

有序分子膜诱导生物功能材料仿生合成的研究进展

张立娟 刘洪国 冯绪胜*

(山东大学胶体与界面化学教育部重点实验室 济南 250100)

摘 要 Langmuir 单层膜、LB 膜和自组装膜可以作为模拟生物矿化的重要模板。在膜/晶体界面上的静电相互作用、晶格几何匹配、立体化学互补、氢键作用使得晶体以某一特定的方向成核,从而使晶体具有特殊的形貌、结构和性质。本文重点介绍了近十几年来研究较多的几种生物功能材料。

关键词 有序分子膜 取向生长 模板 生物矿化

Advances in Investigation on Biomimetic Synthesis of Biological Crystal Materials Induced by Ordered Molecular Films

Zhang Lijuan, Liu Hongguo, Feng Xusheng

(Key Laboratory for Colloid and Interface Chemistry of State Education Ministry, Shandong University Jinan 250100)

Abstract Langmuir monolayers, LB films and self-assembled films are the important templates of mimicking biomineralization. Electrostatic interactions, lattice geometrical matching, stereochemical complementarity and hydrogen bond at film-crystal interfaces lead to oriented nucleation of crystals. So the crystals with well-defined morphology, structure and property can be prepared. A few of biological crystal materials studied in recent ten years were introduced emphatically in this paper.

Key words Ordered molecular films, Oriented growth, Templates, Biomineralization

自然界中大量存在的天然生物材料如贝壳、蚕丝、骨骼、肌肉等都是在细胞中生物模板的作用下形成的。这种复杂的超分子结构具有良好的生物环境适应性及功能性,其优异的韧性、功能适应性及损伤愈合能力是传统人工合成材料无法比拟的。近年来,模拟生物矿化过程制备具有真正生物活性材料已成为生物材料科学研究的极为活跃的前沿领域。Langmuir 单层膜、LB 膜和自组装膜作为模拟生物矿化的重要模板诱导晶体选择性取向生长,不仅为制备新型无机功能材料和生物材料开辟了新的途径,而且对于生物矿化机理的探讨和研究也有重要理论意义。本文重点综述了膜控生物晶体材料生长的机理、并介绍了最有代表性的几种生物材料研究的最新进展情况。

1 单(多)分子层模板

生物矿化是指在生物体中细胞的参与下,无机元素从环境中选择性地沉析在特定的有机基质上而形成生物矿物的过程。即通过有机分子或生物大分子与无机物离子在界面处的相互作用,从分子水平控制无机矿物相的析出,从而使生物矿物具有特殊的多级结构和组装方式。

张立娟 女, 27 岁, 硕士生, 现从事有序分子膜诱导晶体的生长的研究。*联系人

国家自然科学基金资助项目(29873027)

2001-10-24 收稿, 2002-03-21 修回

生物矿化中, 由细胞分泌的自组织的生物分子对无机物的形成起模板作用, 使无机矿物具有特定的形状、尺寸、取向和结构。人们可以从模拟生物矿化过程角度出发: 先形成有机物的自组装体, 无机先驱物在自组装体与溶液相的界面处发生化学反应, 在自组装体模板作用下, 形成无机/有机杂合体, 然后将有机物模板去除后即得到有组织的具有一定形状的无机材料。生物矿化发生在特殊的微空间中, 这些微空间是由细胞所分泌的生物大分子经过自组装而形成的^[1], 与此相似, Langmuir 单(多)分子层、自组装膜和囊泡能创造这种微空间作为模板来有效地控制晶体的成核、生长。

1.1 Langmuir 单层膜和 LB 膜

Langmuir 单层是两亲分子在空气-水界面自发铺展形成的单分子层, 在水平方向压力的作用下使其呈紧密有序排列的状态。这些两亲性分子的亲水基团伸入水中, 疏水基团则伸出水面, 亲水基团在水/空气界面上可以形成不同晶面特征的单分子层模板, 可诱导晶体的成核、取向生长。利用 Langmuir 单层膜和 LB 膜的有序模板效应在膜中可形成纳米尺寸的无机晶体。

1.2 自组装单层膜

自组装单层膜(self-assembled monolayers, SAM)法: 是指靠化学键合在基片表面的具有不同结构特点的有序分子膜, 将基片浸入无机物质的过饱和溶液中, 无机物在有机单分子膜的诱导下发生异相成核、取向生长。它广泛应用于金属和氧化物表面。常用的用于形成 SAM 的有机物有两种:

一是在硅基片上吸附带活性头基 X 的三氯硅烷, $\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{X}$, X 可以为 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 和 COO^- 等带电基团。三氯硅烷先水解使三个氯原子被三个 OH 取代, 化学键合到带 OH 的基底表面, 再发生缩聚形成 SAM, 活性头基 X 指向空间, 整个过程示意图 1^[2]:

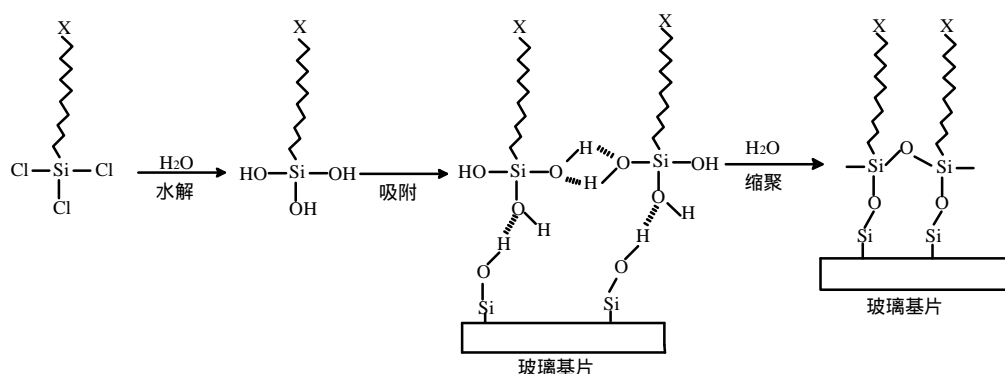


图 1 带活性头基 X 的三氯硅烷形成自组装膜的过程^[2]

Fig.1 The procedure of self-assembled monolayer formed by trichlorosilane with active headgroup X^[2]

Tarasevich 等^[3]将硅基片表面氧化, 放入乙烯基为头基的十七烷基三氯硅烷的环己烷溶液中, 取出后在 SO_3 气体中反应得到以 SO_3^{2-} 为头基的 SAM, 将其浸入一定 pH 值的 Fe^{3+} 溶液中浸泡得到了 FeOOH 膜。

二是在金基片上键合带活性头基 X 的硫醇化合物。如将不同硫醇化合物(头基为 $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$)修饰的金基片浸入由鼠骨组织中提取的羟基磷灰石的悬浮液中 3~

5min, 超声 20s。在生理盐水溶液中进行 AFM 观察, 发现带负电荷的自组装膜更有效地促进带正电荷的羟基磷灰石在界面的结晶^[4]。Feng 等^[5]通过磷酸化的 11-巯基-1-十一醇 (MUD) 自发地吸附到金表面形成一个磷酸的自组装单分子膜, 再将其依次浸入 $ZrCl_4$ 和 1, 10-十烷基二磷酸的水溶液中得到一个磷酸锆三层膜 MUD-Zr-DBPA。以此三层膜诱导磷酸锌结晶生长。

2 有序分子膜诱导生物功能晶体的生长机制

目前的研究水平还不足以从分子水平上揭示有序分子膜诱导下的生物功能晶体的生长机制。

根据经典晶体成核理论可得到晶核形成的热力学条件是^[6]:

$$\text{对于均相成核: } \Delta G = -RT \ln S + sA \quad (2)$$

$$\text{对于异相成核: } \Delta G = -RT \ln S + s_{cl}A_{cl} + (s_{cs} - s_{sl})A_{cs} \quad (3)$$

式中, ΔG 为形成稳定晶核的自由能; s 为饱和溶液中形成新相所需克服的界面能; S 为溶液的过饱和度; 下标 c, s, l 分别代表结晶粒子、基质和液体相; R 为气体常数; A 为表面面积。

由以上热力学条件可以看出, 降低表面能或增加溶液的过饱和度都可促进晶体的异相成核; 如果晶核与基质界面净界面能比晶核和溶液间的界面能低, 即 $(s_{cs} - s_{sl})A_{cs} < s_{cl}A_{cl}$, 那么就有利于异相成核。可见有机表面的作用主要是降低形成晶核的活化能。

