

预拉伸对不同盐质量分数再生丝素膜的影响

朱聪聪^a, 左保齐^{a, b}

(苏州大学 a. 纺织与服装工程学院; b. 现代丝绸国家工程实验室, 江苏 苏州 215123)

摘要: 丝素材料被广泛应用于生物医药领域,这是由于丝素材料具有低免疫源性,可降解且具备良好的力学性能。很多文献表明相比于传统溶解丝素的方法,甲酸/盐溶解丝素制备的再生丝素材料具有更好的机械性能,然而,当再生丝素应用于对力学性能要求更高的骨填充材料时,甲酸/盐溶解丝素制备的再生丝素材料力学性能还是不足的。文章采用甲酸/氯化钙溶解丝素制备再生丝素膜,然后对其进行预拉伸处理。结果表明,通过预拉伸处理的再生丝素膜具备更高的力学性能,选用 4% 的盐质量分数溶解时,可以得到稳定的二级结构(silk II)。研究结果对丝素材料应用于生物医药领域具有潜在的应用价值。

关键词: 再生丝素膜; 拉伸; 外观结构; 二级结构; 机械性能

中图分类号: TS102.1; R318.08 文献标志码: A 文章编号: 1001-7003(2019)01-0001-07 引用页码: 011101

Influence of pre-stretching on regenerated silk fibroin film with different salt mass fraction

ZHU Congcong^a, ZUO Baoqi^{a, b}

(a. College of Textiles and Clothing Engineering; b. National Engineering Laboratory for Modern Silk, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: Silk fibroin materials are widely used in the field of biomedicine because they have low immunogenicity, biodegradability and good mechanical properties. Many literatures have shown that regenerated silk fibroin materials prepared by formic acid/salt dissolved silk fibroin have better mechanical properties than regenerated silk fibroin materials prepared with traditional methods of dissolving silk fibroin. However, when regenerated silk fibroin is applied in a bone filler material that requires higher mechanical properties, the mechanical properties of the regenerated silk fibroin material prepared by formic acid/salt dissolved silk fibroin are still insufficient. In this paper, regenerated silk fibroin film was prepared by dissolving silk fibroin with formic acid/calcium chloride, and then pre-stretched. The results showed that the regenerated silk fibroin film after pre-stretching had higher mechanical properties, and a stable secondary structure (silk II) could be obtained when 4% salt mass fraction was used for dissolution. The research results have potential application value for the application of silk fibroin materials in the field of biomedicine.

Key words: RSF film; stretching; appearance structure; secondary structure; mechanical properties

近年来,家蚕丝作为天然材料,由于其较慢的降解速度,良好的力学性能和充足的来源^[1-4],并且易于加工成各种形式,从而在材料领域得到广泛的应用。丝素蛋白是一种从蚕丝中提取出的天然高分子

纤维蛋白,含有多种氨基酸^[5-7],并具有良好的相容性能,可生物降解等特点,广泛用于医用组织工程材料^[8-10]。随着对其结构和组成的深入研究,已从传统纺织领域扩展到生物医学领域^[11-17]。

再生丝素膜是一种常见的丝素蛋白的应用形式。国内外相关学者也进行了大量的研究工作,结果表明溶剂、外界环境或者时间的改变都会对丝素蛋白溶液产生不同的影响,得到不同的溶解效果^[18-20]。为了得到较好力学性能的材料,国内外相

收稿日期: 2018-06-29; 修回日期: 2018-11-15

作者简介: 朱聪聪(1994—),女,硕士研究生,研究方向为丝蛋白生物材料。通信作者: 左保齐,教授, bqzuo@suda.edu.cn。

关专家从改变溶解方法、时间或者外界环境出发^[21-22],但是很少人可以从丝素蛋白材料的后处理方法入手。初生丝经过预拉伸将纤维重新排列,可以得到力学性能较好的成品丝,所以本文采用对再生丝素蛋白膜进行预拉伸的后处理方法。基于甲酸/盐的再生纤维膜的力学性能优于其他方法制得的再生纤维膜^[23-26],本文采用甲酸/盐^[27-29]溶解而成的再生丝素膜,此方法相对传统的溶解方法不仅缩短了制备成膜的时间,还具有透氧性、透气透湿性、生物相容性^[30]和细胞增殖等优异的性能特点。然后对再生丝素膜进行预拉伸处理,运用相关测试方法表征其性能。

