

富含羧基的多肽基双亲水杂化共聚物 控制碳酸钙的形成*

黄玉刚^{1,2}, 褚曰环², 何明辉², 曾兆华², 杨建文²

(1. 广州医科大学药学院化学教研室, 广东 广州 510183;

2. 中山大学化学与化学工程学院//聚合物复合材料及功能材料
教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 结合 *N*-羧基-环内酸酐开环聚合和“硫-炔”光点击反应制备了侧链富含羧基的多肽基双亲水杂化共聚物(PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA)。该多肽基共聚物可以模拟蛋白质指导 CaCO₃ 在水溶液中的形成。圆二色谱(CD)揭示了多肽链段在水溶液中的构象变化;扫描电子显微镜(SEM)揭示了矿化过程中 CaCO₃ 的形貌变化;X-射线衍射(XRD)确认了 CaCO₃ 的晶型。结果表明,该聚合物可以有效地控制 CaCO₃ 的形貌,此时多肽链段呈无规线团构象,而不是更为有序的 α -螺旋或 β -折叠构象;多肽链段的含量只有达到足够的浓度时,才能有效地控制的 CaCO₃ 晶体的生长;CaCO₃ 的形貌则可以通过调节多肽链段的长度、溶液的 pH 值等因素进行调控,其可以是表面光滑的微球、表面堆满了 CaCO₃ 小颗粒的超结构微球、纳米棒或呈“花瓣状”聚集的纳米棒。XRD 则证明形成的 CaCO₃ 呈稳定的方解石晶型。

关键词: 羧基;多肽;双亲水杂化共聚物;碳酸钙

中图分类号: O63 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2014)03-0073-07

Polypeptide-Based Doubly-Hydrophilic Hybrid Copolymers Containing Carboxyl Groups for Control of the Form of CaCO₃

HUANG Yugang^{1,2}, CHU Yuehuan², HE Minghui², ZENG Zhaohua², YANG Jianwen²

(1. Department of Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences,

Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Chian;

2. Key Lab for Polymer Composite and Functional Materials of Ministry of Education//

School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, Chian)

Abstract: Polypeptide-based doubly-hydrophilic hybrid copolymers (PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA) containing a great amount of carboxyl groups at the side-chains of polypeptide blocks were synthesized by combination of ring opening polymerization of *N*-carboxyanhydrides (NCAs) and thiol-yne photo-click reaction. The obtained polypeptide-based doubly-hydrophilic hybrid copolymers (DHHC) were used as protein template to direct biomineralization of CaCO₃ in aqueous solution. Conformational changes of the polypeptide blocks were revealed by circular dichroism (CD) spectroscopy. Morphology of the obtained CaCO₃ was investigated by scanning electron microscope (SEM). Crystal form of the CaCO₃ was confirmed by *x*-ray diffraction (XRD). The results of CD analysis indicated that the polypeptide blocks could effectively control the morphology of CaCO₃ in water when they adopted random coil conformation, rather than more ordered α -helix or β -sheet. SEM analysis showed that the growth of the CaCO₃ crystals was strongly depend-

* 收稿日期: 2013-12-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50773097); 广州医科大学博士启动基金资助项目(L135015)

作者简介: 黄玉刚(1981年生),男;研究方向:生物仿生及医用高分子材料研究;通讯作者:杨建文;

E-mail: cesyjw@mail.sysu.edu.cn

ent on the concentration of polypeptides. Furthermore, the morphology of CaCO_3 was tunable by the variation of length of polypeptide blocks and pH value of the aqueous solution. CaCO_3 could form the microsphere with smooth surface, spherical superstructures with some tiny disklike particles grown on the surface and “flower” aggregated nanorod structures. XRD analysis verified that the obtained CaCO_3 was calcite in a very stable form in nature.

Key words: carboxyl groups; polypeptide; doubly-hydrophilic hybrid copolymers; calcium carbonate

生物矿物质精确和高超的结构与功能都反映了生物大分子,尤其是蛋白质对其形貌、尺寸及晶体取向的控制作用。蛋白质与矿物质相互作用,扮演结构指导剂的角色。Addadi 和 Morse^[1-2]发现,软体动物的可溶性壳蛋白对构成其外壳的 CaCO_3 的晶型与取向起决定性作用。大自然这种神奇的功能激发了科学家们利用合成化合物来模拟生物大分子结构和功能的兴趣。 CaCO_3 是自然界最为广泛存在的矿物质之一,它对生物有机体起着重要的作用。因此,利用合成材料来模拟 CaCO_3 的生物矿化过程是目前的研究重点之一。 CaCO_3 的生物矿化过程可用聚合物来模拟,例如明胶、己内酯-丙烯酸嵌段共聚物等^[3-4]。尽管这些材料对 CaCO_3 晶体的取向或晶型等起到一定的调控作用,但是它们的本身结构却与蛋白质完全不同。基于多肽的嵌段共聚物是更为理想的材料,因为多肽和蛋白质一样具有 α -螺旋或 β -折叠的二级结构,分子组成也近似。