有机基质/无机物质溶液界面的分子识别决定了生物矿化的位置、晶核的种类和晶核的取向等, 这种分子识别发生在有机基质溶液相的界面处, 界面特性起着重要作用。以 Langmuir 单分子膜和自组装膜作为模拟体系的膜控晶体生长不同于一般在溶液中的无机物质自发地沉淀和结晶。一般认为在晶体的成核取向是由有机/无机界面上的特殊结构信息决定的: 静电势相互作用、晶格几何匹配、立体化学匹配^[7]、氢键作用等。

2.1 静电势相互作用

由于 Langmuir 单分子膜头基带有电荷, 可吸引溶液中带相反电荷的离子, 即二者间存在静电势相互作用, 在诱导晶体成核时起很重要的作用。

崔福斋等^[8]研究了三种不同的单层膜: 十八酰胺、硬脂酸和十六醇诱导磷酸钙晶体的取向生长, 发现虽然这三种单层膜具有几乎相同的二维点阵结构, 但只有十八酰胺和硬脂酸诱导磷酸钙在 (0001) 面成核生长。这是因为三个头基 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{NH}_3^+$ 、 $-\text{OH}$ 的静电势差别导致了磷酸钙不同的结晶过程。在 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{NH}_3^+$ 周围可聚集 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 OH^- ; 而 $-\text{OH}$ 是中性基团, 周围不能聚集 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 OH^- , 不能进行分子识别, 对磷酸钙的结晶没有明显的影响。

2.2 晶格几何匹配

晶格几何匹配关系也是决定生物功能晶体在有机/无机界面上成核的重要因素之一。

如图 2(a)所示, 羟基磷灰石 (HAp) 在 (0001) 面 ($z=0$ 或 $1/2$) 上的 Ca^{2+} 和硬脂酸的负电荷头基间的晶格匹配关系。可以看出 $\text{Ca}-\text{Ca}$ 间的距离 0.54nm 与硬脂酸单层膜的晶格参数 ($a=0.49\text{nm}$, $b=0.74\text{nm}$) 相匹配。也正是 HAp (0001) 面上带正电的 Ca^{2+} 与硬脂酸单层膜上负电荷头基的这种匹配关系, 使得 HAp 在有机/无机界面上优先成核, 而不是磷酸八钙 (OCP) 成核。同样地, 如图 2(b), 十八酰胺带正电荷头基 $-\text{NH}_3^+$ 与 HAp 在 (0001) 面 ($z=1/4$ 或 $3/4$) 上的 PO_4^{3-} 、 OH^- 间也存在着完美的晶格匹配关系^[8,9]。

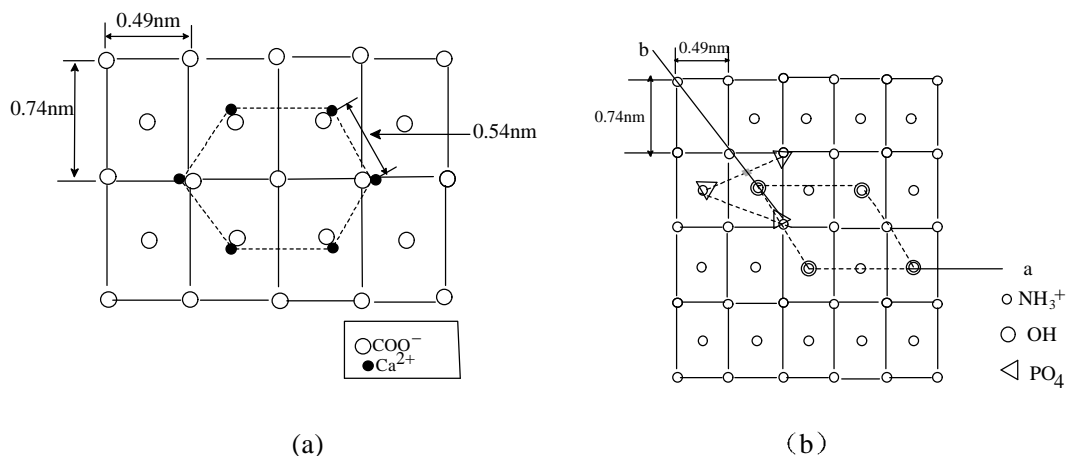


图2 (0001)面上 Hap 和硬脂酸膜 (a) 及十八酰胺膜 (b)间的晶格匹配关系^[8,9]

Fig.2 The lattice matching relationship between (0001) face of Hap and the (a)stearic amide film or (b) stearic acid film^[8,9]

