

亚相 pH 对气水界面上 VE/DPPC 单分子膜的影响

莫凤奎 朱治方

(沈阳药科大学基础部, 沈阳 110015)

摘要 通过表面压-分子面积等温线(π -A 线)的测定,考察了亚相 pH 对气水界面上的维生素 E(VE)/二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)单分子膜的影响. 亚相 pH 降低不改变 DPPC 单分子膜的崩裂压,但使 VE 单分子膜的崩裂压明显增大;不改变 VE 单分子膜的平均分子面积,但使 DPPC 单分子膜凝缩. 低表面压下, VE 对 DPPC 单分子膜的膨胀作用在纯水上很小,在 pH 为 1 的亚相上则很明显. 这提示在低 pH 的亚相上, VE/DPPC 单分子膜中的极性头基间的相互作用对膜性质有着重要的影响.

关键词: 维生素 E(VE), 二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC), 单分子膜, 亚相 pH

Almog 等曾指出,亚相 pH 明显地影响气水界面上 DPPC 单分子膜的性质^[1],当 pH<2 时,膜随 pH 降低而凝缩. pH>11.5 时,膜随 pH 增大而膨胀. 我们在研究磷脂和 VE 单分子膜时,也观察到同样的现象. VE(图 1)与磷脂一样是生物膜不可缺少的物质,气水界面的单分子膜则是研究生物膜的一种较好的模型^[2]. 考虑到生物体内各部位 pH 的不同^[3],我们测定了在 pH 不同的亚相上的 VE、DPPC 单分子膜及 VE/DPPC 混合单分子膜的 π -A 线,以考察亚相 pH 对 VE 与磷脂混合单分子膜的影响,为研究磷脂和 VE 的生物作用提供参考.

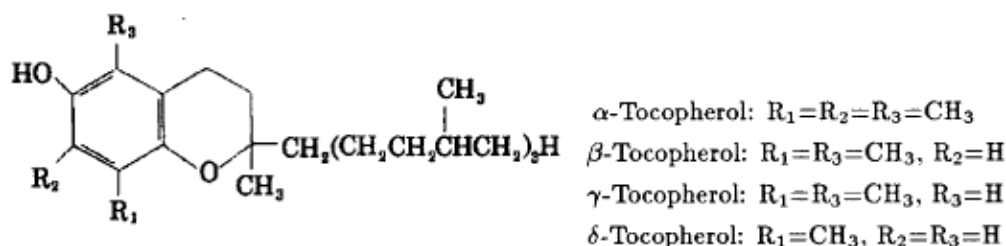


图 1 维生素 E

Fig.1 Vitamin E

1 材料与方法

d- α -生育酚即 VE,日本 Eisai 公司(东京)赠品(纯度 99.6%,质量分数). DPPC,日本和光纯药工业公司(大阪)产品(通过 TLC 测试). 表面压用 Wilhelmy 方法测定. 单分子膜用 100 μ L 注射器将试样的高纯氯仿溶液铺展在亚相上制得. 亚相为纯水(pH=5.5)或不同浓度的 HCl 水溶

液. 膜压缩速率为 $0.1\text{\AA}^2\cdot\text{molecule}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 所有实验均在 $(21\pm 0.1)\text{ }^\circ\text{C}$ 避光条件下进行. 每个样品至少重复测定两次, 表面压的重现性为 $\pm 0.3\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

2 结果与讨论

2.1 VE 单分子膜

纯水和 pH 分别为 4.0, 3.0, 1.0 的 HCl 水溶液表面的 VE 单分子膜的 π -A 线示于图 2. 由图可知随着亚相 HCl 浓度的增大, 崩裂压逐渐增大, 但膜中每分子所占表面积不变. 把亚相由 HCl 水溶液换成相应浓度的 NaCl 水溶液, 所得 π -A 线均与纯水为亚相时完全相同. 这表明 VE 单分子膜的性质随亚相 HCl 浓度的改变系由氢离子所引起. 我们曾推断, 由于 VE 的头基小且极性较弱, 与亚相水分子的相互作用较小, 当纯水表面上的 VE 单分子膜的表面压增大到一定程度时, 将有部分 VE 分子被挤出膜外, 在水面上堆积为多层^[4,5]. 亚相氢离子浓度增大导致 VE 分子与亚相作用的增强, VE 分子不再因易于离开水面而被挤出膜外, 膜变得更加稳定, 反映为崩裂压的升高. 图 2 所示结果证实了这些推断. 纯水中的 VE 膜崩裂后的 π -A 线为斜线, 应用相律于此二维膜体系^[6,7], 可知膜崩裂后仍为单相, 我们认为是 VE 在水面上的多层相. $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸上的 VE 膜崩裂后的 π -A 线则近似为水平线, 表明崩裂后膜相和体相 (bulk phase) 共存. 这可能是在亚相氢离子的作用下, VE 的色满羟基极性增强的结果. 因为头基极性的增强有利于体相核的形成^[8].

