

天然胶乳中蛋白质和磷脂对橡胶分子结构的影响

吴龙梅¹, 王勃翔², 曲 鹏², 周荣杰², 廖双泉^{2*}

(1. 海南大学 农学院, 海口 570228; 2. 海南大学 材料与化工学院, 海口 570228)

摘要:采用碱性蛋白酶和磷脂酶处理天然胶乳, 制备脱蛋白胶乳和脱脂胶乳, 结合原子吸收光谱仪、核磁共振交联密度仪、凝胶色谱(GPC)等仪器对处理前后的天然胶乳进行了分析。通过对比分析, 发现酶处理后胶乳分子量降低, 分子量分布变宽, 金属离子浓度、凝胶含量和交联密度均降低。结果表明, 金属离子与天然橡胶中的蛋白质、磷脂间存在着物理的或化学的作用力; 蛋白质、磷脂在天然橡胶中起到节点的作用, 有利于形成分子间交联, 增大天然橡胶分子量, 形成分子间网络结构。

关键词:天然胶乳; 蛋白质; 磷脂; 交联密度; 凝胶含量

引言

天然橡胶是一种重要的战略资源, 与合成橡胶相比, 它具有较高的拉伸强度、耐撕裂性好、抗裂纹扩张、低生热性等优点^[1~4]。根据前人的研究我们知道, 天然橡胶的优异性能与其分子链结构和复杂的化学成分密切相关。天然胶乳中含大约 6% 的非橡胶成分, 如蛋白质、脂类、金属离子等, 它们当中大部分分散在乳清相中。在合成和贮存过程中, 这些非胶组分对天然橡胶分子链结构是有影响的, 如铜锰离子能加速天然橡胶老化^[5]。天然橡胶的性质与其分子链结构也有很大关系, 天然橡胶之所有具有高弹性源于其具有较大的分子量和交联网络结构。一个线性顺式-1, 4-聚异戊二烯天然橡胶分子链是由 ω 端基, 两个反式-1, 4-异戊二烯单元, 大约 1000~3000 个顺式-1, 4-异戊二烯单元和 α 端基组成^[6,7]。其中, 橡胶分子的 α 端由磷脂组成, 并连接到脂肪酸上, 它有利于天然橡胶形成分支结构。另外, 橡胶分子的 ω 端被认为是连接到改性的二甲基烯丙基功能基团上, 它通过分子间氢键或离子键与蛋白质形成交联点^[8,9]。2005 年, Tanaka 和他的团队研究得到经磷脂酶处理的天然胶乳的分子量和哈金斯参数都会减少, 认为可能是由于连接在天然橡胶 α 末端的磷酸单酯通过胶束形式或者磷脂分子的极性端形成支点, 增大了天然橡胶的分子量^[10~12]。

前人研究天然橡胶分子链结构均使用的是泰国产天然橡胶, 国产天然橡胶分子链结构还未曾有人研究, 并且 Tanaka 等研究了蛋白质及磷脂对天然橡胶分子链结构的影响, 但天然橡胶中金属离子浓度及其对天然橡胶网络结构的影响涉及较少, 为了进一步了解金属离子浓度与天然橡胶中蛋白质、磷脂含量的关系, 蛋白质、磷脂、金属离子浓度与天然橡胶分子量及分子量分布、凝胶含量和交联密度的关系, 天然橡胶分子间网络结构与蛋白质、磷脂、金属离子浓度的关系, 本文通过用酶对天然胶乳进行处理, 制备得到离心天然胶乳、脱蛋白天然胶乳、脱脂天然胶乳, 分析比较不同胶乳橡胶分子链结构的变化。这为我们选择天然橡胶原材料、橡胶初加工、天然橡胶的改性及应用提供理论基础。

1 实验部分

1.1 原料与试剂

新鲜天然胶乳, 海南省儋州市橡胶研究所提供; C_{18} 脂肪醇聚氧乙烯醚(商品名为平平加 O-20) 的分

10.14028/j.cnki.1003-3726.2015.06.009

收稿: 2014-10-08; 修回: 2014-12-17;

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51363006), 国家支撑计划项目(2013BAF08B02), 海南省普通高等学校研究生创新科研课题(Hys2014-02);

作者简介: 吴龙梅(1988—), 女, 重庆人, 在读硕士研究生, 从事天然橡胶加工与改性研究;

* 通讯联系人, E-mail: shqliao@263.net.

