

明胶-柠檬酸-硬脂酸复合凝胶的制备及性能

郭华¹, 史泽毅², 张海霞², 邓博², 王亚雄², 靳利娥^{2*}

(1. 太原理工大学科学技术研究院, 山西太原 030024) (2. 太原理工大学化学化工学院, 山西太原 030024)

摘要: 针对明胶分子链刚性差, 单一组分制备的凝胶机械性能和保水性较差, 降解速率快的问题, 该研究以明胶为原料, 柠檬酸为交联剂, 利用疏水性物质硬脂酸对其进行改性, 制备明胶-柠檬酸-硬脂酸 (Gelatin-Citric Acid-Stearic Acid, GA-CA-SA) 复合凝胶。以压缩强度为响应值优化了明胶-硬脂酸复合凝胶的制备工艺条件, 利用扫描电子显微镜观察其形貌、红外光谱仪对化学结构进行了表征, 并对其进行了细胞毒性评价和姜黄素缓释研究。结果表明: 最佳工艺参数为硬脂酸浓度0.013 g/L, 柠檬酸浓度0.015 g/mL, 温度69 °C, 在此条件下制备的GA-CA-SA复合凝胶压缩强度为99.05 kPa, 较明胶 (Gelatin, GA) 凝胶压缩强度 (45.55 kPa) 来说, 力学强度提高了117%。红外光谱表明, 由于柠檬酸的交联作用, 改变了明胶的二级结构, 使得形成的GA-CA-SA复合凝胶, 亲水性的明胶排列在外面, 疏水性的硬脂酸包裹在里边, 形成了规则的孔隙结构。且无细胞毒性, 对姜黄素具有较好的缓慢释放的效果。

关键词: 明胶; 硬脂酸; 柠檬酸; 复合凝胶; 力学强度

文章编号: 1673-9078(2021)10-171-179

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0183

Preparation and Properties of Gelatin-citric Acid-stearic Acid Composite Gel

GUO Hua¹, SHI Ze-yi², ZHANG Hai-xia², DENG Bo², WANG Ya-xiong², JIN Li-e^{2*}

(1. Office of Academic Research, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

(2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract: In order to enhance the mechanical properties of gelatin gel and expand its application value, gelatin-citric acid-stearic acid composite gel was prepared by using gelatin as raw material, citric acid as cross-linking agent and stearic acid as additive. The preparation conditions of composite gel were optimized with compressive strength as the response value. The morphology of the composite was observed with a scanning electron microscope (SEM), the chemical structure was characterized by infrared spectroscopy (FT-IR), and the cytotoxicity and curcumin release were studied. The results showed that the optimized process conditions were as follows: the quality of stearic acid was 0.013 g/mL, the quality of citric acid was 0.015 g/mL, and the temperature was 69 °C. The mechanical strength of the gelatin-stearic acid composite gel (99.05 kPa) prepared under the optimal conditions was 117% higher than that of the single component gelatin gel (45.55 kPa). The FT-IR spectrum analysis showed that the secondary structure of gelatin was changed due to the cross-linking effect of citric acid, resulting in the formation of GA-CA-SA composite gel. The hydrophilic gelatin was arranged outside and the hydrophobic stearic acid was wrapped in it. Inside, a regular pore structure was formed. It has no cytotoxicity and has a good slow release effect on curcumin.

Key words: gelatin; stearic acid; citric acid; composite gel; compressive strength

引文格式:

郭华, 史泽毅, 张海霞, 等. 明胶-柠檬酸-硬脂酸复合凝胶的制备及性能[J]. 现代食品科技, 2021, 37(10): 171-179, +307

GUO Hua, SHI Ze-yi, ZHANG Hai-xia, et al. Preparation and properties of gelatin-citric acid-stearic acid composite gel [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 171-179, +307

收稿日期: 2021-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51174144); 山西省高等学校科技成果转化培育项目 (201930)

作者简介: 郭华 (1981-), 女, 博士, 研究方向: 生物化学、生物功能材料, E-mail: guohuatyut@126.com

通讯作者: 靳利娥 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学、生物化学, E-mail: lejijin2003@163.com

明胶 (Gelatin, GA) 是胶原蛋白的部分水解产物, 为一种天然两性生物高分子^[1], 由于其可再生、成本低、生物相容性和可生物降解性等特点广泛应用于食品、医药等领域^[2,3]。明胶除了持水性、成膜性、乳化性、起泡性的特性外, 还具有独特的凝胶性, 是制备凝胶的最佳原料^[4,5], 明胶凝胶具有优异的生物相容性、细胞粘附性、可生物降解性等特点。明胶分子链

柔性差,单一组分制备凝胶时机械性能和保水性较差,限制其应用^[6-8]。明胶分子结构上有大量的羟基、羧基和氨基,有利于与其他物质结合制备复合凝胶,Guiseppe 等^[9]利用海藻酸钠与明胶共混制备的凝胶可提高机械性能,但制备凝胶降解速率快。Moreira 等^[10]利用乳酸和醋酸改性明胶,可增加复合凝胶的水分吸收速率,但力学性能没有提升。Tseng 等^[11]制备了壳聚糖-明胶复合凝胶,由于使用的交联剂是戊二醛,京尼平,使得生物相容性方面出现弊端。硬脂酸 (Stearic acid, SA) 是一种疏水性极强的饱和脂肪酸,能够应用到复合材料方面起疏水性的作用^[12], Sobhana 等^[13]将疏水性硬脂酸和亲水性纤维素通过连接剂层状双氢氧化物 (LDH), 制得一种超疏水性复合材料。Khalifeh 等^[14]通过在高纯度镁上涂覆硬脂酸,发现疏水涂层可使高纯度镁的腐蚀速率降低 1000 倍以上,有效提高了耐腐蚀性。硬脂酸疏水性强但存在水溶性差、复合时分散不均匀等问题,从而限制其应用,如果能将二者有效的融合形成复合凝胶,则可互补双方缺点,扩展其应用范围。

