

EDTAD-PEG-dial-明胶复合改性凝胶的制备与性能研究*

柯晴瑾¹, 王飞镝¹, 奚红霞², 严霞波¹, 王凌伟¹, 赵科明¹

(1 广东工业大学轻工化工学院, 广州 510006; 2 华南理工大学化工学院, 广州 510640)

摘要 采用乙二胺四乙酸二酐(EDTAD)和醛基封端聚乙二醇(PEG-dial)对明胶蛋白进行酰化及还原胺化改性, 然后与戊二醛(GTA)交联制备了复合改性明胶蛋白凝胶。研究了 EDTAD、PEG-dial、交联剂等的用量对凝胶性能的影响, 结果表明, 随 EDTAD 用量的增多及 GTA 用量的减少凝胶的平衡溶胀率增大, PEG-dial 的引入提高了破裂强度, 所得凝胶的溶胀率为 160g/g, 破裂强度为 16g。采用 IR 和 SEM 对其进行结构表征, 结果表明, 改性后明胶蛋白上引入了羧基和长碳链, 复合改性后凝胶的微观结构更有序。

关键词 明胶凝胶 酰化 还原胺化 溶胀率 破裂强度

Research on Preparation and Properties of EDTAD-PEG-dial-gelatin Compound Modified Gel

KE Qingjin¹, WANG Feidi¹, XI Hongxia², YAN Xiabo¹, WANG Lingwei¹, ZHAO Keming¹

(1 Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006;

2 School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract A EDTAD-PEG-dial-gelatin compound modified gel is prepared firstly by acylating gelatin protein with ethylenediaminetetraacetic dianhydride(EDTAD), followed by reducing amination with PEG-dial, and then by cross-linking with glutaraldehyde. The effects of the amount of EDTAD, PEG-dial and glutaraldehyde(GTA) on the properties of gelatin gel are discussed. The results show that the swelling ratio of gels increases with increasing amount of EDTAD or decreasing amount of GTA. The rupture strength of gels is improved by introducing PEG-dial into gelatin molecules. The swelling ratio and rupture strength of gels are 160g/g and 16g respectively. The acylated gelatin protein is characterized by IR and the gel is characterized by SEM, it is found that more hydrophilic carboxyl group and long carbon chain of PEG are introduced into gelatin molecules, and a more ordered structure is obtained by compound modifying.

Key words gelatin gel, acylation, reductive amination, swelling ratio, rupture strength

0 前言

蛋白质凝胶是由蛋白质分子、溶剂(如水)及交联剂组成的具有三维网络结构的天然基质。蛋白质凝胶因丰富的内部结构(如凝胶的网络化结构与其分子链上的基团)而表现出重要的功能性, 它不溶于水但在水中溶胀, 具有吸水性、保水性, 作为天然凝胶广泛应用于食品工业。同时蛋白质凝胶与天然组织性质相似且能够生物降解, 近年来被应用于吸水保水产品(如纸尿裤、土壤吸水剂、保水剂)、组织工程和药物释放等^[1-5]非食品工业领域。明胶是动物胶原在高温作用下的变性产物, 具有良好的生物相容性和可降解性, 是由各种氨基酸通过羧基与氨基的相互连接而形成的一种多肽链, 有许多侧链基团, 明胶的许多性质正是源于侧链的这些功能性基团^[6]。本实验采用 EDTAD 和 PEG-dial 对明胶蛋白进行基团改性, 加入交联剂戊二醛得到复合改性明胶凝胶, 探讨

了其溶胀率及质构特性, 并用红外光谱和扫描电镜对其进行表征, 在提高吸水性的同时又改善了力学性能, 有望作为优良的生物材料而得到利用。

1 实验

1.1 原料

明胶(Gelatin), 分析纯; 乙二胺四乙酸二酐(EDTAD), 分析纯; 醛基封端聚乙二醇(PEG-dial), 根据文献^[7]自制; 戊二醛(GTA)25%(质量分数)水溶液, 生化试剂; 透析袋, 截留分子量 14000; 其它试剂均为分析纯。

