·综　述·

明胶化学交联评价方法的研究进展

付慧敏，尹丽，周旖璇，于琛琛，康廷国，程岚*，张纯刚*(辽宁中医药大学药学院，辽宁 大连 116620)

摘要：化学交联是提高明胶性能的重要手段，交联的程度决定了明胶的性能，为了更好地评价明胶的化学交联，本文从目前国内的研究现状出发，对明胶的化学交联进行了分类，并结合现代仪器分析技术，整理出评价明胶化学交联程度的一系列方法。通过研究发现，交联后明胶的物理性能、化学结构和生物学性能发生了明显的变化，这些差异同样反映着明胶的交联程度。

关键词：明胶；化学交联；分类；评价方法

中图分类号：R942　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2021)24-3192-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.24.024

引用本文：付慧敏, 尹丽, 周旖璇, 等. 明胶化学交联评价方法的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(24): 3192-3200.

Research Progress of Gelatine Chemical Cross-linking Evaluation Methods

FU Huimin, YIN Li, ZHOU Yixuan, YU Chenchen, KANG Tingguo, CHENG Lan*, ZHANG Chungang*
(*College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116620, China*)

ABSTRACT: Chemical cross-linking is an important means to improve gelatin properties. The degree of cross-linking determines gelatin properties. In order to better evaluate the chemical cross-linking of gelatin, this paper classifies the chemical cross-linking of gelatin based on the current domestic research situation, and combines with modern instrumental analysis technology to sort out a series of methods to evaluate the degree of chemical cross-linking of gelatin. Through the research, it is found that the physical properties, chemical structure and biological properties of gelatin after cross-linking have changed obviously, and these differences also reflect the degree of cross-linking of gelatin.

KEYWORDS: gelatin; chemical cross-linking; classification; evaluation methods

明胶是由动物皮肤、骨、肌膜等结缔组织中胶原部分降解而成的含有 18 种氨基酸的无脂肪高蛋白，因其成本低廉，可再生、可降解，现已从单一的食用型扩展到生物化工、医学卫生、照相工业等众多领域[1]，但是由于明胶本身韧性较差、亲水性强，体温下水浴可膨胀溶解，在生产中受到了一定的局限。现有技术中常通过对明胶进行交联处理来改善其各方面性能。化学交联就是常见的明胶改性方法之一，它通过特定交联试剂使明胶形成交联结构或催化明胶上的基团进行反应，形成自交联的结构[2]，改善明胶的力学性能、亲水性及耐热性等，使其在生物膜材料[3-4]、医用纤维[5-6]、组织修复与替代[7]、木材黏合[8]等方面得到了更广泛的应用。本文对明胶的化学交联方法、交联程度评价方法作一综述，为其更深入的研究提供参考。

1　化学交联反应的分类

1.1　有长度化学交联

交联剂与明胶的活性官能团通过化学键相连并以该形式稳定地存在于明胶的结构中，这类交联反应被称为有长度化学交联，所用交联剂称为有长度交联剂。常见的有长度交联剂包括醛类(如甲醛、戊二醛)、环氧化合物(如环氧乙烷、缩水甘油醚)、植物多酚(如单宁酸、阿魏酸)等。

醛类交联剂与明胶发生希夫碱反应，生成 C=N 基团[9]，改善了明胶膜的力学性能和热稳定性。且希夫碱具有较强的紫外吸收度，还可以提高明胶的紫外防护，其反应机制见图 1。醛类交联

基金项目：国家重点研发计划项目(2018YFC1706903)；国家自然科学基金项目(81503257)；辽宁省博士启动基金(201501098)；辽宁省自然科学基金指导计划项目(2019-ZD-0968)；中医脏象理论及应用国家教育部重点实验室一般项目(zyzx1809)

作者简介：付慧敏，女，硕士生　Tel: (0411)85890145　E-mail: 1198688083@qq.com　***通信作者：**张纯刚，男，博士，副教授　Tel: (0411)885890145　E-mail: gaogaoii123@163.com　程岚，女 博士，教授　Tel: (0411)85890145　E-mail: sychenglan@163.com

剂不仅交联效率高，而且价格低廉，但是由于其具有一定的毒性，会产生组织的硬化、钙化现象，安全性不能得到保证，不可以应用在食品、药品等领域中。

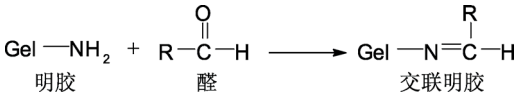


图 1 醛类交联明胶原理(希夫碱反应)
Fig. 1 Principle of aldehyde crosslinked gelatin(Schiff base reaction)

环氧化合物通过发生开环反应，与明胶中的氨基、羧基等发生单点或多点结合[10]，形成交联明胶。环氧化合物开环反应是一种特殊的亲核取代反应，在酸、碱性 2 种条件下，环氧化合物两端开环形成 2 种不同的产物[11]，综合分析发现，碱性条件下交联明胶的稳定性最优[12]，交联反应机制见图 2。虽然大多数的环氧化合物同样具有毒性，但还有少部分在可以医用的合格范围内，如丙三醇二缩水甘油醚、聚乙二醇二缩水甘油醚等[13]。

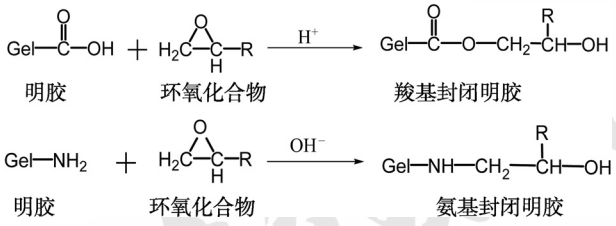


图 2 环氧化合物交联明胶(R 可以含有苯环、羧基、烷基等)
Fig. 2 Principle of epoxy compound crosslinked gelatin(R can contain benzene ring, carboxyl group, alkyl group, etc)

植物多酚可通过疏水键和氢键与明胶发生多点交联，形成络合物，在明胶分子之间构成网状结构[14]。植物多酚广泛存在于植物的叶、壳、果肉以及种皮中，安全无毒，是天然的蛋白质交联剂，制备的交联明胶具有优异的物理性能和生物活性，如抗氧化活性或抗菌活性等，但是由于价格相对较高，不能广泛使用，研究人员正在尝试寻找一种安全有效且价廉易得的交联剂。