柠檬酸 (Citric acid, CA) 是一种常用的高分子材料交联剂,可提供柠檬酸根和羟基,反应活性强、无毒、容易降解^[15,16],用柠檬酸作交联剂制备的复合凝胶表面均匀光滑、内部具有丰富的空隙、无细胞毒性、具有良好的药物缓释效^[17]。本文利用柠檬酸作为交联剂,在酸性溶液中,明胶中质子化的氨基可与柠檬酸根产生静电相互作用,羟基可与硬脂酸的羧基形成大分子物质,将硬脂酸与明胶有机结合,制备得明胶-柠檬酸-硬脂酸 (GA-CA-SA) 复合凝胶。以压缩强度为指标采用响应曲面法优化复合凝胶制备条件,红外光谱和电镜考察其结构,体外细胞相对增殖率 (Cell relative growth rate, RGR) 法研究其生物相容性。以姜黄素 (Curcumin, Cur) 为模型化合物研究了药物缓释性能。本研究为制备高力学强度、可降解和无毒性复合凝胶材料提供了一种新途径,同时也为明胶基复合凝胶在生物医用载药领域的应用提供了理论依据。

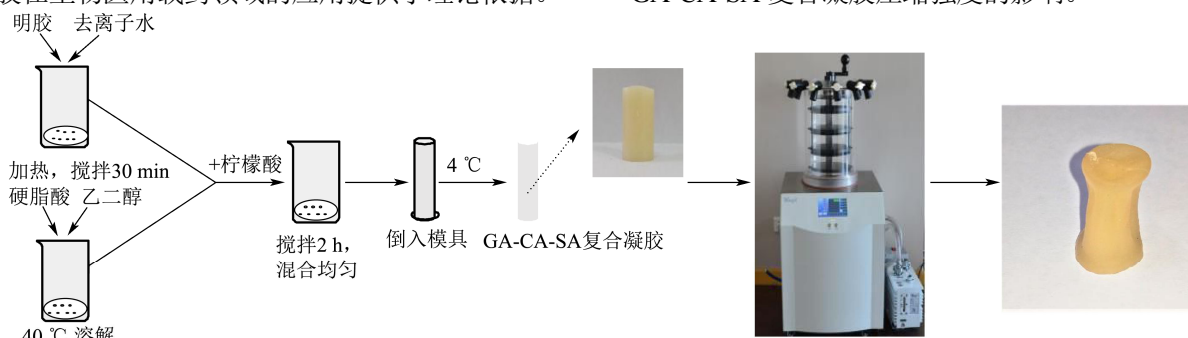


图1 GA-CA-SA 复合凝胶的制备流程

Fig.1 Schematic of the GA-CA-SA composite gel preparation

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

明胶 (CP)、硬脂酸 (AR)、柠檬酸 (AR)、乙二醇 (AR)、小鼠巨噬细胞 (RAW) 无血清培养基 (DMEM basic(1X)), 赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司; 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8), 北京科硕生物技术有限公司; 姜黄素, 天津市光复精细化工研究所; Tween 80, 国药集团化学试剂有限公司; pH=7.4的缓冲溶液: 取7.36 g三聚磷酸钠溶于200 mL去离子水中, 配得磷酸缓冲盐溶液 (PBS), 取0.38 mL Tween 80溶液加入PBS中, 超声震荡溶解。

WDW-05 型电子万能试验机, 扬州市博尧试验机械有限公司; Nicolet 6700 型红外光谱仪, 深圳市瑞盛科技有限公司; S-4800 型扫描电子显微镜, 日本 Hitachi 公司; HF100 型三气培养箱, 上海力申科学仪器有限公司; Multiskan Ascent 型 MK3 酶标仪, 上海沛欧分析仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 GA-CA-SA 复合凝胶的制备

称取 2 g 明胶, 在一定温度的恒温水浴中溶于 10 mL 去离子水; 然后称取一定量硬脂酸, 加 1 mL 乙二醇加热溶解, 与明胶溶液共混, 再加入一定量柠檬酸, 持续搅拌 2 h。混合均匀, 倒入柱状模具中静置 12 h, 然后置于冰箱 (4 °C) 中放置 24 h, -50 °C 真空冷冻干燥 48 h, 制得 GA-CA-SA 复合凝胶, GA-CA-SA 复合凝胶表面均匀光滑, 复合凝胶制备流程及实物图如图 1 所示。将 2 g 明胶溶于 10 mL 去离子水按上述方法制备得对照组明胶 (Gelatin, GA) 凝胶。

1.2.2 单因素试验

以 GA-CA-SA 复合凝胶的压缩强度为考察指标, 研究硬脂酸浓度、反应温度、不同交联剂质量对 GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度的影响。

1.2.3 响应面实验设计

在单因素试验的基础上, 根据响应面 Box-Behnken 试验设计原理, 明胶浓度为 0.2 g/mL, 以硬脂酸 SA 浓度 (X₁)、柠檬酸浓度 (X₂)、反应温度 (X₃) 3 个因素为变量, 以 GA-CA-SA 复合凝胶的压缩强度 (Y) 为响应值, 设计三因素三水平实验, 因素与水平的取值见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验因素与水平

Table 1 Box-Behnken factors and levels			
水平	X ₁	X ₂	X ₃
	SA 浓度/(g/mL)	CA 浓度/(g/mL)	温度/°C
-1	0.008	0.01	60
0	0.012	0.015	70
1	0.016	0.020	80

1.2.4 GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度测试

将直径 10 mm, 高 10 mm 的柱状凝胶试样置于电子万能试验机上, 恒定位移速率 2 mm/min, 测定复合凝胶的压缩强度。当压缩应力达到屈服点时, 复合凝胶内部发生断裂, 测试完成。压缩强度按照公式 (1) 计算

$$L = F / S \quad (1)$$

式中:

L—压缩强度, Pa;

F—压缩应力, N;

S—试样的截面积, m²。

1.2.5 GA-CA-SA 复合凝胶的结构表征

扫描电子显微镜 (SEM) 观察: 将冷冻干燥后的 GA 凝胶与 GA-CA-SA 复合凝胶粉末真空表面喷金, 在电镜电压为 30 kV 下观察凝胶粉末表面形貌微观结构。

红外表征: 将制备的 GA 凝胶与 GA-CA-SA 复合凝胶研磨成粉末, 40 °C 下真空干燥 24 h, 用 KBr 压片, 在 500~4000 cm⁻¹ 范围内测定样品的红外吸收光谱。

