

珍珠质基底上 CaCO_3 晶体的仿生生长研究

罗 程¹ 谢 雷¹ 王小祥¹ 王慧明^{*,2}

(¹ 浙江大学材料科学与工程学系, 杭州 310027)

(² 浙江大学医学院附属第一医院, 杭州 310006)

关键词: CaCO_3 ; 晶体生长; 生物矿化; 珍珠质

中图分类号: O614.23⁺1; O782⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2007)06-1107-04

Simulated Growth of CaCO_3 Crystals on Nacreous Surface

LUO Cheng¹ XIE Lei¹ WANG Xiao-Xiang¹ WANG Hui-Ming^{*,2}

(¹Department of Material Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

(²First Affiliated Hospital of Medical School, Zhejiang University, Hangzhou 310006)

Abstract: A conventional vapor diffusion method was applied to *in vitro* precipitation of CaCO_3 crystal. The morphologies and components of the deposit were characterized by SEM, Raman and X-ray diffraction. The results show that the surface of shell nacre promotes the nucleation of aragonite polymorphs of CaCO_3 , while suppresses the nucleation of calcite and vaterite. The active sites for the deposit, which subsequently transforms to faceted crystals, were only located on the edges of nacreous tablets. The tower-like deposit observed after 24 h was consisted of only aragonite crystals layered along the direction of the *c*-axis of nacreous tablets.

Key words: CaCO_3 ; crystal growth; biomineralization; nacre

珍珠质是一种典型的有机/无机层状复合材料,其中 95% 以上是文石(CaCO_3 的一种晶型)小板片,填充在板片之间的薄层有机基质仅占 1%~5%^[1,2]。这种精细的组织结构不仅使珍珠质具有绚丽的光泽,还赋予珍珠质超乎寻常的强度和韧性^[3](为合成 CaCO_3 晶体的 3000 多倍)。虽然在珍珠质中有机质的含量不足 5%,然而正是这些有机质对珍珠质的结构、性能、晶体取向等起着至关重要的调控作用。珍珠质的生物矿化过程中是如何从微米到纳米级实现精确控制以及其所表现出来的优异的机械性能和医学应用价值吸引了众多研究者的兴趣^[3-6]。有研究表明,从文石珍珠质中提取的有机物在体外能促进文石的生长^[7],一些合成有机大分子或功能性模板,同样能诱导无机物从过饱和溶液中析出矿化,并控制碳酸钙

晶体的晶型、取向和形貌^[8]。另一方面,已有研究表明,利用生物方法能在植入三角帆蚌体内的牙种植体表面沉积出珍珠质涂层,希望为牙种植体开创一种全新的生物涂层的制备方法^[9]。正确理解珍珠层的生长机理不但有助于珍珠质涂层的研究和制备,而且对先进材料的设计和制备同样具有指导意义。本文通过体外模拟试验,在珍珠层表面得到了层片状的文石晶体,希望对理解贝壳中珍珠层的生长机理有所帮助。

1 实验部分

本实验采用的样品均为 2 年生三角帆蚌,新鲜贝壳在剥去外套膜后浸于去离子水中超声振荡 20 min 以除去附着在贝壳表面的软组织和体液。

收稿日期:2007-01-08。收修改稿日期:2007-04-04。

国家自然科学基金资助项目(No.50571088,30572061)。

*通讯联系人。E-mail: wangmysm@yahoo.com.cn; Tel: 057187236893

第一作者: 罗 程, 女, 23 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物医用材料。

$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 和 CaCl_2 试剂为分析纯。所有的玻璃容器用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液清洗干净后,在去离子水中超声振荡,并冲洗干净。