子式为 $C_{18}H_{37}O(CH_2CH_2O)_{20}H$, 工业级, 广州穗欣化工有限公司生产; 碱性蛋白酶(BR), 磷脂酶(BR), 上海源叶生物科技有限公司; 甲苯溶液(分析纯), 浓硝酸(分析纯), $La(NO_3)_3$ (分析纯), $NaOH$ (分析纯), 四氢呋喃(光谱纯), 浓硫酸(分析纯), 硼酸(分析纯), 以上试剂均为阿拉丁试剂公司提供。

1.2 样品制备

取 40g 新鲜胶乳于洁净干燥的烧杯中, 加入 0.5% 的平平加“O”, 加蒸馏水将胶乳稀释至干胶含量为 20%, 在恒温定时搅拌器上搅拌 24h; 于 14000rpm 下离心 20min, 取上层乳状物用 0.5% 的平平加 O-20 水溶液稀释至 20%, 再次离心; 取上层乳状物用 0.5% 的平平加 O-20 水溶液稀释至 20% 即制得离心天然胶乳(C-NR)。脱蛋白天然胶乳(DPNR)和脱脂天然胶乳(P-NR)的制备与离心胶乳的制备相似, 不同的是在加入表面活性剂平平加 O-20 的同时分别加入 0.04% 的碱性蛋白酶, 0.02% 的磷脂酶, 以上百分数均为质量百分比。取 30~40mL 制备好的 C-NR、DPNR、P-NR 及新鲜胶乳, 铺膜于玻璃板上, 厚度保持在 2~4mm, 于真空烘箱中 70℃ 下干燥 8h, 取出保存于干燥器中待用。

1.3 测试表征

1.3.1 氮含量测定 采用凯氏测氮法依照 GB/T 8088-1999 测定胶乳的氮含量。

1.3.2 脂肪含量的测定 采用德国 Bruker TENSOR27 傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)对胶膜样品进行红外表征, 扫描波数范围 $650\sim4000\text{cm}^{-1}$ 。同时采用英国 Kratos 公司 Axis Ultra DLD 多功能 X-射线光电子能谱仪(XPS), 单色化的 $Al\ K\alpha$ 源(Mono $AlK\alpha$, 能量 1486.6eV, 10mA×12kV, CAE 扫描模式进行检测)。

1.3.3 金属离子含量测定 将制备好的干胶样品于马弗炉中 200℃ 下碳化 1h, 再升温至 600℃ 灼烧 6h。用适当浓度的 HNO_3 溶液溶解残余物, 过滤, 加入适量 0.1ppm 的 $La(NO_3)_3$ 溶液做释放剂, 定容待用。采用北京普析通用仪器公司的 TAS-900 原子吸收光谱仪按火焰法条件要求测试。

1.3.4 分子量及分子量分布的测定 分别称量 10mg 已烘干的胶膜样品, 按 2~5mg/mL 的比例, 加入四氢呋喃(THF)溶解, 过膜, 采用美国 Waters1515 凝胶色谱(以聚苯乙烯为标准样)测试。

1.3.5 凝胶含量的测定 取适量天然橡胶样品(m_1)于已烘干的离心管中, 加甲苯溶解, 在 25℃ 静置 16~20h; 完成溶胀后, 摇动离心管 60s, 充分分散底部的沉淀; 用注射器从 45 度倾斜的离心管中抽出甲苯, 加 1mL 丙酮, 静置 30s, 以便甲苯能与底部沉淀分离, 移除甲苯。用抹刀取出沉淀, 放入恒重的容器中, 将容器放在通风室 30min, 让溶剂挥发, 取出容器置于干燥器中干燥 30min, 称重(m_2), 凝胶含量 = $(m_2/m_1) \times 100\%$ 。

