

羟丙基甲基纤维素诱导丝素蛋白的构象转变*

张 瑛 曹传宝** 吕 强 马西兰 朱鹤孙

(北京理工大学材料科学研究中心 北京 100081)

摘 要 制备了羟丙基甲基纤维素(HPMC)和丝素蛋白(SF)的共混膜,用 FTIR, XRD 和 DSC 方法对共混膜的结构进行了表征,讨论了 HPMC 对 SF 的构象转变作用,结果表明,HPMC 能够有效的诱导 SF 的构象转变,HPMC 的比例是影响 SF 的构象转变程度的重要因素.当混入 3% ~ 10% HPMC 时, SF 的构象存在由无规线团或 Silk I 向 Silk II(β -折叠)的转变,当加入 7% HPMC 时, β -折叠构象的比例最大.从红外分析可知,构象转变是由于适量的 HPMC 与 SF 混合形成了二者之间的分子间氢键所致.对不同比例的共混膜测定其在水中的溶出率,结果显示当 HPMC 的比例为 7% 时 SF 几乎不溶于水.

关键词 丝素蛋白, 构象转变, 羟丙基甲基纤维素

丝素蛋白(Bombyx mori)是从蚕丝中提取的天然高分子纤维蛋白,它赋予蚕丝优良的机械性能如强度,弹性,柔韧性.由于 SF 在湿态下具有良好的生物相容性,透气透水性和生物降解性^[1,2],这种高分子除了传统的纺织应用外,近年来已经应用于生物技术和生物材料方面,其中典型的应用包括酶固定化材料^[3]、功能性细胞培养基质和药物缓释载体等等^[4,5].现在人们正在研究 SF 在心血管,人造皮肤等方面的应用.

在上述的生物材料方面的应用中 SF 往往需要制成薄膜、多孔膜、粉末或凝胶,因此, SF 的溶解是必不可少的.通常认为在 SF 中有 3 种构象, Silk I, Silk II(β -折叠)和无规线团^[6].从 SF 水溶液制得的薄膜主要是无规线团构象,通过改变成膜条件如成膜温度^[7],初始浓度^[8]和干燥速率^[9], SF 的构象可以从无规线团转变为 β -折叠,这种 β -折叠转变能显著提高丝素薄膜的力学性能和热稳定性.

目前,一些文献报道,通过混入天然或合成高分子可以增加 SF 的 β -折叠构象,例如海藻酸钠^[10]、壳聚糖^[11]、聚乙烯醇^[12]. Noishiki 等报道混入微晶纤维素能有效提高 SF 的力学性质^[13].纤维素/SF 共混膜的物理性质和结构已有研究^[14-16],他们将 SF 和纤维素溶于铜铵溶液,然后在丙酮-乙酸浴中凝固,再用水清洗,共混膜的制备比较复杂.

为了找到一种简单而有效的诱导 SF 构象转变的方法,我们注意到一种纤维素衍生物-羟丙基甲基纤维素(HPMC).这种高分子在食品、医药领域已经广泛应用,而且溶于水,这使共混膜的制备简单,此外, HPMC 含有大量易形成氢键的羟基^[17],在 SF 和 HPMC 之间可能形成分子间氢键.

本文报道了由 HPMC 诱导的 SF 的构象转变.使用 FTIR、DSC、XRD 和在水中溶出率来表征共混膜的结晶转变,探讨了共混比例对 SF 构象转变的影响.

1 实验

1.1 膜的制备

家蚕丝在 0.5% (W) Na_2CO_3 溶液中煮 1 h 以脱去丝胶蛋白, SF 在 $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 1:8:2$ (摩尔比)溶剂中,于 80℃ 下溶解,用蒸馏水透析 3 天,过滤,得到 SF 水溶液,其浓度用 UV-VIS 紫外分光光度计测定.

羟丙基甲基纤维素(60RT50)由瑞康公司(中国)提供.

将 SF 溶液(64 g/L)和 HPMC 溶液(35 g/L)按质量比为 10/0, 9.7/0.3, 9.5/0.5, 9.3/0.7, 9.0/1.0, 0/10 均匀混合,静置脱泡,浇于聚苯乙烯培养皿中 50℃ 下干燥成膜.薄膜的编号依次为 a, b, c, d, e, f.