1.2 零长度化学交联

交联剂激活一个明胶分子后，被激活的明胶分子与另一个明胶分子通过化学键直接结合，中间没有连接剂或间隔物，这类交联反应被称为零长度化学交联，所用交联剂称为零长度交联剂。常见的零长度交联剂有 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide ，EDC]、1-环己基-3-(2-巯基)碳二亚胺、二环己基碳二亚胺、二异丙基卡二亚胺、伍德沃德氏试剂 K、*N*,*N*-羰基二咪唑等[15]。其中 EDC 是常用且极具价值的零长度交联剂[16]，它与明胶分子的羧基反应生成活性中间体 *O*-酰基脲，活性中间体再与另一明胶分子的氨基发生亲核反应，形成酰胺键[17]，见图 3①。

然而 EDC 活化的 *O*-酰基脲很容易被破坏水解，交联效果较差，常常通过在反应过程中加入 *N*-羟基琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide，NHS)[18]生成稳定的 NHS/羧基中间酯，来提高酰胺键的生成率，交联机制见图 3②。EDC 和交联反应过程中产生的异脲都是水溶性的，可以通过透析去除，达到少毒或无毒的目的。与醛类交联剂相比，EDC/NHS 交联明胶具有良好的结构稳定性和细胞相容性[19]，故此类交联剂逐渐受到各国研究者广泛关注。

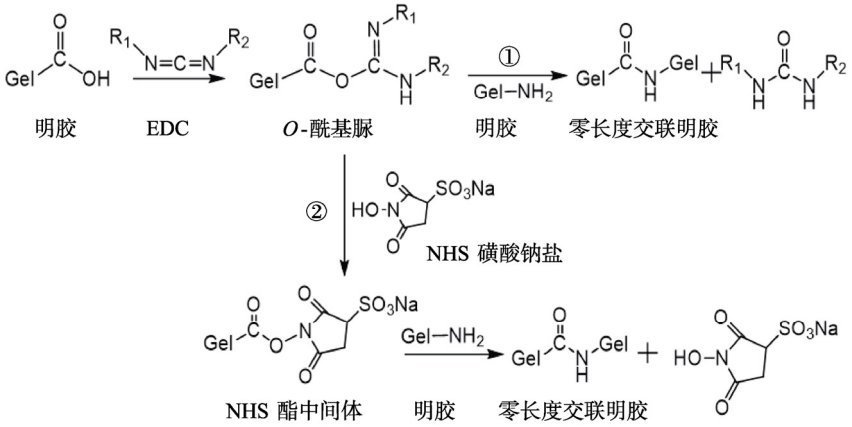


图 3 EDC 交联明胶原理(①)和 EDC/NHS 交联明胶原理(②)
Fig. 3 Principle of EDC crosslinked gelatin(①) and principle of EDC/NHS crosslinked gelatin(②)

2 评价方法

2.1 物理性能分析

2.1.1 溶胀性能分析 明胶的溶胀性能是通过测定其在水中的溶胀程度获得的，由于明胶分子表面有许多极性基团，如氨基、羧基、羟基等侧基，均能与水分子以氢键的方式结合，所以明胶的吸水性很强。交联反应使明胶分子相互链接，形成稳定的网状结构，阻碍水分子进入，这些固化的结构使明胶溶胀性能降低，所以可通过观察明胶的溶胀性能间接评价明胶的交联程度。评价明胶溶胀性能的常见指标有平衡溶胀度[20]、水蒸气透过率[21]、崩解时间[22]等。Kadry[23]用戊二醛(glutaraldehyde，GTA)为交联剂制备纳米纤维素和纤维素的曲马多明胶载药微球，发现交联后 2 种微球的平衡溶胀度均有不同程度的下降，随着 GTA 用量的增加，纤维素微球的平衡吸水率由 646%下降到 329%，纳米纤维素微球的平衡吸水率从 501%下降到 33.7%，可见交联剂的用量对明胶溶胀性能有很大的影响。

2.1.2 力学性能分析 现有技术研究中常常对明胶膜进行拉伸实验，通过绘制拉伸过程的应力应变曲线，获得明胶膜的力学性能参数[24]，标准应力应变曲线见图 4。随着交联剂用量的增加，交联位点增多，使得明胶内部交联密度增大，即明胶刚性增加[25]，不同交联程度的明胶具有不同的弹性、硬度和韧性。曲线的形状反应明胶膜在外力作用下发生的各种形变过程，标准应力应变曲线中的应力和应变以试样的初始尺寸进行计算，然而在拉伸过程中，试样的尺寸不断变化，故实际的应力应变曲线可能不同于标准曲线，当应力应变曲线没有明显的屈服点时，屈服应力规定用 ε=0.2%时的应力表示[26]。

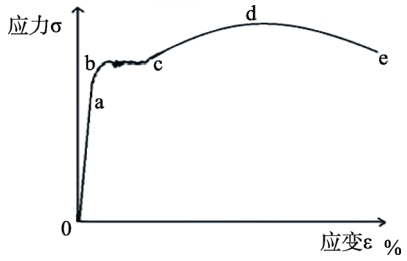


图 4 标准应力-应变曲线

ob–弹性阶段；bc–屈服阶段；cd–强化阶段；de–局部变形。

Fig. 4 Standard stress-strain curve

ob–Elastic stage; bc–yield stage; cd–strengthening stage; de–local deformation.