Yu 和 Cofen^[5-7]利用基于多肽的嵌段共聚物或共聚多肽来控制 CaCO_3 在 DMF 相中的矿化,成绩卓著。不过这些多肽结构比较简单,侧链的羧基含量也比较少,而且 CaCO_3 在水相环境下的生物矿化更有意义。

本文中,结合 *N*-羧基-环内酸酐开环聚合和“硫-炔”光点击反应 (Thiol-Yne) 制备了侧链富含羧基的多肽基双亲水杂化共聚物,利用它来指导 CaCO_3 在水溶液中的生物矿化,并探讨多肽的浓度、构象如何对 CaCO_3 的形貌、尺寸和晶型产生影响。多肽嵌段共聚物的制备过程如示意图 1 所示,其中端氨基的聚乙二醇单甲醚 (PEO-NH₂) 为引发剂, γ -炔丙基-*L*-谷氨酸酯 (PLG-NCA) 为开环单体,得到的聚合物记为 PEO-*b*-PPLG; 多肽侧链的炔基在紫外光条件下用 3-巯基丙酸 (MPA) 改性,目标产物记为 PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA。

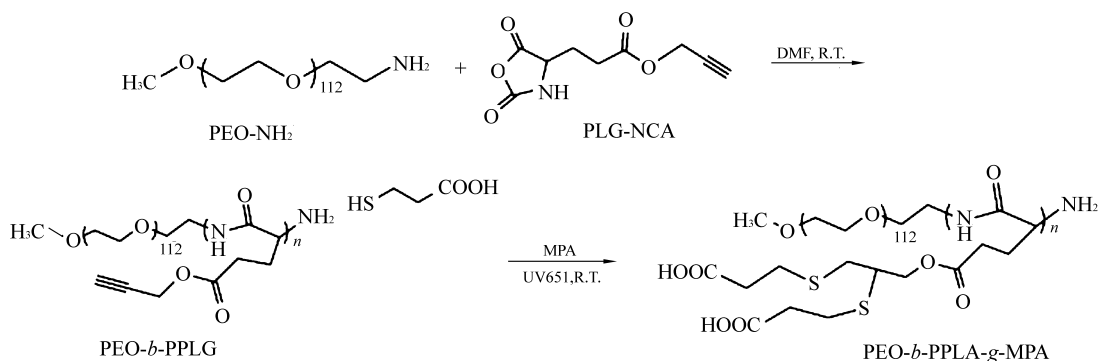


图 1 PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA 的合成路线

Fig. 1 A route for synthesis of polypeptide-based polymer of PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA containing rich carboxyl groups

1 实验部分

1.1 原料

3-巯基丙酸 (MPA) ($w > 97\%$) 和 ω -氨基-聚乙二醇单甲醚 (PEO-NH₂, $M_n = 5\,000$ g/mol) 购自 Sigma-Aldrich, 没有进一步纯化。透析袋 (相对分子质量为 4 000) 使用前用热水浸泡。*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 加入氢化钙过夜, 蒸馏, 加

入 0.4 nm 分子筛保存备用。光引发剂 UV651 (2, 2-二甲氧基-1, 2-二苯乙酮) 为工业级, 用甲醇重结晶。紫外光光源采用中压汞灯点光源, 光照强度为 20 mW/cm²。

1.2 样品合成

1.2.1 PLG-NCA、PEO-*b*-PPLG 和 PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA 的合成 PLG-NCA 根据文献方法合成^[8]。PEO-*b*-PPLG 的合成是在反应瓶中将 PLG-NCA

(0.8 g, 3.70×10^{-3} mol) 用 4 mL DMF 溶解, N_2 鼓泡 20 min。再将溶有 0.2 g PEO-NH₂ 的 2 mL DMF 溶液用注射器注入。磁力搅拌下整个体系持续地通入 N_2 , 室温条件反应 3 d, 整个过程用干燥装置保护。反应结束后将溶液缓慢滴加到 60 mL 乙醚中沉淀出产物 PEO-*b*-PPLG, 然后分别用乙醚、甲醇和水洗涤, 减压干燥。