1.3.6 交联密度的测定 采用德国 IIC XLDS-15 HT 交联密度仪, 于 80℃ 下测试制备好的胶膜样品。

2 结果与讨论

2.1 天然胶乳的氮含量

蛋白质是由碳、氢、氧、氮, 有时还有硫等元素构成的一种结构很复杂的有机化合物, 是构成橡胶粒子保护层的重要物质。由于天然橡胶中含氮物质绝大部分是蛋白质, 故从天然橡胶中氮含量即可知蛋白质含量。图 1 是酶处理前后天然胶乳氮含量图, 从图中可以清晰地看到几种不同处理天然橡胶中氮含量的变化。天然胶乳的氮含量为 0.72%, 经两次离心氮含量降低到 0.11%, 这说明天然胶乳中大部分蛋白质存在于乳清相中。这与前人的研究天然胶乳中大于 75% 的蛋白质自由的分布在胶清相中, 接近 25% 的蛋白质与橡胶粒子结合形成一层保护层相同^[13~15]。脱脂天然胶乳的氮含量为 0.12% 与离心胶乳氮含量相近, 说明采用磷脂酶处理天然胶乳不影响蛋白质在天然橡胶中的分布, 脱脂天然胶乳氮含量的减少是因为离心作用分离掉乳清相中的蛋白质。脱蛋白天然胶乳氮含量为 0.02%, 接近零, 这说明碱性蛋白酶不但能使分布在胶清中的蛋白质被除去, 与橡胶粒子结合的蛋白质也被移除。总的来说, 氮含量分布图说明了碱性蛋白酶能有效地分解天然胶乳中的蛋白质, 经两次离心处理天然胶乳氮含量降低量比采用碱性蛋白酶处理天然胶乳氮含量降低得少, 这说明蛋白质与橡胶分子间存在着某种键合作用力。

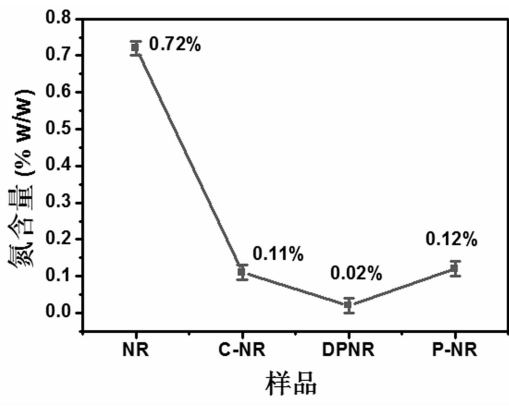


图 1 NR、C-NR、DPNR 和 P-NR 的氮含量

Figure 1 Nitrogen content of NR, C-NR, DPNR and P-NR

2.2 天然胶乳的磷脂含量

天然胶乳是一种化学成分复杂的天然合成物,其中,脂类物含量约 1%,0.6%是磷脂,磷脂的存在在很大程度上影响这天然橡胶的分子链结构^[10~12]。由于磷脂中含有天然橡胶不具有的官能团 O—C=O 和 O—P—O,可以通过检测 O—C=O 和 O—P—O 的含量变化来判断胶乳中磷脂含量的变化^[16]。据研究报道,磷脂在 1738~1742cm⁻¹ 范围内存在一个与脂肪酸酯相关的 C=O 伸缩吸收峰^[10],吸收峰 1240cm⁻¹ 为磷脂中 O—P—O 的非对称伸缩吸收峰^[17]。图 2 中分别为天然胶乳、离心天然胶乳、脱蛋白天然胶乳以及脱脂天然胶乳的红外光谱图。NR、C-NR 以及 DPNR 的红外光谱图中在 1740cm⁻¹ 出现了明显的 C=O 吸收峰,在 1240cm⁻¹ 出现了 O—P—O 的非对称吸收峰;P-NR 的红外光谱图中 1740cm⁻¹ 和 1240cm⁻¹ 的吸收峰均消失。从红外光谱图可以知道,采用磷脂酶处理天然胶乳有效地降低了胶乳中磷脂含量。

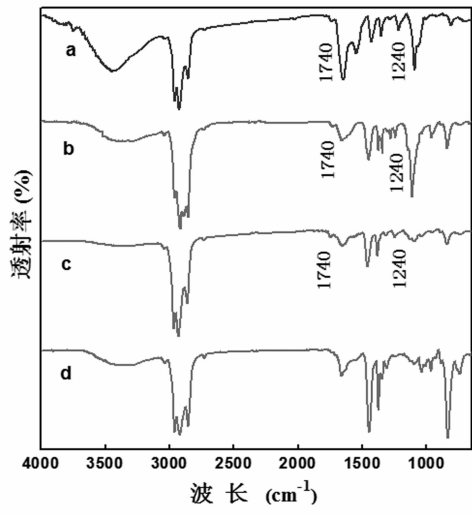


图 2 NR(a)、C-NR(b)、DPNR(c)和 P-NR(d)的红外光谱图

Figure 2 FTIR spectra of NR(a), C-NR(b), DPNR(c) and P-NR(d)