1.2.6 GA-CA-SA 复合凝胶细胞毒性实验

按照 GB/T 16886.5-2003^[18] 将 GA-CA-SA 复合凝胶粉末用无血清培养基于 37 °C、无菌条件下浸提 24 h, 取浸提液利用无血清培养基分别配制浓度为 1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL 的 GA-CA-SA 复合凝胶浸提液, 备用。以 1 mL 无血清培养基为空白对照。

细胞相对增殖率 (Relative growth rate, RGR) 测定: 将生长良好的 RAW 细胞以 100 μL/孔接种于 96 孔板, 于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。分 5 组, 每组两列, 每列含 6 孔, 分别加入 20 μL GA-CA-SA 复合凝胶浸提液 (1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL) 和空白对照液。继续培养 24 h,

48 h, 各选取一列孔, 每孔加入 100 μL CCK-8 试剂, 震荡均匀, 用酶标仪于 λ_{450 nm} 测定各孔吸光度值, 计算平均值。RGR 按照公式 (2) 计算:

$$RGR / \% = A_i / A_0 \times 100\% \pm S \quad (2)$$

式中:

A_i—测试样吸光度值;

A₀—空白样吸光度值;

S—相对偏差。

RGR 越大, 细胞活性越强, 说明制备的复合凝胶毒性越小, 生物相容性越好。RGR ≥ 100% 为 0 级, 75%~99% 为 1 级, 50%~74% 为 2 级, 25%~49% 为 3 级, 1%~24% 为 4 级, 0 为 5 级。

1.2.7 GA-CA-SA 复合凝胶的药物缓释实验

实验以水溶性较差、肠道难以吸收的姜黄素为模型药物进行考察 GA-CA-SA 复合凝胶对姜黄素的缓释性能。

载姜黄素凝胶制备: 在 1.2 实验中制备优化后的 GA-CA-SA 复合凝胶时, 明胶溶解后加入 3 mg 姜黄素磁力搅拌 40 min 至姜黄素溶解, 然后再加硬脂酸及柠檬酸, 制得明胶-柠檬酸硬脂酸-姜黄素复合凝胶 (GA-CA-SA-Cur)。明胶溶解后只加入姜黄素, 制得明胶-姜黄素凝胶 (GA-Cur) 为对照。

按照文献^[19]绘制姜黄素的标准曲线得线性回归方程 (3)。姜黄素的浓度 (C_i) 按照回归方程计算

$$A = 0.00956C_i - 0.00392 (R^2 = 99.9) \quad (3)$$

体外缓释姜黄素实验: 称取 1 g 的 GA-Cur 凝胶和 GA-CA-SA-Cur 复合凝胶密封于经沸水煮过的透析袋中, 置于锥形瓶中, 加入 50 mL 的缓冲液。在 37 °C 的恒温振荡器中, 以 100 r/min 的速率震荡, 每隔一定时间取 3 mL 缓冲液 (同时用 3 mL 缓冲液补充进锥形瓶) 在 425 nm 测定吸光度值, 按照公式 (3), 计算姜黄素浓度, 然后代入公式 (4)、(5)、(6) 计算凝胶累积释放姜黄素率 (Q_i), 绘制时间-累积释放率曲线, 考察缓释姜黄素性能。

$$W_r = 50 \times C_i + 3 \times \sum_{i=1}^n C_{i-1} \quad (4)$$

$$W_{r0} = ma / b \quad (5)$$

$$Q_i = \frac{W_r}{W_{r0}} \times 100\% \quad (6)$$

式中:

W_r—第 i 次取样时累积释放姜黄素量, μg;

C_i—第 i 次取样时测得的姜黄素浓度, μg/mL;

a—姜黄素的质量, μg;

b—凝胶总质量, μg;

m ——姜黄素加入的总量, μg ;

W_{i0} ——凝胶中姜黄素的实际含量, μg ;

Q_i ——第 i 次取样时释放姜黄素的百分率。

1.2.8 数据处理

利用 Minitab 17 进行回归拟合分析, $p < 0.01$ 为回归方程拟合度好。

2 结果与讨论

2.1 响应曲面法实验结果

2.1.1 SA 质量对复合凝胶压缩强度的影响

在柠檬酸浓度 0.015 g/mL, 温度 70 °C 的条件下研究硬脂酸浓度 (0.004、0.008、0.012、0.016、0.020 g/mL) 对 GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度的影响, 结果如图 2 所示。

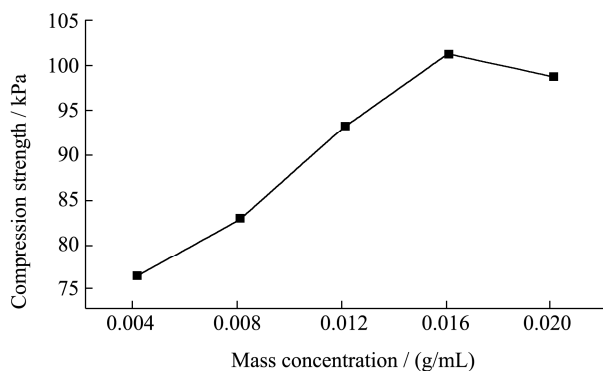


图 2 SA 质量对 GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度的影响

Fig.2 Effect of SA mass on the compression strength of GA-CA-SA composite gel

从图 2 可以看出, 随着硬脂酸质量的增加, GA-CA-SA 复合凝胶的压缩强度均呈先增加后减小趋势。GA-CA-SA 复合凝胶在 SA 浓度为 0.016 g/mL 时, 压缩强度达到最大值 101.442 kPa。明胶中含有大量的蛋白质分子, 溶液酸度 (pH=4.7) 小于明胶的等电点 (pI=4.9), 明胶中羧基解离受到抑制, 氨基质子化, 此时明胶为聚阳离子分子。在 GA-CA-SA 复合凝胶中, 柠檬酸根是一种带 3 个羧基的阴离子, 柠檬酸根与质子化的氨基产生静电相互作用, 羟基与硬脂酸羧基端相互作用。交联剂将亲水性的明胶和疏水性的硬脂酸进行了有机结合, 硬脂酸有效、均匀的掺入复合凝胶中, 在应力作用下, 促进了明胶大分子链的移动, 增加了分子间网络阻力, 增加了分子间作用力, 降低了明胶的亲水性, 使得复合凝胶压缩强度增强。实验中发现, SA 添加量较少时, 对复合凝胶的力学强度有所增加但未得到充足的发挥, 当 SA 浓度达到 0.020 g/mL 时, 由于其溶解度低, 会在复合凝胶溶液发生凝结现象, 难以均匀分散形成匀相状态, 可能会破坏