将 0.1 g PEO-*b*-PPLG 溶于 1.5 mL DMF 中, 然后按炔基和 MPA 比例为 1:4 加入适量 MPA。待聚合物完全溶解后再添加 $\varphi = 5\%$ 的 UV-651, 室温下用 20 mW/cm^2 紫外光照射 30 min。透析法提纯产物, 最终得到产物 PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA。

1.3 测试和表征

¹H NMR 由 Varian 300 核磁共振仪采集, 室温下以 DMSO-*d*₆、CDCl₃ 或 D₂O 为溶剂; GPC 曲线由 Waters 高效凝胶色谱系统采集, PS 柱子为固定相; CD 采用 JASCO-810 圆二色谱仪在室温条件下测定, 首先将聚合物溶解在 pH 为 12 的水溶液中, 然后稀释至 0.1 mg/mL, 50 nm/min 中速扫描, 响应时间为 1 ms, 光径为 1 cm; 由 JSM-6330F 冷场发射 SEM 观察 CaCO₃ 形貌, 将含有 CaCO₃ 颗粒的水滴在载玻片上, 多余的水用滤纸吸干, 然后放在干燥器内自然挥发, 样品测试前不经热处理。XRD 采用 Rigaku D-MAX 2200 VPC 粉末 X 射线衍射仪在室温下收集, 扫描速率 8 (°)/min。Cu Kα1 激发, 波长 0.154 06 nm, 范围 20° ~ 70°。CaCO₃ 的尺寸由 Nano Measurer 1.2.5 软件统计。

1.4 CaCO₃ 在水溶液中的生物矿化的模拟

在实验室利用 Na₂CO₃ 水溶液和 CaCl₂ 水溶液混合的方法来模拟 CaCO₃ 的生物矿化过程, 本实验采用两种方法, 与 Colfen^[5] 采用的方法类似。具体可分为双注射法和单注射法, 双注射法具体过程为: 先配制一系列浓度不同的 5 mL 聚合物水溶液, pH 调整到 10 或 12; 然后向聚合物溶液中同时注入 0.16 mL、0.5 mol/L 的 Na₂CO₃ 水溶液和同等体积、浓度的 CaCl₂ 水溶液, 流速均为 0.03 mL/min。注入完毕, 在室温下保持 CaCO₃ 结晶, 定时取样进行形貌分析; 单注射法具体过程为: 先配制一系列浓度不同的 5 mL 聚合物水溶液, pH 调整到 10 或 12; 向聚合物溶液中注入 0.16 mL、0.5 mol/L 的 CaCl₂ 水溶液, 室温静置 12 h。此时再以 0.03 mL/min 的速度注入同等体积、浓度的 Na₂CO₃ 水溶液, 定时取样进行形貌分析。

2 结果与讨论

2.1 多肽基双亲水杂化共聚物的合成、表征及构象性质

PEO-*b*-PPLG 采用 PLG-NCA 单体的开环聚合, 以数均相对分子质量为 5 000 的 PEO-NH₂ 为大分子引发剂。MPA 与侧链炔基之间的 Thiol-Yne 点击反应在 365 nm 的紫外光照射下, 添加光引发剂 UV-651 辅助进行, 目标产物记为 PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA。一个炔基可以和两个巯基分子发生反应, 因此与传统的聚谷氨酸基嵌段共聚物相比, 明显地增加了羧基含量。PEO-*b*-PPLG 和 PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA 的 ¹H NMR 见图 2 所示, 其中包含反应前后各个质子峰的位置。在图 3 中 PEO 和 PEO-*b*-PPLG 的 GPC 曲线中后者为一单峰, 表明成功合成了目标聚合物, Thiol-Yne 点击产物的具体表征见本课题组前期报导^[8]。本方法具有“点击”反应的特征, 无须基因保护, 提纯简单, 效率高, 最大的优势是 Thiol-Yne 点击反应无需使用铜盐做催化剂, 避免了铜盐的生物细胞毒性。多肽链段的长度可以通过

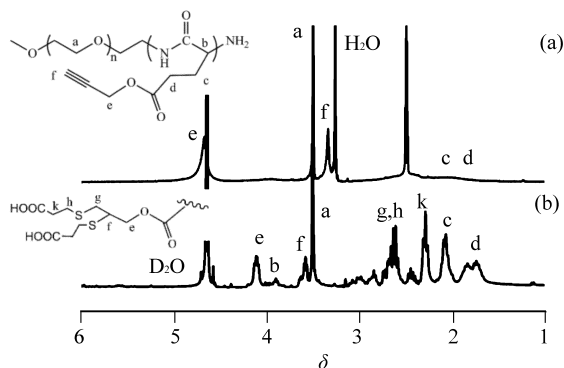


图 2 PPLG 和 PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA 的核磁图

Fig. 2 ¹H NMR spectra of PEO-*b*-PPLG and PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA

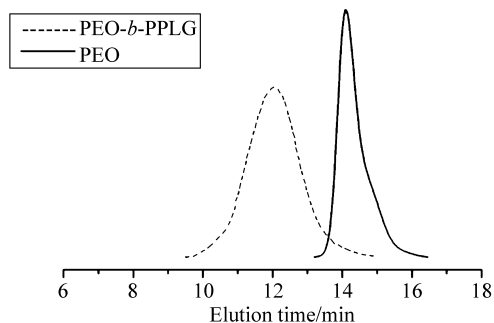


图 3 PEO 和 PEO-*b*-PPLG 的 GPC 曲线

Fig. 3 GPC chromatograms of PEO and PEO-*b*-PPLG determined in DMF at 50 and in the presence of 0.1 mol/L LiBr

PEO-NH₂ 和 PLG-NCA 的质量比例来控制, 当 $m(\text{PEO-NH}_2) : m(\text{PLG-NCA})$ 分别为 1:200 和 1:250 时, 根据图 2 中质子峰 *a* 和 *e* 的面积比, 得到多肽组分的聚合度分别为 170 和 224, 因此经 MPA 改性后的产物 PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA 简称为 P₁₇₀ 和 P₂₂₄。PEO-*b*-PPLG 及 PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA 的相对分子质量及其分布、Thiol-Yne 效率等参数列于表 1。Thiol-Yne 反应非常高效, 辐照 10 min 内, 炔基的转化率 (或巯基的接枝效率) 即可超过 92%^[8]。PEO-*b*-PPLG 可以在 CHCl₃、THF、DMF、DMSO 等溶剂中溶解。PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA 在大部分常见溶剂中都不能够溶解, 不过在碱性水溶液中可溶, 在 DMSO 中可以有限溶解。溶解度低的原因是多肽的螺旋构象导致其分子链非常僵硬, 而且侧链引入了的大量羧基, 侧链之间强烈的相互作用降低了其溶解性, 这也从侧面证明了 Thiol-Yne 反应的高效性。

表 1 多肽基杂化共聚物的表征参数

Table 1 Parameters for characterization of polypeptide-based hybrid copolymers

Polymer	$M_n^1 / (10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1})$	$M_w^2 / (10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1})$	Grafting ratio/% ³⁾	PDI ¹⁾
PEO- <i>b</i> -PPLG ₁₇₀	4.15	3.34	-	1.44
PEO- <i>b</i> -PPLG ₂₂₄	4.27	4.24	-	1.37
P ₁₇₀	-	-	94.3	-
P ₂₂₄	-	-	92.7	-

1) Determined by GPC in DMF at 50 °C, 0.1 mol/L LiBr; 2) Determined by ¹H NMR in *d*₆-DMSO; 3) Determined by ¹H NMR in *d*₆-DMSO based on the conversion of alkynes at 10 min under UV irradiation (grafting ratio of thiols)

PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA 中多肽链段的二级结构可由 CD 测定, 其结果如图 4 所示。不同 pH 条件下 P₁₇₀ 中的多肽链段采取的构象不一样。当 pH 低于 4.9 时, 酸性条件下出现的以 222 和 208 nm 为中心的两个负 Cotton 效应峰是多肽 α -螺旋构象的特征峰, 它们分别由 $n_1 - \pi^*$ 和 $\pi^0 - \pi^*$ 平行极化的激子跃迁所导致^[9]。而当 pH 高于 6.9 时, 以 218 nm 为中心的正的 Cotton 效应峰是多肽呈无规线团的特征峰, 说明此时多肽呈现无规线团二级构象。因此, CD 光谱分析表明, pH 低于 4.9 时, 多肽采取 α -螺旋构象, 当水溶液 pH 继续升高时, 侧链带负电荷, 侧链间的静电排斥导致螺旋构象解体, pH 诱导多肽发生了构象转变, 慢慢转变成无规线团状, 转变区间是 4.9 ~ 6.9。由此可见, 当用

PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA 做为蛋白质模板指导 CaCO₃ 的生物矿化时, 因 CaCO₃ 只能在碱性条件下存在, 故多肽只能采取无规线团的二级结构。

