

胶原蛋白在离子液中的溶解及流变特性

王兆梅^{1,2}, 廖伟¹, 李琳¹, 郑翠¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

(2. 华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室, 广东广州 510640)

摘要: 研究了胶原蛋白在氯化胆碱·2ZnCl₂离子液体中的溶解性及溶液的稳态流变性能, 分别以水、乙醇、乙腈对胶原蛋白进行再生, 采用傅里叶—红外光谱 (FT-IR)、X射线广角衍射 (XRD)、热重示差扫描量热仪 (DSC) 等对再生胶原蛋白进行结构分析。氯化胆碱·2ZnCl₂是胶原蛋白的直接溶剂, 120 °C时胶原蛋白在离子液体中的溶解度可达到 11.3 g±0.2 g/100g。红外光谱显示, 乙腈再生的胶原蛋白具有完整的三股螺旋结构, 但结晶度、热稳定性都较原胶原蛋白样品有所降低。稳态剪切流变分析表明, 随着溶液浓度的升高, 胶原蛋白/离子液体溶液粘度增大, 且随剪切速率的增大, 粘度降低, 呈现假塑型流体特性; 当质量分数为 3 g/100g 时, 溶液呈现显著的剪切变稀现象, 且温度达到 90 °C, 剪切速率为 100 s⁻¹时溶液基本失去粘性。

关键词: 胶原蛋白; 离子液体; 溶解; 流变

文章编号: 1673-9078(2014)11-34-37

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.007

Dissolution and Rheological Behavior of Collagen in Ionic Liquids

WANG Zhao-mei^{1,2}, LIAO Wei¹, LI Lin¹, ZHENG Cui¹

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (2. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The solubility and steady-state rheological behavior of collagen in the ionic liquids based on choline chloride·2ZnCl₂ were studied. The collagen was regenerated using water, ethanol, and acetonitrile. The structure of regenerated collagen was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), wide angle X-ray diffraction (XRD), thermogravimetry-differential scanning calorimetry (DSC). Choline Chloride·2ZnCl₂ was used as the direct solvent for collagen, and the solubility of collagen in the ionic liquid at 120 °C was up to 11.3 g ± 0.2 g/100 g. The FT-IR results revealed that the acetonitrile-regenerated collagen had a complete triple helical structure, while the crystallinity and thermal stability of the regenerated collagen were somewhat lower than those of the original sample. The steady-state shear rheological analysis showed that the viscosity of collagen/choline chloride·2ZnCl₂ increased with increasing concentrations of solution and decreased with increasing shear rates, which are the characteristic features of a pseudoplastic fluid. When the mass fraction was 3 g/100 g, the shear-thinning phenomenon was observed in solution. Furthermore, the solution viscosity was almost disappeared when the temperature was 90 °C and the shear rate was 100 s⁻¹.

Key words: collagen; ionic liquid; dissolution; rheology

胶原蛋白是哺乳动物体内含量最丰富的一类蛋白质, 作为一种具有优良性能的可再生天然高分子化合物, 可应用于食品, 化妆品和生物医用材料等领域。然而, 由于胶原蛋白内部存在数量众多的氢键, 离子键, 范德华力和疏水键, 难溶于水或一般的有机溶剂中, 使得加工变得困难, 极大地限制了胶原蛋白的应用。离子液体由于具有蒸汽压低、极性高、溶解性强、

收稿日期: 2014-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371743; 31071505); 华南理工大学中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2013Z2078); 华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室开放基金项目

作者简介: 王兆梅 (1974-), 女, 博士, 副研究员, 主要研究生物大分子结构与功能

不易燃、热稳定性和化学稳定性良好等特性而被广泛的应用于分析化学、有机合成、材料制备学等领域, 且离子液体易回收, 是良好的绿色溶剂^[1]。研究者对不同的咪唑型离子液体如[EMIM]Cl、[BMIM]Cl、[DMBIM]Cl等咪唑氯盐溶解蚕丝、皮肤胶原蛋白、丝素蛋白等高分子聚合物进行研究^[2-6], 有研究报道[C₄MIM]Cl溶解再生出了可生物降解的胶原蛋白/纤维素水凝胶珠^[7], 结果表明, 离子液体是蚕丝等难容有机物的良好溶剂。但总体而言, 咪唑型离子液体普遍对胶原蛋白的溶解性不高, 此外, 咪唑型离子液价格昂贵, 也限制了其在相关领域的广泛应用; 同时, 尽管离子液体是新型绿色溶剂, 但是, 咪唑型离子液由于制造原料及制造过程中产生环境污染物, 因此,