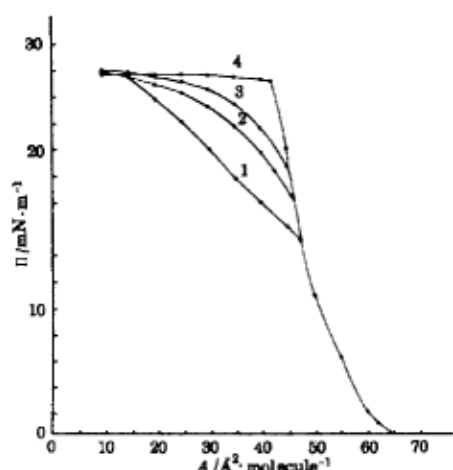


图 2 亚相 pH 分别为 5.5(1), 4.0(2), 3.0(3), 1.0(4) 的 VE 单分子膜的 π -A 线

Fig.2 π -A isotherms of VE monolayers on the subphases at pH 5.5(1), pH 4.0(2), pH 3.0(3), and pH 1.0(4)

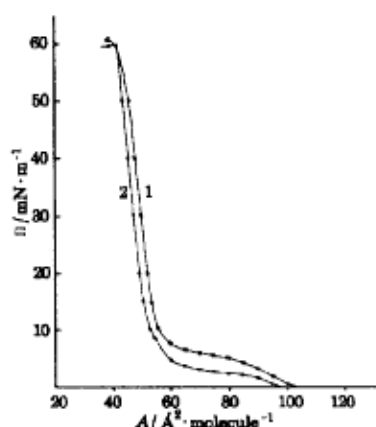


图 3 纯水和 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 水溶液上的 DPPC 单分子膜的 π -A 线

Fig.3 π -A isotherms of DPPC monolayers on pure water(1) and $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl(2)

2.2 DPPC 单分子膜

纯水和 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 水溶液上的 DPPC 单分子膜的 π -A 线示于图 3. 比较两条 π -A 线, 可以发现亚相 pH 的降低不改变膜的崩裂压, 但使膜凝缩. 据 Almog 等^[1]的解释, 这是因为在接近中性的 pH 条件下, DPPC 分子中的磷酸根带有负电荷, 分子间较强的静电排斥作用迫使胆碱基采取垂直于碳氢链, 平行于膜面的旁式构型, 从而每个分子在膜中占有较大的面积. 在低 pH

条件下, 磷酸根的负电荷被亚相中的氢离子所中和, DPPC 分子间的静电排斥减弱, 胆碱基倾向于伸入水中而采取平行于碳氢链, 垂直于膜面的构型, 膜中每个分子所占面积随之减小. 但我们也注意到, 亚相 pH 降低引起的膜凝缩作用与表面压有关. 由图 3 可知, 亚相 pH 降低引起的膜凝缩作用在膜发生由液态膨胀态 (Le 态) 到液态凝缩态 (Lc 态) 的相变时 (表面压 $2 \sim 8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) 最为明显. 纯水和 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 溶液上的 DPPC 膜发生这一相变的表面压范围分别约为 $4 \sim 8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 和 $1.5 \sim 5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, 相变前后分子平均面积的改变分别约为 28 \AA^2 和 39 \AA^2 . Blume 等通过对磷脂单分子膜等压线的考察指出, 磷脂单分子膜相变前后平均分子面积的改变等相变行为主要决定于磷脂极性头基的性质^[2]. 我们的实验结果与这一结论相一致, 因为亚相中的 H^+ 离子不可能与碳氢链产生直接的相互作用. Almog 等^[1]指出, 膜由 Le 态转变为 Lc 态时, DPPC 分子的构象由有利于分子内相互作用转变为有利于分子间相互作用. 根据水合磷脂晶体的 X-射线衍射数据^[9,10], 这种分子间相互作用主要是氢键. 显然, 亚相 pH 的降低导致了这种氢键相互作用的增强, 从而降低了由 Le 态到 Lc 态的相变压, 膜变得更为凝缩. 在低表面压下 ($< 2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), 两种亚相上的膜均处于 Le 态, 分子间距离很大, 头基构型的改变不足以影响膜中分子的平均占有面积. 此时亚相 pH 降低引起的膜的较小凝缩, 看来应是分子间静电排斥这种长程力的减小所致. 在高表面压下 ($> 10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), 两种亚相上的膜均处于 Lc 态, 它相当于含水大块磷脂的 $\text{L}\beta'$