图 3 为不同天然胶乳的 C1s 分峰拟合图,NR、C-NR、DPNR 表面结构中存在 3 种形态的碳结构: 284.6eV 的峰为聚异戊二烯中 C=C(即 sp^2 杂化碳),285.6eV 的峰为聚异戊二烯中 C—C(即 sp^3 杂化碳),288.8eV 的峰为羧基碳 O—C=O,并且聚异戊二烯中的碳碳峰面积占 C1s 总面积的 98%以上。P-NR 表面的含碳结构较简单,只有 C=C 和 C—C 峰,羧基碳(O—C=O)的峰消失。与 NR 的 C1s 分峰

拟合图(见图 3a)相比,离心处理的天然橡胶(见图 3b)和脱蛋白天然橡胶(见图 3c)在 288.8eV 处峰的面积减小;这说明在高速离心作用下有少量的脂质从胶乳中分离出去。P-NR C1s 分峰拟合图(见图 3d)中 O—C=O)的峰消失,说明经脱脂处理天然橡胶中的脂类物质含量大大降低。

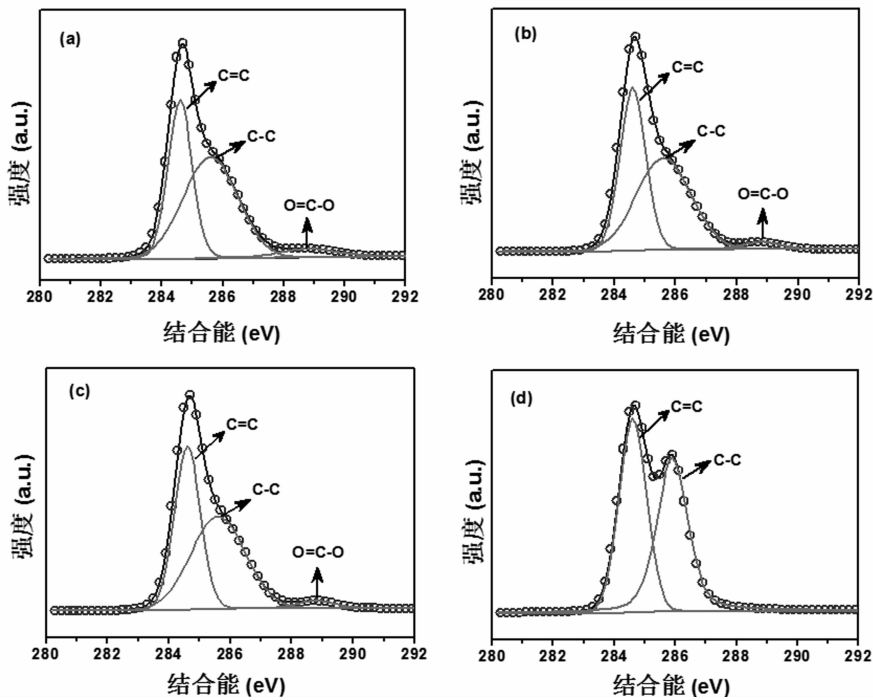


图 3 NR (a)、C-NR (b)、DPNR (c)和 P-NR (d)的 XPS C1s 谱图
Figure 3 XPS C 1s spectra of NR(a), C-NR(b), DPNR(c) and P-NR(d)

2.3 天然胶乳的金属离子浓度

从表 1 可以看到,新鲜胶乳中的金属离子浓度远大于其它经过处理的胶乳中金属离子浓度,这是由于天然胶乳中大多数金属离子以游离的形式存在在乳清相^[18]。与离心胶乳相比脱蛋白胶乳和脱脂天然胶乳中 Mg^{2+} 和 Cu^{2+} 的浓度降低较大, Mg^{2+} 浓度从 $26.38\mu g/g$ 降低到 $9.37\mu g/g$ 和 $6.19\mu g/g$,脱蛋白胶乳中 Mg^{2+} 浓度略高于脱脂天然胶乳。 Cu^{2+} 浓度在上述 3 种胶乳中的减少趋势与 Mg^{2+} 相同。脱蛋白胶乳中 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 浓度降低到离心胶乳的一半,而脱脂天然胶乳 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 浓度降低到接近离心胶乳的 1/3。 Ca^{2+} 浓度在 C-NR、DPNR、P-NR 中变化不大,说明 Ca^{2+} 与蛋白质和磷脂的相互作用较小。以上数据变化说明 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 与磷脂和蛋白质均有离子键或氢键的作用力,而且与磷脂的相互作用力大于与蛋白质的相互作用力,较多地分布在橡胶粒子的脂质层,这可能是由于磷脂具有极性端和非极性端,极性端与金属离子间的具有较强的作用力。