其安全性一直备受争议。最近,有研究报道了胆碱类离子液,这种离子液是以氯化胆碱和氯化锌为主要原料,制备过程简单,完全不会产生环境污染,因此,被誉为真正安全的绿色新型溶剂。目前氯化胆碱· $x\text{ZnCl}_2$ 离子液体主要应用于电镀,Diels-Alder反应,Fischer吡啶合成反应等方面。研究显示,胆碱类离子液体对于单糖类和纤维素的乙酰化起到很好的促进作用^[8],具有良好生物相容性特点的,因此对生物大分子破坏作用较小,而关于其在天然高分子化合物溶解方面的研究目前还较少。

本文旨在考察胶原蛋白在氯化胆碱· 2ZnCl_2 离子液体中的溶解性,为开发胶原蛋白新型溶剂,以扩大其应用范围。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与实验材料

DZF-6050型真空干燥箱,上海博迅实业有限公司;DF-101S型集热式恒温加热搅拌器,巩义市予华仪器有限公司;BX51型偏光显微镜,日本OLYMPUS公司;VECTOR 33型傅里叶变换红外光谱仪、D8-ADVANCE全自动X射线衍射仪,德国Bruker公司;DSC Q200型扫描量热仪,美国TA公司;TI-H-25型超声清洗器,德国Elma公司。

氯化胆碱,氯化锌,乙醇,乙腈,均为分析纯;胶原蛋白(来源:猪皮,含量>95.0%);蒸馏水,实验室自制。

1.2 氯化胆碱氯化锌离子液体的制备

取13.96 g氯化胆碱分别与13.63 g、27.26 g、40.89 g ZnCl_2 于50 mL圆底烧瓶中150 °C恒温油浴加热,电磁搅拌反应1 h,直至获得透明无色均相液体。

1.3 胶原蛋白在离子液体中的溶解及再生

1.3.1 胶原蛋白在离子液体中的溶解

配置5 g氯化胆碱· 2ZnCl_2 离子液体于50 mL圆底烧瓶中,在70至170 °C每10分钟设置一个温度梯度,恒温电磁搅拌条件下逐次加入0.05 g胶原蛋白(80 °C真空干燥24 h),当加入的上一份胶原蛋白完全溶解后,再加入下一份,持续搅拌6 h至样品不能完全溶解为止。溶解过程中可采用偏光显微镜观察,胶原蛋白完全溶解时呈现黑场。直至所加胶原蛋白不能再溶解,趁热用高速离心机分离除去少量未溶解胶原蛋白,得到透明均相的胶原蛋白/离子液体溶液和未溶样品,并用偏光显微镜检测胶原蛋白溶液,以确保未溶样品

完全去除。用去离子水洗去未溶样品上的离子液体,真空干燥,称重,平行试验三次。由所加样品和离子液体的量,计算最佳温度下胶原蛋白在氯化胆碱· 2ZnCl_2 离子液体中的溶解度。

1.3.2 胶原蛋白的再生

将上一步中所得到的胶原蛋白/离子液体溶液转移到100 mL烧杯中,加入适量乙醇浸泡,静置过程中缓慢有白色絮状物析出。静置24 h后将溶液进行离心分离(4000 r/min, 15 min),得到固体沉淀物,再用乙醇洗涤3次,以除去其中残留的离子液体,最后于80 °C真空干燥24 h后得到再生胶原蛋白,置于真空干燥器中储存备用。分别采用蒸馏水、无水乙醇和乙腈作为再生试剂。

1.3.3 再生胶原蛋白的红外光谱分析(FT-IR)