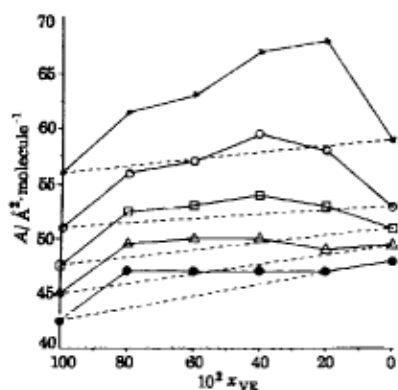


图 4 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 溶液上的 VE/DPPC 混合单分子膜在不同表面压下的平均分子面积

Fig.4 Mean molecule area of VE/DPPC mixed monolayer on the solution of $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HCl}$ at different surface pressure ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)
5(\times), 10(\circ), 15(\square), 20(\triangle), 25(\bullet)

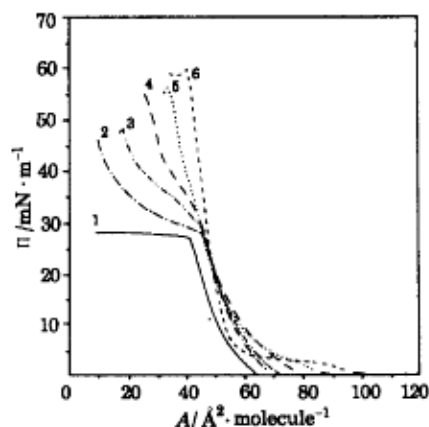


图 5 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 水溶液上的 VE/DPPC 单分子膜的 π -A 线

Fig.5 π -A isotherms of VE/DPPC monolayers on the $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HCl}$
The mole fractions of VE were 0(1), 0.20(2), 0.40(3), 0.60(4), 0.80(5), and 1.00(6) respectively.

胶态 (分子平均表面积 $48 \sim 52 \text{ \AA}^2$) 或晶态 (分子平均表面积 41 \AA^2). 这种状态下, 已不允许磷酸胆碱基采取完全平行于脂水界面的构型^[9]. Pearson 等^[10]对二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱 (DMPC, 碳氢链比 DPPC 少两个亚甲基) 的 X-射线研究表明, 二水合 DMPC 晶体中, 分子以双层结构排列, 层内和层间相邻磷脂酰胆碱基团通过水分子以氢键相连, 形成一种锯齿 (zigzag) 形氢键带 (ribbon). 由于这种特殊的氢键, 晶胞中一对近似互为镜象的 DMPC 分子的磷酸胆碱头基分别相

对于脂水界面倾斜 17° 和 27° 、且沿碳氢链方向相对位移 2.5\AA ，从而层面变为波形。这种结构相当于磷脂双层的 $P\beta'$ 态^[11]，允许分子占有较小的层表面积 (38.9\AA^2)。气水界面的单分子膜相当于双层结构的一半，但它不存在层间极性基团的相互作用，因此可以预期分子在单分子膜中的平均分子面积比在双层中大。亚相中存在较多的 H^+ 时，可能产生一种类似于层间氢键的相互作用，进而也形成一种波形膜，导致膜中每分子占有面积的减小。这可能是高表面压下，亚相 pH 降低引起膜的较小凝缩的原因，有待于实验（例如 X-射线小角衍射）的证实。至于亚相 pH 的增大并不改变膜的崩裂压的事实，可能是在约 $60\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 这样高的表面压下，两种亚相上的 DPPC 分子的极性头基构型趋于一致的结果。