* 2003-06-30 收稿, 2003-09-02 修稿, 国家重大基础研究(973)项目(项目号 G1999064705)及国家高技术(863)研究项目(项目号 2002AA326030); ** 通讯联系人

1.2 膜的结构表征

薄膜的红外光谱用 Perkin 公司的傅立叶变换红外光谱仪记录,测量范围 4000 ~ 1000 cm⁻¹;X-射线衍射谱图用 Rigaku D-Max-2400 型全自动 X-射线衍射仪记录,CuKα 射线(λ = 1.54 nm)、管电压 30 kV、管电流 20 mA、扫描速度 0.5 (°)/min,扫描范围 5 ~ 40°(2θ);DSC 图谱用美国 Perkin-Elmer-DSC-7 型热分析仪测定,升温速度 10K/min,氮气流速 50mL/min.

1.3 膜的热水溶解性

准确称量 0.2 g(W₁)薄膜,放入烘箱中 105℃ 烘干称重(W₂),算出含水率(V).从同一块薄膜取样品 0.5 g(W₃),放入蒸馏水中,(37 ± 1)℃ 恒温振荡 72 h 后清洗,105℃ 烘干后称重(W₄),算出膜的溶出率(S):

$$V = (W_1 - W_2) / W_1$$
$$S = [W_3(1 - V) - W_4] / W_3(1 - V)$$

2 结果与讨论

2.1 红外光谱分析

图 1 示出 SF、HPMC 及其共混膜在 2400 ~ 4000 cm⁻¹范围的 FTIR 光谱. HPMC 膜的红外光谱中,3448 cm⁻¹处的峰归属于 O—H 的伸缩振动.共混后,在 3450 ~ 3288 cm⁻¹处出现一个较宽的吸收

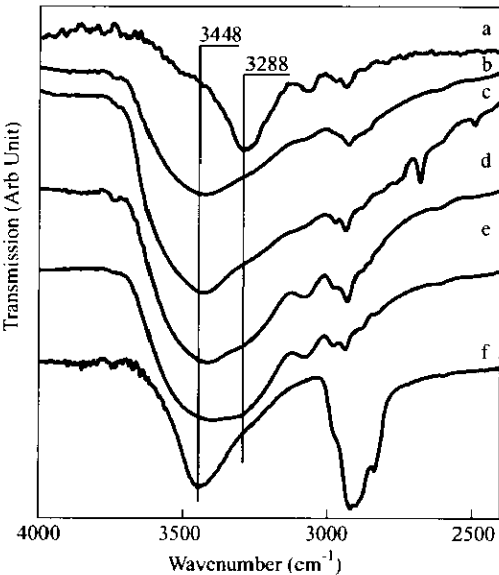


Fig. 1 FTIR spectra of SF/HPMC blend membranes in the range 2400 ~ 4000 cm⁻¹
HPMC content: a) 0%; b) 3%; c) 5%; d) 7%; e) 10%; f) 100%

峰,比 SF 的 N—H 和 HPMC 的 O—H 处的吸收峰要宽,并且随着 HPMC 比例的减少,峰值向低波数移动,但是样品 e(10% HPMC)的宽峰却没有明显的最大值,只是 SF 和 HPMC 的吸收峰的简单叠加.以上现象说明当 HPMC 比例为 3% ~ 7% 时,由于 HPMC 含有大量易形成氢键的羟基,HPMC 的 O—H 和 SF 的 N—H 之间形成了分子间氢键,而当 HPMC 比例为 10% 时,二者之间的分子间作用力相对减弱,这是由于 HPMC 含有大量的羟基,过量的 HPMC 倾向于形成 HPMC 的分子内氢键,从而使 SF 和 HPMC 的分子间氢键作用力减弱.

纯 SF、HPMC 膜和共混膜在 1000 ~ 1800 cm⁻¹范围的红外谱图示于图 2,其酰胺 I,酰胺 II,酰胺 III 的吸收峰列于表 1.