胶原蛋白和再生胶原蛋白的红外光谱分别在VECTOR 33型傅里叶变换红外光谱仪上进行测定。胶原蛋白和再生胶原蛋白分别与1.0%精磨的KBr混合压片制样,测定样品的红外光谱。波数范围:4000~400 cm^{-1} ,波数精度:0.01 cm^{-1} ,分辨率:优于0.09 cm^{-1} 。

1.3.4 再生胶原蛋白X-射线衍射分析(XRD)

采用X-射线衍射仪分析对胶原蛋白和再生胶原蛋白的结晶结构进行分析,在 $\text{CuK}\alpha$ 射线下,工作电压40 kV,工作电流40 mA,在5-60°范围内测定胶原蛋白和再生胶原蛋白的X-射线衍射图谱。

1.3.5 再生胶原蛋白差示扫描量热分析(DSC)

热重分析采用差示扫描量热仪对样品的热稳定性进行表征。表征前试样经过干燥处理(80 °C真空干燥24 h)。实验在充 N_2 的条件下进行,氮气流速为25 mL/min,升温速率为10 °C/min,温度测定范围为30 °C到300 °C。

1.4 胶原蛋白/离子液体溶液的流变性能研究

采用德国Thermo Haake公司的HAAKE RheoStress 600型旋转流变仪测定胶原蛋白/氯化胆碱· 2ZnCl_2 离子液体溶液的稳态流变特性。采用锥板夹具,1°锥角钛钢,锥板直径为35 mm,板间间隙为52 μm ,剪切速率变化范围设为0.01~100 s^{-1} 。分别测定不同浓度的胶原蛋白/离子液体溶液在不同温度下的稳态粘度(η)随着剪切速率($\dot{\gamma}$)的变化规律。

2 结果与讨论

2.1 离子液体的选取

所制得的离子液体氯化胆碱· $x\text{ZnCl}_2$ ($x=1, 2, 3$),

经测定,其凝固点分别为 65 °C、20 °C 和 45 °C,只有氯化胆碱·2ZnCl₂ 离子液体在室温下呈液体状态,且性质最稳定,因此本研究选取的离子液体为氯化胆碱·2ZnCl₂。

2.2 胶原蛋白在离子液体中的溶解性

在胶原蛋白在离子液体中低温时能缓慢溶解,随着温度的升高,胶原蛋白的溶解度增大。温度低于 90 °C 时,离子液体的粘度较大,影响传质传热的进行,其能量不足以破坏胶原蛋白分子间的氢键,当温度升高到 120 °C 时,溶解度达到最大。温度高于 120 °C 后溶解速率的变化率显著降低,且 150 °C 时溶液颜色明显加深,说明此温度下胶原蛋白结构被破坏的程度较大,胶原蛋白失去活性,因此选择 120 °C 为胶原蛋白在氯化胆碱·2ZnCl₂ 离子液体中的最佳溶解温度。该温度下,测得胶原蛋白在氯化胆碱·2ZnCl₂ 离子液体中的溶解度为 11.3 g±0.2 g/100g (120 °C)。而据文献报道,胶原蛋白在离子液体氯代-1-烯丙基-3-甲基咪唑中加热至 140 °C 溶解度达到最大值为 8.78%^[9]。说明在离子液体氯化胆碱·2ZnCl₂ 中胶原蛋白的溶解性良好。

2.3 胶原蛋白的再生与结构表征

2.3.1 再生胶原蛋白的 FT-IR 分析

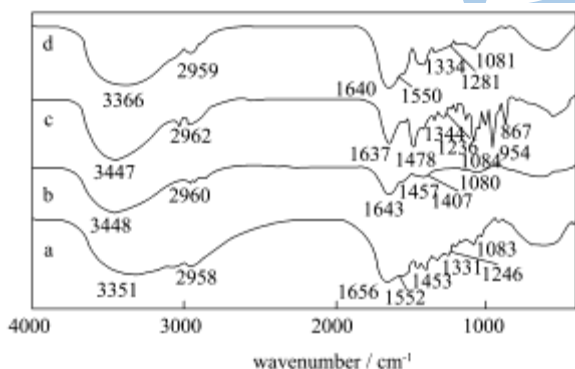


图 1 胶原蛋白 (a) 和再生胶原蛋白 (b 水再生、c 乙醇再生、d 乙腈再生) 的红外谱图

Fig.1 FT-IR spectra of native collagen (a) and regenerated collagen from water (b)/ethanol (c)/ acetonitrile (d)