2.3 VE 与 DPPC 混合单分子膜

表 1 给出表面压分别为 $5.0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 和 $10.0\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 时，在 pH 分别为 5.5 和 1.0 的亚相上铺展的 VE/DPPC 混合单分子膜的平均分子面积及其差值 ΔA 。可以发现，在 $5\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 时，亚相 H^+ 浓度增大引起的膜凝缩随 VE 浓度的增加而减小。显然，进入 DPPC 膜的 VE 分子起着一种使膜膨胀的作用。这种趋势在较高表面压（大于 $10\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ）下同样存在。图 4 给出在 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液上，不同浓度的 VE/DPPC 混合单分子膜在不同表面压下的平均分子面积。图中虚线表示假定膜中 VE 与 DPPC 处于理想混合状态时的平均分子面积，实线表示实测平均分子面积。它

表 1 VE/DPPC 混合单分子膜的平均分子面积

Table 1 Mean area per molecule of VE/DPPC mixed monolayer ($\text{\AA}^2\cdot\text{molecule}^{-1}$)

mole ratio of VE(%)	$5\text{m}\cdot\text{mN}^{-1}$			$10\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$		
	$A_1^{\text{a)}}$	$A_2^{\text{b)}}$	$\Delta A^{\text{c)}}$	$A_1^{\text{a)}}$	$A_2^{\text{b)}}$	$\Delta A^{\text{c)}}$
0.0	81.0	59.0	22.0	55.0	53.0	2.0
20.0	76.0	68.0	8.0	64.0	58.0	6.0
40.0	72.0	67.0	5.0	62.0	59.0	2.5
60.0	67.5	63.0	4.5	60.0	57.0	3.0
80.0	62.0	61.5	0.5	56.0	56.0	0.0
100.0	56.0	56.0	0.0	51.0	51.0	0.0

a) pH of the subphase was 5.5; b) pH of the subphase was 1.0; c) $\Delta A = A_1 - A_2$

清楚地表明，VE/DPPC 单分子膜的平均分子面积相对于理想混合存在正偏差，即 VE 的混入导致了 DPPC 膜的膨胀。这种膨胀作用对于纯水上的 VE/DPPC 混合单分子膜同样存在，但是膨胀作用随表面压的变化趋势有所不同。表 2 和表 3 分别给出在不同表面压下，纯水和 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 溶液上的 VE/DPPC 混合单分子膜的分子表面积对理想混合的加和性原则^[12] 的偏离 ΔA 。

$$\Delta A = A_e - A_i$$

式中 A_e 为实测表面积， A_i 为根据加和性原则计算的表面积。

$$A_i = x_1 A_1 + x_2 A_2$$

式中 x_1 、 x_2 分别表示膜中两个组分的摩尔分数， A_1 、 A_2 分别表示两个纯组分独自成膜时的分子表面积。由于纯水上的 VE 单分子膜在表面压大于 $15\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 时已经崩裂，所以表 3 只给出了表面压小于 $15\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 时的数据。可以看出，在两种亚相上，VE/DPPC 混合单分子膜的分

子表面积均对加和性原则产生正偏差, 即两种亚相上的 DPPC 膜均因 VE 的混入而膨胀. 在纯水上, 低表面压时膨胀作用很小, 随着表面压的增大, 膨胀作用迅速增大, 超过一定表面压后, 膨胀作用又变小. 我们曾指出^[5], 这是随着表面压的增大, 膜中 DPPC 分子的有序排列趋于更加紧密, VE 分子因自身构型的相应变化, 对这种有序排列的干扰由弱而强而再弱所致. 亚相为 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸时, 膨胀作用在低表面压下很大, 表面压增大则减小, 并不经历由小到大再变小的变化. 显然, 在低表面压下, 亚相氢离子对 VE/DPPC 单分子膜的性质有重要的影响. 它使 VE 对 DPPC 膜的膨胀作用明显增强. 这种影响是在亚相氢离子作用下, VE 头基极性增大, 进而 VE 与 DPPC 头基之间静电相互排斥作用增强的结果. 随着表面压增大, 膜中分子趋于紧密排列, 头基之间的相互作用不再重要, 膜膨胀的大小取决于非极性尾间的相互作用, 呈现出逐渐减小的趋势.