1.2 复合改性明胶蛋白凝胶的制备

图 1 为 EDTAD-PEG-dial-明胶复合凝胶的完整制备工艺流程。

1.3 平衡溶胀率的测定

称取一定质量(W_d)的干凝胶, 置于自制的尼龙底胶杯中

* 广东省绿色化学产品技术重点实验室开放基金(GC200702); 广东工业大学博士启动基金课题(063027)

柯晴瑾: 女, 1984 年生, 硕士研究生, 主要从事功能高分子材料研究 E-mail: kejingwa@163.com 王飞镝: 女, 1968 年生, 博士, 副教授, 主要从事功能高分子材料研究 E-mail: hgxbwang@163.com

用去离子水浸泡。每隔一段时间取出胶杯悬挂,以去除凝胶表面的水分,称量记录,直至恒重,记为 W_s 。根据 $SR = (W_s - W_d) / W_d$ 计算凝胶的平衡溶胀率,可用 SR 来表示凝胶的吸水能力。

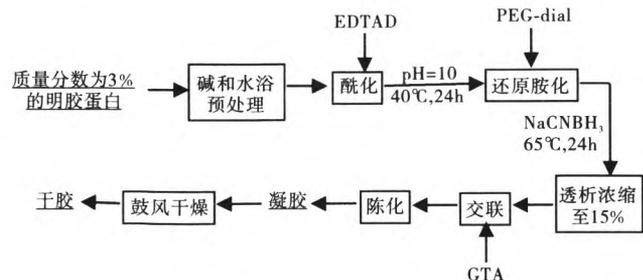


图1 EDTAD-PEG-dial-明胶复合凝胶的制备工艺流程
Fig. 1 Flow chart of preparation of EDTAD-PEG-dial-Gelatin compound gel

1.4 凝胶质构特性的测定

采用美国 Lfra texture analyzer 测定凝胶质构特性,探针刺破凝胶过程中所受的最大力值记为破裂强度 $RS(g)$, 设定参数如下:循环模式,负载 5g,距离 5.0mm,速度 2mm/s,循环 2 次。

1.5 扫描电镜和红外分析

取相同横截面积的干凝胶样品进行喷金处理,采用 S-3400N 型扫描电子显微镜在 5.0kV 加速电压下观察改性凝胶的断面形貌。将明胶试样研成粉,采用 KBr 压片法制成样品,用 Nicolet380 傅里叶变换红外光谱仪进行测试。

2 结果与讨论

2.1 改性机理

EDTAD 能与肽链上赖氨酸中的游离-NH₂ 发生反应,从而将-COO⁻ 引入蛋白分子链。被引入的-COO⁻ 产生分子内静电排斥作用,破坏蛋白分子规整的折叠结构,且-COO⁻ 是亲水极性基团,经 EDTAD 改性可增强蛋白质与水分子的亲和力,提高其亲水性。PEG-dial 是由 PEG 的羟基被氧化为醛基而衍生来的,也可与明胶肽链上的氨基发生还原胺化反应,形成新的 C-N 单键,并将其长碳链连接到氨基上。PEG-dial 为亲水长链分子,接入后既可提高明胶蛋白的亲水性又能保护蛋白质在体内不易被酶分解,将经其改性后的明胶交联,便可制得具有良好吸水性和质构特性的水凝胶。EDTAD 和 PEG-dial 改性明胶蛋白的反应方程如图 2 所示。

2.2 改性明胶的红外光谱

图 3(a)和图 3(b)分别为明胶、EDTAD-PEG-dial-明胶的红外光谱图。改性前后明胶蛋白分子结构有所不同。从图 3(a)可以看出,在 3435.5cm⁻¹ 处出现了强宽峰,这是明胶蛋白对应的 N-H 或 O-H 振动,2921.2cm⁻¹ 处为-CH₂-的伸缩振动,1631.1cm⁻¹ 处为蛋白质-CONH-中 C=O 的酰胺吸收带 I。由图 3(b)可知,3435.5cm⁻¹ 处的吸收峰变宽且红移至 3307.8cm⁻¹, 其原因是还原胺化改性引入了 PEG 的 (CH₂-CH₂-O)_n 长链,使蛋白质分子间缔合作用增强;2887.3cm⁻¹