1 实验

1.1 再生丝素膜的制备与预拉伸

称取一定量的桑蚕丝(浙江湖州浙丝二厂有限公司),用0.05% Na₂CO₃溶液以1:20的浴比、100℃的去离子水脱胶3次,每次脱胶时间为30 min,然后放在烘箱中烘干,即得丝素蛋白(silk fibroin, SF)纤维。室温条件下,将所得到的SF纤维溶解在氯化钙盐质量分数分别为2%、4%、6%和8%的甲酸/盐溶液中,磁力搅拌4 h,将得到的混合溶液倒入相同大小的培养皿,放入通风处通风,使甲酸挥发,再放入自来水中去盐12 h,得到再生丝素膜备用。

再生丝素膜的预拉伸:不同盐质量分数的再生丝素膜裁剪成合适大小的试样,首先将试样的一端夹紧在织物强力机上夹钳中心位置,随后将另一端垂直放入下夹钳中心位置夹紧,施加一定程度的外力,进行一定的预拉伸。实验所采用的单向定相对伸长拉伸,拉伸时速度是100 mm/min,拉伸固定2 h。

1.2 仪器与设备

HD101A型电热恒温鼓风干燥箱(南通宏大实验仪器有限公司),YGO26B型电子织物强力机(宁波纺织仪器厂),S-4800型冷场发射扫描电子显微镜(日本Hitachi公司),Nicolet5700型傅里叶红外光谱仪(美国Nicolet公司),X'Pert-Pro型全自动X射线衍射仪(荷兰PANalytical公司),BS201S电子天平(德国Sartorius公司),Instron 3365型万能材料试验机(美国Instron公司)。

1.3 再生丝素膜的性能测试

1.3.1 扫描电子显微镜(SEM)

将干燥后的再生丝素膜,取横截面,黏贴在SEM

样品台上,经喷金处理后,在室温条件下,利用S-4800型冷场发射扫描电子显微镜进行相应的形貌观察。

1.3.2 傅立叶变换红外(FTIR)

利用Nicolet5700型傅里叶红外光谱仪进行测试,采用压片全反射的方法,测试400~4000 cm⁻¹的吸光度值,分析再生丝素膜中所存在的二级结构。

1.3.3 X射线衍射(XRD)

将再生丝素膜烘干,并研磨成粉末状颗粒,利用X'Pert-Pro型全自动X射线衍射仪进行XRD测试。测试条件为CuKα射线、管电压40 mA、扫描速度10°/min,在其条件下记录2θ=5°~45°的样品衍射强度曲线。

1.3.4 再生丝素膜的力学性能

将不同盐质量分数的再生丝素膜制成尺寸为10 mm(宽)×50 mm(长)的长方形,在20℃、65% RH条件下,在Instron 3365型万能材料试验机上进行拉伸力学性能的测试,力学测试方向与预拉伸方向相同。测试条件为加持距离20 mm,预加张力为20 cN。

2 结果与分析

2.1 再生丝素膜的形态学分析

图1、图2、图3、图4中盐质量分数分别为2%、4%、6%、8%,丝素质量分数为8%。

丝素一般用LiBr、CaCl₂等中性盐溶液溶解,溶液中电离出的强极性离子可以破坏分子之间的氢键和范德华力,适当增加温度可以达到最优的溶解效果。实验中用甲酸/盐溶解丝素,甲酸/盐溶解可以保留部分纳米级的基原纤^[31-33],即纳米级纤维^[34-35],所以从不同盐质量分数下再生丝素膜横截面的SEM图(图1)可以看出,预拉伸后再生丝素膜中有明显的纳米级纤维。在经过预拉伸的丝素膜截面扫描电子显微镜图中可以观察到一些纵向或者横向线条,如图1(a-1~d-1)可以看出再生丝素膜中的纳米纤维长度有变小的趋势。未经预加张力的丝素膜没有表现出一定的规则性,呈现无规则状,如图1(a~d)所示。这种现象出现的原因是在湿态下再生丝素蛋白膜经过预拉伸后,分子链沿施加外力方向重新排列,在同等外力的持续作用下,再生丝素膜由湿态变为干态的过程中,分子链之间由于存在相互作用而逐渐趋于稳定结构。所以说,经过预拉伸后的结构更加稳定。

