

研究简报

凝胶扩散体系中磷酸钙的沉淀图形

杨展澜* 贾会珍 孙颖 王岩 周勇 吴瑾光

(北京大学化学与分子工程学院化学生物学系, 稀土材料化学应用国家重点实验室, 北京 100871)

关键词: 磷酸钙 凝胶 沉淀图形 红外光谱 生物矿化
 分类号: O611.6 O648.1

0 引言

生物矿化可分为正常矿化和异常矿化。胆结石是一种生物异常矿化, 是世界性的常见病和多发病, 形成机理尚不十分清楚。从结石的形成过程来看, 不仅结石的组成与其形成机理有关, 而且结石的组成分布和剖面图形同样与之有密切关系。人们经常可以观察到, 一类结石的剖面具有周期环状图形, 且棕色和乳白色环相间。其中白色环的主要成份为胆固醇; 棕色环的主要成份为胆红素钙络合物, 同时棕色环中还常常含有少量的磷酸钙和碳酸钙等无机难溶盐。由于结石的形成是一个长期的过程, 研究表明在结石生长的过程中胆汁的组成不发生规律性的周期变化, 那么结石中这种规律性周期变化的图形是如何产生的呢? 为此我们曾对脱氧胆酸金属络合物沉淀图形的生长进行了研究, 研究结果表明在凝胶扩散体系中脱氧胆酸金属络合物沉淀可以形成分形和周期环状的规律性沉淀图形^[1-3], 并且溶液的组成、离子强度、沉淀的溶解度、离子的扩散方式和沉淀成核的速度均对图形的生长产生影响。然而在胆结石中胆汁酸金属络合物很少见, 常见的是磷酸钙、碳酸钙等无机难溶盐。此外在我们以往的研究中发现很难生长出胆红素钙沉淀的周期环状图形。Christa 等的研究结果表明^[4], 游离胆红素能够很快地与无定形磷酸钙(也就是新生成的磷酸钙)作用, 并且在明胶介质中磷酸钙能够形成 Liesegang's Rings 沉淀图形。由于结石形成的初期是在胆囊或

胆管的粘膜层产生的, 那么在类似的凝胶介质中是否容易形成磷酸钙的 Liesegang's Rings 沉淀图形呢? 胆汁的主要特征成份胆盐又如何影响沉淀图形的生长呢? 本文在琼脂胶扩散体系中研究了磷酸钙沉淀图形的生长, 并利用傅立叶变换红外光谱研究了胆盐对磷酸钙沉淀图形生长的影响。

1 实验部分

1.1 试剂

脱氧胆酸钠(NaDC)为 Serva 公司产品进口分装, 生化试剂, 纯度 98%。胆酸钠(NaC)和牛磺胆酸钠(NaTC)为 Sigma 公司产品, 生化试剂, 纯度 98%。氯化钙和磷酸氢二钠为分析纯试剂。

1.2 沉淀图形的生成

胆汁在胆囊尤其在胆管中处于流动状态, 为了模拟在胆囊和胆管中沉淀的形成, 我们设计了一维试管扩散实验模型(见图1)。考虑到胆结石通常在胆管或胆囊的粘膜层形成, 而粘膜层是由糖蛋白组成的凝胶体, 因而选择了琼脂胶作为介质。我们把试管分为三层, 下层(2mL)放入磷酸氢二钠浓度为 $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1% 琼脂胶 ($0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 是胆汁中 HPO_4^{2-} 的存在浓度), 中层(2mL)放入 1% 空白琼脂胶, 上层(1mL)放入氯化钙溶液(浓度分别为: $0.3, 0.1, 0.05, 0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。形成氯化钙-磷酸氢二钠的一维离子扩散体系, 当钙离子与磷酸氢根离子相遇时产生沉淀, 并随钙离子浓度的改变产生不同的沉淀图形。

