

# 蚕丝纤维表层酪氨酸含量及其与活性染料染色性能的关系

叶梦妮, 邵 敏

(浙江理工大学先进纺织材料与制备技术教育部重点实验室, 杭州 310018)

**摘 要:** 通过高效液相色谱法(HPLC)和红外光谱法(FT-IR)分析酪氨酸在丝素纤维表层的分布状况,并在此基础上阐明酪氨酸和活性染料反应性能之间的关系。实验结果表明:丝素纤维的外表层和次表层多为结构疏松的无定形区,且酪氨酸在外表层和次表层分布较多;酪氨酸的酚羟基与一氯均三嗪型活性染料反应性能优于和乙烯砷型活性染料的反应性能,并且酪氨酸与染料分子反应绝大部分发生在结构疏松的最外层。

**关键词:** 桑蚕丝; HPLC; FT-IR; 酪氨酸; 活性染料

**中图分类号:** TS141.8      **文献标志码:** A

## 0 引 言

活性染料是唯一一类能与纤维以共价键结合的染料,应用活性染料对蚕丝进行染色可以提高其染色牢度,在弱碱性条件下,蚕丝表面富集的酚羟基是与活性染料反应的重要基团<sup>[1]</sup>。高效液相色谱法具有高效、简便、准确等优点,常被用于活性染料与纤维素纤维的结合能力研究、活性染料自身的水解性能研究<sup>[2-3]</sup>以及蚕丝亲核基团与活性染料键合性能研究。在选用对甲酚模拟蚕丝丝素上的酚羟基与活性染料进行模拟反应的实验中<sup>[4]</sup>,发现酚羟基与不同类型的活性染料反应性能亦存在差异。然而蚕丝纤维的实际染色过程更为复杂,除了亲核基团对染色性能有影响外,蚕丝表面与本体之间在物理结构上的差异性也会对染色性能造成一定的影响。

郑今欢等<sup>[5]</sup>通过福林试剂法和紫外光谱法对桑蚕丝和柞蚕丝中酪氨酸分布状态以及光照后对蚕丝中酪氨酸分布状态的影响进行了初步的探讨。本文利用酪氨酸在紫外区有特征吸收这一特性,通过高效液相色谱法并结合红外光谱法来测定丝素表层中酪氨酸的含量,在模拟染色的基础上对蚕丝进行实

际染色,在探明了蚕丝表层中酪氨酸含量的基础上,结合蚕丝纤维结构上的特点,研究酪氨酸的酚羟基与活性染料在实际染色过程中的反应情况。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

纤维和染料:桑蚕丝(浙江湖州产春蚕丝),一氯均三嗪(MCT)型活性染料:活性艳橙 K-G 和活性翠蓝 K-GL、乙烯砷(VS)型活性染料:活性翠蓝 KN-G 和活性艳蓝 KN-R 染料均为为商用染料(泰兴市锦鸡染料有限公司)。

化学试剂:L-酪氨酸(上海康捷生物科技发展有限公司),盐酸(分析纯),烧碱(分析纯),甲酸(分析纯),乙腈(分析纯)。

### 1.2 实验仪器

HP1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),Nicolet 5700 傅里叶变换红外光谱仪(美国赛默飞世尔公司),万分之一电子天平(上海精密科学仪器有限公司),电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);DGG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司),KQ-100DB 数控

超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),pHS-2F pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

### 1.3 蚕丝的染色

#### a) 染液配方

染料	2% (owf);
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40 g/L;
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	16 g/L;
NaHCO <sub>3</sub>	4 g/L;
浴比	1 : 50。