处的吸收峰明显增强源于引入了较多的-CH₂-,1113.7cm⁻¹ 处的吸收峰是由分子链中 C-O 伸缩振动引起的,同时1535.4cm⁻¹、1467.0cm⁻¹ 处出现了-COO⁻ 的伸缩振动特征峰,说明酰化反应使蛋白质分子中引入了羧基。

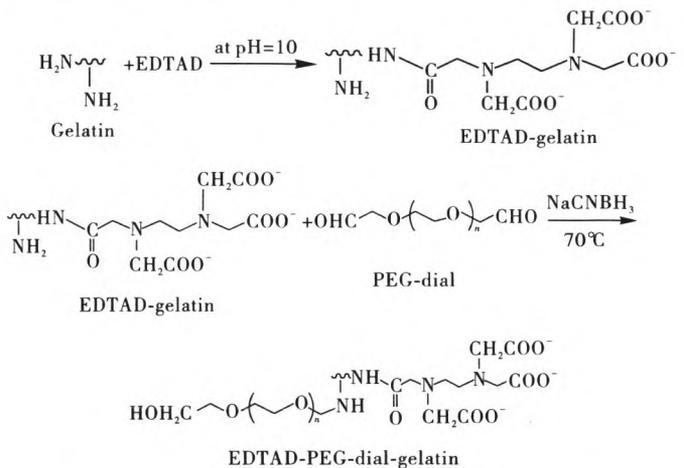


图2 EDTAD 和 PEG-dial 改性明胶蛋白的反应方程
Fig. 2 Reaction equation of gelatin modified with EDTAD and PEG-dial

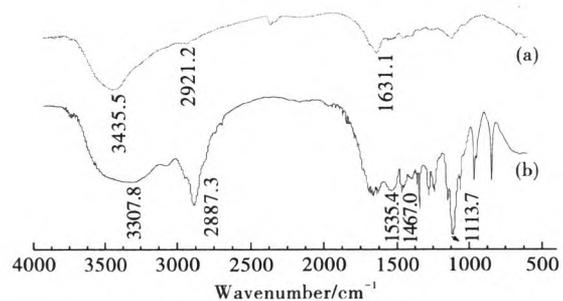


图3 EDTAD-PEG-dial-明胶复合凝胶的红外光谱图
Fig. 3 IR spectrum of EDTAD-PEG-dial-gelatin compound gel

2.3 酰化改性对明胶凝胶性能的影响

图 4 为固定 $m(\text{PEG-dial}) : m(\text{Gelatin}) = 1.6 : 3$ 、 $m(\text{GTA}) : m(\text{Gelatin}) = 1 : 100$ 、加入不同量的 EDTAD 酰化剂所得改性凝胶的 SR 曲线和 RS 曲线。由图 4 可知,未改性明胶凝胶的 SR 仅为 19g/g,随 EDTAD 用量的增多,凝胶的 SR 明显提高。因为酰化后蛋白质分子中引入了亲水极性基团羧基,增大了网络离子电荷,随之产生了高于周围环境的渗透压,提高了凝胶的溶胀率^[8]。当 $m(\text{EDTAD}) : m(\text{Gelatin}) = 0.15 : 3$ 时 SR 最大,为 160g/g,而当 $m(\text{EDTAD}) : m(\text{Gelatin}) = 0.2 : 3$ 时 SR 反而下降,这是由 EDTAD 与 Gelatin 侧链氨基反应的方式引起的。反应可按 2 种方式进行,一种是蛋白质分子侧链上的 1 个赖氨酸 $\epsilon\text{-NH}_2$ 中只引入 1 个羧基,另一种则可引入 3 个羧基^[9]。当 EDTAD 用量过多时,即使明胶的改性程度增大也有可能 1 个 EDTAD 分子同时与 2 个蛋白质分子的肽链或同个分子的 2 条肽链上的赖氨酸基团反应,使分子发生内部交联,降低凝胶的 SR 。