表 1 NR、C-NR、DPNR、P-NR 的金属离子浓度
Table 1 Metal ion concentration of NR, C-NR, DPNR and P-NR

样品	金属离子浓度/ $(\mu g \cdot g^{-1})$				
	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Fe^{2+}	Cu^{2+}	Mn^{2+}
NR	123.05	143.34	38.62	41.32	1.35
C-NR	26.38	29.86	9.05	9.45	0.31
DPNR	9.37	22.33	4.66	0.38	0.17
P-NR	6.19	21.51	3.20	0.44	0.095

2.4 天然胶乳分子量及分子量分布

从前人的研究可知,天然橡胶粒子是由具有较长支链的聚异戊二烯分子链缠结在一起组成的^[19,20]。图 4 为天然橡胶经离心和酶处理前后重均分子分布图,C-NR 的分子量分布的双峰峰型没有发生变化,而在 DPNR 和 P-NR 分子量分布图中双峰峰值从高分子量向低分子量移动。图 4 和表 2 可以看出,经过离心和酶处理天然橡胶的分子量大小受到影响,与新鲜胶乳相比 C-NR 的分子量略微降低,DPNR 和 P-NR 的分子量减小较多,几种胶乳的重均分子量分别是 5.63×10^5 、 5.46×10^5 、 4.61×10^5 、 4.43×10^5 ;分子量分布增大,分散系数由 1.16 增大到 1.31。这些变化表明,天然橡胶中蛋白质、磷脂、金属离子有利于橡胶分子链形成支链,当用酶处理减少蛋白质、磷脂、金属离子含量的时候,分子链中支链结构受到破坏,平均分子量减少,分子量分布变大。

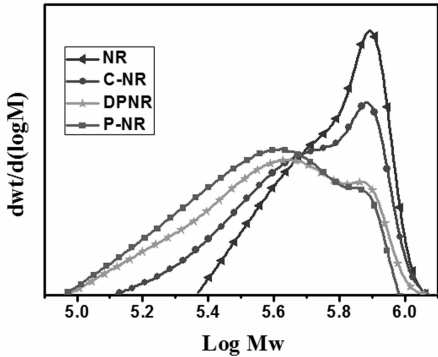


图 4 NR、C-NR、DPNR、P-NR 重均分子量及分子量分布

Figure 4 Weight-average molecular weight and molecular weight distribution of NR, C-NR, DPNR and P-NR

表 2 NR、C-NR、DPNR、P-NR 的分子量及分子量分布

Table 2 Molecular weight and molecular weight distribution of NR, C-NR, DPNR and P-NR

样品	$M_n(\times10^4)$	$M_w(\times10^4)$	$M_z(\times10^4)$	分散系数(M_w/M_n)
NR	4.87	5.63	6.31	1.16
C-NR	4.52	5.46	6.30	1.21
DPNR	3.72	4.61	5.78	1.24
P-NR	3.39	4.43	5.46	1.31

2.5 天然橡胶的交联结构

图 5 为天然橡胶凝胶含量分布图,从图中可以看到新鲜胶乳与离心胶乳凝胶含量相近,分别为 42.9%、40.7%,而酶处理天然橡胶的凝胶含量显著减少,脱蛋白胶乳的凝胶含量为 14.3%,脱脂肪胶乳的凝胶含量为 11.9%。离心作用只减少了少量的凝胶含量,对天然橡胶分子链将结构破坏较少;酶处理大量的破坏了天然橡胶分子链的交联,大大降低了天然橡胶的凝胶含量^[21]。结果表明,蛋白质、磷脂的存在能增加天然橡胶的凝胶含量。