收稿日期: 2001-12-24。收修改稿日期: 2002-03-06。

教育部高等学校骨干教师资助计划项目和国家自然科学基金资助项目(No. 20171004)。

* 通讯联系人。E-mail: yzl@chem.pku.edu.cn

第一作者: 杨展澜, 女, 41岁, 博士学位, 讲师; 研究方向: 生物无机化学。

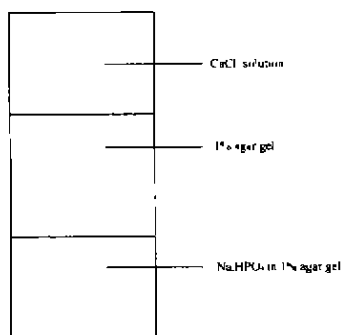


图 1 一维试管实验的模型图

Fig. 1 Model of one dimension tube experiment

为了观察胆盐对磷酸钙沉淀图形生长的影响, 在试管的下层同时加入了磷酸氢二钠和胆盐 (分别为: NaTC、NaC 和 NaDC), 胆盐的浓度为 $0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0.02\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 是人体胆汁中胆盐的平均浓度), 与上层的钙离子形成扩散体系。

1.3 显微红外光谱分析

将沉淀从试管中取出经热水洗涤处理后, 过滤, 把分离出来的沉淀放在金刚石样品池上, 用 Nicolet Magna 750- II 型傅立叶变换红外光谱仪的 Nic-Plan 红外显微镜测定红外光谱。分辨率: 4cm^{-1} , 扫描范围: $4000 \sim 650\text{cm}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 沉淀图形的生成

首先观察了磷酸氢二钠 - 氯化钙体系沉淀生长的情况。随即又观察了在下层凝胶中分别加入 NaTC、NaDC 和 NaC 后, 三个体系中沉淀图形的生长。观察结果发现, 60 天后四个体系中的沉淀图形均不再发生改变。表 1 列出了 60 天后不同体系中钙离子起始浓度不同时所形成的沉淀图形。从图 1 中不难看出, 在磷酸氢二钠与氯化钙组成的琼脂胶扩散体系中生成了周期环状沉淀图形。不同类型胆盐的加入对沉淀图形的形状有影响。加入 NaTC 后, 沉淀图形仍为周期环状图形与未加入胆盐的类似; 加入 NaDC 后, 沉淀图形为周期环状、粒状与连续图形的混合图形, 周期环加宽; 加入 NaC 后, 沉淀图形为周期环状与球状图形的混合图形, 周期环加宽。上述结果表明, NaTC 的加入不改变沉淀图形, 而 NaC 和 NaDC 的加入使沉淀图形发生改变。

2.2 钙离子浓度对沉淀图形生长的影响

从图 2 可以明显地看出, 当钙离子浓度较大时

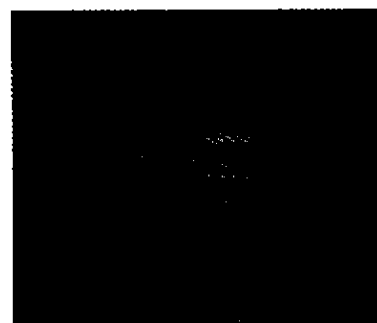
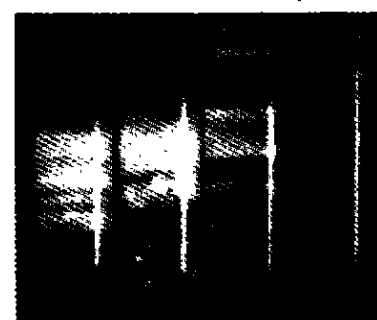
CaCl₂-Na₂HPO₄ systemCaCl₂-Na₂HPO₄/NaTC systemCaCl₂-Na₂HPO₄/NaDC systemCaCl₂-Na₂HPO₄/NaC system

图 2 扩散 60 天后的沉淀图形

Fig. 2 Patterns of the precipitation after 60 days
The concentrations of CaCl₂ from left to right:
0.3, 0.1, 0.05 and 0.01 mol · L⁻¹