#### b) 工艺流程

染色总时间为 100 min, 染色过程见图 1。

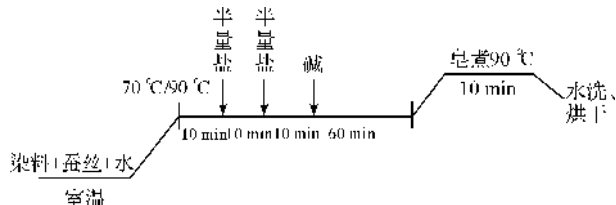


图1 蚕丝纤维染色过程

注:VS型活性染料染色温度为70℃,MCT型活性染料染色温度为90℃。

### 1.4 蚕丝水解液的制备

a) 丝素全溶:将1 g 蚕丝丝素以及染色后蚕丝分别置于100 mL容量瓶中,加入6 mol/L的HCl溶液50 mL然后在沸水浴中加热12 h,使得蚕丝全部水解,待蚕丝水解液冷却后再加入6 mol/L的NaOH溶液50 mL使其中和,取样,过滤后注入HPLC分析用的样品瓶中。

b) 丝素表层的溶解:将1 g 蚕丝丝素置于100 mL容量瓶中,加入4 mol/L的盐酸50 mL,置于40℃水浴锅中加热4 h或12 h,冷却后再加入HCl配置成6 mol/L的蚕丝水解液,再在沸水浴中加热12 h,蚕丝水解液冷却后加入6 mol/L的NaOH溶液使其中和,取样,过滤后注入HPLC分析用的样品瓶中。经过4 h和12 h水解后残余的蚕丝丝素用去离子水清洗,烘干,测定处理过程丝素的失重率。

### 1.5 红外光谱分析

将未经处理的蚕丝丝素原样和经HCl溶解一定时间后的残余丝素水洗烘干,用哈氏切片器切成粉末,取1 mg丝素粉末与100 mg溴化钾充分混合研磨,压片后进行红外光谱测试,利用傅里叶红外光谱来分析溶蚀前后的丝素的结晶度以及丝素中的酪氨酸含量的变化。

红外光谱测试条件:波数范围4 000~400 cm<sup>-1</sup>,扫描次数32次,分辨率4 cm<sup>-1</sup>。

### 1.6 高效液相色谱分析

a) 酪氨酸标准曲线:配制不同浓度标准酪氨酸

溶液,分别称取0.001、0.002、0.006、0.010、0.014、0.018、0.022、0.026、0.030、0.035、0.040 g酪氨酸粉末溶解在100 mL去离子水中,超声震荡至澄清。对制备好的标准酪氨酸溶液应用高效液相色谱分析定量,制成酪氨酸定量标准曲线,如图2所示。

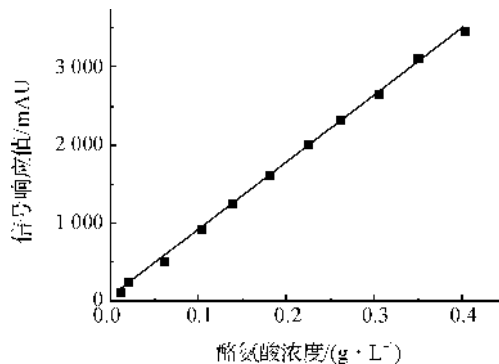


图2 不同浓度下酪氨酸标准样的峰面积曲线

L-酪氨酸线性方程为 $y = 8\,642.1x + 42.465$ ,相关系数为0.998 9,通过测定丝素溶解后的峰面积,可求得其中酪氨酸的含量(g · L<sup>-1</sup>)。

b) 将1.4中制备好的样品用高效液相色谱进行分离检测,对样品中的酪氨酸进行定量。

c) 测试条件:SB-C18(150 mm×4.6 mm,5 μm);流速1.0 mL/min;进样量20 μL;柱温30℃;梯度0~9 min流动相比从V<sub>乙腈</sub>:V<sub>甲酸</sub>=5:95转变到V<sub>乙腈</sub>:V<sub>甲酸</sub>=95:5,9 min后流动相比维持在V<sub>乙腈</sub>:V<sub>甲酸</sub>=95:5;停止时间12.50 min;后运行时间12.50 min;检测波长276 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蚕丝丝素表面结晶度分析