离心及酶处理对天然橡胶物理交联密度的影响见图 6。C-NR 的物理交联密度 $4.61\times10^5\text{mol/cm}^3$ 小于 NR 物理交联密度为 $6.41\times10^5\text{mol/cm}^3$,当酶处理后 DPNR 和 P-NR 分别迅速降低到 $3.57\times10^5\text{mol/cm}^3$ 和 $3.36\times10^5\text{mol/cm}^3$ 。NR、C-NR、DPNR、P-NR 交联点之间平均相对分子质量 M_c 分别为 14.81kg/mol、20.63kg/mol、26.61kg/mol、28.25kg/mol。以上数据说明蛋白质、磷脂、金属离子在天然橡胶分子链中其交联作用,通过相互作用力将不同的分子量联结到一起,增大了天然橡胶的交联密度。根据以上实验结果分析,可以得到天然橡胶分子链分支和交联结构模型(见图 7)。

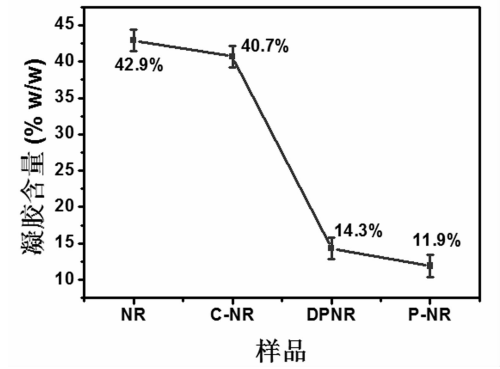


图 5 NR、C-NR、DPNR、P-NR 的凝胶含量
Figure 5 Gel content of NR, C-NR, DPNR and P-NR

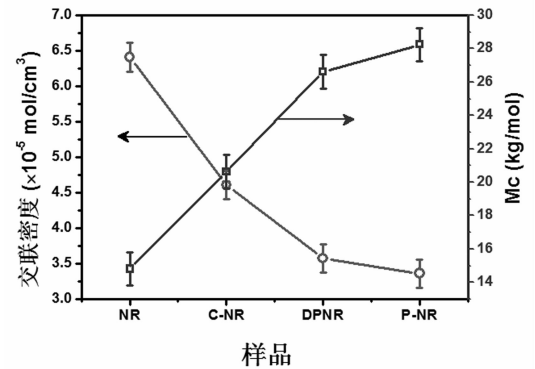


图 6 NR、C-NR、DPNR、P-NR 的交联密度
Figure 6 Crosslinking density of NR, C-NR, DPNR and P-NR

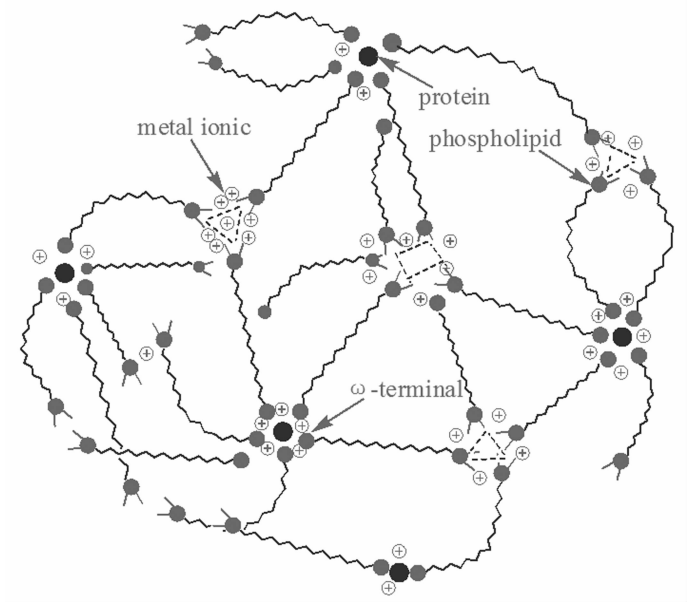


图 7 天然橡胶分子链分支和交联结构模型
Figure 7 Presumed structure of branch-point and cross-linked structure in natural rubber chain

3 结论

天然橡胶中蛋白质、磷脂对天然橡胶分子量及分子量分布、凝胶含量和交联密度、金属离子浓度有很大的影响,天然橡胶分子量及分子量分布与凝胶含量和交联密度之间也存在这密切的联系,在一定程度上,天然橡胶分子量增大,凝胶含量和交联密度也相应的增大。在天然橡胶分子链中有大量的长支链存在,这些支链通过天然橡胶分子链末端基团与少量的蛋白质、磷脂键合,再通过蛋白质、磷酸根基团上带有的少量电荷与金属离子通过离子键作用连接起来,而形成交联网状结构。随着天然橡胶中蛋白质、磷脂、金属离子含量的减少,天然橡胶的分子量、凝胶含量和交联密度都有所降低。

参考文献:

[1] Nasir R M, El-Tayeb N S M. J Thermoplast Compos, 2012, 25(6): 701~715.
[2] Wongthong P, Nakason C, Pan Q M. Eur Polym J, 2014, 59: 144~155.