将在离子液中充分溶解的胶原蛋白分别用去离子水、乙醇、乙腈再生,得到的再生胶原蛋白分别作红外检测分析。如图 1 所示,3500~3300 cm⁻¹ 附近是 N-H 伸缩振动峰,1700~1600 cm⁻¹ 附近是酰胺 I 带的 C=O 伸缩振动峰,为蛋白质二级结构变化的敏感区域,且其吸收最强,用于蛋白质的二级结构分析。1600~1550 cm⁻¹ 附近的吸收峰主要为胶原蛋白的 C-N 伸缩振动与 N-H 弯曲振动的反映,它和酰胺 I 带一样复杂,为 α-螺旋、β-折叠、转角和无规卷曲叠加的吸收带。d 图

1550 cm⁻¹ 处有明显的吸收峰,说明乙腈再生后的胶原蛋白有较完整的 α-螺旋结构,而 b 图和 c 图此处吸收峰发生较大红移,说明水和乙醇再生的胶原蛋白 α-螺旋结构发生破坏。1200~1360 cm⁻¹ 附近是酰胺 III 带的 N-H 变形振动峰。b 图此处无吸收峰,进一步说明水再生的胶原蛋白二级结构发生破坏。且乙醇再生胶原蛋白在 954 cm⁻¹、867 cm⁻¹ 等处出现了新的吸收峰,表明乙醇在再生胶原蛋白的过程中与胶原蛋白发生了衍生化反应。而 d 图中胶原蛋白的 N-H 伸缩振动峰位于 3366 cm⁻¹,说明了胶原蛋白肽链间氢键的存在。以上结果表明乙腈再生胶原蛋白与原胶原蛋白化学结构基本保持不变,且乙腈可以成功地将胶原蛋白从氯化胆碱·2ZnCl₂ 离子液体中再生出来,因此氯化胆碱·2ZnCl₂ 离子液体是胶原蛋白的直接溶剂,并在以下的结构研究中,如无特别说明,样品均以乙腈为再生试剂。

2.3.2 再生胶原蛋白的 XRD 分析

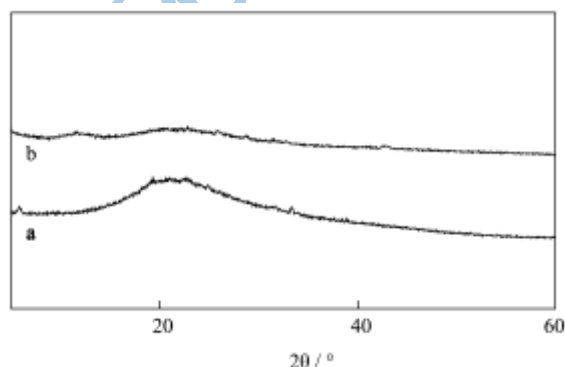


图 2 胶原蛋白 (a) 和再生胶原蛋白 (b) 的 XRD 谱图

Fig.2 XRD curves of native collagen (a) and regenerated collagen (b)

图 2 中胶原蛋白在 2θ 为 21.08°、6.08° 处分别出现了一个强衍射峰和一个较弱的衍射峰,这两个衍射峰是胶原蛋白的特征峰。而胶原蛋白在 2θ 为 6°~8° 之间的峰反映了胶原蛋白分子链之间的距离,2θ 为 21.08° 处的峰代表的是胶原蛋白分子内部多结构层次所引起的漫散射。比较胶原蛋白样品和乙腈再生胶原蛋白的 X-射线衍射图,可以发现乙腈再生胶原蛋白并不存在明显的衍射峰,由此可以看出,胶原蛋白有结晶结构,而乙腈再生胶原蛋白基本都是无定形结构,这是由于离子液体溶解胶原蛋白的过程中破坏了分子间的氢键,也破坏了结晶区域,而乙腈再生的过程中,脱去了氯化胆碱·2ZnCl₂ 分子,使得原本的结晶区域破坏,使再生的胶原蛋白无序排列,形成了无定型结构。