对未经处理的蚕丝纤维和经过HCl溶液分别处理4 h和12 h的残余丝素溴化钾压片,再进行红外光谱测试,其原始红外光谱图见图3。

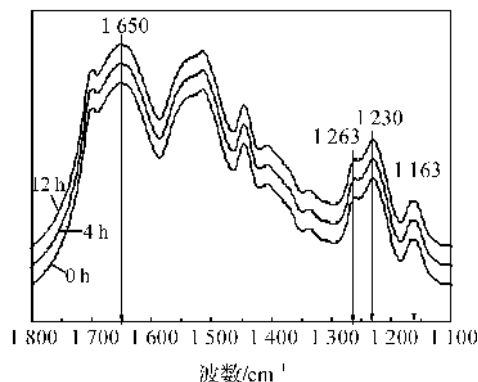


图3 HCl处理不同时间后残余丝素的红外光谱图

如图3所示,  $1\,230\text{ cm}^{-1}$  归属于蚕丝酰胺Ⅲ带中无规线团(构成无定形区)的特征吸收,  $1\,263\text{ cm}^{-1}$  归属于蚕丝酰胺Ⅲ带中呈反平行  $\beta$ -折叠结构(构成结晶区)的特征吸收<sup>[6]</sup>。通过求这两个谱带的峰面积比值, 可获得纤维表面结晶度变化的有关信息<sup>[6-7]</sup>。

二阶导数谱是红外光谱中常用的分辨出谱图中重叠的峰的方法<sup>[8]</sup>, 由于原红外谱图中两个谱带相互交叠, 很难定量分析, 因而对原始光谱图作二阶导数光谱图(见图4), 采用基线法计算二阶导数谱图中  $1\,230\text{ cm}^{-1}$  和  $1\,263\text{ cm}^{-1}$  两个谱带相应特征吸收峰的峰面积, 得到  $1\,230\text{ cm}^{-1}$  和  $1\,263\text{ cm}^{-1}$  两个谱带的峰面积为  $A_{1\,230\text{ cm}^{-1}}$  和  $A_{1\,263\text{ cm}^{-1}}$ , 以  $A_{1\,263\text{ cm}^{-1}}/(A_{1\,263\text{ cm}^{-1}} + A_{1\,230\text{ cm}^{-1}})$  表示丝素的相对结晶度, 经过三次重复实验

计算相对结晶度的平均值。表1比较了未处理丝素及 HCl 处理不同时间后残余丝素的相对结晶度。

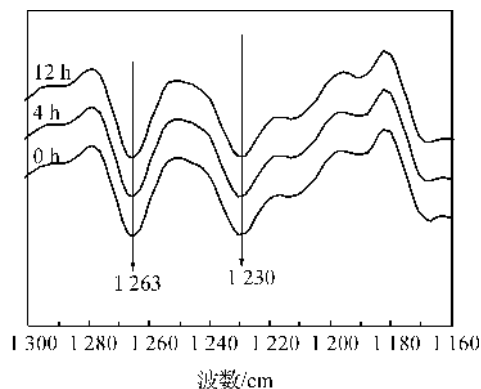


图4 HCl 处理不同时间后剩余丝素的红外二阶导数光谱图

表1 经 HCl 不同时间溶蚀后残余丝素的二阶导数红外吸收峰面积

处理 时间/h	失重 率/%	$A_{1\,230\text{ cm}^{-1}}$			$A_{1\,263\text{ cm}^{-1}}$			相对结晶度			平均结晶度 ±标准偏差
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
0	0	0.015	0.015	0.016	0.026	0.026	0.026	0.634	0.634	0.619	$0.629 \pm 0.009$
4	10.03	0.016	0.015	0.016	0.029	0.026	0.027	0.644	0.634	0.628	$0.635 \pm 0.008$
12	37.32	0.013	0.015	0.014	0.026	0.025	0.026	0.667	0.625	0.650	$0.647 \pm 0.021$

由表1可以发现, 未经处理时蚕丝原样的相对结晶度为62.9%, 经 HCl 处理4 h, 丝素的失重率为10.03%, 其相对结晶度为63.5%; 处理12 h, 失重率是37.32%时, 结晶度是64.7%。表明蚕丝丝素纤维表面部分结晶度随 HCl 溶蚀时间的延长而逐渐增大, 4 mol/L 的 HCl 溶液在40℃下处理蚕丝丝素时条件比较温和, 蚕丝首先进入的是蚕丝纤维中易被溶落的区域, 该部分区域结构较相对蚕丝纤维内部疏松。