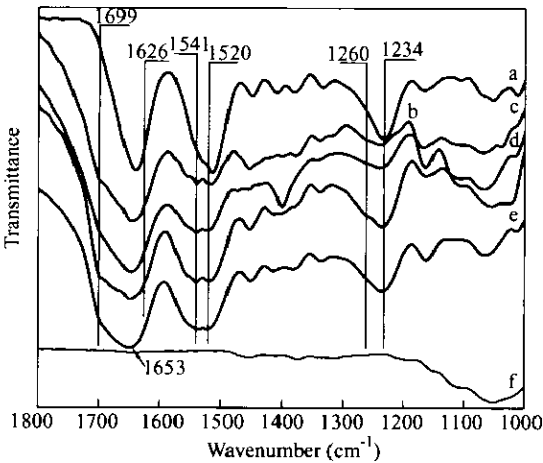


Fig. 2 FTIR spectra of SF/HPMC blend membranes in the range 1000 ~ 1800 cm⁻¹
HPMC content: a) 0%; b) 3%; c) 5%; d) 7%; e) 10%; f) 100%

Table 1 Comparison of FTIR frequencies (cm⁻¹) for the blend SF membranes

	a	b	c	d	e
Amid I C=O stretching	1641	1699 ~ 1626	1699 ~ 1626	1699 ~ 1626	1699 ~ 1626
Amid II	1530	1541	1541	1541	1539
N—H Deformation	1514	1515	1520	1521	1520
Amid III Vibrations involving O—C—N and N—H	1234	1240	1240	1260 1238	1234

酰胺 I 对应于氨基酸残基的 C=O 伸缩振动. SF 存在无规线团、Silk I 和 Silk II(β-折叠)3 种构

象,无规线团或 Silk I 和 Silk II(β -折叠)所对应的特征吸收范围分别在 $1640 \sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1620 \sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ ^[18,19]. 从图中可知,纯 SF 在 1641 cm^{-1} 出现一个对称的吸收峰,归属于无规线团或 Silk I. 当混入 3% ~ 10% HPMC 时,均在 $1699 \sim 1626 \text{ cm}^{-1}$ 出现宽的酰胺 I 特征吸收峰,可以断定共混膜中含有 β -折叠构象,也可能存在 Silk I,这说明加入 HPMC 使得 SF 的构象发生了转变. 值得注意的是 1699 cm^{-1} 处的吸收峰在加入 3% ~ 7% HPMC 时逐渐增强,而 HPMC 的加入量增加到 10% 时,此峰强度减弱,即在混入 7% HPMC 时, 1699 cm^{-1} 处峰强度最大, 1699 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 Silk II(β -折叠)构象^[8,20],这说明混入 7% HPMC 时, β -折叠构象转变最大.

酰胺 II 由 N—H 键的变形振动引起的, $1540 \sim 1530 \text{ cm}^{-1}$ 范围内的吸收峰为无规线团构象或 Silk I, 1522 cm^{-1} 处吸收峰属于 β -折叠构象^[21]. 纯 SF 膜在 1514 cm^{-1} 处有一强吸收峰, 1530 cm^{-1} 处出现一弱吸收峰,而不同比例的共混膜都在 1520 cm^{-1} 和 1541 cm^{-1} 出现两个吸收峰,并且这两个吸收峰叠加在一起,说明加入 3% ~ 10% HPMC 时 SF 出现了 β -折叠构象,可能含有 Silk I.

酰胺 III 为 O—C—N 和 N—H 振动的共同作用,吸收峰在 $1230 \sim 1260 \text{ cm}^{-1}$ 范围内, 1235 cm^{-1} 处的吸收峰为无规线团或 Silk I, 1260 cm^{-1} 和 1240 cm^{-1} 处吸收峰则归属于 β -折叠构象^[22,23]. 纯 SF 膜在 1234 cm^{-1} 处出现吸收峰,为无规线团或 Silk I. 加入 3% ~ 10% HPMC 后,吸收峰则明显加宽,范围在 $1230 \sim 1260 \text{ cm}^{-1}$, 其中 3% ~ 7% HPMC 共混膜在 1240 cm^{-1} 出现最大值,而且 1260 cm^{-1} 处的吸收峰强度随着 HPMC 加入量的增加而增强,但 10% HPMC 共混膜,吸收峰的最大值为 1235 cm^{-1} 处,在 1260 cm^{-1} 处的吸收峰比 7% HPMC 共混膜在此处的吸收峰强度弱. 这进一步说明加入 HPMC 使得 SF 出现 β -折叠构象,也可能含有 Silk I, SF 的构象发生了转变,并且在混入 7% HPMC 时, β -折叠构象的比例最大.