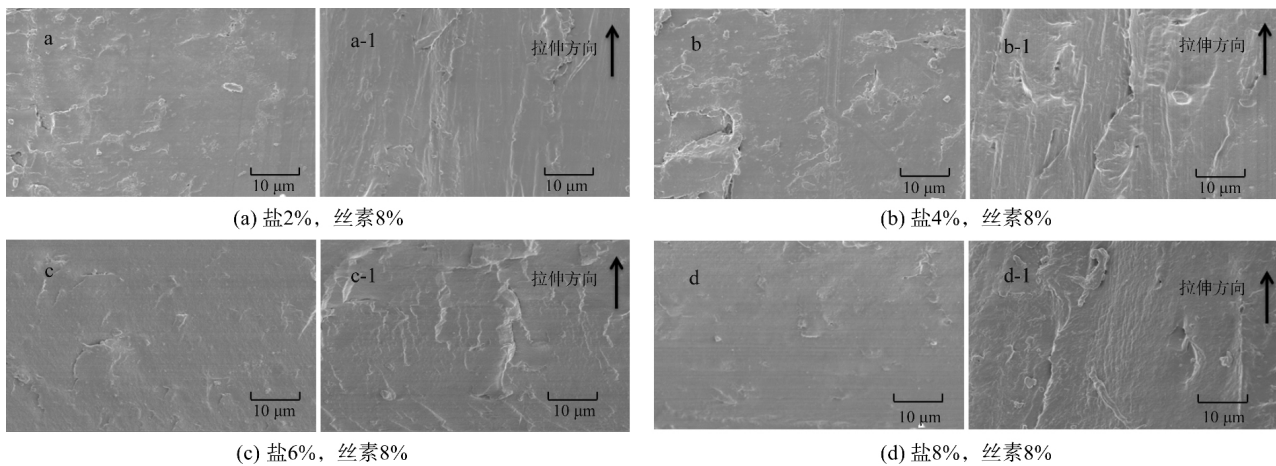


图 1 不同盐质量分数下再生丝素膜横截面的 SEM 图

Fig. 1 SEM images of the cross section of regenerated silk fibroin film with different salt mass fractions

2.2 再生丝素膜的力学性能分析

材料的力学性能是指一种承受机械荷而不超过自身许可变形或不被破坏的能力,在一定程度上体现材料的可利用性。

经过预拉伸之后的再生丝素膜内部分子结构发生一定程度的改变,沿预应力方向分子间排

列紧密,使再生丝素膜的应力增大。但从图 2 可以看出,膜的应变相对预拉伸前较低,是由于预拉伸后丝素膜的变形能力会降低,受外力影响时,不易产生很大的变形。经过预拉伸之后再生丝素膜相比未拉伸的在纵向上的弹性模量有所增加。