了凝胶内部分子结构, 抑制力学性能的增强。因此, 硬脂酸的适宜浓度范围为 0.008~0.016 g/mL。

2.1.2 反应温度对复合凝胶压缩强度的影响

在硬脂酸浓度 0.012 g/mL, 柠檬酸浓度 0.015 g/mL 的条件下, 比较不同温度 (60、65、70、75、80 °C) 对 GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度的影响, 结果如图 3 所示。由图可知, 随着温度的增加, GA-CA-SA 复合凝胶的压缩强度均呈先增加后减小趋势。在 70 °C 时, 各复合凝胶的压缩强度均达到最大值, 分别为 97.49 kPa。分析原因: 温度的高低决定分子间作用力的强弱, 明胶的溶解温度为 60 °C 以上, 温度较低时, 明胶难以充分溶解, 硬脂酸难以均匀的分散到凝胶溶液中。温度较高时, 可能会破坏明胶中蛋白质部分二级键的存在, 对复合凝胶内部结构产生影响, 使得复合凝胶内部结构被破坏, 导致凝胶力学强度下降。因此, 制备 GA-CA-SA 复合凝胶温度的适宜变化范围为 60~80 °C。

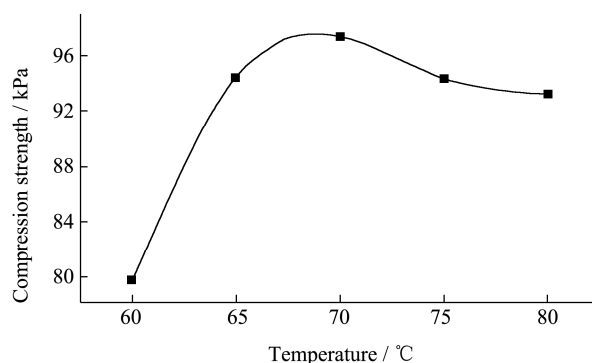


图 3 温度对 GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度的影响

Fig.3 Effect of temperatures on the compression strength of GA-CA-SA composite gel

2.1.3 CA 质量对 GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度的影响

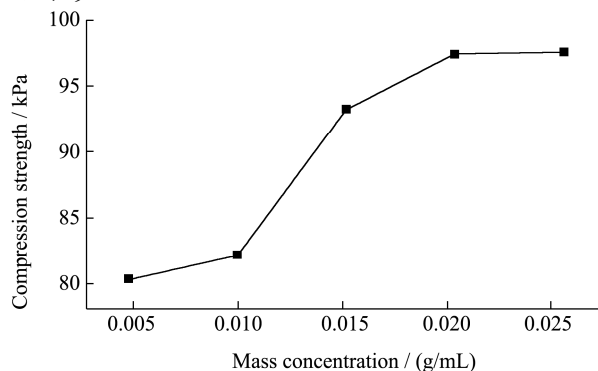


图 4 CA 质量对 GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度的影响

Fig.4 Effect of CA mass on the compression strength of GA-CA-SA composite gel

在硬脂酸浓度 0.012 g/mL, 温度 70 °C 条件下, 比较柠檬酸浓度 (0.005、0.010、0.015、0.020、0.025 g/mL)

对 GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度的影响。

不同 CA 质量对 GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度的影响如图 4 所示。可以看出，随着柠檬酸质量的增加，复合凝胶的压缩强度先增加后趋于平缓。分析原因为：增加交联剂用量增大了复合凝胶的交联密度，使凝胶内部结构更加致密，抑制明胶大分子链移动，水分子不易渗透到凝胶内部达到平衡，吸水性降低，故压缩强度逐渐增加。柠檬酸用量超过 1.49 wt%时，压缩强度变化甚微。这可能是由于凝胶体系达到了静电平衡状态，分子间作用充分，交联趋于平衡状态。

2.2 响应曲面法实验结果

表 2 实验方案与结果

Table 2 The experimental scheme and results

Factor	X ₁ /g	X ₂ /g	X ₃ /°C	Y/kPa
1	1	0	-1	79.688
2	1	0	1	83.459
3	0	1	1	75.621
4	-1	0	-1	73.950
5	0	0	0	95.560
6	0	-1	-1	74.832
7	-1	-1	0	68.056
8	0	-1	1	69.887
9	0	0	0	98.654
10	1	1	0	77.925
11	-1	1	0	70.955
12	0	1	-1	80.236
13	1	-1	0	72.550
14	-1	0	1	71.256
15	0	0	0	100.580