质构仪所测数据显示,EDTAD 酰化改性后明胶凝胶的 RS 略有增大趋势,从未改性的 14g 逐渐增至 16.5g。蛋白质凝胶网络结构的稳定与分子中的疏水作用、静电作用、氢键和二硫键等有关,酰化反应使蛋白分子链上引入了 $-\text{COO}^-$,改变了网络中的相互作用力,特别是静电作用,调整了分子链结构,增强了分子间的网络,从而使 RS 增大。当 $m(\text{EDTAD}) : m(\text{Gelatin}) = 0.2 : 3$ 时凝胶的 SR 虽下降,但 RS 仍有微增,这也证明 EDTAD 用量过多可使明胶分子发生内部交联,网络密度增大,从而提高 RS。

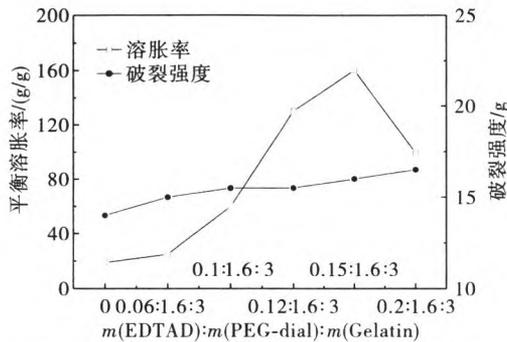


图 4 不同 EDTAD 用量与改性明胶凝胶的溶胀率和破裂强度的关系曲线

Fig. 4 Swelling ratios and rupture strength for EDTAD-modified gelatin gels

图 5 为未经酰化改性与酰化比不同的改性明胶凝胶断面的 SEM 照片($m(\text{GTA}) : m(\text{Gelatin}) = 1 : 100$),其中图 5(a)、图 5(b)、图 5(c)分别为 $m(\text{EDTAD}) : m(\text{PEG-dial}) : m(\text{Gelatin}) = 0, 0.15 : 1.6 : 3, 0.2 : 1.6 : 3$ 。由图 5 可知,未改性的明胶凝胶表面形貌比较平整(表面白色部分可能为戊二醛的自聚),而酰化改性后出现了“波浪形”的纹路,可能是 EDTAD 的引入调整了蛋白分子链间的作用力,改变了其规整性,且图 5(c)比图 5(b)纹路更清晰,可认为 EDTAD 用量的增大使凝胶内部结构更紧密,与其 SR 由 160g/g 下降为 99g/g 但 RS 却增大了 0.5g 的情况相符。

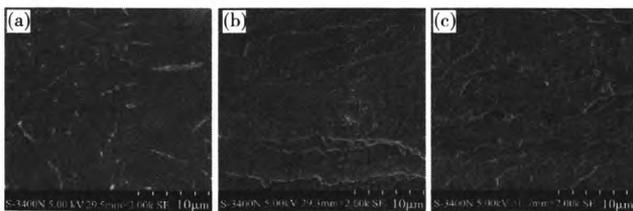


图 5 改性和未改性明胶蛋白凝胶断面的 SEM 照片

Fig. 5 Scanning electron photomicrographs of unmodified and modified with EDTAD gelatin gels

2.4 还原胺化反应对明胶凝胶性能的影响

图 6 为固定 $m(\text{EDTAD}) : m(\text{Gelatin}) = 0.15 : 3$ 、 $m(\text{GTA}) : m(\text{Gelatin}) = 1 : 100$ 、改变 PEG-dial 用量得到的改性凝胶的 SR 曲线和 RS 曲线。与图 4 相比,PEG-dial 和 EDTAD 用量的变化对凝胶的 SR 影响呈相反的趋势,当 PEG-dial 用量增大时 SR 下降,还原胺化改性后凝胶的 SR

最大值为 180g/g,最小值为 95g/g。加入 PEG-dial 改性,亲水性的 PEG-dial 帮助凝胶增强亲水性,但因其为长分子链,用量太多可能使凝胶网络空间变小,从而影响水分子的进入,使凝胶的吸水率有所降低。