实验采用常用的 Vapor diffusion 方法^[10],实验装置如图 1 所示。

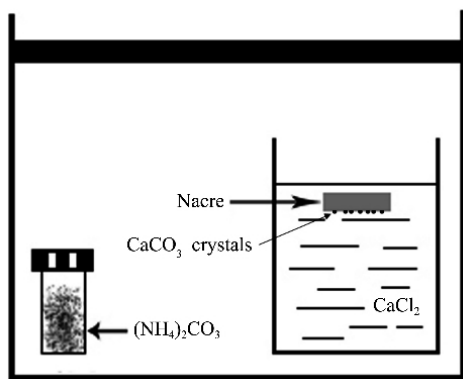


图 1 实验装置示意图

Fig.1 Schematics of the experimental setup

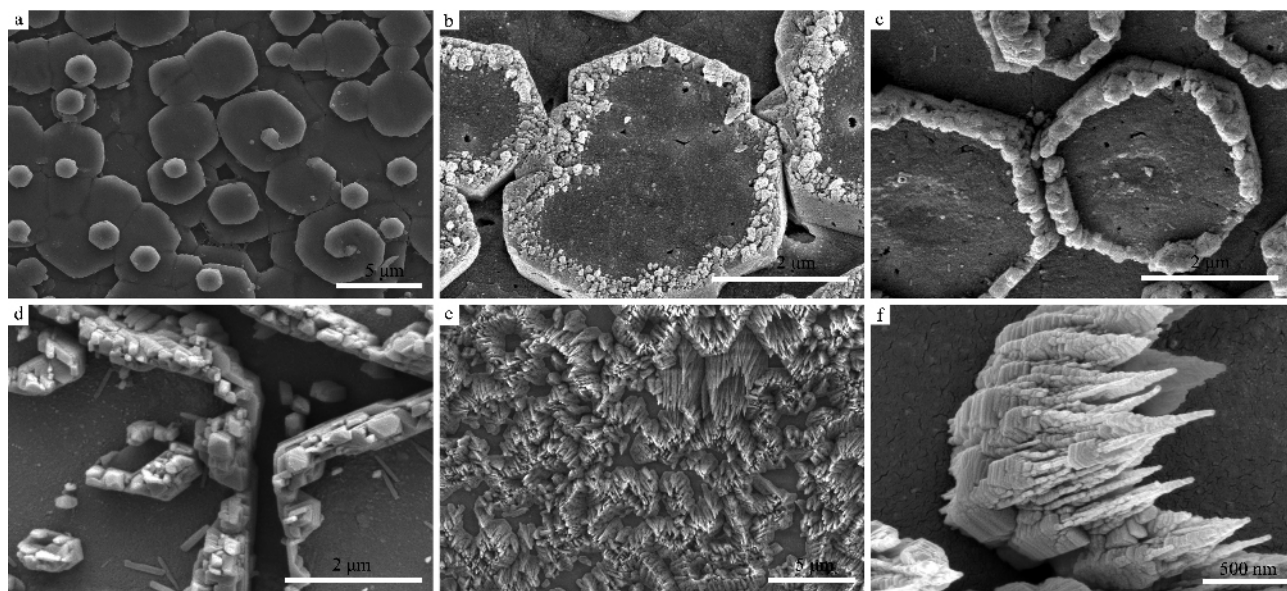
取新鲜配制的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液 300 mL ,将清洗干净的贝壳悬挂于 CaCl_2 溶液中,珍珠质层表面向下,离溶液表面约 5 mm 处。对比实验中使用清洗干净的载玻片作基底。另用玻璃小瓶装 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$,塑料的瓶盖打上 4 个针眼大小的小孔便于 CO_2 气体的挥发扩散。盛装 CaCl_2 水溶液的烧杯和玻璃小瓶放入直径为 180 mm 的干燥器中。室温下, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 分解产生的 CO_2 气体通过扩散进入 CaCl_2 溶液中,引起 Ca^{2+} 浓度过饱和, CaCO_3 晶体在

基底表面形核并长大。经过不同的沉积时间,取出贝壳和载玻片,用去离子水冲洗干净,室温下风干后进行观察和分析。

用 FEI Sirion 场发射扫描电镜观察所沉积的 CaCO_3 晶体的表面形貌。用 Philips X 射线衍射仪对沉积层进行成分分析,使用 $\text{Cu K}\alpha$ 射线和 $\theta/2\theta$ 模式,为了防止基底对 XRD 结果的影响,将 CaCO_3 沉积物从基底上收集起来再进行测试。作为对照,沉淀在烧杯底、烧杯壁以及载玻片上的 CaCO_3 晶体也被收集起来进行 XRD 测试。用 Jobin-Yvon HR-800 拉曼光谱测试的结果可以进一步证实 XRD 的测试结果,激光波长为 514.532 nm ,扫描从 100 cm^{-1} 至 2000 cm^{-1} 。