以上酰胺 I, 酰胺 II, 酰胺 III 的分析表明: HPMC 能够诱导 SF 的构象转变. 由于 SF 和 HPMC 形成分子间氢键,导致 SF 分子重排,从无序状态转变为有序排列,从而 SF 的构象从无规线团或 Silk I 转变为 β -折叠构象. 在海藻酸钠/SF^[10]、壳聚糖/SF^[11] 和纤维素/SF^[14] 共混体系中也发生了相似的构象转变. 但是当 HPMC 的共混比例上升到

10% 时,由于过量的 HPMC 自身形成分子内氢键,而使 HPMC 和 SF 的分子间氢键作用力很弱,从而迫使 SF 分子进行有序重排的程度大大降低.

2.2 X-衍射分析

图 3 为 SF/HPMC 及其共混膜的 X-射线衍射图谱. 从图中可以看出,纯 SF 膜衍射图谱是一个宽的非晶衍射峰,说明纯 SF 膜构象主要为非晶态即无规线团,纯 HPMC 膜在 11.0° 和 19.3° 分别出现弱的 α 和 β 的衍射峰. 而两种高分子共混后的衍射图谱发生了明显变化,当 HPMC 比例为 3% ~ 10% (重量比) 时, 2θ 在 20.0° 出现一个强的衍射峰,在 11.8° 、 24.4° 出现两个较弱的衍射峰,其中在 20° 和 24.4° 处的衍射峰是 SF 的 Silk II(β -折叠)的特征峰,而 11.8° 表示 Silk I^[24],因此说明在加入 HPMC 的共混膜中存在 Silk I 和 Silk II, HPMC 的加入引起 SF 的构象转变. 从各比例的共混膜的衍射图中可以明显看出, $2\theta = 11.8^\circ$ 的衍射峰在 HPMC 比例为 7% 时出现最小值,这说明其 β -折叠构象在此比例转变得最多. 以上结果表明加入 HPMC 使得 SF 出现 β -折叠构象,在混入 7% HPMC 时 β -折叠构象的比例最多.

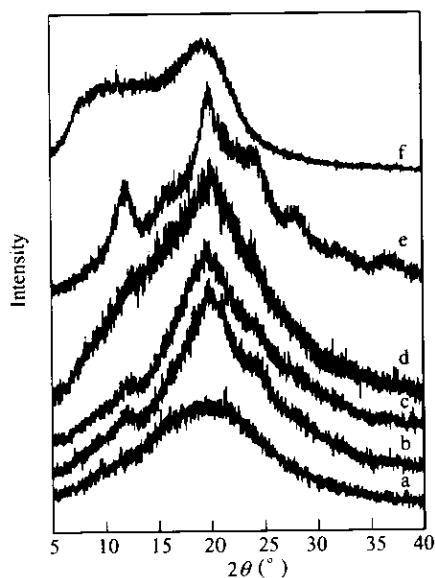


Fig. 3 X-ray diffraction profiles of SF/HPMC blend membranes
HPMC content: a) 0%; b) 3%; c) 5%; d) 7%; e) 10%; f) 100%

2.3 DSC 分析

在图 4 的 DSC 曲线中,纯 SF 膜在 224.4°C 出现放热峰,此峰是结晶峰,所对应的温度为结晶温度(T_c),是由升温引起 SF 构象从无规线团或 Silk

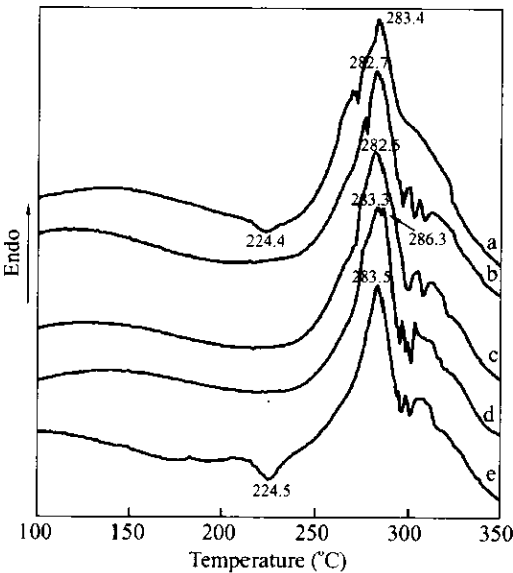


Fig. 4 DSC thermogram of the SF/HPMC blend membranes
HPMC content: a) 0%; b) 3%; c) 5%; d) 7%; e) 10%