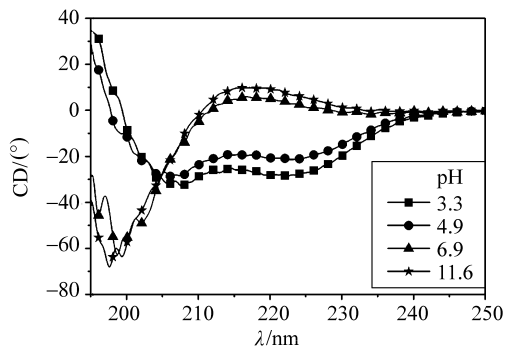


图 4 不同 pH 条件下 P₁₇₀ 在水溶液中的 CD 曲线
Fig. 4 CD spectra of P₁₇₀ in aqueous solution with concentration of 0.1 mg/mL

2.2 CaCO₃ 在水溶液中的形貌分析及其调控

2.2.1 肉眼观察 CaCO₃ 的生物矿化过程

可以直接从表观上观察多肽对 CaCO₃ 矿化过程的影响。图 5 给出了采用双注射法时该混合体系的外观。图 5 (a, b, c) 显示, 当 1 min 时, 含有 P₁₇₀ 的水相体系呈现出稍许淡蓝色, 并无肉眼可见的颗粒出现 (图中白色物为搅拌子); 3 min 时该体系淡蓝色比较明显, 不过仍无肉眼可见的固体颗粒出现, 淡蓝色暗示了颗粒的尺度在 1 000 nm 以内; 5 min 后 CaCl₂ 溶液和 Na₂CO₃ 溶液同时滴加完毕, 此时保持体系不再被搅动, 60 min 时有肉眼可见固体颗粒出现, 底部有固体颗粒沉积, 不过体系上层仍保持浑浊状。而图 5 (d, e, f) 显示, 如若无 P₁₇₀, 1 min 时体系即出现肉眼可见颗粒, 也没有淡蓝色; 3 min 时体系中已有大量固体颗粒; 5 min 后同样保持体系不再被搅动, 60 min 时发现底部有大量固体颗粒沉积, 体系上层澄清。这些直观的实验现象说明, 多肽基杂化双亲水共聚物中的多肽组分的确对 CaCO₃ 晶核的形成和晶体生长有所影响, 它延迟了晶核的形成和晶体的生长, 至少在尺度上起到了指导作用。

2.2.2 CaCO₃ 生物矿化过程中多肽浓度的影响

多肽作为 CaCO₃ 的矿化指导剂, 其浓度可能会对 CaCO₃ 晶体的形貌有所影响, 利用 SEM 可观测各种多肽浓度条件下 CaCO₃ 的形貌。图 6 (a, b, c, d) 显示了在 pH 为 10 时, 改变多肽浓度, 36 h 后 CaCO₃ 晶体的形貌。在浓度为 0 ~ 0.05 mg/mL 区间, 多肽失去了对 CaCO₃ 形貌的控制, 因为从图 6

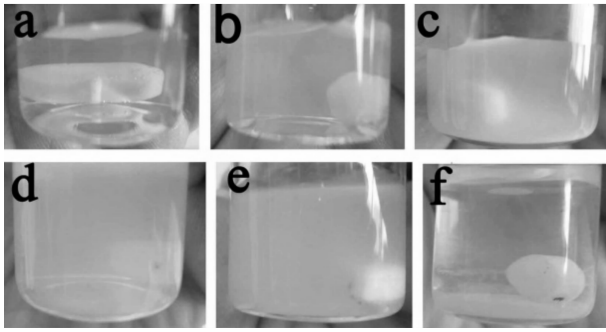


图5 采用双注射法肉眼观察 P_{170}

在水溶液中对 CaCO_3 结晶形成的控制

Fig. 5 Visual inspection of biomimetalization of CaCO_3 in aqueous solution in the presence or absence of P_{170} , double-jet method

(a, b, c) 1 min, 3 min and 60 min, 0.1 mg/mL P_{170} ;