($0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、(1) 由于体系中离子梯度大, 扩散快, 因此沉淀图形的形成速度快, 不易观察沉淀形成的过程; (2) 由于钙离子浓度大造成沉淀量较大, 沉

表1 60天后形成的沉淀图形

Table 1 Patterns of Precipitates in Different Systems after 60 Days

concentration of CaCl_2	$0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ system	periodic rings	periodic rings	periodic rings	periodic rings
$\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaTC}$ system	periodic rings	periodic rings	periodic rings	periodic rings
$\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaDC}$ system	periodic rings + continuous	periodic rings + continuous	periodic rings + continuous	periodic rings + continuous + granule
$\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaC}$ system	periodic rings + spheroid	periodic rings + spheroid	periodic rings + spheroid	periodic rings + spheroid

淀图形致密,不易观察图形的结构。尤其在 $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaDC}$ 体系中,由于连续沉淀很致密,以至于很难观察到其中的周期环状沉淀。当钙离子浓度较小时($0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), (1)由于体系中钙离子的离子梯度小,扩散速度慢,形成沉淀图形的时间过长; (2)钙离子浓度低,沉淀量少,不易观察到完整的沉淀图形。如在 $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 体系中,只能观察到一个环的形成。因此从图形的完整性、清晰度和沉淀图形形成的周期考虑,我们认为钙离子的起始浓度控制在 $0.05 \sim 0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较适宜。

2.3 沉淀图形随时间的改变

我们选择了钙离子浓度为 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的四个体系,随着生长时间的延长,对沉淀图形的变化进行了仔细的观察,结果见表2。 $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 体系中,扩散5天后产生周期环状沉淀图形,且图形60天后仍不变; $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaTC}$ 体系中,扩散8天后才产生周期环状沉淀图形,与上一体系相比沉淀产生的时间延缓了3天,同样图形60天后仍不变,并且图形与 $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 体系的非常相似; $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaDC}$ 体系中,扩散5天后产生连续的沉淀图形,扩散30天后在连续图形上产生周期环状图形,45天后在试管的底部出现粒状沉淀; $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaC}$ 体系中,扩散8天后产生周期环状沉淀图形,30天后又出现球状沉淀图形。

由此可见,NaTC的加入虽然不改变沉淀的图形,但延缓了沉淀产生的时间;NaDC的加入虽然没有延缓沉淀产生的时间,但首先产生的是连续沉淀图形;NaC的加入既延缓了沉淀产生的时间,同时也产生了新的沉淀图形。

我们将60天定型后图形中的沉淀经热水洗涤3次,红外光谱测定表明得到不含琼脂凝胶的沉淀组分,进行FT-IR光谱分析。光谱中特征谱带数据列于表3,其中PO伸缩振动谱带的峰位是通过二阶导数谱及必要的分峰得到的。从中可以看到四个体系的环状沉淀中都出现了典型的PO伸缩振动谱带,表明形成环状沉淀的主要成分均为磷酸钙。从谱图中可以看到它们之间存在着很大的差别。(1)其中加入胆盐的体系(即分别加入NaTC、NaDC和NaC的体系),在 3570cm^{-1} 附近均出现了羟基磷灰石特征的OH伸缩振动谱带,而未加胆盐体系的光谱中未观察到 3570cm^{-1} 附近的峰。并且加NaTC的体系中,该谱带的相对强度明显高于加NaDC和NaC的体系。(2)在特征PO伸缩振动区,不同体系环状沉淀的PO伸缩振动谱带的频率相近(见表3),但谱带形状不同(见图3),并且与羟基磷灰石有很大差别。其中 1030cm^{-1} 处为 PO_4^{3-} 中PO的伸缩振动谱带, 1120cm^{-1} 处为 HPO_4^{2-} 中PO的伸缩振动谱带^[5],由于这两条谱带强度的差别使四个体系环状沉淀在PO伸缩振动区的谱图各不相同。由此可见,胆盐的加入不仅影响沉淀的图形,同时影响沉淀的组成,使四个体系的环状沉淀中羟基磷灰石、 PO_4^{3-} 和 HPO_4^{2-} 的比例不同。研究表明在中性和碱性溶液中 PO_4^{3-} 和 HPO_4^{2-} 含量不定的无定形磷酸钙是形成羟基磷灰石的前驱体,如三钙磷酸盐和八钙磷酸盐等^[6]。图中四个体系中环状沉淀PO伸缩振动区谱图的变化表明,胆盐的加入改变了无定形磷酸钙前驱体中 PO_4^{3-} 与 HPO_4^{2-} 的比例,从而影响磷酸钙前驱体向羟基磷灰石的转变。