2 结果与讨论

自然生长的珍珠质表面典型的 SEM 形貌如图 2a 所示,可以清楚地观察到处于生长过程中的六边形的文石小板片。经过 1 h 浸泡沉积后,在文石板片的边缘上沉积出许多独立的无规则形状的小颗粒(图 2b)。小颗粒随着沉积时间延长而长大,图 2c 为沉积 4 h 后珍珠层表面的 SEM 照片。这些颗粒还没有表现出任何 CaCO_3 晶型的特征形貌。沉积 12 h 后的 SEM 照片如图 2d 所示,可以观察到沉积物已经出现有规则的形状。而沉积 24 h 的珍珠层整个表面都被一层塔状的沉积物所覆盖(图 2e),在高分辨模式下观察发现,与红鲍鱼壳中文石板片堆垛型的排



(a)nacreous surface before deposition; (b)1 h; (c)4 h; (d)12 h; (e)24 h and (f)enlarged image of (e)

图 2 在 CaCl_2 溶液中沉积不同时间后珍珠层表面生长的 CaCO_3 晶体的 SEM 照片

Fig.2 SEM images of nacreous surface after deposition in CaCl_2 solution for various periods of time

列方式类似^[11], 这些塔状的沉积物也呈层片状(图2f), 每层为一六边形的小板片, 高约数十纳米, 直径约数百个纳米。无论是六边形的形貌还是高度与直径比例, 这些小板片都与天然的三角帆蚌贝壳中的文石板片接近。

图3是未做沉积和经过24 h沉积后的珍珠层表面的拉曼光谱图, 扫描范围从 100 cm^{-1} 到 400 cm^{-1} 。在波数为 150 cm^{-1} 和 205 cm^{-1} 处(见图3a), 样品与文石晶型的特征拉曼峰完全吻合^[12]。 142 cm^{-1} , 190 cm^{-1} , 213 cm^{-1} 以及 271 cm^{-1} 处的波峰是由天然珍珠层中的有机基质引起的^[12], 由于 Raman 信号受到表面沉积的 CaCO_3 晶体的影响, 在谱线 b 中很强的这些波峰在谱线 a 中却明显减弱。在谱线 a 中没有发现其他 CaCO_3 晶型的特征拉曼峰。

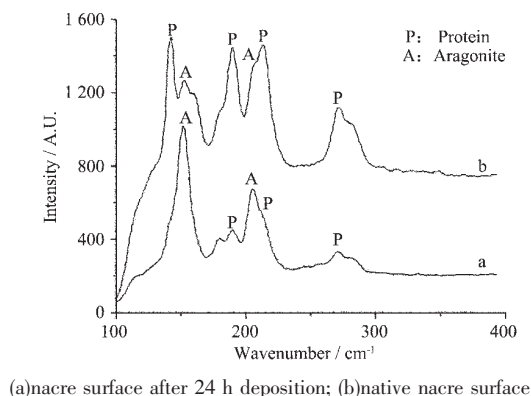


图3 珍珠质表面的 Raman 光谱

Fig.3 Raman spectra of nacreous surface

经过24 h沉积后的珍珠层表面以及从其表面收集的沉积物粉末的 XRD 图分别示于图4(a)和(b)。谱线 b 中各衍射峰均与 XRD 卡片 41-1475 所提供的文石结构的特征峰位置完全吻合, 说明沉积物完全由文石组成, 与拉曼光谱的结果一致。谱线 a 说明沉积在珍珠层表面的文石晶体择优取向非常明显, 主要为[001]晶向, 垂直于珍珠层面。图5是对照实验中烧杯底部的沉淀(a)以及从载玻片上收集的沉积物(b)的 XRD 图。前者是在 CaCl_2 溶液中形核并长大的 CaCO_3 晶体, 包含了方解石 (Calcite)、球文石 (Vaterite)、文石 (Aragonite) 3 种晶型。而后者是以载玻片为基底形核的, 主要包含方解石 (Calcite) 和球文石 (Vaterite) 2 种晶型。

Vapor diffusion 方法通过 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 的热分解产生 CO_2 气体, 是目前 CaCO_3 晶体沉积研究中常用的方法。通常, 没有添加其他物质的 CaCl_2 溶液中最终形成的是最具热稳定性的六棱柱方解石晶体。如果