评价明胶力学性能常用的参数有凝胶强度、杨氏模量、断裂伸长率、抗拉强度等[27-30]。纯明胶的应力应变曲线表现为屈服点后应力略有下降，继而趋于平稳，屈服点后出现轻微的非线性[31]，最后通过强化效应使其断裂。Zhang 等[28]采用室温交联的方法将明胶纳米纤维与饱和 GTA 蒸气进行交联，应力应变曲线显示，75%相对湿度下交联前后电纺明胶纤维膜的曲线形状相似，但交联明胶弹性阶段的斜率(弹性模量)和屈服应力明显增大，其拉伸强度和模量均提高到非交联明胶膜的近 10 倍，说明随着交联剂用量的增加，需要更大的力才可以变形到设定值。在一定范围内，力学性能参数和交联剂用量之间呈正相关，但当交联剂用量达到一定值之后，断裂强度趋于平缓，断裂伸长率变化也趋于缓和，这可能是由于明胶中的氨基数量有限，交联达到一定程度后[32]，反应趋于饱和。

2.1.3 亲水性能分析 水在明胶材料表面上的接触角，是衡量该明胶亲水性能的重要参数，它能间接反映交联程度。通过微量注射器上旋钮精确控制液滴体积，使其与明胶膜接触，用高倍摄像头即刻拍照，将影像传入计算机计算接触角[33]，见图 5。若固体表面是亲水性，液体较易润湿固体，接触角会较小(<90°)，反之，若固体表面为疏水性，液体容易在固体表面上移动，接触角会较大(>90°)[34]。田野等[35]使用封端型水性聚氨酯在碱性条件下与明胶反应，发现明胶膜的接触角从 81.6° 上升至 101.1°，证实了交联。明胶作为一种亲水性较强的水解多肽却表现出较高的接触角，主要是由于明胶表面的亲水基团定向排列到明胶膜的内侧所致[36]，交联使明胶的接触角变大，故可以根据接触角变化的大小判断明胶的交联程度。

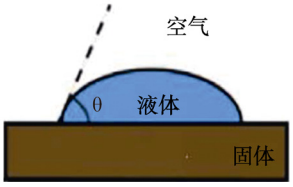


图 5 接触角 θ

Fig. 5 Contact angle θ

2.1.4 光学性能分析 透明和色泽是明胶的重要理化指标之一，使用紫外可见光谱法(ultraviolet-visible spectrometry，UV)可以测试交联明胶膜的透

光能力和对紫外辐射的吸收能力，进而对交联明胶的光学性能进行表征。随着交联剂用量的增加，交联后明胶形成致密的网络结构，在宏观上阻止了光线的传播，导致了光线在网络中的吸收和散射，使明胶的透明度下降[37]。一般情况下，聚合物的链越紧凑，光就越难穿过，薄膜的不透明性就会增强[38]，所以光学性能的分析可以间接评价明胶的交联程度。耿晓明[39]使用 NHS 活化乙二胺四乙酸酐改性的微晶纤维素制备纤维素酯，合成大分子交联剂微晶纤维素-NHS 活性酯(microcrystalline cellulose-ethylenediamine tetraacetic anhydride-*N*-hydroxy succinimide，MEN)，制备了交联明胶，用 UV 测试交联明胶膜的光的阻碍性能，结果显示，随着交联剂用量的增加，明胶薄膜的光透过率逐渐降低，当交联剂 MEN 的用量为 30%时，光透过率达到最低值，此时的交联程度达到最大。Mu 等[9]以新型双醛多糖-双醛羧甲基纤维素(dialdehyde carboxymethyl cellulose，DCMC)为交联剂，制备了甘油增塑明胶薄膜。光学性能结果显示，添加 DCMC 可以提高明胶薄膜的 UV 阻隔性能，这是交联产物席夫碱的 C=N 基团紫外吸收的结果，C=N 基团含量越大，紫外阻隔性越强。

2.2 化学分析

2.2.1 氨基酸含量分析 氨基是明胶上活性基团发生交联的主要位点[40]，明胶发生交联反应后，氨基数目减少，通过计算交联前后明胶氨基的数目可以判断交联的程度。常用测定方法有甲醛滴定法和茚三酮比色法等。甲醛滴定法的原理为甲醛和明胶的氨基发生反应，消耗氨基导致明胶溶液的碱性消失，显示出酸性，用标准碱液滴定明胶溶液，根据消耗的碱液量可以计算出明胶中的 α-氨基、ε-氨基和咪哇基的总含量[41]，反应原理见图 6。茚三酮比色法的原理是茚三酮与 α-氨基酸发生反应，生成蓝色物质，这种蓝色物质在 570 nm 附近有最大吸收[42]，根据吸光值可以确定参与反应的氨基数目，反应原理见图 7。崔敏等[43]的实验结果证实了这 2 种检测方法具有较好的重复性和较高的准确度。

氨基酸残基含量分析还可以用 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid，TNBS)方法测定[44]，反应原理见图 8，TNBS 在偏碱性的条件下与明胶的氨基发生反应形成中间络合物，该络合物在酸性溶液中转化成 TNB-氨基酸。TNB-氨基酸在 346 nm 处有最大吸收值，根据生成 TNB-