利用 Box-Behnken^[20] 试验设计 15 个试验，结果见

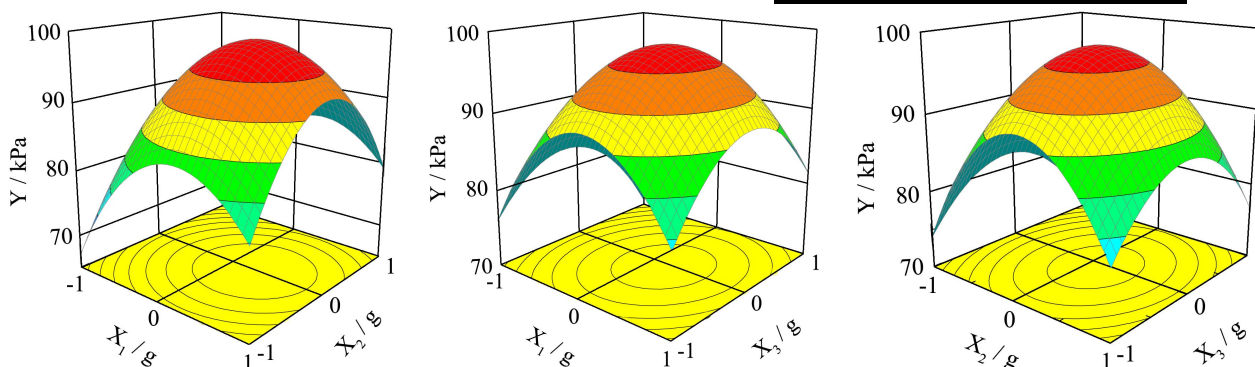


图 5 两因素交互作用对压缩强度的响应曲面图

Fig.5 Response surface plots for operating parameters on compression

表 2。其中 12 个析因点，3 个零点。

利用 Minitab 17 进行回归拟合分析，得到压缩强度的回归方程为：

$$Y=98.26+3.676X_1+2.427X_2-1.060X_3-11.97X_1^2-13.92X_2^2-9.20X_3^2+0.62X_1X_2+1.62X_1X_3+0.08X_2X_3。$$

对模型方程进行回归分析如表 3，方差分析如表 4。

由表 3 可知；各因素对复合凝胶压缩强度的影响依次为：硬脂酸质量>柠檬酸质量>温度。其中，X₁²、X₂²、X₃² 影响极显著 (p<0.01)。表 4 可知：F=25.60>F_{0.05}(9,3)=8.81, p=0.001<0.01, 表明该模型极显著，模型的决定系数 R² 为 97.88%，表明说明回归方程拟合度好，可对实验结果进行理论预测。

两因素交互作用对复合凝胶压缩强度的影响响应曲面图如图 5 所示。由图 5 可以看出每两个因素的交互作用对复合凝胶压缩强度的影响先升高后降低，响应值呈抛物线趋势，回归方程有极大值，可以预测最佳反应条件。利用 Minitab 软件优化得到最佳工艺条件如图 6 所示。

表 3 回归方程偏回归系数的检验

Table 3 Test of partial regression coefficients of regression equation

回归系数	系数取值	T 值	P 值
常数	98.26	65.95	0.000
X ₁	3.676	4.03	0.010
X ₂	2.427	2.66	0.045
X ₃	-1.060	-1.16	0.298
X ₁ ²	-11.97	-8.91	0.000
X ₂ ²	-13.92	-10.36	0.000
X ₃ ²	-9.20	-6.85	0.001
X ₁ X ₂	0.62	0.48	0.652
X ₁ X ₃	1.62	1.25	0.266
X ₂ X ₃	0.08	0.06	0.951

表 4 回归方程各项的方差分析

Table 4 Analysis of variance of regression equations

方差来源	自由度	连续平方和	调整均方差	F 值	P 值
模型	9	1534.51	170.501	25.60	0.001
一次项	3	164.18	54.727	8.22	0.022
X ₁	1	108.08	108.082	16.23	0.010
X ₂	1	47.10	47.103	7.07	0.045
X ₃	1	9.00	8.995	1.35	0.298
二次项	3	1358.32	452.773	67.98	0.000
X ₁ ²	1	529.27	529.269	79.47	0.000
X ₂ ²	1	715.12	715.124	107.38	0.000
X ₃ ²	1	312.53	312.525	46.93	0.001
交互项	3	12.01	4.003	0.60	0.642
X ₁ X ₂	1	1.53	1.533	0.23	0.652
X ₁ X ₃	1	10.45	10.449	1.57	0.266
X ₂ X ₃	1	0.03	0.027	0.00	0.951
		R ²	97.88%	R ² adj	94.05%

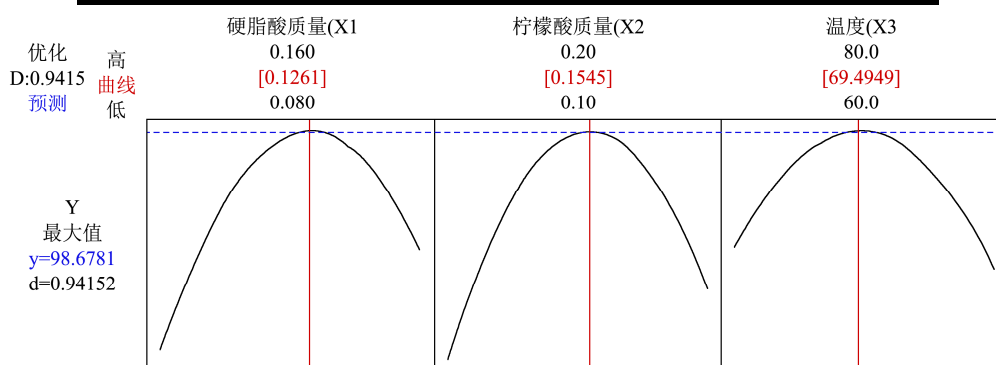


图 6 优化的最佳工艺条件

Fig.6 Optimized technological condition

由图 6 可知, GA-CA-SA 复合凝胶最佳的制备条件为: 硬脂酸浓度、柠檬酸浓度、温度分别为 0.013 g/mL、0.015 g/mL、69 °C 时, 压缩强度的预测值为 98.68 kPa。在该条件下进行 3 次平行实验进行验证, 测得的 GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度平均值为 99.05 kPa, 与理论预测值相对误差为 0.38%, 预测值可靠, 拟合的方程有效, 在此条件下测得的横向应变 ϵ_x 为 4.85 mm, 纵向应变 ϵ_y 为 13.12 mm, 对应的泊松比 $\mu = \epsilon_y / \epsilon_x = 2.71$ 。在最佳条件下所测得 GA 凝胶压缩强度为 45.55 kPa, 与之相比, GA-CA-SA 复合凝胶压缩强度提高了 117%。这与 Michael Di Guisepppe 等人^[21]制备的海藻酸-明胶水凝胶在质量分数为 10 wt% 时测定的弹性模量相比强度 43 kPa 相比, 压缩强度得到了极大的提高, 可用于软骨组织材料的应用。