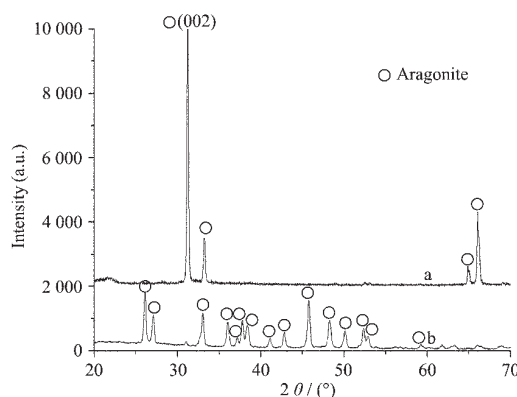


图4 经24 h沉积后的珍珠层表面(a)以及从其表面收集的沉积物粉末(b)的 XRD 图

Fig.4 XRD patterns of (a)nacreous surface after 24 h deposition; (b)deposit powder scraped from the specimen

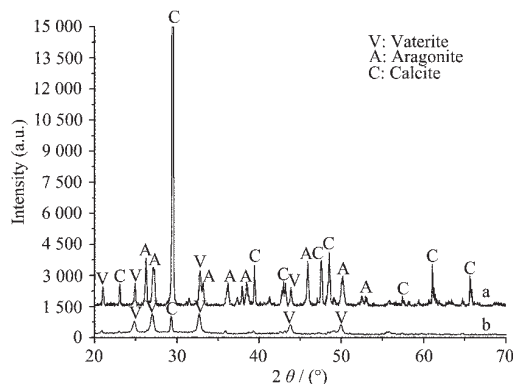


图5 (a)烧杯底部的沉淀和(b)载玻片上收集的沉积物的 XRD 图

Fig.5 XRD patterns of (a)sediment collected on the bottom of the beaker; (b)deposit scrapped from the glass sheet

CaCl_2 溶液的浓度较低, 在铵根离子的作用下, 溶液中会形成球文石晶体^[13]。只有在添加了某些可溶^[8,11]或不可溶有机物^[10]的情况下, CaCl_2 溶液中才会有文石形成。而我们的研究发现, 在三角帆蚌珍珠质的基底上沉积的 CaCO_3 仅包含文石晶型, 而从容器底部和载玻片上收集的 CaCO_3 粉末含有大量的方解石、球文石以及微量的文石, 这说明珍珠层表面具有能抑制方解石和球文石形核, 同时诱导文石形核长大的作用。

经过对新鲜贝壳的珍珠质表面的大量观察发现, 在体内生长过程中, 新生文石一般都在下层文石板片的边缘处形核, 如图6所示。而图2显示的 CaCO_3 沉积物沿基底文石板片边缘形核的现象与上述现象是一致的。这说明下层文石板片的边缘处有

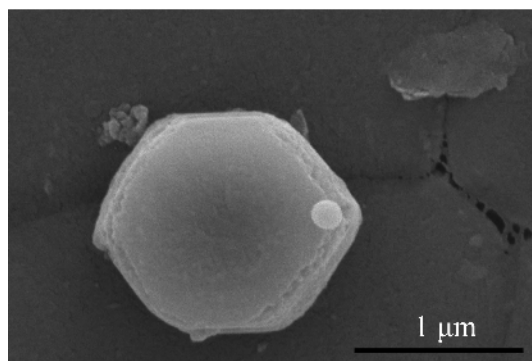


图 6 新鲜贝壳的珍珠质表面上新生文石板片在下层文石板片边缘形核的 SEM 照片

Fig.6 SEM image showing the *in vivo* nucleation of the new nacre tablet on the edge of the underlying tablet

机质与其中心区域的有机质不同。随着文石沿 a 、 b 轴方向的生长,文石板片边缘的新生有机质具有诱导文石晶体形核的活力,而中心区域的有机质失去形核活力可能与其随时间变性或者被另外种类的有机质覆盖有关。