2.3 立体化学互补

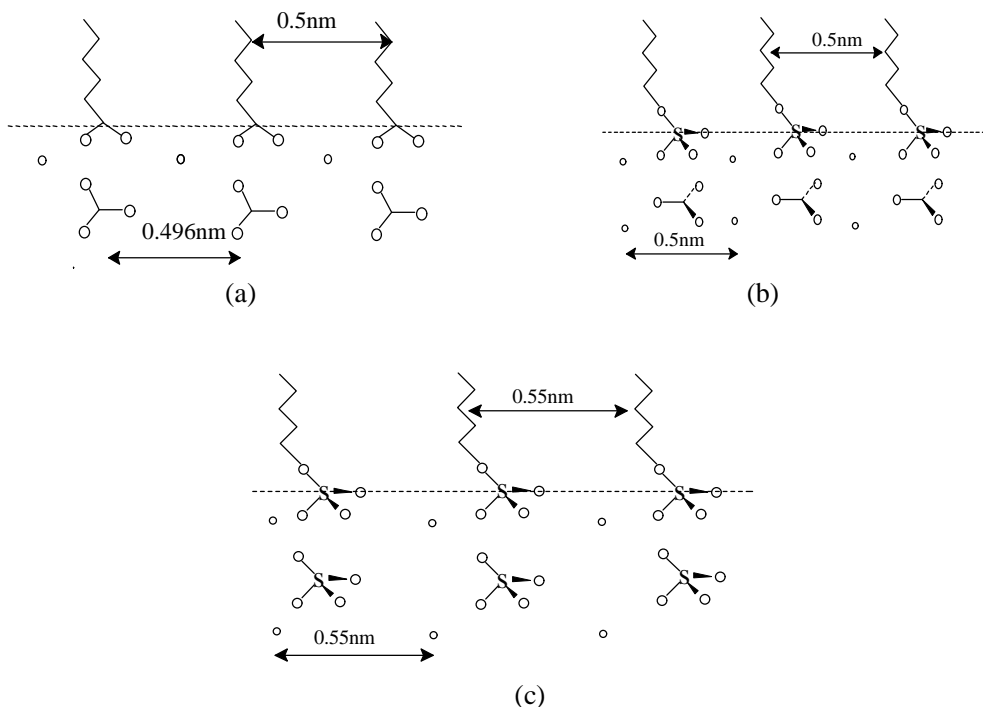


图3 单层膜与晶体界面的立体化学互补

(a) 硬脂酸单层膜下方解石在 (1 0) 面的成核; (b) 磺酸单层膜下方解石在 (001) 面的成核; (c) 磺酸单层膜下 BaSO₄ 在 (100) 的成核

Fig.3 stereochemical complementarity between monolayer and crystal interface.

除了静电势相互作用和晶格几何匹配外, 立体化学互补也起着决定作用, 例如单层膜阴离子头基的配位构型对生物功能晶体选择性成核和取向生长尤为重要。(1) 头基不同的单层膜可诱导相同晶体在不同晶面的成核。如图 3(a,b)中 RCOO⁻膜和 ROSO₃⁻膜诱导 CaCO₃ 晶体的生长, 由于羧基二齿状的排列同 CO₃²⁻ 中三个氧原子几乎垂直膜界面的排列相匹配, 从而诱导方解石 (1

0) 面的成核; 而 ROSO_3^- 中硫酸基三齿状的排列与 CO_3^{2-} 中三个氧原子平行于膜晶面排列相似, 从而使方解石优先在 (001) 晶面成核。(2) 头基相同单层膜也可诱导不同晶体的成核。同理因为立体化学的互补, 在长烷基硫酸单分子膜下, 方解石沿 (001) 面生长, BaSO_4 则沿 (100) 面生长。更有趣的是, Ca^{2+} (或 Ba^{2+}) 之间的距离与长链烷基间的间隔几乎相等, 这说明膜头基构型不仅能决定晶体的成核, 而且对晶体的生长也有重要影响^[7]。

2.4 氢键作用

氢键作用对有机单层膜选择性地诱导生物功能晶体的取向生长也是一个重要的影响因素。如 Peter J. J. A. Buijnsters 等^[10]研究了含酰胺基的磷脂可作为模板诱导方解石在 (10.0) 面的取向生长, 这是由于质子化的磷酸头基与醚氧基形成氢键, 使得磷酸基团向下弯曲的两个氧原子与水面接触, 形成二齿状排列, 因为立体化学互补, 亚相中的 CO_3^{2-} 也采取相同的排列, 从而诱导了方解石在 (10.0) 面的取向结晶。