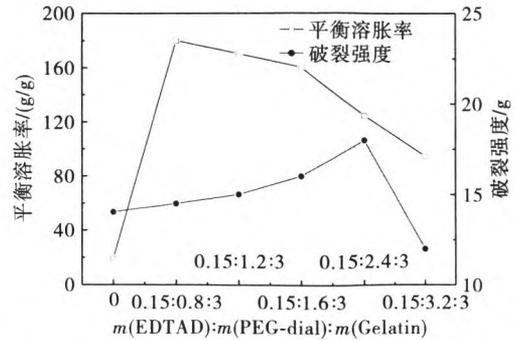


图 6 不同 PEG-dial 用量与改性明胶凝胶溶胀率和破裂强度的关系曲线

Fig. 6 Swelling ratios and rupture strength for PEG-modified gelatin gels

相比之下,改性凝胶的 RS 则有较大的变化,当 PEG-dial 用量增大时,RS 也增大,当 $m(\text{PEG-dial}) : m(\text{Gelatin}) = 2.4 : 3$ 时其 RS 高达 18g。这可能是因为 PEG-dial 为长链分子,能与蛋白质分子链产生一定的排斥力迫使分子链分离,从而阻止蛋白质分子内或分子间发生聚集,以达到稳定的效果,使凝胶强度增强。而后 RS 又突降为 12g 且小于未改性凝胶的 RS。这是因为加入过多 PEG-dial,改性程度过大,剩余可参与交联反应的氨基数目太少,交联密度不够导致凝胶质地松软弹性不足。由此,可见明胶中添加合适比例的 PEG-dial 可以改善明胶凝胶的质构特性。图 7 为不同 $m(\text{PEG-dial}) : m(\text{Gelatin})$ 凝胶断面的 SEM 照片($m(\text{GTA}) : m(\text{Gelatin}) = 1 : 100$),其中图 7(a)、图 7(b)、图 7(c)分别为 $m(\text{EDTAD}) : m(\text{PEG-dial}) : m(\text{Gelatin}) = 0.15 : 0.8 : 3, 0.15 : 1.6 : 3, 0.15 : 2.4 : 3$ 的明胶凝胶,RS 逐渐显示为其表面形貌纹理随 PEG-dial 用量的增大而变得密集褶皱更多,凝胶内部网络过于紧密而使溶胀率下降。



图 7 不同 PEG-dial 用量改性明胶蛋白凝胶断面的 SEM 照片
Fig. 7 Scanning electron photomicrographs of modified with PEG-dial gelatin gels

2.5 交联剂对明胶凝胶性能的影响

凝胶的力学强度几乎完全归因于凝胶的交联^[10]。增加交联剂用量可提高凝胶网络的交联密度,影响内部分子的有序排列,稳定网络结构,从而提高破裂强度。图 8 为不同交联剂用量与改性明胶凝胶的溶胀率和破裂强度的关系曲线。

凝胶的RS随交联比的增大而增大;相反,随交联剂用量的增加,凝胶内部引入了大量的化学交联键,产生了更多的交联点,限制了多肽链及PEG-dial柔性链的运动,在结构上使网络空间变小,阻碍溶胀过程中水分子进入凝胶内部,导致其吸水能力变差,改性凝胶的SR降低。

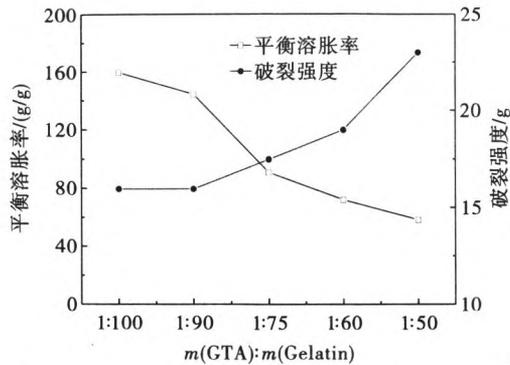


图8 不同交联剂用量与改性明胶凝胶溶胀率和破裂强度的关系曲线

Fig. 8 Swelling ratios and rupture strength for gelatin gels crosslinked GTA

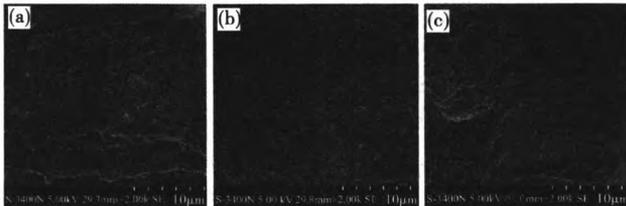


图9 不同交联比改性明胶蛋白凝胶断面的SEM图片
Fig. 9 Scanning electron photomicrographs of modified gelatin gels crosslinked GTA