## 2.2 蚕丝丝素中酪氨酸的含量分析

### 2.2.1 丝素中酪氨酸含量的红外分析

$1\,160\text{ cm}^{-1}$  峰是酪氨酸酚羟基的振动吸收<sup>[9]</sup>,  $1\,600 \sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$  范围内归属于酰胺Ⅰ带即羰基  $\text{C}=\text{O}$  的伸缩振动<sup>[10]</sup>。酰胺Ⅰ带( $1\,650\text{ cm}^{-1}$ )为强带,

所以以此来作为分析蚕丝表面酚羟基变化的内标峰。 $1\,163\text{ cm}^{-1}$  与  $1\,650\text{ cm}^{-1}$  处吸收峰面积之比  $A_{1\,163\text{ cm}^{-1}}/A_{1\,650\text{ cm}^{-1}}$  可反映蚕丝表面在样品深度范围内酪氨酸相对含量的变化。

从表2可以看出, 未处理蚕丝中酪氨酸相对含量为22%, HCl 处理4 h减少到14%, 相比之下, 酪氨酸的含量减少为原来的7/11; 处理12 h时残余丝素酪氨酸相对含量为9%, 与原蚕丝的22%相比含量大幅度减少为原来的9/22, 说明 HCl 处理时蚕丝纤维中结构疏松的无定型区先被破坏, 剩余丝素表面酪氨酸相对含量逐渐减少, 表明在蚕丝纤维中易被溶落的结构较为疏松的区域中分布着较多的酪氨酸, 含量占蚕丝中酪氨酸总量的60%左右。

表2 HCl 处理不同时间后残余丝素的酪氨酸相对含量

处理 时间/h	失重 率/%	$A_{1\,163\text{ cm}^{-1}}$			$A_{1\,650\text{ cm}^{-1}}$			酪氨酸相对含量			酪氨酸平均 含量±标准偏差
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
0	0	2.89	2.67	2.68	12.74	12.07	12.93	0.23	0.22	0.21	$0.22 \pm 0.001$
4	10.03	2.67	2.58	2.64	18.77	19.17	19.45	0.14	0.13	0.14	$0.14 \pm 0.005$
12	37.32	2.30	2.06	2.17	23.05	24.80	24.57	0.10	0.08	0.09	$0.09 \pm 0.001$

### 2.2.2 丝素中酪氨酸含量的高效液相色谱分析

蚕丝中的酪氨酸和色氨酸都存在着共轭双键, 在紫外部分均有吸收<sup>[3]</sup>, 最大吸收波长为276 nm, 但丝素经 HCl 处理后溶落层中的色氨酸已经被破

坏, 所以可以用 HPLC 来检测酪氨酸的含量, 且酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸的保留时间分别为2.33、3.66 min 和1.37 min。

图5为丝素全部水解后的样品的 HPLC 色谱

图,酪氨酸的保留时间为 2.3 min,与标样一致,根据峰面积测得酪氨酸占丝素纤维的 11.71%。

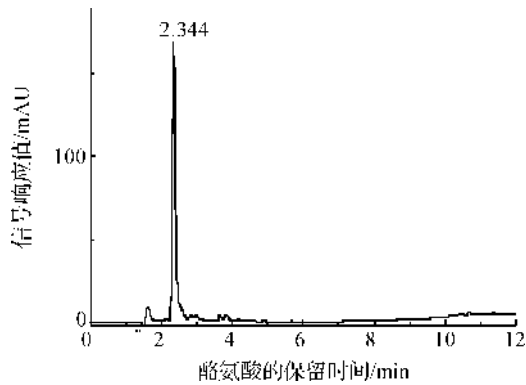


图 5 蚕丝全溶色谱图

蚕丝纤维进行 HCl 溶落水解反应是一个由表及里的渐进过程。蚕丝在 4 mol/L 的 HCl 溶液中 40℃下水解 4 h 和 12 h,对溶落层中的丝素蛋白、肽链进一步在 6 mol/L 的 HCl 溶液中 100℃下水解 12 h 后用 HPLC 分析,得到的酪氨酸含量变化见表 3。