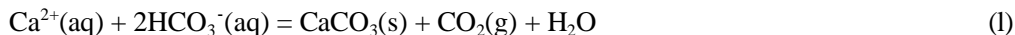
另外, 膜压大小^[11]、膜的相态、其它膜物质的加入、成核物种浓度、溶液的 pH 值、不同结晶阶段对晶体的形貌、结构和取向等方面也有重要影响。

3 膜诱导下生物功能材料的合成

有序分子膜诱导生成的大小均匀, 具有特定取向的生物功能晶体可用于合成形式复杂的晶体材料, 可作为新型催化剂的载体, 生物医药移植, 药物载体, 病原体和 DNA 传输和释放的媒介。目前, 因碳酸钙、磷酸钙和草酸钙是生物体硬组织中无机物的主要成分或具有医学上特殊的研究价值而成为国内外科学者研究的热点。

3.1 碳酸钙

碳酸钙是生物体如贝壳、牙齿等的重要成分之一, 也是尿结石的主要成分之一。早期研究有机基质控制 CaCO_3 的取向生长, 是在软体动物壳上进行的, 发现 Ca-Ca 的距离与反平行 β -折叠片蛋白质骨架上的羧酸官能团的间距相匹配。后来把提取的蛋白质吸附到玻璃基质上诱导 CaCO_3 的取向生长, 发现立体化学互补和静电势相互作用起着重要作用, 这些研究的困难在于大分子成分复杂, 很难描述其界面结构。而 Langmuir 单层膜作为在空气/液体界面上铺展经恰当设计的不溶性两亲分子二维基质来模拟三维结晶界面, 可促使晶体在单层膜界面成核。英国的 Mann 等^[7,12]利用 Langmuir 单层膜研究了 CaCO_3 的成核取向结晶, 基本过程是: 将双亲物质铺展液铺展在 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 过饱和溶液表面上, 维持一定的膜压, 随着 CO_2 的不断逸出 CaCO_3 在界面处结晶析出:



研究发现 (1) 改变头基电荷和 Ca^{2+} 的浓度对晶体结构和形貌有很大的影响, 如 RCOO^- 诱导方解石 {11.0} 面成核, RNH_3^+ 诱导六方球方解石 (00.1) 成核。当 $[\text{Ca}^{2+}] = 9 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时, RCOO^- 控制方解石的结晶; 当 $[\text{Ca}^{2+}] = 4.5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时, RCOO^- 控制文石的结晶。(2) 不同立体化学构型的单分子膜诱导生成不同结晶取向的 CaCO_3 。 RCOOH 头基为二齿状排列诱导生成 (1 0) 方解石的取向, RSO_3H 或 RPO_3H_2 为三齿状排列诱导方解石 (00.1) 成核取向。(3) 亚相中其它阳离子 (如 Mg^{2+}) 的存在可影响晶体的类型。例如, 在碳酸氢钙过饱和溶液中不存在 Mg^{2+} 时诱导生成方解石晶体, 当在过饱和溶液中有 Mg^{2+} 时诱导生成文石晶体, 这是因为在单分子膜界

面 Mg^{2+} 代替了部分 Ca^{2+} ，减小了体系的成核效率。

最近, Joanna Aizenberg 等人^[13]先在金属基片修饰上 $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{X}$ (X 为 $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OH}$) 的单层膜后, 以一个弹性印模进行微接触。用 10 mmol/L 的 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 乙醇溶液冲洗, 使不与印模接触的部分钝化, 后将基片支撑于 CaCl_2 的溶液中, 再放入一个在底部盛有固体 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 的封闭干燥器内, 进而在基片上形成碳酸钙晶体。如图 4 所示得到了银基片上以 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ 为背景的规则排列的方解石的结晶图案。这是因为在 COO^- 头基区有晶体的形成, 而在 $-\text{CH}_3$ 头基区无晶体的形成。