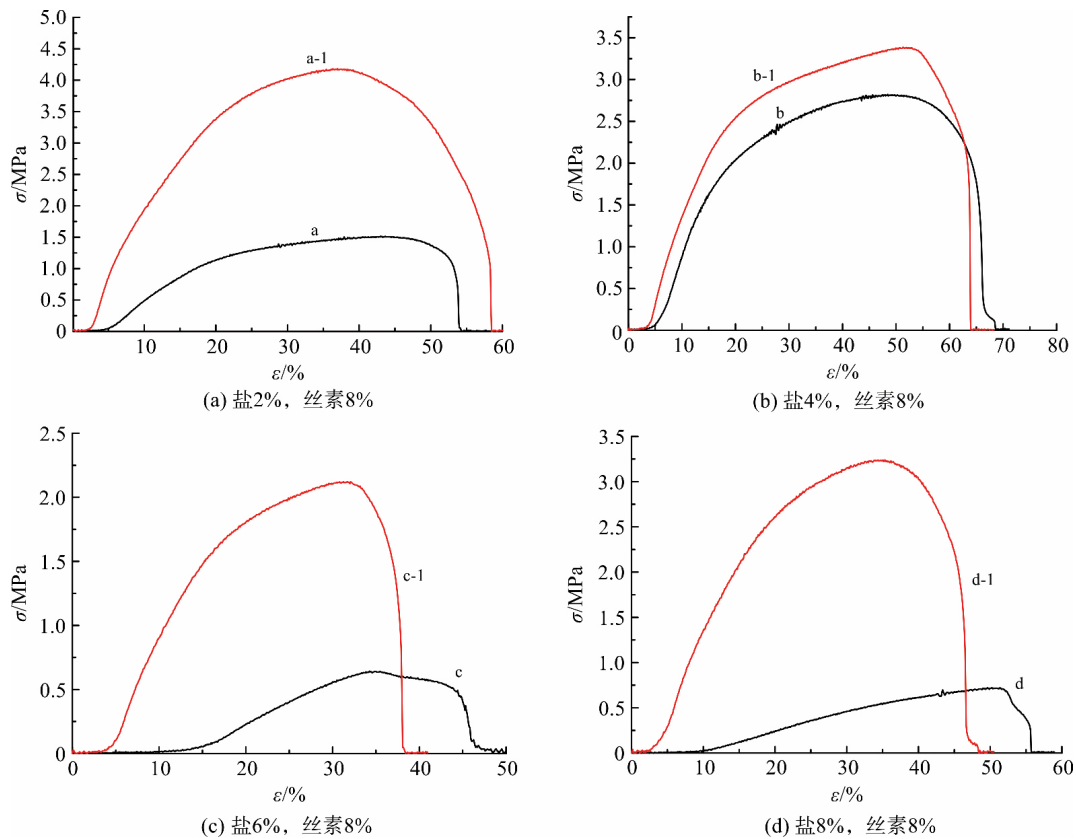


图 2 不同盐质量分数下再生丝素膜的应力应变图

Fig. 2 Stress-strain diagram of regenerated silk fibroin film with different salt mass fractions

表 1 是不同盐质量分数下再生丝素膜的杨氏模量。如表 1 所示,不同盐质量分数下,经过预拉伸再

生丝素膜的杨氏模量比未经预拉伸的杨氏模量皆有所增加,说明经过预拉伸之后膜材料的形变变小,这与应力应变曲线所表明的结果一样,材料抵抗变形能力增加。这种改变可以满足具有较高力学性能骨填充材料的要求,同时也为新型软骨材料提供力学性能参考。

表1 不同盐质量分数下再生丝素膜的杨氏模量

Tab.1 Young's modulus of regenerated silk fibroin films with different salt mass fractions

盐质量分数/%	预拉伸前/MPa	预拉伸后/MPa
2	0.099	0.375
4	0.206	0.259
6	0.037	0.190
8	0.023	0.258

2.3 再生丝素膜的二级结构分析

丝素蛋白的构象一般以无规卷曲、 α 螺旋和 β 折叠为主^[36]。经过传统方法溶解后的丝素溶液的二级结构呈现无规结构,但由表2和图3可以看出,在经过甲酸/盐溶解制成的丝素膜中不仅有无规结构还有 β 折叠结构。众所周知,具有 β 折叠构象的肽链与其他构象相比是高度延展的,在两条相邻 β 折

叠肽链的N—H和C=O间形成链间氢键,这种相邻肽链之间的氢键在使结构稳定的结合力方面起重要作用。所以,再生丝素膜中的 β 折叠结构是一种相对稳定的二级结构。

表2 红外光谱中丝蛋白特定构象的特征峰位置值

Tab.2 The positional value of characteristic peak of the silkprotein specific conformation in the infrared spectrum

构象	酰胺 I / cm^{-1}	酰胺 II / cm^{-1}	酰胺 III / cm^{-1}
β 折叠	1 625 ~ 1 640	1 515 ~ 1 525	1 265
无规卷曲	1 650 ~ 1 660	1 535 ~ 1 550	1 235