表2 沉淀图形随生长时间的改变(钙离子浓度为 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)Table 2 Changes of Precipitate Patterns in Different Systems with Growth Time when the Concentration of CaCl_2 is $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

growth time	5 days	8 days	30 days	60 days
$\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ system	periodic rings	periodic rings	periodic rings	periodic rings
$\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaTC}$ system	—	periodic rings	periodic rings	periodic rings
$\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaDC}$ system	continuous	continuous	periodic rings + continuous	periodic rings + continuous + granule
$\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaC}$ system	—	periodic rings	periodic rings + spheroid	periodic rings + spheroid

表 3 四个体系中不同图形沉淀的红外光谱特征谱带数据(钙离子浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)Table 3 FTIR Data of Precipitates in Four Systems when $[\text{Ca}^{2+}]$ is $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (cm^{-1})

assignment	OH	COO ⁻	PO	PO	PO	PO
hydroxyapatite	3572	—	—	1091	1024	963
model 1 -periodic precipitate	—	—	1114	1086	1022	959
model 2 -periodic precipitate	3571	—	1112	1089	1026	962
model 3 -periodic precipitate	3569	—	1116	1094	1027	960
model 4 -periodic precipitate	3569	—	1119	1091	1026	961
$\text{Ca}(\text{DC})_2$ complex	—	1552	—	—	—	—
model 3 -continuous precipitate	—	1550	—	—	—	—
CaC_2 complex	—	1551	—	—	—	—
model 4 -spheroid precipitate	—	1556	—	—	—	—

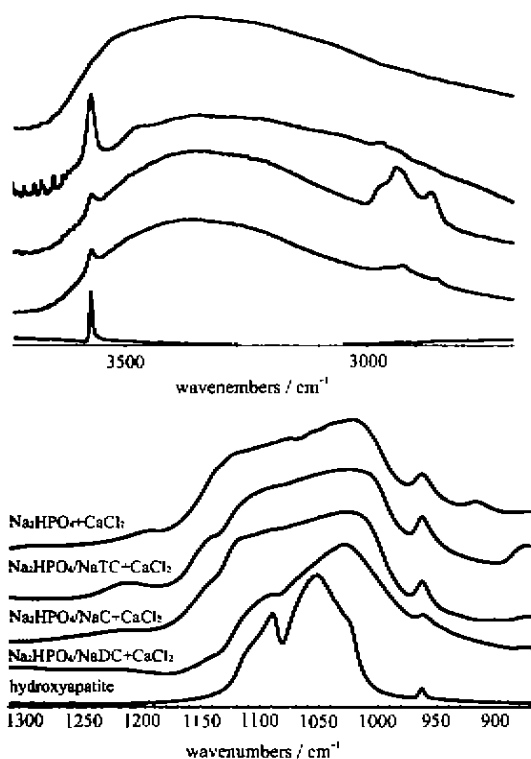
model 1: $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ system; model 2: $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaTC}$ system;model 3: $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaDC}$ system; model 4: $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaC}$ system