I 转变为 Silk II(β -折叠构象)结晶构象形成的^[25], 在 283.4℃ 出现吸热峰,这是由于 SF 的热降解所引起的^[26], 对应温度为熔点 (T_m). 纯 SF 膜在 224℃ 出现放热峰说明纯 SF 膜的构象主要为无规线团或 Silk I. 在加入 3% ~ 7% HPMC 后, 在 224℃ 的放热峰消失, 这意味着共混膜中 SF 的构象中 Silk II 即结晶态显著增加. 然而当 HPMC 加入量为 10% 时, 在 224℃ 处的放热峰又重新出现, 说明 SF 的构象中 Silk II 的含量少, 该位置峰的强度比纯 SF 样品稍大, 可能与测试时样品的用量的不同有关. 3% ~ 10% HPMC 的共混膜在 283.0℃ 附近均出现吸热峰, 此外 7% HPMC 共混膜在 286.3℃ 出现一个尖的吸热峰, SF 的取向程度会在一定程度影响熔点温度, 取向程度越大 T_m 越高, 故可以说明在各共混比例中 7% HPMC 共混膜的取向程度最大, 即 SF 形成的有序构象(Silk II)最多. 以上分析说明当 HPMC 为 3% ~ 10% 时, HPMC 能诱导 SF 的构象转变, 在混入 7% HPMC, Silk II 的比例最多, 以上结果与 FTIR 和 XRD 的结论相一致.

2.4 热水溶出率

由于 SF 的无规线团和 Silk I 溶于水, 而 β -折

叠构象不溶于水^[27], 因此可以通过测定共混膜在水中的失重来判断其结晶度. 从图 5 可以看出共混膜的失重随着 HPMC 比例增加而降低, 当 HPMC 为 7% 时, 共混膜几乎不溶于水, 但是当 HPMC 比例再增加时, 共混膜的溶出率则急剧增加. 这表明当 HPMC 的添加量为 3% ~ 7% 时, HPMC 有效的诱导了 SF 的构象转变, 结晶度随着 HPMC 比例的增加而提高, 但 HPMC 的比例增加到 10% 时, 由于该成分的样品中转变的 β -折叠构象含量少, 因而其失重显著增加.

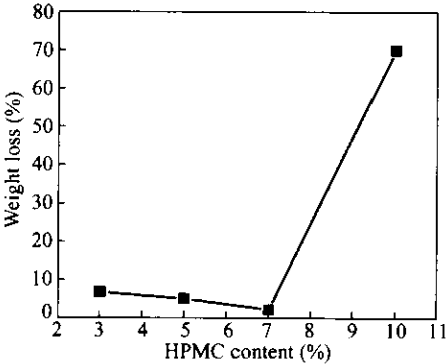


Fig. 5 Weight loss of the SF/HPMC blend membranes immersed in water for 72 h

综上所述结果表明 HPMC 能有效的诱导 SF 的构象转变, HPMC 的混入比例是影响构象转变的重要因素. 当 HPMC 为 3% ~ 7% 时, SF 的构象出现 β -折叠, 并且 β -折叠构象的比例随着 HPMC 的增加而增加, 当 HPMC 为 7% 时, 构象转变最完全, 促使构象转变的原因是 HPMC 和 SF 分子间形成了氢键, 使 SF 分子不得不调整自身构象, 从而引起其构象转变. 但是当 HPMC 的混入比例增加到 10% 时, HPMC 对 SF 的构象转变的诱导作用小, 这是由于过量的 HPMC 自身形成分子内氢键, 从而使 SF 和 HPMC 的分子间氢键作用力减弱. 当 HPMC 为 7% 时, 热水溶出率最小, 几乎不溶于水, 而且由于 HPMC 混入量很少, 共混膜的性质主要体现 SF 的性质, 这就为 SF 在人工血管方面的应用提供了可能.