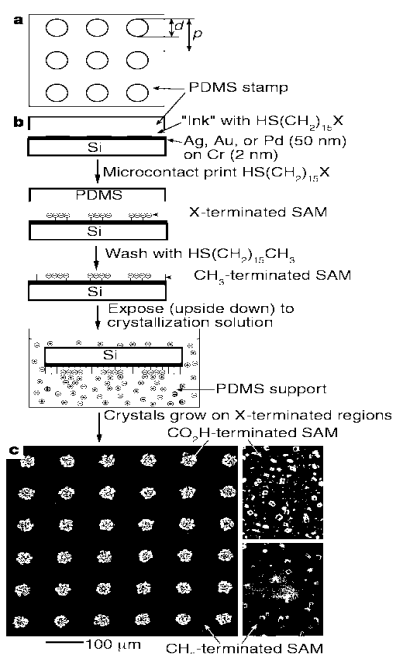


图4 微接触自组装膜法选择性诱导碳酸钙晶体生长的过程示意图^[13]

Fig.4 The progress scheme of inducing selectively calcium carbonate growth using micropatterned self-assembled monolayers^[13]

3.2 磷酸钙

与其它钙质生物材料相似，骨质的矿化是通过形成骨胶原网络开始的。多孔羟基磷灰石是一种性能优异的人体硬组织修复材料，植入体内能逐步参与代谢以至最终与人体骨骼结合成一体，在移植手术中有很大的应用前景。

最近,用不同有序分子膜调控磷酸钙的结晶生长已成为生物矿化新的研究热点。例如 Kazuo Onuma 等^[14]用自组装法研究了磷酸钙在仿生溶液中的结晶。即用 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ 自组装膜修饰的金基片浸入仿生溶液 (NaCl , 140mmol/L; CaCl_2 , 2.5mmol/L; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1mmol. dm^{-3}) 中, 1h 后在界面上有磷酸钙晶体生成。磷酸钙晶体的生长分两个阶段: 起始阶段(几小时内), 形成的磷酸钙纳米点直径为 5-10nm, 在二维空间中以六方密堆积规则排列。经 XPS 分析, 此时 Ca/P 比 Hap 中的 Ca/P 高, 这是因为 $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ 簇以 c 轴平行于硫醇界面与两个 $-\text{COO}^-$ 结合的。后一阶段(大于 1 天), 生成的磷酸钙粒子的直径增大为 20~30nm, 结构的有序性变差。最近, Xu 等^[15]提出了一种在硬脂酸单层下合成碳酸磷灰石的新方法: 在含有 HPO_4^{2-} 的碳酸氢

钙的过饱和溶液的亚相上铺展硬脂酸单层膜诱导形成无定形的碳酸磷酸钙薄膜前驱物,再沉积到基片上加热到 900°C 使其发生相变生成碳酸磷灰石结晶膜。

另外,聚电解质多层膜也可诱导磷酸钙晶体的成核、生长^[16]。

3.3 草酸钙

草酸钙是尿结石的主要成分。以有序分子膜作为模板诱导草酸钙晶体生长,对于模拟生物体内尿结石的形成和抑制具有重要的意义。

Whipps 等^[17]研究了一水草酸钙($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)在一系列磷脂单分子层(双十六烷基磷脂酰甘油酯(DPPG)、双十六烷基磷脂酰丝氨酸(DPPS)、双十六烷基磷脂酰胆碱(DPPC)和花生酸等)诱导下的成核。在各种单分子膜的诱导下,90%的晶体以(101)晶面面向膜/水界面定向生长。这种选择性是由于这些磷脂单分子膜有利于富集钙的(101)晶面生长。比较上述三种磷脂单分子膜,在 DPPG 组装阴离子单分子膜下面 $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 晶体的生长速度较快。

Tunik 等^[18]研究了阴离子表面活性剂硫代丁酸二异辛酯(AOT)单分子膜诱导下草酸钙晶体的生长。采用 X 射线粉末衍射和热分析方法研究了晶体的相组成,用扫描电子显微镜和电子衍射法研究了它们的晶体形态。在膜控体系中,当 AOT 的浓度小于其临界胶束浓度(CMC)时,表面活性剂优先选择一水草酸钙(010)晶面生长。