2.3.3 再生胶原蛋白的 DSC 分析

从图 3 中可知,胶原蛋白存及再生胶原蛋白均在两个吸热峰,在 100~150 °C 之间的第一个峰,峰面积

较大,宽度也较大,这是胶原蛋白的热变性过程。在200~250 °C之间的第二个峰,面积较小,这个峰对应的是胶原蛋白热变性升温后的热降解过程。由第一个峰可知,再生胶原蛋白低于胶原蛋白的变性温度,是由于胶原蛋白/离子液溶液中的离子键破坏了胶原蛋白中支撑多肽链骨架的部分氢键,从而再生胶原蛋白热稳定性低于胶原蛋白。且乙腈再生胶原蛋白的晶区结构受到部分破坏,有序程度降低,“晶区”与“非晶区”的差别较小,因而再生胶原蛋白第二个峰也就明显小于胶原蛋白样品的结晶峰,这与XRD的结果相吻合。

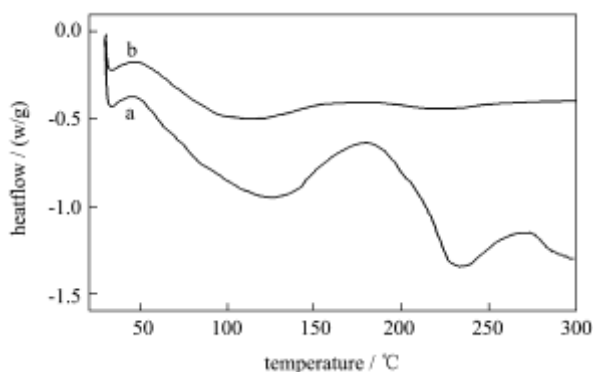


图3 胶原蛋白(a)和乙腈再生胶原蛋白(b)的DSC曲线

Fig.3 DSC curves of native collagen (a) and regenerated collagen (b) from acetonitrile

2.4 胶原蛋白/离子液体溶液的流变性

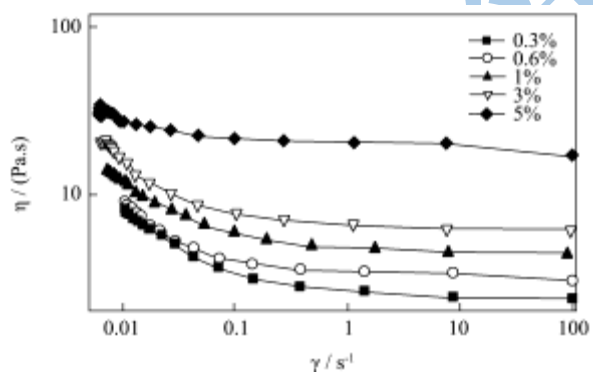


图4 70 °C下不同浓度胶原蛋白/离子液体溶液稳态粘度和剪切速率的关系

Fig.4 Relationship between steady-state viscosity and shear rate of collagen/ILs solutions with various concentrations at 70 °C

由图4可知,不同浓度的胶原蛋白/离子液体溶液随着剪切速率的增大,粘度降低,因此它们都属于非牛顿性流体中的假塑性流体。而且随着胶原蛋白浓度的增加,非牛顿指数有减小的趋势,即溶液偏离牛顿流体的程度增大。当温度和剪切速率相同时,随着浓度的增大,胶原蛋白/离子液体溶液的稳态粘度增大。这是由于当溶液的浓度逐渐增大时,胶原蛋白蛋白质链之间以及胶原蛋白蛋白质分子与离子液体之间会由

于较强的氢键作用而相互缠结从而形成更多的物理交联点,因此使溶液的表观粘度增加。但是溶液中的这些缠结点不是固定不变的,会受到剪切作用的影响而发生变化,因此,随着剪切速率的增大,溶液体系中的缠结点密度会随之减小,使溶液的稳态粘度减小,溶液表现出剪切变稀的流变行为,属于假塑型流体。