(d, e, f) 1 min, 3 min and 60 min, without P_{170}

(c) 和 6 (d) 中看出, 0.008 mg/mL 时, CaCO_3 晶体是典型的六面体, 与不加多肽时 (0 mg/mL) 的形貌一样, 六面体的尺度也都在 $1 \sim 8 \mu\text{m}$ 之间。当浓度增加到 0.05 mg/mL 时, 可以观察到除了有六面体晶体, 还有少量尺寸为 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ 的 CaCO_3 微球出现, 此时六面体的尺度也在 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ 之间 (图 6 (b)), 比多肽浓度为 0.008 mg/mL 时的尺寸小了很多, 这表明在该浓度下多肽已经对 CaCO_3 的形貌、晶核的形成及生长有了一定程度的控制作用。而当浓度增加到 1 mg/mL 时, 可以明显观察到一定数量的尺度在 $1.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$ 之间的 CaCO_3 微球, 此时还有很多尺寸为几百纳米 CaCO_3 颗粒, 它们的边缘钝化成弧形。这说明多肽对 CaCO_3 的形貌已经有较好的控制, 也可以指导晶核的形成及其生长速度。有意思的是, 浓度为 1 mg/mL 的条件下, 结晶 18 h 时取样观察可看到有橄榄形的 CaCO_3 出现, 它们的长轴尺寸平均为 $1.5 \sim 3.0 \mu\text{m}$ 之间, 平均约 $1.7 \mu\text{m}$, 与图 6 (a) 中的微球尺寸一致, 这说明在 $0 \sim 36 \text{ h}$ 之内 CaCO_3 并不是直接转变成微球, 而是从橄榄形过渡到球形。假若矿化过程时间足够长, 图 6 (a) 和 6 (f) 中边缘钝化成弧形的 CaCO_3 晶体小颗粒几乎全部生长成微球状, 这将在下面论述。图 6 (d) 和 6 (e) 分别是不含多肽的情况下结晶 36 h 和 30 min 后 CaCO_3 的形貌, 它们彼此之间并无差别, 说明若无多肽, CaCO_3 的形貌始终为典型的六面体形, 其尺寸也相近, 故可知矿化过程无法得到调控。PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA 由两部分组成, PPLG-*g*-MPA 可与矿物相互作用,

PEO 不与矿物相互作用, 这种结构对 CaCO_3 晶体的生长起模板作用。多肽侧链的羧基阴离子对 Ca^{2+} 有高度的亲合性, 为 Ca^{2+} 提供结合点, 使 Ca^{2+} 浓度局部过饱和, 加快成核过程出现。晶核形成后, PPLG-*g*-MPA 链段与纳米晶体的表面相互作用, 选择性地吸附在晶粒表面, 而不同的 PEO 链段彼此缠绕, 这样的结构稳定纳米晶粒并控制其生长^[10]。多个纳米晶体也可以形成无序或有序的聚集体, 最终呈现出特定的形貌。不过聚合物模板形成并发挥调控作用的机理十分复杂, 目前并无确定的结论。

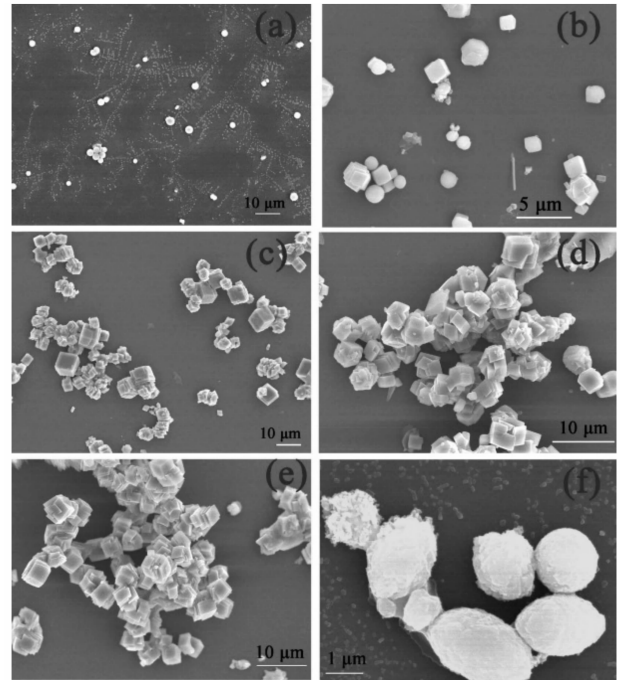


图6 采用双注射法用 SEM 观察可变条件下 CaCO_3 的形貌

Fig. 6 SEM morphologies of CaCO_3 in variable conditions in pH = 10 aqueous solution, double-jet method (a, b, c, d) 1, 0.05, 0.008, 0 mg/mL of P_{170} after 36 h, respectively; (e) 0 mg/mL, 30 min; (f) 1.0 mg/mL, 18 h

2.2.3 CaCO_3 形貌的调控 大自然中由生物蛋白所控制的 CaCO_3 形貌具有多样性, 因此本研究进一步探讨我们所得到的多肽基双亲水杂化共聚物 PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA 对 CaCO_3 形貌的调控作用。图 7 是可变条件下 CaCO_3 的 SEM 照片。 CaCO_3 形貌的调节可以通过改变双亲水杂化共聚物中多肽嵌段的长度来实现。在 pH 为 10、聚合物浓度为 1.0 mg/mL 的条件下, 当多肽嵌段的长度为 224 个重复单元时, CaCO_3 呈棒状, 其长短不一, 但横截面尺寸平均为 520 nm, 如图 7 (a) 所示; 同等条件