2.3 复合凝胶的结构分析

2.3.1 GA-SA 微观结构分析

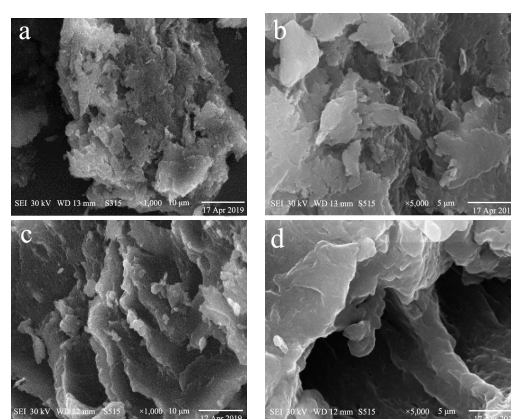


图 7 GA 凝胶与 GA-CA-SA 复合凝胶的扫描电镜图像

Fig.7 SEM images of GA gel and GA-CA-SA composite gel

注: a、b: GA 凝胶; c、d: GA-CA-SA 复合凝胶。

GA 凝胶和 GA-CA-SA 复合凝胶的扫描电镜如图 7a、b 所示。由图 7a 可知, GA 凝胶放大 1000 倍呈不规则的团簇状结构, 表面粗糙, 放大 5000 倍表面致密, 无明显孔隙。图 7b GA-SA 复合凝胶放大 1000 倍可以

看出具有规则的疏松空隙结构,放大 5000 倍空隙更加明显,这可能是由于加入交联剂柠檬酸后,硬脂酸被均匀、有效地掺入复合凝胶内部,在应力作用下,明胶大分子链被解聚,更多的水分子被引入凝胶内部,经过冷冻干燥时,固态水在低真空度下升华,该温度下明胶与硬脂酸分子为冻结状态,从而形成疏松的空隙结构。该疏松的空隙结构可为药物运输以及细胞的黏附、增殖和分化提供优良的环境。

2.3.2 红外光谱分析

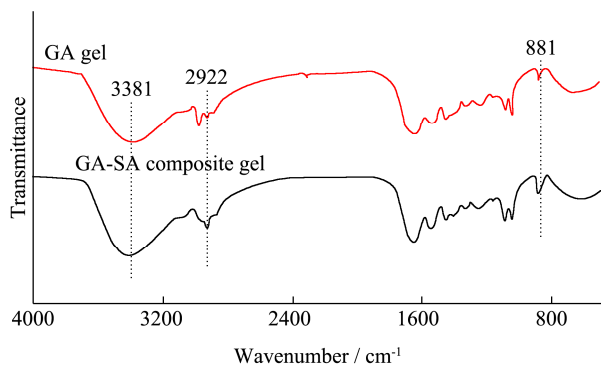


图 8 GA 凝胶和 GA-CA-SA 复合凝胶的红外光谱图

Fig.8 Infrared spectrum of GA gel and GA-CA-SA composite

GA 凝胶和 GA-CA-SA 复合凝胶的红外光谱如图 8 所示,其中,3381 cm⁻¹和 2922 cm⁻¹处分别是 O-H 键和 N-H 键伸缩振动吸收峰,GA-CA-SA 复合凝胶中这两处吸收峰比 GA 凝胶吸收峰明显增强,这可能是由于柠檬酸根与明胶中质子化的氨基产生静电作用以及活性基团之间氢键作用的结果。881 cm⁻¹处是 C-C 键伸缩振动的吸收峰,GA-CA-SA 复合凝胶同样在该处伸缩振动增强,进一步证明在柠檬酸作用下硬脂酸与明胶发生交联后,硬脂酸中长链烷烃导致的结果。

明胶的红外吸收光谱主要由一系列酰胺模型的吸

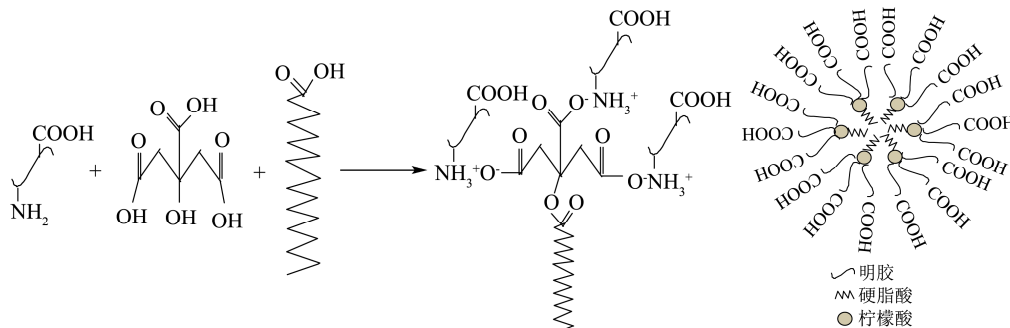


图 10 GA-CA-SA 形成机理

Fig.10 The formation mechanism of GA-CA-SA composite gel

由表 5 可以看出,形成 GA-CA-SA 复合凝胶后,二级结构发生了明显变化,其中 β 转角结构增加最多,可达 27.12%, α 螺旋增加了 3.97%。 β 折叠和无规则卷曲结构相应减少,分别为 2.02%、21.72%。

收区组成^[22]。其中在 1600~1700 cm⁻¹为 amide I,为进一步探讨形成 GA-CA-SA 复合凝胶后二级结构的变化,对 GA 凝胶和 GA-CA-SA 复合凝胶红外图谱中酰胺 I 带范围内的振动峰进行去卷积和曲线拟合处理,结果如图 9a、9b 所示。按 Byler 和 Susi 酰胺 I 带蛋白二级结构指认方法^[23](1600~1630 cm⁻¹, β 折叠; 1630~1650 cm⁻¹, 无规则卷曲; 1645~1665 cm⁻¹, α 螺旋; 1665~1685 cm⁻¹, β 转角)进行子峰峰位归属,计算各子峰面积在总面积中的百分含量得二级结构的含量如表 5。