- [3] Bruzzone M, Carbonaro A, Gargani L. Rubber Chem Technol, 1978, 51(5): 907~924.
- [4] De Valle Ramos L F, Monterongo M. Rubber Chem Technol, 1978, 51(5): 863~871.
- [5] Taumpoemsab S, Sakdapipanich J, Tanaka Y. Rubber Chem Technol, 2007, 80(1): 159~168.
- [6] Archer B L, Cockbain E G. Biochem J, 1955, 61(3): 508~512.
- [7] Tanaka Y, Kawahara S, Tangpakdee J. Kautschuk Gummi Kunststoffe, 1997, 50(1): 6~11.
- [8] Tanaka Y, Aikhwee E, Ohya N, Nishiyama N, Tangpakdee J, Kawahara S. Phytochem, 1996, 41(6): 1501~1505.
- [9] Mekkiengkrai D, Sakdapipanich J T, Yasuyuki T. Rubber Chem Technol, 2006, 79(2): 366~380.
- [10] Tarachiwin L, Sakdapipanich J, Ute K, Kitayama T, Bamba T, Fukusaki E, Kobayashi A, Tanaka Y. Biomacromolecules, 2005, 6(4): 1851~1857.
- [11] Tarachiwin L, Sakdapipanich J, Ute K, Kitayama T, Tanaka Y. Biomacromolecules, 2005, 6(4): 1858~1863.
- [12] Amnuayporn Sri S, Sakdapipanich J, Toki S, Hsiao B S, Ichikawa N, Tanaka Y. Rubber Chem Technol, 2008, 81(5): 753~766.
- [13] Nawamawat K, Sakdapipanich J T, Ho C C. Macromol Sym, 2010, 288(1): 95~103.
- [14] Ariyawiriyanan W, Nuinu J, Sae-heng K, Kawahara S. Energy Procedia, 2013, 34: 728~733.
- [15] Sansatsadeekul J, Sakdapipanich J, Rojruthai P. J Biosci Bioeng, 2011, 111(6): 628~634.
- [16] Blume A, Hubner W, Messner G. Biochemistry, 1988, 27(21): 8239~8249.
- [17] Wong P T T, Mantsch H H. Chem Phys Lipids, 1988, 46(3): 213~224.
- [18] Rippel M M, Paula Leite C A, Vasconcelo S C M. Microsc Microanal, 2003, 9(2): 450~451.
- [19] Rojruthai P, Tarachiwin L, Sakdapipanich J T, Ute K, Tanaka Y. KGK-Kaut Gummi Kunst, 2009, 62(5): 227~232.
- [20] Tarachiwin L, Tanaka Y, Sakdapipanich J. KGK-Kaut Gummi Kunst, 2005, 58(1): 115~122.
- [21] Amnuayporn Sri S, Tarachiwin L, Sakdapipanich J T. J Appl Polym Sci, 2010, 115(6): 3645~3650.

The Effect of Protein and Phospholipid on Natural Rubber Latex Molecular Structure

WU Long-mei¹, WANG Bo-xiang², QU Peng², ZHOU Rong-jie², LIAO Shuang-quan^{2*}

(1. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Natural rubber latex was firstly treated with alkaline protease or phospholipase. Then the effect of protein and phospholipid on natural rubber molecular structure was investigated by the combination of atomic absorption spectroscopy, nuclear magnetic resonance crosslinking density meter and gel permeation chromatography. The results indicated that the molecular weight, molecular weight distribution, the concentration of metal ions and crosslinking density, and the gel content of natural rubber presented a significant decrease after the treatment with alkaline protease or phospholipase, which are due to that there exist physical forces or chemical bond between the metal ions and protein, phospholipid in the natural rubber. The presence of protein and phospholipid contributes to the formation of intermolecular cross-linking, increasing molecular and intermolecular network structure.

Key words: Natural rubber latex; Protein; Phospholipid; Crosslinking density; Gel content