下,降低多肽的长度至 170 个重复单元, CaCO_3 为表面光滑的微球,尺寸在 $1.0 \sim 3.7 \mu\text{m}$ 之间,平均约 $2.4 \mu\text{m}$,结果如图 7 (b) 所示。改变体系的 pH 值,也可以调节 CaCO_3 的形貌。如图 7 (c) 所示,保持多肽长度为 170 个重复单元,浓度同样为 1.0 mg/mL ,当 pH 上升到 12, CaCO_3 为超结构微球,其表面不再光滑,堆满了片状的 CaCO_3 小颗粒。

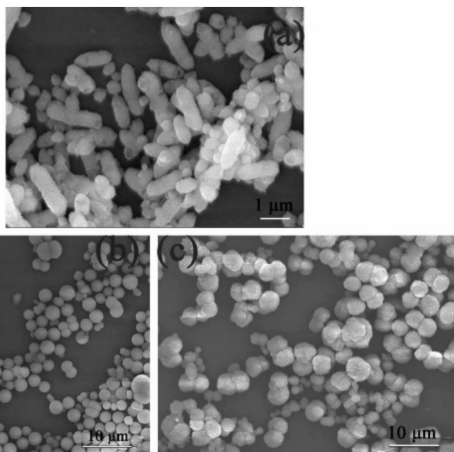


图 7 在 7 d 后采用双注射法观察可变条件下 CaCO_3 的形貌

Fig. 7 Morphologies in CaCO_3 under variable conditions after 7 days, double-jet method

(a) 1.0 mg/mL of P_{224} , $\text{pH} = 10$; (b) 1.0 mg/mL of P_{170} , $\text{pH} = 10$; (c) 1.0 mg/mL of P_{170} , $\text{pH} = 12$

甚至改变 CaCO_3 矿化过程的操作方法,也可以得到形貌多样的 CaCO_3 晶体。以上都是采用双注射法,图 8 展示了采用单注射法得到的 CaCO_3 的形貌。如图 8 (a) 所示,当 pH 为 10 时,在 P_{170} 浓度为 1.0 mg/mL 的条件下,24 h 后单注射法得到的 CaCO_3 呈“花瓣状”,该“花瓣状”聚集体由多根 CaCO_3 纳米棒聚集而成,而同等条件下双注射法得到的 CaCO_3 为表面光滑的微球(图 8 (b))。在 pH 为 12、 P_{224} 浓度为 1.0 mg/mL 的条件下,单注射法得到的 CaCO_3 也是表面堆满了小颗粒的超结构微球,这与图 7 (c) 中 CaCO_3 的形貌一样。由此可见,在 pH 较高的条件下,多肽链段的长度、结晶时间甚至注射方法都不是影响 CaCO_3 的主要因素,pH 高,则多肽侧链的羧基阴离子就较多,这个条件下可能对 CaCO_3 形貌的控制作用就比较稳定,而其他影响因素则得到抑制。

2.2.3 CaCO_3 的晶型

用 XRD 研究了所得到的 CaCO_3 的晶型。 CaCO_3 主要有三种晶型:方解石

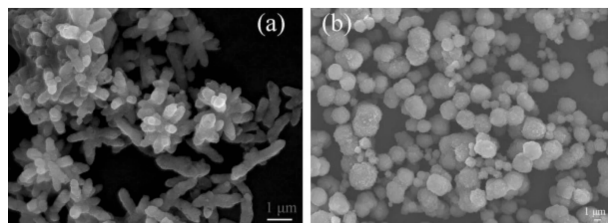


图 8 在 24 h 后采用单注射法观察可变条件下 CaCO_3 的形貌

Fig. 8 Morphologies of CaCO_3 in variable conditions using single-jet method after 24 h

(a) P_{170} , 1.0 mg/mL , $\text{pH} = 10$;
(b) P_{224} , 1.0 mg/mL , $\text{pH} = 12$

(calcite)、文石 (aragonite) 和球霏石 (vaterite),其中前两者是最常见的稳定晶型,第三种是热动力学不稳定晶型,在自然界中比较少见^[1, 11]。XRD (图 9) 结果显示,在实验条件下所有的 CaCO_3 都为方解石晶型,其最稳定的晶型。林嘉平等^[12]用聚 (*N*-异丙基丙烯酰胺)-*b*-聚谷氨酸嵌段共聚物来调控 CaCO_3 的生物矿化,可以得到不稳定的球霏石,其中聚合物胶束对 CaCO_3 的晶型有重要影响。这里,我们制备的多肽基共聚物是双亲水的,碱性条件下并不形成胶束,因此 CaCO_3 结晶过程主要受羧酸阴离子的控制,多肽的构象也可能调控晶核的生长^[12]。