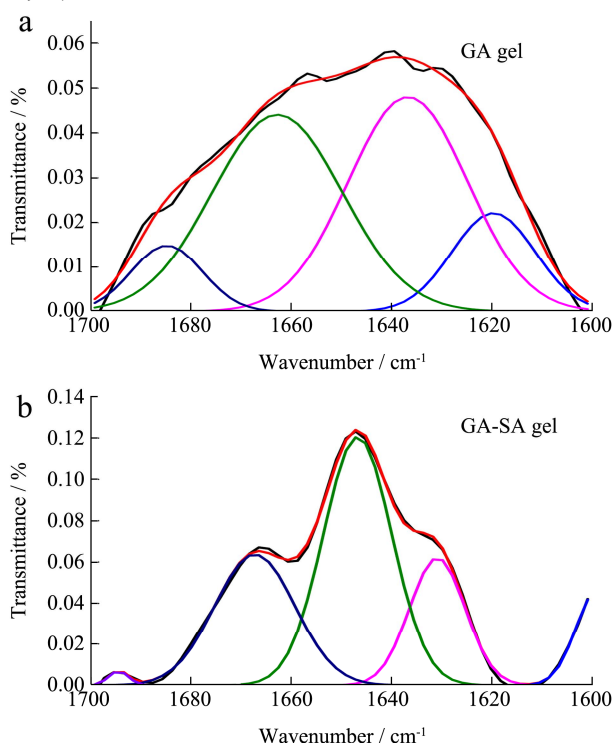


图 9 GA 凝胶和 GA-CA-SA 复合凝胶的酰胺 I 带红外拟合曲线

Fig.9 Infrared fitting curve of amide I about GA gel and GA-CA-SA composite gel

分析其原因可能是由于明胶凝胶的形成主要作用力为链内氢键和链间氢键^[24,25]。其中, Gly-Pro-、Pro- (或 HPro)、-Gly-Pro-Pro 结构被认为是凝胶形成的链接点,稳定了明胶的螺旋结构^[26]。当加入硬

脂酸和柠檬酸后, 由于反应体系中的 pH 小于明胶的等电点, 明胶中氨基质子化, 带正电荷, 柠檬酸羧基端与明胶中质子化的氨基以静电作用相互结合, 柠檬酸的羟基端与硬脂酸羧基端进行作用, 改变了明胶的二级结构及链内氢键和链间氢键, 导致 β 折叠和无规则卷曲减少, β 转角和 α 螺旋增加。这样在形成凝胶时, 由于柠檬酸的交联作用, 使得亲水性的明胶排列在外面, 疏水性的硬脂酸包裹在里边。具有较为规则的排列方式, 并形成了孔隙, 进一步印证了 SEM 的微观结构。柠檬酸交联明胶与硬脂酸可能的作用机理图 10 所示。

表 5 GA 凝胶和 GA-CA-SA 复合凝胶二级结构相对百分含量

Table 5 The relative percentage of secondary structure of GA gel and GA-CA-SA composite gel (%)

Sample	β -sheets	Unordered	α -helix	β -turns
GA gel	12.83	39.94	39.88	7.35
GA-SA gel	10.81	18.22	43.85	27.12

2.4 细胞毒性评价

按照 1.6 进行实验, 计算不同浓度 GA-CA-SA 复合凝胶的细胞相对增值率结果如图 11 所示。

由图 11 可以看出: 浓度为 1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL 的 GA-CA-SA 复合凝胶浸提液中细胞生长 24 h 后 RAR 值分别为 102.82%、106.53%、104.41% 和 116.28%, 再继续浸泡 48 h 后测得的 RGR 为 122.01%、129.22%、127.73% 和 132.29%, 两个时间段内测得的 RAW 细胞的 RAR 值均大于 100%, 细胞毒性为 0 级, 随着时间的延长, RGR 增加。因此, GA-CA-SA 复合凝胶无毒, 具有良好的生物相容性, 可应用于药物缓释和组织工程。

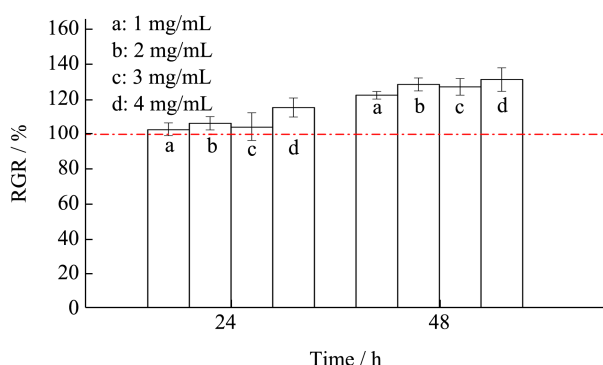


图 11 不同浓度 GA-CA-SA 复合凝胶中细胞相对增值率

Fig.11 The relative growth rate of cells at different concentrations of GA-CA-SA composite gel

2.5 GA-SA 复合凝胶的姜黄素缓释分析

按照 1.7 进行实验, GA-Cur 凝胶和 GA-CA-SA-Cur

复合凝胶缓释姜黄素的时间-累积释放率曲线如图 12 所示。图 12 可以看出, GA-Cur 凝胶和 GA-CA-SA-Cur 凝胶中的姜黄素均在初始阶段发生突释, 随后平缓释放。但在 48 h 之内, GA-CA-SA-Cur 凝胶的姜黄素释放率明显低于 GA-Cur 凝胶, 48 h 后都逐渐趋于平缓, 120 h 后 GA-Cur 凝胶和 GA-CA-SA-Cur 凝胶累计释药率分别达到 92.32% 和 98.60%, 说明与 GA-Cur 凝胶相比, GA-CA-SA-Cur 凝胶累计释药率略有所提高。对比姜黄素在两种凝胶中的释放行为, 姜黄素在 GA-CA-SA-Cur 复合凝胶中初始释放速率较慢, 最终释药率高。可能在柠檬酸交联后, 复合凝胶中的明胶发生静电作用的亲水基团减少, 使复合凝胶的溶胀度下降, 从而释放姜黄素速率减缓, 随着时间的增加累积释药率达到最大而趋于平缓, 这是因为随着时间的增加, 扩散使缓冲液浓度增加从而抑制了姜黄素的释放作用; 同时复合凝胶结构更加致密, 使得姜黄素释放速率减慢, 起到缓释作用。