预拉伸前后,不同盐质量分数下再生丝素膜的傅里叶变换红外光谱,如图3所示。从图3可以看出,随着盐质量分数的增加,酰胺I特征峰位置向无规卷曲方向偏移。从表2和图3可以看出,丝素蛋白特征峰出现在 $1\ 524$ 、 $1\ 624\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 235\ \text{cm}^{-1}$ 附近,这表明它主要以 β 折叠的形式出现。从图3还可以看出,盐质量分数为2%时,预拉伸对相对低一些的盐质量分数影响明显一点,特征峰的峰强度有增加,但随着盐质量分数的增加预拉伸效果不明显。总体而言,预拉伸前后,再生丝素膜的分子构象变化不大,

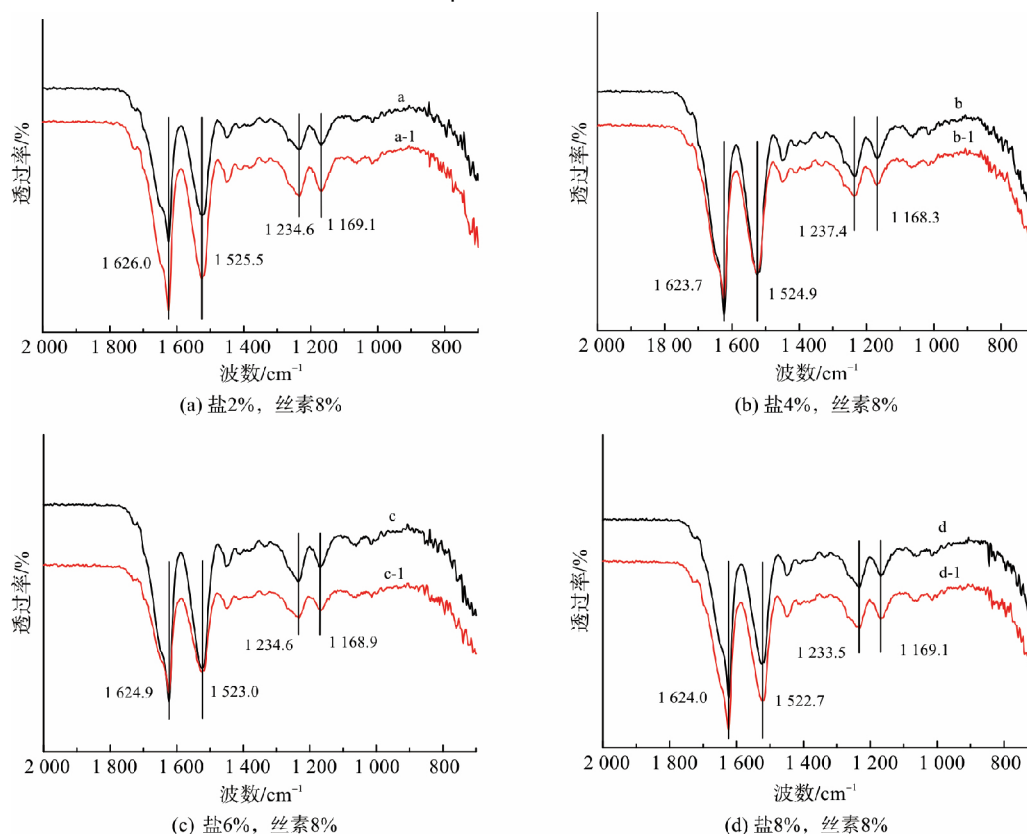


图3 不同盐质量分数下再生丝素膜的 FTIR 图

Fig.3 FTIR images of regenerated silk fibroin film with different salt mass fractions

预拉伸对其影响较小。

丝素蛋白 β 折叠主衍射峰为 9.1° 、 18.9° 、 20.7° 和 24.0° ^[37], 无规卷曲和 α 螺旋的主衍射峰分别为 12.2° 、 19.7° 、 24.7° 和 28.2° ^[37-39]。不同盐质量分数下, 再生丝素膜经预拉伸前后的 X 射线衍射如图 4 所示。从图 4 可以看出, 不同盐质量分数下, 在 8.6° 和 20.3° 左右出现丝素 β 折叠构象的特征峰, 经过预拉伸之后, β 折叠构象的特征峰的峰