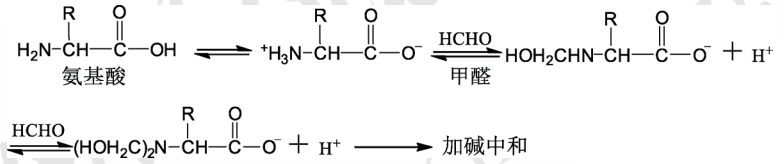


图 6 甲醛滴定法原理

Fig. 6 Principle of formaldehyde titration

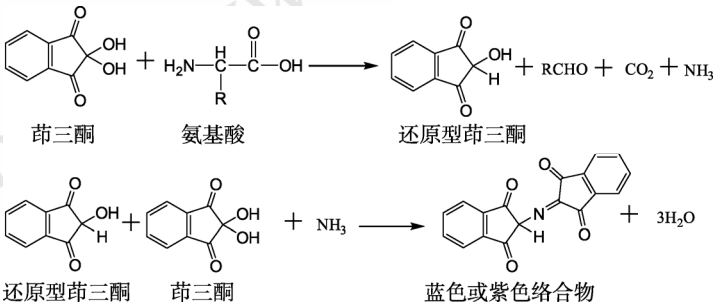


图 7 茚三酮显色法原理

Fig. 7 Principle of ninhydrin coloration

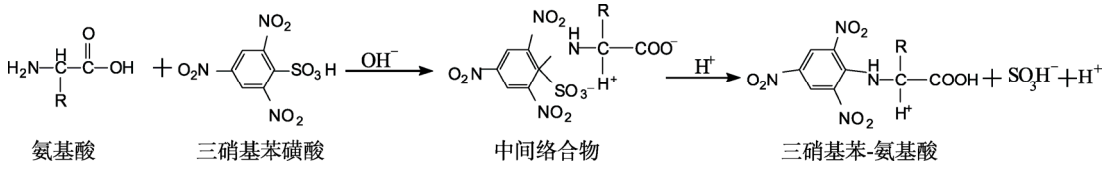


图 8 TNBS 原理

Fig. 8 Principle of TNBS

氨基酸的量可以知道参与反应的氨基量，通过计算单位明胶中游离 ε-氨基基团的摩尔数，就可测得明胶的交联程度。

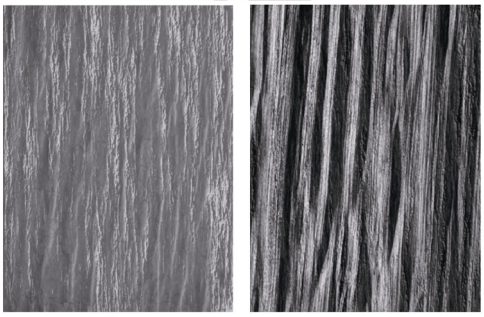
2.2.2 总碳含量分析(total organic carbon，TOC) 针对引入新的碳链的交联反应，可以通过碳含量的变化程度来评价明胶的交联程度。交联明胶碳含量越高，则代表引入的碳链越多，明胶的交联程度越大。碳含量分析是将明胶水溶液中的总有机碳氧化为二氧化碳，采用总有机碳分析仪测定二氧化碳的含量，利用二氧化碳与总有机碳之间碳含量的对应关系，对明胶溶液中总有机碳进行定量测定[45]。夏淳淳等[46]用甲醇在盐酸做催化剂的条件下制备了羧基封闭明胶，用二碳酸二叔丁酯制备了氨基封闭明胶，测得了明胶、氨基封闭明胶、羧基封闭明胶的总含碳量，结果显示，氨基、羧基封闭明胶的 TOC 都比未交联明胶高，这是因为明胶的羧基封闭引入甲醇基，氨基封闭引入了二碳酸二叔丁基，导致明胶分子中碳含量增多。

2.2.3 抗酶解性能分析 明胶中富含蛋白质，易被蛋白酶酶解，明胶发生交联反应后，酶的分解只能在胶原分子的表面进行[47]，无法和胶原分子充分接触，因此延缓了胶原的降解时间。交联提高了明胶的抗酶解能力，明胶的胶原酶酶解所需时间越长，交联度越高[48]。抗胶原酶酶解性能用单位体积胶原膜被胶原酶分解的时间来度量。朱静吟[49]评价了孟加拉玫瑰红 RB 和 532 nm 激光介导的光化学胶原交联作用提高猪眼角膜抵抗胶原酶溶解作用的能力，在二者共同介导的交联下，猪眼角膜的抗胶原酶溶解能力得到了显著提高，胶原酶溶解时间从(10.8±3.1)d 增加到了(19.7±6.2)d，可见抗蛋白酶酶解时间可以作为间接评价明胶交联程度的方法之一。

2.2.4 生物相容性 广泛地认为，交联剂的使用会降低明胶的生物相容性，甚至会产生细胞毒性，通过 MTT 比色法可以获得明胶的生物相容性。MTT 试验是一种检测细胞存活与生长的方法，利用活细胞线粒体酶将细胞摄取的 MTT 还原为蓝色颗粒的原理，以样品的吸光度测定值为比较参数，根据细胞生长的增殖率来评估材料对细胞的毒性作用，进而初步判断出该复合材料的生物相容性[50]。需要注意的是，用明胶材料制备培养细胞的浸提液时要进行灭菌处理[51]。张敏[52]以四硼酸钠为交联促进剂，利用氧化海藻酸钠与明胶发生席夫碱反应制备了化学交联明胶，MTT 试验结果表明，交联作用越强，明胶的生物相容性越差。

2.3 图谱分析

2.3.1 扫描电子显微镜(scanning electron microscope，SEM)表面形态分析 SEM 主要通过二次电子信号成像观察明胶交联前后的表面和横截面区域的均匀度和紧密度，来评价明胶的交联程度，交联后的明胶呈现出局部定向，区域交织，区域不连续的形态[53]，见图 9。交联程度越大，SEM 图反映的明胶膜微观结构越紧密。Cao 等[54]用扫描电镜观察了阿魏酸和单宁酸交联明胶薄膜的表面与横截面，结果显示，阿魏酸和单宁酸的加入使明胶的横截面失去了一定的纤维性，自由体积明显减小。



①　②

图 9 明胶薄膜(①)和交联明胶薄膜(②)SEM 图

Fig. 9 SEM image of gelatin film(①) and cross-linked gelatin film(②)

2.3.2 X-射线衍射分析(X-ray analysis，XRD) 明胶的 XRD 图谱会出现 2 个特征峰，衍射角 2θ 在 7°附近出现 1 个尖峰，在 20°附近出现 1 个宽峰[55-56]，分别代表了胶原中 3 股超螺旋结构和单链左手螺旋结构[57]。位于 7°附近的峰代表肽链间的距离，用 d 表示，通过布拉格方程 $2d\sin\theta=n\lambda$ 可以求出。不同剂量交联剂对明胶 X 射线图谱的影响见图 10，交联剂添加量越大，d 值越小，d 值的变化程度反映明胶的交联程度。夏雨等[56]使用不同浓度的茶多酚交联明胶，通过对其进行 XRD 分析，发现茶多酚浓度为 2 g·L^{-1} 时，d 值最小，交联作用最强。强交联作用甚至还会扰乱明胶膜中原来的结晶，导致明胶 2θ=7.5°的特征衍射峰消失[58]。

2.3.3 热稳定性分析 明胶交联后分子内形成稳定的共价键，交联共价键越多，共价键的断裂需要吸收的能量就越大，因此明胶对热的稳定性越强。采用差示扫描量热法(differential scanning

calorimetry，DSC)、热重量法(thermogravimetry，TG)对交联明胶进行定量和定性分析，对热稳定性和交联程度进行表征与评价。

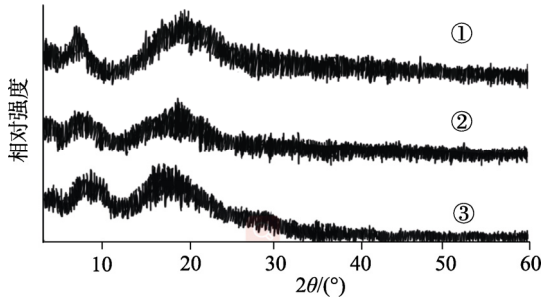


图 10　XRD 扫描图谱

①–明胶；②–低剂量交联剂交联明胶；③–高剂量交联剂交联明胶。

Fig. 10　XRD spectrum

①–gelatin; ②–low dose cross-linked gelatin; ③–high dose cross-linked gelatin.