表 3 HCl 处理蚕丝丝素的失重率和溶落层的酪氨酸含量

HCl 处理 时间/h	失重 率/%	溶落层酪 氨酸含量/%	残余丝素中 酪氨酸含量/%
4	10.03	1.13	10.71
12	37.32	5.67	5.59
全溶	100.00	11.71	0

将高效液相色谱中所测得的色谱峰峰面积代入酪氨酸的标准曲线,得到溶解液中酪氨酸的浓度 $c(\text{g/L})$ ,根据下面公式计算溶落层中酪氨酸的百分含量:

$$\text{溶落层中酪氨酸含量百分比} = (c \times V) / m_0 \times 100\%$$

其中: $m_0$  为蚕丝的重量, $V$  是溶解液的体积。

随着失重率的增加,溶落层中酪氨酸含量也在逐渐增加,残余丝素中酪氨酸含量则慢慢减少。溶解 4 h 时,即失重率为 10% 时,溶落层中酪氨酸含量只占溶落蚕丝水解液重量的 1.13%;溶解 12 h 时,失重率达 35% 左右,溶落层中酪氨酸含量为 5.67%,已经达到全溶丝素中酪氨酸总量的 50% 左右。表明蚕丝表层中就易溶落的区域中分布着相对较多的酪氨酸,占酪氨酸总量的 50% 左右,与红外光谱测定的酪氨酸含量基本相符。

### 2.3 活性染料染色前后的蚕丝丝素中酪氨酸含量分析

在活性染料与丝素的模拟反应研究中发现,不同类型的活性染料与丝素中酪氨酸的酚羟基反应,其反应性能存在较大的差异<sup>[4]</sup>。一氯均三嗪型活性染料以及乙烯砒型活性染料是最有代表性的两类活

性染料,前者与酚羟基的反应性能很好,相比之下,后者与酚羟基的反应性能则较差。本研究选用这两类活性染料对蚕丝进行实际染色,比较染色后蚕丝中的酪氨酸含量,分析实际染色中不同类型活性染料与丝素中酪氨酸的反应性差异。

表 4 比较了蚕丝经一氯均三嗪型活性染料和乙烯砒型活性染料实际染色时蚕丝中酪氨酸含量变化的差异。染料与蚕丝中酪氨酸的酚羟基结合得越多,经 HCl 全部溶蚀后剩余的酪氨酸就越少,经表 4 数据显示,两种类型的染料与蚕丝反应后酪氨酸减少的量均相对较少,蚕丝经 MCT 型活性染料和 VS 型活性染料染色后酪氨酸分别减少了 1.2% 和 0.1% 左右,前者减少的量是后者的十几倍,说明 MCT 型染料与酪氨酸的酚羟基结合比 VS 型活性染料多,这与模拟反应<sup>[4]</sup>得到的结果一致。

表 4 不同活性染料染色后蚕丝的酪氨酸含量比较

染料	溶落层酪氨酸含量/%			
	溶解 4 h	溶解 12 h	$\Delta(4\text{ h}-12\text{ h})$	全溶
未染色	1.13	5.67	4.54	11.71
活性艳橙 K-G	0.24	4.58	4.34	10.42
活性翠蓝 K-GL	0.28	4.69	4.41	10.64
活性翠蓝 KN-G	1.07	5.54	4.47	11.56
活性艳蓝 KN-R	1.12	5.64	4.52	11.66