$0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶液上的 VE/DPPC 混合单分子的 π -A 线示于图 5, 值得注意的是, 当 VE 含量 (x , 摩尔分数, 下同) 大于 0.20 时, VE/DPPC 单分子膜发生两次崩裂, 第一次崩裂的表面压与纯 VE 膜的崩裂压 (见图 3) 相等, 表明多余的 VE 从混合膜中分离出来. Chung 等提出, 膜被压缩时, 易于崩裂即较不稳定的膜组分将被排出膜外^[13]. 上述现象与这一论断一致. 在纯水上, 发生这种现象则要直到 VE 含量大于 0.60^[5]. 由此可知, 亚相氢离子浓度的增大使膜中 VE 和 DPPC 互溶度降低. 此外, 亚相 pH 较低时, 低浓度的 VE 即可引起 DPPC 膜的明显膨胀, 对研究 VE 在其含量很低的生物膜中的作用或可提供某种启示.

表 2 纯水上 VE/DPPC 单分子膜的平均分子面积对加和性原则的偏离

Table 2 Deviations of the mean area per molecule from the additivity rule for the VE/DPPC monolayers on pure water ($\text{\AA}^2\cdot\text{molecule}^{-1}$)

$\pi/\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$10^2 x_{\text{VE}}$			
	20	40	60	80
5.0	1.0	1.5	1.5	1.0
10.0	10.8	8.6	7.4	3.2
15.0	6.2	5.4	5.6	3.8

表 3 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 水溶液上 VE/DPPC 单分子膜的平均分子面积对加和性原则的偏离

Table 3 Deviations of the mean area per molecule from the additivity rule for the VE/DPPC monolayers on the water containing $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl ($\text{\AA}^2\cdot\text{molecule}^{-1}$)

$\pi/\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$10^2 x_{\text{VE}}$			
	20	40	60	80
5.0	9.6	9.2	5.8	4.9
10.0	5.4	7.3	5.2	4.6
15.0	2.7	4.4	4.1	4.3
20.0	0.4	2.3	3.2	3.6
25.0	0.1	1.2	2.3	3.4

致谢 作者感谢日本 Eisai 公司提供高纯度维生素 E, 感谢日本静冈县立大学赤尾幸男教授和植松正吾先生对本研究的帮助.

参 考 文 献

- 1 Almog R, Berns D S. *J. Colloid Interface Sci.*, 1981, 81:332
- 2 Blume A. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 557:32
- 3 Florence A T, Attwood D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*, Second Edition, London: Macmillan Press Ltd., 1988, p.408
- 4 莫凤奎, 植松正吾, 赤堀幸男. 沈阳药科大学学报, 1995, 12:161
- 5 莫凤奎, 植松正吾, 赤堀幸男. 物理化学学报, 1995, 11(12): 1077
- 6 中垣正幸编, 许景文, 严忠译. 膜学入门, 上海: 上海科学技术文献出版社, 1984, p.36
- 7 中垣正幸. 表面状体とコロイド状体, 东京: 东京化学同人株式会社, 1968, p.55
- 8 Szleifer I, Kramer D, Ben-Shaul A, et al. *Chem. Phys.*, 1990, 92:6800
- 9 Hauser H, Pascher I, Sundell S. *J. Mol. Biol.*, 1980, 137:249
- 10 Pearson R H, Pascher I. *Nature*, 1979, 281:499
- 11 木村初男. 生体膜相転移, 表面, 1991, 29:171
- 12 Roels O A, Shah D L. *J. Colloid Interface Sci.*, 1969, 29:279
- 13 Chung J B, Hannemann R E, Franses E I. *Langmuir*, 1990, 6:1647

Affect of Subphase pH on the Behavior of the Monolayers at the Air/Water Interface for Vitamin E and Dipalmitoylphosphatidylcholine

Mo Fengkui Zhu Zhifang

(Department of Basic Courses, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015)

Abstract The affect of subphase pH on the monolayers at air/water interphase for vitamin E and dipalmitoylphosphatidylcholine was investigated by determining the surface pressure-area isothermis. Decrease in subphase pH didn't change the collapse pressure of monolayer for DPPC, but led to obvious increase in that for VE, it also didn't change the area per molecule of monolayer for VE, but caused DPPC monolayer to be condensed. At lower surface pressure, the action of VE to the expansion of DPPC monolayer was small on pure water, but large on the subphase of pH=1. It suggests that interactions between the polar head groups may play an important role in the behavior of the VE/DPPC monolayers on the subphase of lower pH.

Keywords: Vitamin E, Dipalmitoylphosphatidylcholine, Monolayer, pH of subphase