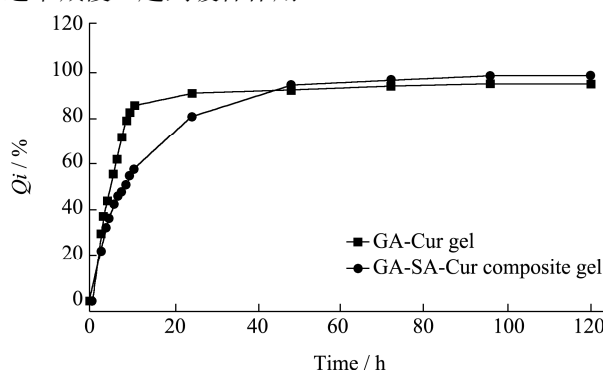


图 12 GA-Cur 凝胶和 GA-CA-SA-Cur 复合凝胶缓释姜黄素的累积释放曲线

Fig.12 Cumulative release curve of curcumin in GA-Cur gel and GA-CA-SA-Cur gel

3 结论

以明胶为原料, 柠檬酸为交联剂, 利用疏水性物质硬脂酸对其进行改性, 制备了 GA-CA-SA 复合凝胶。通过响应曲面法优化其最佳制备条件为: 硬脂酸浓度为 0.013 g/mL, 柠檬酸浓度为 0.015 g/mL, 温度为 69 °C。此时压缩强度较明胶凝胶提高了 117%。红外光谱分析表明, 由于柠檬酸的交联作用, 改变了明胶的二级结构, β 折叠和无规则卷曲减少, α 螺旋和 β 转角结构增多。在形成 GA-CA-SA 复合凝胶时, 亲水性的明胶排列在外面, 疏水性的硬脂酸包裹在里边, 并形成了具有孔隙的结构规则均匀的结构。另外细胞毒性及姜黄素缓释分析表明制备的 GA-CA-SA 复合凝胶内部呈疏松空隙结构, 无细胞毒性, 对姜黄素具有较好的缓释释放的效果, 可以用作生物医药载体。

参考文献

- [1] Gomez-Guillen M C, Turnay J, Fernandez-Diaz M D, et al. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16(1): 25-34
- [2] Babaei J, Mohammadian M, Madadlou A, et al. Gelatin as texture modifier and porogen in egg white hydrogel [J]. Food Chem, 2019, 270(1): 189-195
- [3] Yi Liu, Sai Cheong N G, Jiasheng Yu, et al. Modification and crosslinking of gelatin-based biomaterials as tissue adhesives [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 174(1): 316-323
- [4] Suo H, Zhang D, Yin J, et al. Interpenetrating polymer network hydrogels composed of chitosan and photocross linkable gelatin with enhanced mechanical properties for tissue engineering [J]. Materials Science and Engineering, 2018, 92(1): 612-620
- [5] Davidenko N, Schuster C F, Bax D V, et al. Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics [J]. Acta Biomaterialia, 2015, 25(1): 131-142
- [6] Hospodiuk M, Dey M, Sosnoski D, et al. The bioink: a comprehensive review on bioprintable materials [J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(2): 217-239
- [7] Thakur S, Govender P P, Mamo M A, et al. Recent progress in gelatin hydrogel nanocomposites for water purification and beyond [J]. Vacuum, 2017, 146: 396-408
- [8] 周扬, 马良, 戴宏杰, 等. 基于凝胶特性改善的多糖-明胶互作及调控研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(11): 277-284
ZHOU Yang, MA Liang, DAI Hong-jie, et al. Recent progress in polysaccharide-gelatin interaction and its regulation for improved gel properties [J]. Food Science, 2020, 41(11): 277-284
- [9] Guisepppe M D, Law N, Webb B, et al. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting [J]. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2018, 79: 150-157
- [10] Moreira T F M, Oliveira A de, Silv T B V da, et al. Hydrogels based on gelatin: effect of lactic and acetic acids on microstructural modifications, water absorption mechanisms and antibacterial activity [J]. LWT, 2019, 103: 69-77
- [11] Tseng H J, Tsou T L, Wang H J, et al. Characterization of chitosan-gelatin scaffolds for dermal tissue engineering [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2013, 7(1): 20-31
- [12] Chen Q F, Shi Y H, Chen G X, et al. Enhanced mechanical and hydrophobic properties of composite cassava starch films with stearic acid modified MCC (microcrystalline cellulose)/NCC (nanocellulose) as strength agent [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 142: 846-854
- [13] Sobhana S S L, Zhang X, Kesavan L, et al. Layered double hydroxide interfaced stearic acid - cellulose fibres: a new class of super-hydrophobic hybrid materials [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2017, 522: 416-424
- [14] Khalifeh S, Burleigh T D. Super-hydrophobic stearic acid layer formed on anodized high purified magnesium for improving corrosion resistance of bioabsorbable implants [J]. Journal of Magnesium and Alloys, 2018, 6(4): 327-336
- [15] Chen X, Li P, Kang Y, et al. Preparation of temperature-sensitive xanthan/NIPA hydrogel using citric acid as crosslinking agent for bisphenol A adsorption [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 206(15): 94-101
- [16] Ghorpade V S, Yadav A V, Dias R J. Citric acid crosslinked cyclodextrin/ hydroxypropylmethylcellulose hydrogel films for hydrophobic drug delivery [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 75-86
- [17] Ahmad, Zuber, S An, et al. Effectiveness of triacetin and triethyl citrate as plasticizer in polyvinyl alcohol [J]. Materialstoday: Proceedings, 2019, 17(3): 560-567
- [18] GB/T 16886.5-2016 医疗器械生物学评价 第5部分 体外细胞毒性试验[S]
GB/T 16886.5-2016 Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5, *In vitro* Cytotoxicity Test [S]
- [19] 高凤苑, 关欣, 韩良亮. 木薯淀粉水凝胶负载姜黄素及缓释性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(11): 204-210
GAO Feng-yuan, GUAN Xin, HAN Liang-liang. Study on curcumin loading and sustained-release properties of cassava starch hydrogel [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(11): 204-210
- [20] 肖枫, 朱文学. 响应面法优化超声辅助热水提取黄河鲤鱼鱼鳞明胶工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(22): 101-105
XIAO Feng, ZHU Wen-xue. Optimization of ultrasonic-assisted hot water extraction of gelatin from yellow river *Cyprinus carpio* haematopterus scale [J]. Food Science, 2013, 34(22): 101-105
- [21] Thi P L, Lee Y, Nguyen D H, et al. In situ forming gelatin hydrogels by dual-enzymatic cross-linking for enhanced tissue adhesiveness [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2017, 5: 757-764