3.3 氨基酸

Jung F. Kang 等^[19]研究了 4'-羟基-4-硫醇二苯,4-(4-硫醇苯)-吡啶及它们与 4'-甲基-4-硫醇二苯混合自组装膜作为模板诱导甘氨酸的结晶。在这些模板下,甘氨酸以 α -甘氨酸结构成核生长。在甘氨酸成核过程中,氢键作用起着重要的作用。4'-羟基-4-硫醇二苯自组装膜界面的甘氨酸晶体几乎以平行于{011}面成核,这是因为在界面上 COO^- 、 NH_3^+ 与有机单层的 OH 形成了氢键,氢键作用越强,甘氨酸分子的偶极越垂直于自组装膜界面。4'-羟基-4-硫醇二苯和 4-(4-硫醇苯)-吡啶的浓度不同,可诱导甘氨酸晶体在不同的晶面成核。另外,Cooper 等^[20]在较低的膜压下对天冬氨酸和天冬酰胺在酯胺盐单层下结晶情况进行了研究。

除上述 4 种生物功能材料外,利用有机单分子膜也可控制半导体纳米材料的取向生长,该方法简单、易操作,通过改变成膜物质可得到不同类型的晶体。

4 结束语

有序分子膜诱导生物功能晶体材料的取向生长的一个最大优点是有机界面的官能团和堆积方式很容易被修饰,这不仅有助于弄清生物矿化的机制,而且极有可能发展成为结晶成核工程的一种新途径,在结晶科学和功能材料科学等高科技领域中得到应用。人们可以通过设计、合成不同结构的两亲分子和选择不同的基质来改变气/液、液/液界面的特性,如几何形状、空间电荷分布、水合作用、缺陷位置和表面弛豫等,以达到调节界面生物矿物成核密度、结晶形态和大小之目的。

利用有序分子膜作为诱导生物功能晶体生长的模板,迄今已成功合成了 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 CaCO_3 、 CaC_2O_4 、 BaSO_4 、 CuSO_4 、 NaCl 、 FeOOH 等晶体材料。近几年,模拟生物体内生长环境,利用生物两亲分子膜分别控制碳酸钙、磷酸钙和草酸钙的生长已成为生物矿化机理研究的主攻方向。因此我国从事生物功能材料化学研究的学者应该从这些方面入手,去深入研究生物矿化机制,

在仿生材料、新型功能材料方面作出贡献！

参考文献

- [1] 欧阳健明. LB 膜原理与应用. 广州:暨南大学出版社 1999:248~249.
- [2] Bunker B C, Rieke P C, Tarasevich B J et al. Science, 1994, 264:48~55.
- [3] Tarasevich B J, Rieke P C, Liu J. Chem. Mater., 1996, 8:292~300.
- [4] Zhang J, Kirkham J, Wallwork M L et al. Langmuir, 1999, 15(23):8178~8183.
- [5] Feng S, Bein T. Nature, 1994, 368:834~836.
- [6] Aksay I A, Tran M, Manne S. Science, 1996, 273:892~898.
- [7] Heywood B R, Mann S. Chem, Mater., 1994, 6:311~318.
- [8] Ma C L, Lu H B, Wang R Z et al. J. Crystal Growth, 1997, 173:141~149.
- [9] Lu H B, Ma C L. J. Crystal Growth, 1995, 155:120~125.
- [10] Peter J J A Buijnsters, Jack J J M Donners, Susan J Hill et al. Langmuir, 2001, 17(12):3623~3628.
- [11] Cooper S J, Sessions R B, Lubetkin S D. Langmuir, 1997, 13:7165~7172.
- [12] Mann S, Didymus J M, Sanderson N P et al. J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1990, 86(10):1873~1880.
- [13] Joanna Aizenberg, Andrew J Black, Georgem. Whitesides. Nature, 1999, 398: 495~498.
- [14] Kazuo Onuma, Ayako Oyane, Tadashi Kokubo. J Phys. Chem. B, 2000, 104(50):11950~11956.
- [15] guofeng Xu, Aksay Ilhan A, Groves John T. J. Am. Chem. Soc., 2001, 123: 2196~2203.
- [16] Ngankam P A, Lavalle Ph, Voegel J C et al. J. Am. Chem. Soc., 2000, 122(37): 8998~9005.
- [17] Whipps S, Khan S R, Backov R et al. J. Crystal. Growth, 1998, 192: 243~249.
- [18] Tunik L, Addadi L, Garti N et al. J. Crystal. Growth, 1996, 167: 748~755.
- [19] Jung F. Kang, Julien Zaccaro, Abraham Ulman et al. Langmuir, 2000, 16: 3791~3796.
- [21] Cooper S J, Sessions R B, Lubetkin S D. J. Am. Chem. Soc., 1998, 120: 2090~2098.