注: $\Delta(4\text{ h}-12\text{ h})$  表示 HCl 处理 4~12 h 之间溶落的酪氨酸的百分含量。

将染色后的蚕丝分别用 HCl 溶液水解 4 h 和 12 h,经计算分析可得,全溶时经活性翠蓝 K-GL 染色后的蚕丝中酪氨酸减少总量为 1.1%;水解 4 h 时酪氨酸已经减少了 0.85%,占全溶时减少总量的 80% 左右;经过 12 h 水解后,由于结晶度变大,结构较外表层稍微紧密一些,此时酪氨酸的减少的量微乎其微。蚕丝经活性艳橙 K-G 染色后,全溶时蚕丝中酪氨酸减少总量为 1.3%;溶解 4 h 时酪氨酸已经减少的量占全溶时减少总量的 45%;溶解 12 h 时,酪氨酸减少占减少总量的 91%,表明蚕丝和活性艳橙 K-G 的反应绝大部分发生在结构较为疏松的外表层;这与活性翠蓝 K-GL 情况基本一致。活性翠蓝 KN-G、活性艳蓝 KN-R 对蚕丝进行染色后,酪氨酸减少的量非常少,但也几乎都是发生在蚕丝纤维结构疏松的外表层。通过以上分析结果表明染料分子容易进入蚕丝结构疏松的外表层,也易与其内的酪氨酸结合,越靠近内层结晶度越大,结构也越致密,染料很难进入并与酪氨酸结合反应。

### 3 结 论

a) 由红外光谱分析可知,蚕丝丝素纤维表面部分结晶度随 HCl 溶蚀时间的延长而增大,蚕丝纤维的外表层结构较内层相对比较疏松;b) 通过高效液相色谱法检测蚕丝中酪氨酸含量显示,在失重率达到 35%时,酪氨酸含量占全溶丝素中酪氨酸含量的 50%左右,表明酪氨酸在易溶落的外表层含量相对较多;c) 蚕丝酪氨酸上的酚羟基与一氯均三嗪型活性染料反应性能优于与乙烯砜型活性染料反应性能,且酪氨酸与染料分子反应绝大部分发生在结构疏松的外表层。

#### 参考文献:

- [1] 邢铁玲. 活性染料与真丝绸的反应机理[J]. 国外丝绸, 1993, 20(3): 30-32.
- [2] Nalankilli G. Reaction mechanism of reaction dyes with silk[J]. Am Dyest Rep, 1994, 83(9): 28-34.
- [3] Wang Z J, Shao M, Shao J Z. Study on the hydrolysis kinetics of vinylsulfone reactive dyes with HPLC analysis [J]. Journal of Textile Research, 2006, 27(9): 9-13.
- [4] 邵 敏, 邵建中, 刘今强, 等. 丝素与一氯均三嗪型活性染料反应性的 HPLC 研究[J]. 纺织学报, 2007, 28(6): 83-87.
- [5] 郑今欢, 邵建中, 刘今强. 蚕丝丝素蛋白中酪氨酸分布的初探[J]. 纺织学报, 2001, 22(6): 351-353.
- [6] Dousseau F, Pezolet M. Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands: comparison between classical and partial least-squares methods[J]. Biochemistry, 1990, 29(2): 8771-8779.
- [7] Byler D M, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra[J]. Biopolymers with Peptide Science, 1986, 25(3): 469-487.
- [8] 邢本刚, 梁 宏. FT-IR 在蛋白质二级结构研究中的应用进展[J]. 广西师范大学学报, 1997, 15(3): 45-49.
- [9] Shikawa H I, Nagura M. Structure and physical properties of silk fibroin[J]. Sen-I Gakkaishi, 1983, 39(10): 353-363.
- [10] 谢孟峡, 刘 媛. 红外光谱酰胺Ⅲ带用于蛋白质二级结构的测定研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(2): 226-231.

## Tyrosine Content on Surface of Silk Fiber and Its Relationship with Dyeing Properties of Reactive Dyes

YE Meng-ni, SHAO Min

(The Key Laboratory of Textile Materials and Manufacturing Technology,  
Ministry of Education, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** This paper analyzes the distribution of tyrosine on the surface layer of fibroin fiber with high performance liquid chromatography (HPLC) and infrared spectroscopy (FT-IR) and explores the relationship between tyrosine and the reactive performance of reactive dye on this basis. The experimental result shows that the outer surface and subsurface of fibroin fiber are mostly amorphous regions with loose structure and tyrosine is mostly distributed on the outer surface and subsurface; the reactive performance of phenolic hydroxyl group of tyrosine and monochlorotriazine reactive dye is better than that of it and vinyl sulfone reactive dye; the reaction between tyrosine and dye molecule mostly occurs on the outer surface with loose structure.

**Key words:** silk fiber; HPLC; FT-IR; tyrosine; reactive dye

(责任编辑: 许惠儿)