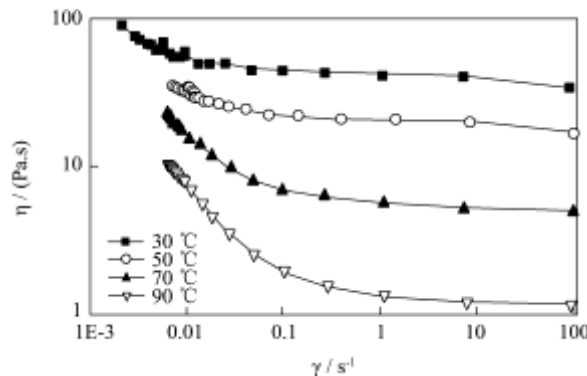


图5 不同温度下3.0%胶原蛋白/离子液体溶液稳态粘度和剪切速率的关系

Fig.5 Relationship between steady-state viscosity and shear rate of collagen/ILs solutions (3.0%) at different temperatures

图5表示的是质量分数为3.0%的胶原蛋白/离子液体溶液在不同温度条件下的稳态粘度与剪切速率的关系曲线。由图可以看出,随着温度的升高,溶液的稳态粘度均显著降低。这是因为随着温度升高,分子无规则热运动加剧,分子间的空隙也相应增大,使得分子链更容易发生移动,从而溶液的粘度下降。从图中还可以看出,溶液发生剪切变稀行为的临界剪切速率随着温度的升高而向高频区移动。

3 结论

氯化胆碱·2ZnCl₂离子液体对胶原蛋白的溶解性良好,在120 °C时胶原蛋白在氯化胆碱·2ZnCl₂离子液体中的溶解度可达到11.3 g/100g。乙腈再生的胶原蛋白结构未发生明显变化,但结晶度、热稳定性都较原胶原蛋白样品的有所降低。胶原蛋白/离子液体溶液是假塑型流体,随着浓度增大,粘度增大,随着温度升高,粘度降低。这为进一步研究胶原蛋白的产业化发展提供新途径。

参考文献

[1] 安小宁,朱小娟.活性炭吸附离子液体[BMIM]Cl的研究[J].现代食品科技,2009,25(11):1239-1242
AN Xiao-ning, ZHU Xiao-juan. Research of activated carbon adsorption of ionic liquid [BMIM]Cl [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25 (11): 1239-1242

[2] Phillips D M, Drummy L F, Conrady D G, et al. Dissolution and

- regeneration of bombyx mori silk fibroin using ionic liquids [J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(44): 14350-4351
- [3] Meng Z, Zheng X, Tang K, et al. Dissolution and regeneration of collagen fibers using ionic liquid [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(4): 440-448
- [4] Junghans F, Moraeietz M, Conrad U, et al. Preparation and mechanical properties of layers made of recombinant spider silk proteins and silk from silk worm [J]. Applied physics A-Materials science & Processing, 2006, 82(2): 253-260
- [5] Ami Mehta, J Raghava Rao, Nishtar Nishad Fathima. Effect of ionic liquids on the different hierarchical order of type I collagen [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 5(117): 376-382
- [6] 汤尧旭,赵玲,覃发正,等. 猪皮胶原蛋白在1-丁基-3-甲基氯代咪唑中的溶解性能[J].皮革科学与工程,2010,20(1):5-12
TANG Yao-xu, ZHAO Ling, QIN Fa-zheng, et al. Properties of pigskin collagen dissolving in 1-butyl-3-solubility of methyl chloride imidazole [J]. Leather Science and Engineering, 2010, 20(1): 5-12
- [7] Jilei Wang, Ligang Wei, Yingchong Ma, et al. Collagen/Cellulose hydrogel beads reconstituted from ionic liquid solution for Cu(II) adsorption [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(10): 736-743
- [8] Abbott A P, El Ttaib K, Frisch G, et al. Electrodeposition of copper composites from deep eutectic solvents based on choline chloride [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009, 11(21): 4269-4277
- [9] 牛凤英,王少军.胶原蛋白在离子液体中的溶解及再生性能表征[J].中国皮革,2011,10,40(19):27-34
NIU Feng-ying, WANG Shao-jun. Collagen dissolution and regeneration performance characterization in ionic liquids. [J]. Chinese Leather, 2011, 10, 40(19): 27-34