sinica*), 1993, 9(5), 713. (童 华) *Wuji Huaxue Xuebao (Chinese J. Inorg. Chem.)*, 1999, 15(3), 341.
- [9] Sikes C. S. *Corrosion*, NACE International Publishers, 1995, p26 ~ 31. [11] Khan S. R. *J. Crystal Growth*, 1993, 134, 211.
- [10] WU Bing(吴 冰), YAO Song-Nian(姚松年), TONG Hua [12] Ogbuji L. U., Finlayson B. *Invest. Urol.*, 1981, 19(3), 182.

The Study of Mimetic Biomineralization of Calcium Oxalate in PC-H₂O System

LI Xia YAO Song-Nian*

(Center of Analysis and Measurement, Wuhan University, Wuhuan 430072)

In this paper, the mimetic biomineralization of CaC₂O₄ in lecithin-water(PC-H₂O) ordered systems has been discussed. First, the effect of the aggregation state of PC aqueous solutions on the crystal structure of CaC₂O₄ has been studied. In all experiments, the only precipitated crystal forms obtained are calcium oxalate monohydrate (COM) and calcium oxalate dihydrate(COD). It have been shown that the relative amount of COD in PC-H₂O systems is much higher than that of in H₂O system, and furthermore the aggregation state of PC influences the composition of coprecipitations to some extent. When PC distributing in aqueous solution as single molecules, it acts as inhibitor of COM, and then favors the formation of COD. While PC in micelle existence, the relative amount of COM increases, but is still lower than that of in H₂O system. And when PC aggregates as vesicles, COD forms predominantly. Second, the morphology of CaC₂O₄ obtained in different reaction systems under different conditions has been also investigated. In H₂O system, we observed thin, plate-like crystals with serrated edges under IS_L(low ionic strength) condition and oriented clusters under IS_H(high ionic strength) condition. Crystals with two layers arrangement were obtained in micelle ordered PC-H₂O system under IS_L condition. And in vesicle ordered PC-H₂O system, clusters with butterfly-like shape were observed. The results obtained revealed a complex dependence of calcium oxalate formation, crystal growth, structure and morphology on the aggregation state of PC-H₂O systems.

Keywords: lecithin calcium oxalate calcium oxalate monohydrate calcium oxalate dihydrate