已有研究表明^[14],天然珍珠质中的新生文石小薄片也被一层有机薄层所覆盖。Blank 等人曾进行了与我们类似的实验,发现在鲍鱼的珍珠层表面会生长大量的针状文石,因此认为有机质层中的不可溶蛋白质诱导了文石沉积^[14]。但他们没有进行针状文石生长过程的深入研究。我们的研究表明,是基体表面的有机质薄层控制了文石晶体的形核与生长。更值得注意的是,新生文石的 c 轴与基底文石板片的 c 轴完全平行。这说明,珍珠质中的有机质薄层在新生文石的形核长大过程中起模板作用。在软体动物贝壳的珍珠质矿化过程中,矿物相的沉积和有机质的分泌交替进行,而且一旦矿物相形核,就马上有有机质附着上去,这样就有效的抑制了文石晶体沿 c 轴生长,确保珍珠质矿化的有序性和一致性。

此外,在 CaCO_3 晶体生长初期,珍珠质基底表面所形成的 CaCO_3 沉积物都没有特征晶体形貌(图 2b、c)。随沉积时间的延长,这些无特定形貌的 CaCO_3 沉积物才逐渐转变成文石晶体(图 2d、e)。最近, Nassif 等人用高分辨透射电镜观察了珍珠质中文石板片与有机质层的界面,发现与有机质层相接触的 CaCO_3 是非晶态的,认为珍珠质中文石的形核长大起源于非晶 CaCO_3 ^[15]。Gehrke 等人也进行了碳酸钙的沉积实验,用傅立叶红外光谱仪观察到溶液中最先形成的是非晶 CaCO_3 颗粒^[13]。因此,我们推测

实验初期形成的沉积物很有可能是非晶 CaCO_3 ,随着时间的延长,在基底有机质的调控下,这些非晶 CaCO_3 逐渐聚集并转变为文石晶体,最后呈现出六边形的塔状形貌。

3 结 论

本研究采用 Vapor diffusion 实验,在珍珠质基底上体外模拟 CaCO_3 晶体的沉积过程,观测到珍珠层表面具有抑制方解石和球文石形核,促进文石形核的作用,并且文石晶体的形核发生在珍珠质表面文石板片的边缘部位。 CaCO_3 形核初期无特征形貌,随着沉积时间的延长,逐渐形成层片状的塔状文石晶体,其 c 轴取向与基底文石一致。 CaCO_3 的这些生长特征在一定程度上与珍珠质矿化特征相吻合,这说明本研究中的体外实验方法适合用来研究珍珠质生物矿化过程。我们认为藉此方法并通过今后更广泛深入的研究,可能会获得更多具有参考价值的数据和信息,从而可以更深入地揭示珍珠质生物矿化的机理。

参考文献:

- [1] Meldrum F C. *Int. Mater. Rev.*, **2003**, **48**:187~224
- [2] ZHANG Xue-Ao(张学骅), WANG Jian-Fang(王建方), WU Wen-Jian(吴文建), et al. *Wuji Cailiao Xuebao(Chinese J. Inorg. Mater.)*, **2006**, **21**(2):257~266
- [3] Lin A, Meyer M A. *Mater. Sci. & Eng. A*, **2005**, **390**:27~41
- [4] Addadi L, Joester D, Nudelman F, et al. *Chem. Eur. J.*, **2006**, **12**:980~987
- [5] Rousseau M, Lopez E, Couté A, et al. *J. Struct. Biol.*, **2005**, **149**:149~157
- [6] Oaki Y, Imai H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, **44**:6571~6575
- [7] Belcher A M, Wu X H, Christensen P K, et al. *Nature*, **1996**, **381**:56~68
- [8] Lara A E, Andrew D H. *Chem. Mater.*, **2001**, **13**:3227~3235
- [9] Wang X X, Xie L, Wang R. *Biomaterials*, **2005**, **26**:6229~6232
- [10] Nassif N, Genrke N, Pinna N, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, **44**:6004~6009
- [11] Blank S, Arnoldi M, Khoshnavaz S, et al. *J. Microsc.*, **2003**, **212**:280~291
- [12] Dandeu A, Humbert B, Carteret C, et al. *Chem. Eng. Technol.*, **2006**, **29**:221~225
- [13] Gehrke N, Cölfen H, Pinna N, et al. *Cryst. Growth Des.*, **2005**, **5**:1317~1319
- [14] Wada K. *Bull. Natl. Pearl. Res. Lab.*, **7**:703~828
- [15] Nassif N, Pinna N, Gehrke N, et al. *PNAS*, **2005**, **102**:12653~12655