图9为不同交联比改性明胶蛋白凝胶断面的SEM图片($m(\text{EDTAD}) : m(\text{PEG-dial}) : m(\text{Gelatin}) = 0.15 : 1.6 : 3$),其中,图9(a)–(c)分别为 $m(\text{GTA}) : m(\text{Gelatin}) = 1 : 100, 1 : 75, 1 : 50$ 的改性明胶蛋白凝胶。由图9可知,凝胶形貌因交联剂含量不同产生了明显变化,随GTA用量的增加,凝胶表面由较平滑带微皱变为出现小的凹洞且纹路变细,再到表面出现裂缝和突起且纹理更加细腻,证明随交联剂用量的增加,交联密度增大,网络分子排列愈加有序,使凝胶强度提高。

3 结论

以明胶蛋白为原料,EDTAD和PEG-dial为改性剂,GTA为交联剂制成复合改性明胶凝胶。结果表明,EDTAD用量的增多及交联剂GTA用量的减少使凝胶的平衡溶胀率增大,而PEG-dial的引入则提高了破裂强度。综合平衡溶胀

率及破裂强度2种性能,当 $m(\text{EDTAD}) : m(\text{PEG-dial}) : m(\text{Gelatin}) = 0.15 : 1.6 : 3, m(\text{GTA}) : m(\text{Gelatin}) = 1 : 100$ 时,制得的凝胶性能较好,溶胀率为160g/g,破裂强度为16g。红外光谱显示酰化改性使明胶蛋白分子引入了更多的羧基,还原胺化改性将PEG-dial的长碳链接入到蛋白质分子中。凝胶断面结构的扫描电镜结果显示,改性后的明胶凝胶分子排列有序,微观纹路更加清晰,凝胶的微观结构与其性能有关。

参考文献

- 1 Yu H Q, Xiao C B. Synthesis and properties of novel hydrogels from oxidized konjac glucomannan crosslinked gelatin for in vitro drug delivery[J]. Carbohydr Polym, 2008, 72: 479
- 2 Weng L, Ivanova N D, Zakhaleva J, et al. In vitro and in vivo suppression of cellular activity by guanidinoethyl disulfide released from hydrogel microspheres composed of partially oxidized hyaluronan and gelatin[J]. Biomaterials, 2008, 29: 4149
- 3 Hirano Y, Mooney D J. Peptide and protein presenting materials for tissue engineering[J]. Adv Mater, 2004, 16(1): 17
- 4 Rowe S L, Lee S Y, Stegemann J P. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels[J]. Acta Biomater, 2007, 3(1): 59
- 5 Gan C Y, Cheng L H, Easa A M. Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil[J]. Innov Food Sci Emerging Technol, 2008, 9(4): 563
- 6 Teng Shuhua(滕淑华), Chen Lijuan(陈丽娟). Modification of group in gelatin and its effect on gelatin properties(明胶的基团改性及其对明胶性能的影响)[J]. Sci Techn Gelatin(明胶科学与技术), 2003, 23(1): 1
- 7 Harris J M, Struck E C, Case M G, et al. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) derivatives[J]. J Polym Sci: Polym Chem Ed, 1984, 22: 341
- 8 顾雪蓉, 朱育平. 凝胶化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 41
- 9 Hwang D C, Damodoran S. Chemical modification strategies for synthesis of protein-based hydrogel[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 751
- 10 Bigi A, Cozzani G, Panzavolta S, et al. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking[J]. Biomaterials, 2001, 22: 763

(责任编辑 向东)