REFERENCES

- 1 Minoura N, Tsukada M, Nagura M. *Polymer*, 1990, 31: 265 ~ 269
- 2 Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M. *J Biomed Mater Res*, 1999, 46: 382 ~ 389
- 3 Kawahara Y. *J Seric Sci, Jpn*, 1993, 62: 272 ~ 275
- 4 Inouye K, Kurokawa M, Nishikawa S, Tsukada M. *J Biochem Biophys Methods*, 1998, 37: 159 ~ 164
- 5 Demura M, Asakura T. *J Membr Sci* 1991, 59: 39 ~ 52
- 6 Asakura T, Kuzuhara A, Tabeta R, Saitô H. *Macromolecules*, 1985, 18: 1841 ~ 1845
- 7 Magoshi J, Magoshi Y, Nakamura S. *J Appl Polym Sci*, 1977, 21: 2405 ~ 2407
- 8 Tretinnikov O N, Tamada Y. *Langmuir*, 2001, 17: 7406 ~ 7413
- 9 Tsukada M. *J Polym Sci Part B: Polym Phys*, 1986, 24: 457 ~ 460
- 10 Liang C X, Hirabayashi K. *J Appl Polym Sci*, 1992, 45: 1937 ~ 1943
- 11 Xin Chen, Wenjun Li, Yongyin Yu. *J Polym Sci: Part B: Polym Phys*, 1997, 35: 2293 ~ 2296
- 12 Li Mingzhong, Lu Senhenzhou, Wu Zhengyu, Tan Ke, Minoura Norihiko, Kuga Shigenori. *Internat J Biological Macromolecules*, 2002, 30: 89 ~ 94
- 13 Noishiki Y, Nishiyama Y, Wada M, Kuga S, Magoshi J. *J Appl Poly Sci*, 2002, 86: 3425 ~ 3429
- 14 Giuliano F, Maria R. *J Appl Polym Sci*, 1995, 56: 1537 ~ 1545
- 15 Yang G, Zhang L, Cao X, Liu Y. *J Membr Sci*, 2002, 210: 379 ~ 387
- 16 Yang G, Zhang, L, Liu Y. *J Membr Sci*, 2000, 177: 153 ~ 161
- 17 Raghavan S L, Trividie A, Davis A F, Hadgraft J. *International J of Pharmaceutics*, 2001, 212: 213 ~ 221
- 18 Surewicz W K, Mantsh H H. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 952: 115 ~ 130
- 19 Haris P I, Chapman D. *Biopolymers*, 1995, 37: 251 ~ 263
- 20 Ishida M, Asakura T, Yokoi M, Saito H. *Macromolecules*, 1990, 23: 88 ~ 94
- 21 Msakura T, Shimanouchi Y, Mizushima S. *J Chem Phys*, 1958, 29: 611 ~ 616
- 22 Bhatt N V, Ahirrao S M. *J Polym Sci: Part A: Polym Chem Ed*, 1983, 21: 1273 ~ 1280
- 23 Tsukada M J. *J Polym Sci: Part B: Polym Phys*, 1994, 32: 961 ~ 968
- 24 Liang C X, Hirabayashi K. *Polymer*, 1992, 33: 4388 ~ 4393
- 25 Chul I U, Kweon H Y, Park Y H, Hudson S. *Inter J Bio Macromolecules*, 2001, 29: 91 ~ 97
- 26 Jin N, Young H P. *J Appl Poly Sci*, 2001, 81: 3008 ~ 3021
- 27 Hae Y K, Young H P. *J Appl Polym Sci*, 1999, 73: 2887 ~ 2894

CONFORMATION TRANSITION OF SILK FIBROIN INDUCED BY BLENDING HYDROXYPROPYL METHYLCELLULOSE

ZHANG Ying, CAO Chuanbao, LÜ Qiang, MA Xilan, ZHU Hesun

(*Research Center of Materials Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081*)

Abstract The blend membranes of silk fibroin (SF) and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) were made. The effect of HPMC on the conformation transition of silk fibroin membranes was analyzed by Fourier transform infrared spectrum, X-ray diffraction, and Differential scanning calorimetry. The results demonstrated that the content of blending HPMC had a great influence on the conformation of silk fibroin membranes. The conformational change from a random coil or Silk I to β -sheet structure occurred when blending 3% ~ 10% HPMC and the β -sheet content was maximal when HPMC content was 7%. This result is due to the formation of intermolecular hydrogen bonds when some content HPMC was mixed with fibroin. The result of water-solubility showed the blend film was almost insoluble when HPMC content was 7%.

Key words Silk fibroin, Hydroxypropyl methylcellulose, Conformation transition