DSC 主要测试热量随温度的变化，DSC 曲线的峰向上表示吸热，向下表示放热，峰包围的面积正比于热焓的变化。随着明胶交联程度的增大，DSC 曲线的吸热峰位置会向高温偏移，焓变值增大[59]，见图 11。通过测定焓变值的大小可以评价明胶网状结构的紧密程度和明胶肽链间的键合交联程度。在王坤等[60]的单宁交联明胶 DSC 实验中，随着交联剂单宁添加量的增加，明胶膜的玻璃化转换温度提升了 11.46 ℃，交联膜的焓变值增大。

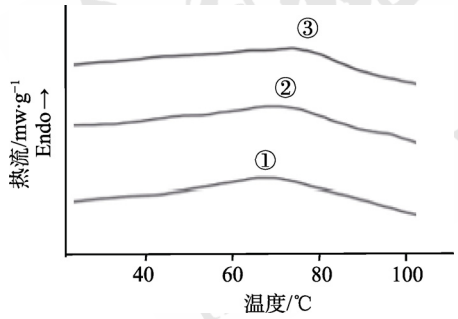


图 11　DSC 曲线图

①–明胶；②–低剂量交联剂交联明胶；③–高剂量交联剂交联明胶。

Fig. 11　DSC curve

①–gelatin; ②–low dose cross-linked gelatin; ③–high dose cross-linked gelatin.

TG 主要测试样品质量随温度的变化，明胶的 TG 分析图显示，在 59 ℃时会出现一个由水分蒸发引起的约为 13%的质量损失，在 360 ℃时，由于氨基酸片段分解，质量急剧下降，质量损失约为 43%，在 539 ℃和 600 ℃时可以观察到一个小的质量减少现象，这是聚合物机制分解的结果[61]。随着交联剂用量增加，交联明胶热稳定性增强，见图 12。Han 等[62]用辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶和葡萄糖的混合物交联明胶，TG 图结果显示，随着交联剂用量增加，交联明胶热稳定性增强，热分解、失去吸附水和达到最大分解速率的温度均大于纯明胶。

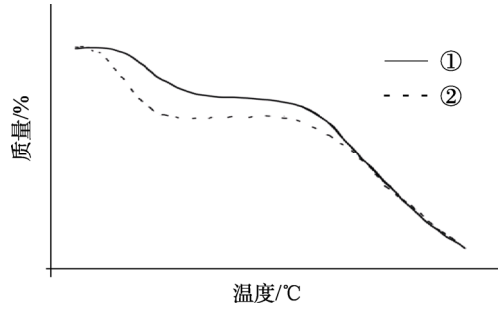


图 12　TG 分析图

①–明胶；②–交联明胶。

Fig. 12　TG curve

①–gelatin; ②–cross-linked gelatin.

2.3.4　UV　交联会使明胶产生新的结构，见图 13。通过 UV 可以准确测定该结构的含量。邵士凤等[63]用单宁酸作交联剂对明胶进行交联处理，紫外分析结果表明，纯明胶在 215.5 nm 附近有一个由明胶中 C=O 的 π→π* 跃迁产生的吸收峰[64]，交联明胶在紫外光区 276 nm 处有一新吸收峰，是交联反应而引入了芳香环的结果，根据该峰的大小可以评价明胶的交联程度。交联还会影响明胶膜吸收峰的位置向长波方向移动[54]。

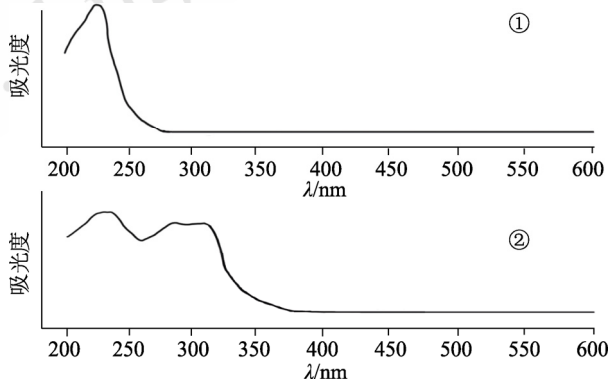


图 13　明胶(①)和交联明胶(②)的紫外光谱图

Fig. 13　UV spectra of gelatin (①) and cross-linked gelatin (②)

2.3.5　圆二(circular dichroism，CD)色谱分析　交联反应会使明胶形成致密有序的螺旋状结构，可以通过测定明胶溶液的 CD 色性评价明胶的交联程度。当平面圆偏振光通过明胶的光活性生色基团时，光活性中心对平面圆偏振光中的左、右圆偏振光的吸收不相同，产生了吸收差值，这种吸收差造成了偏振光矢量的振幅差，圆偏振光变成

了椭圆偏振光，这就是明胶的 CD 色性。

蛋白质主要生色团的紫外区段 190~240 nm[65]，这一波长范围的 CD 谱包含了生物大分子主链构象的信息，谱带位置见表 1[66-67]。α-螺旋是一种紧密且没有空腔的稳定结构，其结构中存在较多的氢键，决定了蛋白质的刚性，β-折叠结构是二级结构中较为无序的结构，其含量影响着蛋白质的柔韧性和扩展性，从而发挥蛋白质的某些功能性质[68]，β-转角是一种很不稳定的环状结构。

表 1 蛋白质圆二色谱谱带信息
Tab. 1 Protein circular dichroism band information

构象	形成原因	正 CD 谱带位置/nm	负 CD 谱带位置/nm
α-螺旋构象	肽键上的 N-H 氢和它后面(N 端)第 4 个残基上 C=O 氧之间形成氢键	190	222，208 肩峰
β-折叠构象	相邻肽链主链上的-NH 和 C=O 之间形成氢键	195~200	216，175
β-转角构象	第 1 个氨基酸残基的 C=O 与第 4 个残基的 N-H 之间形成氢键	206	–