图 3 四个体系中环状沉淀在 OH 和 PO 伸缩振动区的红外光谱图

Fig. 3 IR spectra of the OH and PO stretching vibration region for the ring precipitates in four systems

从表 3 中还可以看到, $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaDC}$ 体系中连续和粒状沉淀为脱氧胆酸钙络合物; 而 $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaC}$ 体系中的球状沉淀则为胆酸钙络合物。

综合上述分析结果可以得到如下结论:

(1) $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 琼脂胶扩散体系中可以形成组成为磷酸钙的周期环状沉淀图形, 并且在胆汁

中 HPO_4^{2-} 的存在浓度下, Ca^{2+} 在 $0.3 \sim 0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内均可以明显地观察到周期环状沉淀图形形成和生长的过程。

(2) 胆汁的特征成分胆盐的加入不仅改变沉淀产生的时间, 而且改变沉淀的图形和组成。由于结构上的相似性, 导致 NaTC 与 NaC 对磷酸钙周期环状沉淀图形生长的影响有类似的作用, 同时还说明三羟基胆盐与二羟基胆盐由于结构上的差别对磷酸钙的沉淀和图形生长的影响迥然不同。

(3) 胆盐的加入影响磷酸钙沉淀的组成。无胆盐存在时, 无定形的磷酸钙前驱体不易转化为羟基磷灰石。而加入胆盐后, 有利于这一转变, 尤其是 NaTC 的加入使磷酸钙更容易转变为羟基磷灰石。原因是胆盐的加入改变了无定形磷酸钙前驱体中 PO_4^{3-} 与 HPO_4^{2-} 的比例, 从而使其更容易转化为羟基磷灰石。因此, 虽然胆盐的加入可以延缓磷酸钙沉淀的产生, 但是一旦体系中形成了磷酸钙沉淀则有利于磷酸钙向羟基磷灰石的转化, 是胆石中磷酸钙多以羟基磷灰石形式存在的原因。

参 考 文 献

- [1] Xie Datao, Wu Jinguang, Xu Guangxian, Qi Ouyang, Soloway R. D., Hu Tiandou. *J. Phys. Chem. B*, 1999, 103 (40), 8602.
- [2] Peng Q., Wu J. G., Soloway R. D., Hu T. D., Huang W. D., Xu X. Z., Wang L. B., Li X. F., Li W. H., Xu D. F., Xu G. X. *Biospectroscopy*, 1997, 3(3), 195.
- [3] Li Xiao-Feng(李晓峰), Soloway R. D., Wu Jin-Guang(吴瑾光), Xu Guang-Xian(徐光宪). *Zhongguo Kexue B (Science in China (Series B))*, 1996, 26(1), 52.

- [4] Christa N. V., Berry S., Roelof M., Albert K. G., Peter L. M. J., Ronald P. J. O. E. *J. Lipid Res.*, **1995**, **36**, 1697. [6] Meyer J. L. *Croat Chem. Acta*, **1983**, **56**, 753.
- [5] Paola T., Anna T., Giorgio B., Alessandro B. *Biopolymers*

The Growth Patterns of Calcium Phosphate Precipitation in Gel System

YANG Zhan-Lan* JIA Hui-Zhen SUN Ying WANG Yan ZHOU Yong WU Jin-Guang

(State key Laboratory of Rare Earth Material Chemistry and Applications, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

The formation and growth of calcium phosphate precipitation pattern were investigated in agar gel system. As an important biologic surfactant, the influence of bile salts on the patterns and composition of calcium phosphate precipitation was discussed. The results indicated that calcium phosphate precipitation shaped the periodic ring pattern in agar gel system. Addition of bile salts will postpone the creation of the periodic ring pattern of calcium phosphate precipitation. NaTC only postponed the creation but not changed the pattern of it. NaC and NaDC not only postponed the creation but also changed the pattern of it. The results of FT-IR spectroscopy demonstrated that NaTC have promoted the transformation of calcium phosphate to hydroxyapatite.