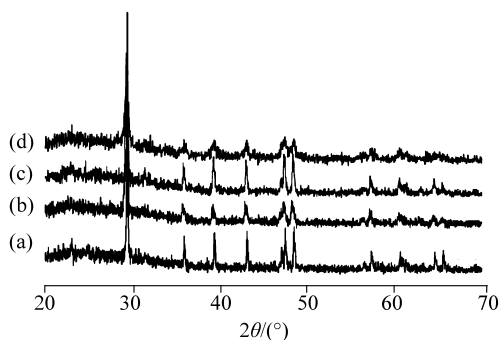


图 9 在 7 d 后 CaCO_3 的 XRD 曲线

Fig. 9 XRD patterns of CaCO_3 after 7 days

(a) 0 mg/mL , $\text{pH} = 10$; (b) P_{170} , 1.0 mg/mL , $\text{pH} = 10$; (c) P_{170} , 1.0 mg/mL , $\text{pH} = 12$; (d) P_{224} , 1.0 mg/mL , $\text{pH} = 10$

3 结论

结合 *N*-羧基-环内酸酐开环聚合和“硫-炔”点击反应制备了侧链富含羧基的多肽基双亲水杂化共聚物 (PEO-*b*-PPLG-*g*-MPA)。该多肽基共聚物可以模拟蛋白质指导 CaCO_3 在水溶液中的形貌和尺

寸。多肽可以有效地调控 CaCO_3 的生物矿化, 不过此时其为无规线团构象, 而不是其更为有序的 α -螺旋或 β -折叠构象。 CaCO_3 形貌是可控的, 可以通过调整体系 pH 值、多肽长度等手段实现, 其形貌可以是表面光滑微球、超结构微球、纳米棒或呈“花瓣状”聚集的纳米棒。

参考文献:

- [1] FALINI G, ALBECK S, WEINER S, et al. Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules[J]. *Science*, 1996, 271: 67 - 69.
- [2] BELCHER A M, WU X H, CHRISTENSEN R J, et al. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins[J]. *Nature*, 1996, 381: 56 - 58.
- [3] 付丽红, 程惊秋, 来国莉. 明胶基质作用下碳酸钙的仿生合成[J]. *化学学报*, 2005, 63: 1626 - 1632.
- [4] 李翠珍, 张琰, 胡小毅, 等. 聚己内酯-*b*-聚丙烯酸胶束溶液对碳酸钙结晶的研究[J]. *化学学报*, 2011, 69: 471 - 476.
- [5] KAŠPAROVÁP, ANTONIETTI M, CÖLFEN H. Double hydrophilic block copolymers with switchable secondary structure as additives for crystallization control [J]. *Colloid Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2004, 250: 153 - 162.
- [6] GUO X H, YU S H, CAI G B. Crystallization in a mixture of solvents by using a crystal modifier; morphology control in the synthesis of highly monodisperse CaCO_3 microspheres[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 3977 - 3981.
- [7] GUO X H, XU A W, YU S H. Crystallization of calcium carbonate mineral with hierarchical structures in DMF solution under control of poly(ethyleneglycol)-*b*-poly(*L*-glutamic acid); effects of crystallization temperature and polymer concentration[J]. *Cryst Growth Des*, 2008, 8: 1233 - 1242.
- [8] HUANG Y G, ZENG Y H, YANG J W, et al. Facile functionalization of polypeptide by thiol-yne photochemistry for biomimetic materials synthesis [J]. *Chem Commun*, 2011, 47: 7509 - 7511.
- [9] HOLTZWARTH G, DOTY P. The ultraviolet circular dichroism of polypeptides[J]. *J Am Chem Soc*, 1965, 87: 218 - 228.
- [10] YU S H, COLFEN H. Bio-inspired crystal morphogenesis by hydrophilic polymers[J]. *J Mater Chem*, 2004, 14: 2124 - 2147.
- [11] De OLIVEIRA D B, LAURSEN R A. Control of calcite crystal morphology by a peptide designed to bind to a specific surface [J]. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 10627 - 10631.
- [12] 朱文杰, 蔡春华, 林嘉平. 碳酸钙在聚合物胶束控制下的仿生合成[J]. *高分子学报*, 2011(4): 335 - 339.