明胶具有独特的 CD 光谱，其特征是在 220 nm 处有 1 个阳性峰，在 213 nm 处有 1 个交叉峰，在 197 nm 处有 1 个大的阴性峰[69]。引入正峰强度与负峰强度比值(ratio of positive peak intensity over negative peak intensity，Rpn)这一 CD 参数以确定溶液中是否存在三螺旋构象。交联明胶形成的三螺旋结构，会在 CD 光谱呈现出弱于明胶的负峰，使 Rpn 值急剧增加[70]，见图 14。Chen 等[71]研究了 α1/α2 亚基比对明胶的影响，测定不同 α1/α2 比例交联明胶的 CD 色谱，计算 Rpn 后发现，α1 和 α2 比例是 1 的 Rpn 为 0.047，α1 和 α2 比例是 2 的 Rpn 达到 0.067，三螺旋结构含量增加，确定 α1 和 α2 比例为 2 时交联程度更大。

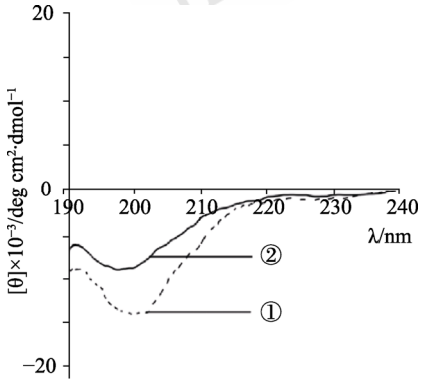


图 14 明胶(①)和交联明胶(②) CD 色谱图
Fig. 14 CD spectra of gelatin(①) and cross-linked gelatin (②)

2.3.6 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrum，FTIR)分析 FTIR 可以研究明胶分子结构和化学键的变化，确定明胶含有哪些特征官能团。在 1 540 cm^{-1} 和 1 650 cm^{-1} 的骨架特征吸收是明胶区别于其他物质的唯一特征[72]。醛类交联产物希夫碱 C=N 的伸缩振动吸收峰出现在 1 690~1 590 cm^{-1} 区域内[73]，呈中等强度的峰，峰形尖锐，与明胶分子结构中 C=O 伸缩震动引起的酰胺 I 带吸收峰(1 647 cm^{-1})相比，有一定的红移，见图 15。林海莉等[74]制备戊二醛交联明胶膜，与纯明胶膜的 FTIR 图谱相比，交联明胶膜在波数 1 700~1 630 cm^{-1} 有多个吸收小峰，表明明胶中的氨基已与戊二醛中的醛基发生交联反应并形成了希夫碱结构。Kim 等[75]使用原花色素(proanthocyanidin，PA)，浓缩单宁，将明胶/壳聚糖基薄膜交联，红外光谱分析谱图出现酰胺键和酯键的特征，证明发生了交联。

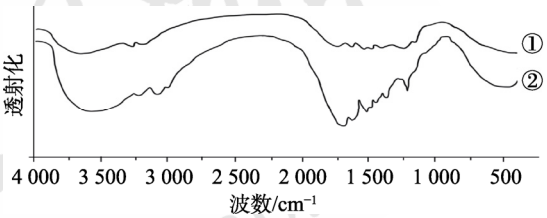


图 15 明胶(①)和醛类交联明胶(②)的傅里叶红外光谱图
Fig. 15 FTIR spectra of gelatin(①) and aldehydes cross-linked gelatin(②)

3 总结与展望

通过查阅已报道文献，笔者对明胶的化学交联方法进行归纳，根据交联明胶的物理性能和化学官能团变化，总结出评价明胶化学交联程度的一系列方法，内容包括交联明胶物理性能和结构表征等多方面的分析方法和表征手段，如交联明胶的溶胀性能、光学性能、力学性能等性能测试，以及 UV、XRD、SEM 等表征方法，以期为其更深入的研究提供参考。明胶的应用领域正在不断探索，但随着新型功能的明胶不断出现，同样存在问题需要解决，如交联明胶内存在一些未反应的交联剂，以及在体内生物降解过程中形成有毒产物等，通常通过降低交联剂浓度或在实验后再处理，例如采取冲洗产物、透析或在真空干燥器中蒸发等方法减少或消除潜在的毒副产物，不过提高产物的安全性措施还需要进一步探索。虽然许多研究工作者试图利用其他材料来替代明胶，

但至今仍没有一种物质具备这个性质，而且明胶的改性方法日益完善，具有优异理化性质和生物学性能的改性明胶将在各个领域发挥愈来愈重要的作用。

REFERENCES

[1] 丁凤平. 单因素及正交试验法在酸法制备明胶中的应用[J]. 生化药物杂志, 1991, 11(4): 29-34.

[2] LIU R X, ZHOU T, FAN X M, et al. Research progress in gelatin-based composite hydrogel[J]. J Light Ind(轻工学报), 2018, 33(6): 42-54, 81.

[3] TORRES-HERRERA J, TORRES-RUIZ G. Gelatin tannate: A selective biofilm-forming, gut mucoprotectant for acute gastroenteritis in children. A short narrative review[J]. Curr Drug Ther, 2017, 12(1): 23-28.

[4] DIVYA M, VASEEHARAN B, ABINAYA M, et al. Biopolymer gelatin-coated zinc oxide nanoparticles showed high antibacterial, antibiofilm and anti-angiogenic activity[J]. J Photochem Photobiol B: Biol, 2018(178): 211-218.

[5] ZHANG X A. Preparation and properties of PLGA/Gt electrostatic spinning fiber medical dressings[J]. Shanghai Text Sci Technol(上海纺织科技), 2019, 47(7): 22-25, 36.

[6] RICKMAN J, TRONCI G, LIANG H, et al. Rotation-assisted wet-spinning of UV-cured gelatin fibres and nonwovens[J]. J Mater Sci, 2019, 54(14): 10529-10547.

[7] KLOTZ B J, GAWLITTA D, ROSENBERG A J W P, et al. Gelatin-methacryloyl hydrogels: Towards biofabrication-based tissue repair[J]. Trends Biotechnol, 2016, 34(5): 394-407.

[8] LI Y, WANG X C, CHEN K, et al. Preparation of adhesive with PAE modified technical gelatin and its application in wood[J]. China Leather(中国皮革), 2018, 47(5): 1-5, 13.