强度有所降低。当盐质量分数增加时, 峰强度的降低现象越明显。通过单轴拉伸可以提高再生丝素膜的韧性^[40-41], 综合图 3 和图 4, 当盐质量分数为 4% 时, 红外测试再生丝素膜在 1524 、 1624 cm^{-1} 和 1235 cm^{-1} 附近出现 β 折叠构象的特征峰, 是一种稳定的二级结构。XRD 测试所得到的峰形比较尖锐, 表明膜的取向度较高, 同样说明再生丝素膜可以得到相对稳定的结构。

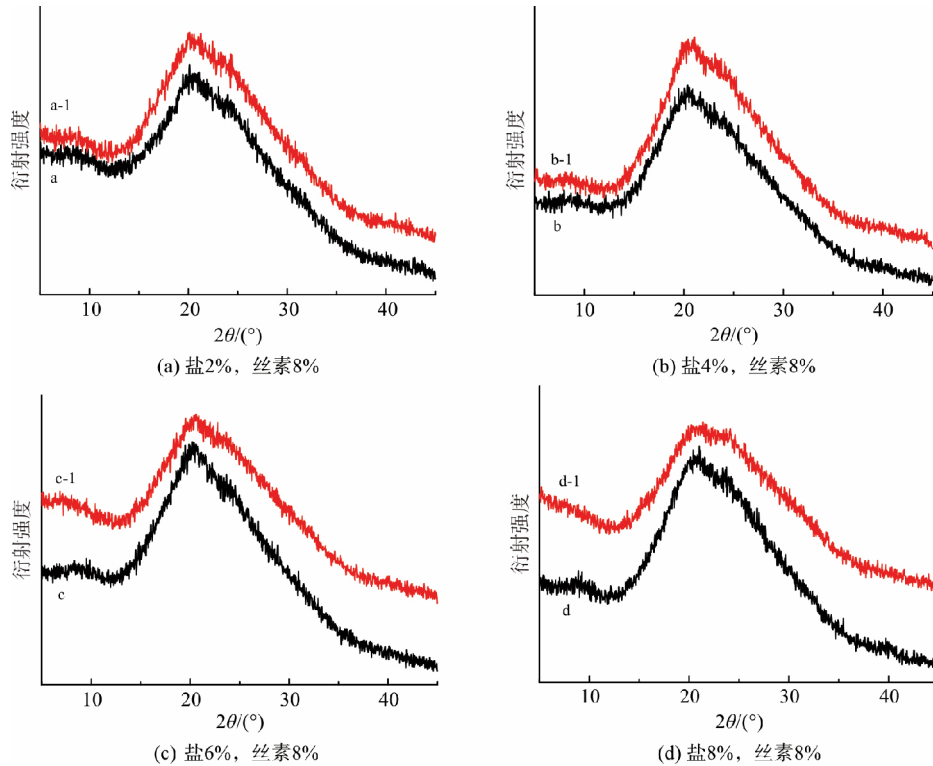


图 4 不同盐质量分数下再生丝素膜的 XRD 图

Fig.4 XRD images of regenerated silk fibroin film with different salt mass fractions

3 结 论

采用甲酸/氯化钙溶解丝素制备再生丝素膜, 然后对其进行预拉伸处理。实验结果表明, 通过预拉伸处理的再生丝素应力将得到改善, 应变有一定程度的降低。再生丝素膜的盐质量分数不能太高。溶解丝素可选用 4% 的盐质量分数, 以便获得更好的稳定性和机械性能。再生丝素膜的这种变化可以为丝素蛋白作为新型软骨材料提供力学性能参考, 同时也可以成为一种力学性能优良的骨填充材料。

参考文献:

[1] BAI H, JU J, ZHENG Y, et al. Functional fibers with unique wettability inspired by spider silks [J]. *Advanced Materials*, 2012, 24(20): 2786-2791.
[2] ZARKOUB S, EBY R K, RENEKER D H, et al. Structure

and morphology of electrospun silk nanofibers [J]. *Polymer*, 2004, 45(11): 3973-3977.
[3] SHAO Z, VOLLRATH F. Surprising strength of silkworm silk [J]. *Nature*, 2002, 418(6899): 741.
[4] WU G, DENG H, JIANG T, et al. Regulating the gaps between folds on the surface of silk fibroin membranes via LBL deposition for improving their biomedical properties [J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 2017, 154(1): 228-238.
[5] ZHENG Y, BAI H, HUANG Z, et al. Directional water collection on wetted spider silk [J]. *Nature*, 2010, 463(7281): 640-643.
[6] HUANG Z, CHEN Y, ZHENG Y, et al. Capillary adhesion of wetted cribellate spider capture silks for larger pearly hanging-drops [J]. *Soft Matter*, 2011, 7(19): 9468-9473.
[7] CHEN Y, HE J, WANG L, et al. Excellent bead-on-string silkworm silk with drop capturing abilities [J]. *Journal of*

- Materials Chemistry A, 2013, 2(5): 1230-1234.
- [8] 于同隐, 梅娜, 陈光, 等. 丝素蛋白在组织工程中的应用 [J]. 复旦学报(自然科学版), 2003, 42(6): 828-832.
YU Tongyin, MEI Na, CHEN Guang, et al. Application of silk fibroin in tissue engineering [J]. Journal of Fudan University(Nature Science Edition), 2003, 42(6): 828-832.
- [9] VEPARI C, KAPLAN D L. Silk as a Biomaterial [J]. Progress in Polymer Science, 2007, 32(8/9): 991-1007.
- [10] CAO T T, ZHANG Y Q. Processing and characterization of silk sericin from Bombyx mori and its application in biomaterials and biomedicines [J]. Materials Science & Engineering C, 2016, 61: 940-952.
- [11] LOTZ B, CESARI F C. The chemical structure and the crystalline structures of Bombyx mori, silk fibroin [J]. Biochimie, 1979, 61(2): 205-214.
- [12] ZHOU C Z, CONFALONIERI F, JACQUET M, et al. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence [J]. Proteins Structure Function & Bioinformatics, 2001, 44(2): 119-122.
- [13] ASAKURA T, ASHIDA J, YAMANE T, et al. A repeated beta-turn structure in poly(Ala-Gly) as a model for silk I of Bombyx mori silk fibroin studied with two-dimensional spin-diffusion NMR under off magic angle spinning and rotational echo double resonance [J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 306(2): 291-305.
- [14] SOFIA S, MCCARTHY M B, GRONOWICZ G, et al. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2001, 54(1): 139-148.
- [15] YANG Y, CHEN X, FEI D, et al. Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro [J]. Biomaterials, 2007, 28(9): 1643-1652.
- [16] HOFMANN S, FOO C T, ROSSETTI F, et al. Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery [J]. Journal of Controlled Release, 2006, 111(2): 219-227.
- [17] WENK E, WANDREY A J, MERKLE H P, et al. Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery [J]. Journal of Controlled Release, 2008, 132(1): 26-34.
- [18] 吴章伟, 冯新星, 朱海霖, 等. 不同溶解体系的丝素蛋白分子质量及对再生丝素膜性能的影响 [J]. 蚕业科学, 2010, 36(4): 707-712.
WU Zhangwei, FENG Xinxing, ZHU Hailin, et al. Effects of different solvent systems on molecular mass of silk fibroin and properties of the regenerated silk fibroin membranes [J]. Science of Sericulture, 2010, 36(4): 707-712.
- [19] WANG Q, CHEN Q, YANG Y, et al. Effect of various dissolution systems on the molecular weight of regenerated silk fibroin [J]. Biomacromolecules, 2013, 14(1): 285.
- [20] CHO H J, KI C S, OH H, et al. Molecular weight distribution and solution properties of silk fibroins with different dissolution conditions [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(3): 336-341.
- [21] CHEN X, KNIGHT D P, SHAO Z, et al. Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR [J]. Polymer, 2001, 42(25): 9969-9974.
- [22] CHO H J, KI C S, OH H, et al. Molecular weight distribution and solution properties of silk fibroins with different dissolution conditions [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(3): 336-341.
- [23] SIONKOWSKA A, LEWANDOWSKA K, MICHALSKA M, et al. Characterization of silk fibroin 3D composites modified by collagen [J]. Journal of Molecular Liquids, 2016, 215: 323-327.
- [24] LÜ X, LI Z, CHEN S, et al. Structural and functional evaluation of oxygenating keratin/silk fibroin scaffold and initial assessment of their potential for urethral tissue engineering [J]. Biomaterials, 2016, 84: 99-110.
- [25] MARSANO E, CORSINI P, AROSIO C, et al. Wet spinning of Bombyx mori silk fibroin dissolved in N-methyl morpholine N-oxide and properties of regenerated fibres [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 37(4): 179-188.
- [26] XING T. Study of the Solubility of silk fibroin and cellulose using NMMO and preparation of the blend films [J]. Journal of Textile Research, 2003.
- [27] MING J, LIU Z, BIE S, et al. Novel silk fibroin films prepared by formic acid/hydroxyapatite dissolution method [J]. Materials Science & Engineering C, 2014, 37(37): 48-53.
- [28] ZHANG F, LU Q, MING J, et al. Silk dissolution and regeneration at the nanofibril scale [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2014, 2(24): 3879-3885.
- [29] ZHANG F, LU Q, YUE X, et al. Regeneration of high-quality silk fibroin fiber by wet spinning from CaCl₂-formic acid solvent [J]. Acta biomaterialia, 2015, 12: 139-145.
- [30] MORI H, TSUKADA M. New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials [J]. Reviews in Molecular Biotechnology, 2000, 74(2): 95-103.
- [31] 吴惠英, 左保齐, 周燕. 氯化钙/甲酸溶解体系下氯化钙质量分数对蚕丝溶解性的影响 [J]. 纺织学报, 2014, 35(12): 1-5.
WU Huiying, ZUO Baoqi, ZHOU Yan. Effect of CaCl₂ concentration on solubility of silk in CaCl₂-formic acid system [J]. Journal of Textile Research, 2014, 35(12): 1-5.
- [32] FENG Z, YOU X, HAO D, et al. Facile fabrication of robust silk nanofibril films via direct dissolution of silk in CaCl₂-formic acid solution [J]. Acs Applied Materials &

- Interfaces , 2015 , 7(5) : 3352.
- [33] 王鹏, 左保齐. 不同盐/甲酸溶解体系下丝素膜的制备及性能表征 [J]. 丝绸, 2016 , 53(7) : 18-22.
WANG Peng , ZUO Baoqi. Preparation of silk fibroin films in different salt/formic acid dissolution system and its property characterization [J]. Journal of Silk , 2016 , 53 (7) : 18-22.
- [34] HA S W , TONELLI A E , HUDSON S M. Structural studies of Bombyx mori silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning [J]. Biomacromolecules , 2005 , 6(3) : 1722-1731.
- [35] UM I C , KWEON H Y , LEE K G , et al. The role of formic acid in solution stability and crystallization of silk protein polymer [J]. International Journal of Biological Macromolecules , 2003 , 33(4) : 203-213.
- [36] CHEN X , SHAO Z , MARINKOVIC N S , et al. Conformation transition kinetics of regenerated Bombyx mori silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopy [J]. Biophysical Chemistry , 2001 , 89(1) : 25-34.
- [37] DRUMMY L F , PHILLIPS D M , StONE M O , et al. Thermally induced alpha-helix to beta-sheet transition in regenerated silk fibers and films [J]. Biomacromolecules , 2005 , 6(6) : 3328-3333.
- [38] LU Q , WANG X , LU S , et al. Nanofibrous architecture of silk fibroin scaffolds prepared with a mild self-assembly process [J]. Biomaterials , 2011 , 32(4) : 1059-1067.
- [39] MAGOSHI J , NAKAMURA S. Studies on physical properties and structure of silk: glass transition and crystallization of silk fibroin [J]. Journal of Applied Polymer Science , 1975 , 19(4) : 1013-1015.
- [40] YIN J , CHEN E , PORTER D , et al. Enhancing the toughness of regenerated silk fibroin film through uniaxial extension [J]. Biomacromolecules , 2010 , 11(11) : 2890-2895.
- [41] SU D , YAO M , LIU J , et al. Enhancing mechanical properties of silk fibroin hydrogel through restricting the growth of β -sheet domains. [J]. Acs Appl Mater Interfaces , 2017 , 9(20) : 17489-17498.