[9] MU C D, GUO J M, LI X Y, et al. Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films[J]. Food Hydrocoll, 2012, 27(1): 22-29.

[10] DAN N H, DAN W H, ZENG R, et al. Application of epoxy compound in collagen modification[J]. Mater Rev(材料导报), 2006, 20(6): 119-122.

[11] SUN L L. Ring opening reaction of epoxy compounds preparation β-alcohol compounds[D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology, 2013.

[12] HUANG J, HAN X N, GUO X Q, et al. Gelatin modification and stabilization using epoxy silane coupling agents[J]. Leather Sci Eng(皮革科学与工程), 2014, 24(1): 17-22.

[13] TANG X L. Study on the reaction of water-soluble epoxy compound with collegen peptide[D]. Jinan: Shandong Polytechnic University, 2012.

[14] 刘晓晓. 明胶与多酚的相互作用研究[D]. 成都: 西华大学, 2014.

[15] HERMANSON G T. Zero-length crosslinkers[M]. Bioconjugate Techniques. Amsterdam: Elsevier, 2008: 213-233.

[16] BARNES C P, PEMBLE C W, BRAND D D, et al. Cross-linking electrospun type II collagen tissue engineering scaffolds with carbodiimide in ethanol[J]. Tissue Eng, 2007, 13(7): 1593-1605.

[17] CHOU S F, LUO L J, LAI J Y, et al. Role of solvent-mediated carbodiimide cross-linking in fabrication of electrospun gelatin nanofibrous membranes as ophthalmic biomaterials[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017, 71(2): 1145-1155.

[18] HOARE D G, KOSHLAND D E. A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins[J]. J Biol Chem, 1967, 242(10): 2447-2453.

[19] HUANG G P, SHANMUGASUNDARAM S, MASIH P, et al. An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds[J]. J Biomed Mater Res A, 2015, 103(2): 762-771.

[20] CHIONO V, PULIERI E, VOZZI G, et al. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications[J]. J Mater Sci Mater Med, 2008, 19(2): 889-898.

[21] GUO J M, GE L M, LI X Y, et al. Periodate oxidation of xanthan gum and its crosslinking effects on gelatin-based edible films[J]. Food Hydrocoll, 2014(39): 243-250.

[22] 田军, 邹莹莹, 李刘辉, 等. 中药软胶囊崩解迟缓及抗氧剂干预的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(12): 29-31.

[23] KADRY G. Comparison between gelatin/carboxymethyl cellulose and gelatin/carboxymethyl nanocellulose in tramadol drug loaded capsule[J]. Heliyon, 2019, 5(9): e02404.

[24] 赵金侠, 张亚梓, 吕晓静. 金属材料应力-应变曲线分析[J]. 科技风, 2019(9): 171, 182.

[25] CHEN X H, GUAN G P, WANG L. Preparation and characterization of gelatin hydrogel with epoxide as crosslinking agent[J]. Prog Biomed Eng(生物医学工程学进展), 2014, 35(1): 18-22.

[26] 李维. 关于屈服强度($\sigma_{0.2}$)的说明[J]. 理化检验: 物理分册, 2000, 36(5): 212.

[27] BIGI A, PANZAVOLTA S, RUBINI K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films[J]. Biomaterials, 2004, 25(25): 5675-5680.

[28] ZHANG Y Z, VENUGOPAL J, HUANG Z M, et al. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers[J]. Polymer, 2006, 47(8): 2911-2917.

[29] KARIMI A, NAVIDBAKHSH M, YOUSEFI H, et al. An experimental study on the elastic modulus of gelatin hydrogel using different stress-strain definitions[J]. J Thermoplast Compos Mater, 2015, 28(10): e3-e4. Doi: 10.1177/0892705714533377.

[30] ZHENG X J, LI Y, LIU J, et al. Research progress of gelatin-based hydrogel with high mechanical performance[J]. China Leather(中国皮革), 2013, 42(1): 56-58.

[31] WAN Y Z, WANG Y L, LUO H L, et al. Carbon fiber-reinforced gelatin composites. I. Preparation and mechanical properties[J]. J Appl Polym Sci, 2000, 75(8): 987-993.

[32] LIU X J, QI L, BAI L F. Preparation and mechanical properties of modified gelatin membrane[J]. J Tianjin Polytech Univ(天津工业大学学报), 2006, 25(2): 19-21, 32.

[33] XIONG Y, JIA Z H, CAI X S. Measurement of droplet contact angle with image analyzing method[J]. Metrol Meas Technol(计测技术), 2010, 30(2): 9-11.

[34] LIU C S, ZHENG D M, ZHOU J G, et al. Thermal annealing treatment to achieve switchable and reversible wettability on ZnO nanowires surface[C]//Advanced Materials and Processing 2010. Yunnan, P R China. World Scientific, 2011: 105-108.

[35] TIAN Y, LIU J. Preparation and performance of blocked waterborne polyurethane[J]. West Leather(西部皮革), 2014, 36(22): 12-19.

[36] YASUDA T, OKUNO T, YASUDA H. Contact angle of water on polymer surfaces[J]. Langmuir, 1994, 10(7): 2435-2439.

[37] 郭佶懋, 穆畅道, 李德富. DCMC 交联明胶食品包装膜的制备与表征[C]//中国化工学会. 2011 全国生物化工技术发展

研讨会论文集, 2011: 84-92.
[38] MATSUGUMA L S, LACERDA L G, SCHNITZLER E, et al. Characterization of native and oxidized starches of two varieties of Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* B.) from two production areas of Paraná state, Brazil[J]. Braz Arch Biol Technol, 2009, 52(3): 701-713.
[39] 耿晓明. 二元羧酸型交联剂的制备及对明胶(膜)的改性研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2018.
[40] 姚荣国. 氨基改性明胶的物理化学性质和照相性能[J]. 感光材料, 1977(4): 13-14.
[41] 徐炜, 关蕊. 测定蛋白质氨基置换度的三种方法[J]. 明胶科学与技术, 2003, 23(2): 74-79.
[42] 鲁子贤. 蛋白质化学[M]. 北京: 科学出版社, 1981: 2-17.
[43] CUI M, FU J, CHI Y L, et al. Comparison of ninhydrin colorimetry and formaldehyde titration in determination of collagen hydrolysate[J]. China Leather(中国皮革), 2011, 40(7): 1-4.
[44] OFNER C M, BUBNIS W A. Chemical and swelling evaluations of amino group crosslinking in gelatin and modified gelatin matrices[J]. Pharm Res, 1996, 13(12): 1821-1827.
[45] SUN D W, YU C X, LIU Y F. Determination of the total organic carbon in water by high-temperature burning and oxidation processs[J]. Mod Sci Instruments(现代科学仪器), 2010(4): 117-118.
[46] XIA C C, LUO Z Y, FAN H J, et al. The modification methods of protein[J]. Leather Sci Eng(皮革科学与工程), 2011, 21(2): 10-14.
[47] WANG Y J, YANG C R, WANG L Y. Influence of EDC/NHS crosslinking on physicochemical properties of collagen[J]. J South China Univ Technol: Nat Sci Ed(华南理工大学学报: 自然科学版), 2007, 35(12): 66-70, 96.
[48] LIN X Y, LIU K W, LU J, et al. A comparative study on modification of medical collagen membrane by ^{60}Co irradiation[J]. Chem Res Appl(化学研究与应用), 2004, 16(2): 248-250.
[49] 朱静吟. 光化学胶原交联技术增强了猪眼角膜抗胶原酶溶解能力[C]//国际眼科学学术会议、国际视光学学术会议、国际角膜塑形学术大会, 2014: 256.
[50] YI C Q, ZHANG M G, CAO Y, et al. A study of the biocompatibility of cross-linked g-phb and bone marrow stromal cells *in vitro*[J]. Chin J Histochem Cytochem(中国组织化学与细胞化学杂志), 2006, 15(3): 261-265.
[51] 张丽茹. 双醛普鲁兰改性胶原基材料的结构及性能[D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
[52] ZHANG M. Study on covalently cross-linked alginate-gelatin hydrogels[D]. Tianjin: Tianjin University, 2006.
[53] DE CARVALHO R A, GROSSO C R F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde[J]. Food Hydrocoll, 2004, 18(5): 717-726.
[54] CAO N, FU Y H, HE J H. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid[J]. Food Hydrocoll, 2007, 21(4): 575-584.
[55] YAO L Y, CHEN G R, WANG R, et al. Effect of ferulic acid on the properties of gelatin[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2015, 36(15): 83-86,91.
[56] XIA Y, JIAO Z H, LIU H Y. Study on the properties of gelatin modified by tea polyphenols[J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2011, 37(10): 36-40.
[57] 王毅虎, 郭燕川, 马铭, 等. 应用 X-射线衍射方法研究明胶凝胶化机理[J]. 明胶科学与技术, 2012, 32(2): 60-63, 69.
[58] 张思肖. 聚氨酯交联改性工业明胶制备木材胶黏剂及其性能研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2019.
[59] LIU H Y, HE L, GUO S D. A new assay method on quality of gelatin with small sample size using DSC[J]. J Food Sci Biotechnol(食品与生物技术学报), 2011, 30(5): 675-678.
[60] WANG K, WANG W H, ZHANG Y, et al. Impact of tannin on the properties of gelatin edible film[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2017, 33(3): 251-256.
[61] DE MENEZES A S, REMÉDIOS C M R, SASAKI J M, et al. Sintering of nanoparticles of α-Fe_2O_3 using gelatin[J]. J Non - Cryst Solids, 2007, 353(11/12): 1091-1094.
[62] HAN Y P, ZHAO X H. Properties of bovine gelatin cross-linked by a mixture of two oxidases (horseradish peroxidase and glucose oxidase) and glucose[J]. Cyta-J Food, 2016, 14(3): 457-464.
[63] SHAO S F, ZHAO X H, SUN H M. Optimization of cross-linking conditions for gelatin with vegetative tannic acid and analysis for its properties[J]. Trans Chin Soc Agric Eng(农业工程学报), 2009, 25(S1): 241-245.
[64] JING L G, ZHAO X H. Effects of cross-linking treatment of ferulic acid on properties of gelatin[J]. Chin J Mater Res(材料研究学报), 2015, 29(9): 701-706.
[65] KANG X F, LI H M, CHEN D J, et al. Encapsulation of astaxanthin in zein-saccharide graft reaction products[J]. Food Sci(食品科学), 2018, 39(7): 168-173.
[66] 李冬梅. 蛋白质圆二色谱解析研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2001.
[67] BRAHMS S, BRAHMS J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism[J]. J Mol Biol, 1980, 138(2): 149-178.
[68] LI C. Study of physiochemical properties and flavor controlled release of peanut protein isolate-polysaccharides films crosslinked by glycation reaction[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.
[69] KHEW S T, TONG Y W. The specific recognition of a cell binding sequence derived from type I collagen by Hep3B and L929 cells[J]. Biomacromolecules, 2007, 8(10): 3153-3161.
[70] FENG Y B, MELACINI G, TAULANE J P, et al. Acetyl-terminated and template-assembled collagen-based polypeptides composed of gly-pro-hyp sequences. 2. synthesis and conformational analysis by circular dichroism, ultraviolet absorbance, and optical rotation[J]. J Am Chem Soc, 1996, 118(43): 10351-10358.
[71] CHEN S L, TANG L L, HAO G X, et al. Effects of α1/α2 ratios and drying temperatures on the properties of gelatin films prepared from tilapia (*Tilapia zillii*) skins[J]. Food Hydrocoll, 2016(52): 573-580.
[72] AKIN H, HASIRCI N. Preparation and characterization of crosslinked gelatin microspheres[J]. J Appl Polym Sci, 1995, 58(1): 95-100.
[73] 王军. 氨基酸席夫碱及其钇配合物的红外光谱研究[C]//中国稀土学报. 第九届全国稀土化学与湿法冶金学术会议专辑. 北京:《中国稀土学报》编辑部, 2005(12): 11-14.
[74] 林海莉, 曹静, 李艳. 戊二醛交联明胶膜的制备与性能研究[J]. 化学工程与装备, 2010(6): 56-58.
[75] KIM S, NIMNI M E, YANG Z, et al. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin[J]. J Biomed Mater Res, 2005, 75B(2): 442-450.

收稿日期：2020-11-18
(本文责编：曹粤锋)