

文章编号:1673-1689(2008)01-0026-06

天然裂环环烯醚萜 Oleuropein A 改性明胶薄膜的性能

丁克毅, 林鹏, 何达海

(西南民族大学 化学与环保工程学院, 四川 成都 610041)

摘 要: 研究了用不同用量的天然环烯醚萜 Oleuropein A 交联改性明胶薄膜的物理机械性能和稳定性, 并对其交联反应的机理进行了初步探讨。结果表明, Oleuropein A 主要以单分子通过 C-1、C-3 与明胶多肽侧链的氨基发生交联反应。当 Oleuropein A 用量小于干明胶质量分数 6% 时, 随着 Oleuropein A 用量的增加, 明胶薄膜的热稳定性显著提高; 断裂伸长率下降, 抗张强度提高, 初度显著增大; 水溶性、吸水性明显降低。这些性能的改变都有利于明胶更好地发挥其作为食品包装膜、药用胶囊及其它生物医学材料的使用性能。

关键词: 裂环环烯醚萜; Oleuropein A; 明胶薄膜; 物理机械性能; 稳定性

中图分类号: Q 555

文献标识码: A

Properties of Gelatin Film by Crosslinking with Natural Secoiridiod Oleuropein A

DING Ke-yi, LIN Peng, HE Da-hai

(College of Chemistry & Environmental Protection Engineering, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: In this manuscript, the mechanical properties and stabilities of gelatin film by crosslinking with different dosage of natural secoiridiod Oleuropein A were investigated. And the crosslinking mechanism was also. The result indicated that, the crosslinking reaction is occurred by C-1 and C-3 of oleuropein A mono-molecular with ϵ -amino groups of side chains in gelatin's polypeptides. Within the dosage of 6%, film's thermal stability(T_g), stress at break(σ_b) and toughness increased significantly. However, strain at break(ϵ_b), solubility and swelling decreased notably. All these changes are beneficial for the application of gelatin films as edible films for food, soft and hard capsules for medicine, biomedical materials such as wound dressing and adsorbent pad for surgical use, etc.

Key words: secoiridiod; Oleuropein A; gelatin film; physical-mechanical properties; stabilities

收稿日期: 2007-08-31.

基金项目: 国家公派留学基金项目(2003851019); 西南民族大学博士创新基金项目.

作者简介: 丁克毅(1966-), 男, 湖北仙桃人, 工学博士, 教授, 主要从事天然产物化学研究. Email: keyiding2000@yahoo.com.cn

由于明胶具有天然、安全、易降解等优异而独特的性质,加之原料为畜产品加工的副产物,可再生,来源丰富且廉价,符合绿色化学和循环经济的要求,因此在食品、药品、生物医学材料等领域得到广泛的应用,其中比较重要的用途是作为食品包装膜、药物胶囊膜及生物医学材料(如外科手术的粘合材料)。

未经交联改性的明胶薄膜,用于上述领域时其各种使用性能(如抗张强度、韧性,吸水膨胀度等)较差。而通常所用的化学方法交联改性的明胶,其使用性能虽有提高,但交联剂(如戊二醛、环氧化合物等)毒性较大,限制了其广泛应用;为此作者曾采用生物化学的方法,用转谷氨酰胺酶(mTG)对明胶进行改性,得到了一种具有较良好使用性能的可食性明胶薄膜^[1-2]。

近年来,有较多关于用从梔子果实中提取的一种叫做 Genipin 的天然交联剂改性胶原或明胶的报导^[3-5]。结果表明,Genipin 的交联效果与戊二醛相当,而毒性(LD₅₀)比戊二醛低 10 000 倍^[6-8]。Genipin 是一种环烯醚萜化合物,而环烯醚萜类化合物在双子叶植物,尤其是唇形科、茜草科、龙胆科、玄参科等植物中分布相当广泛。至 2001 年,分离出的天然环烯醚萜化合物已超过 1 400 种^[9]。按照基本结构,这类天然产物可分为闭环环烯醚萜及其苷、裂环环烯醚萜(Secoiridoids)及其苷(Secoiridoid glucosides)两大类,见图 1。

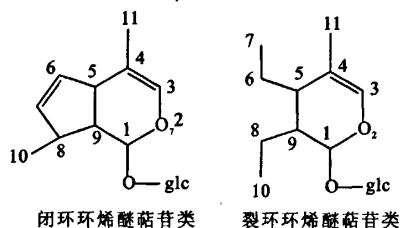
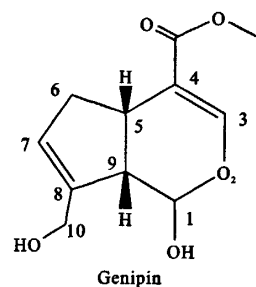


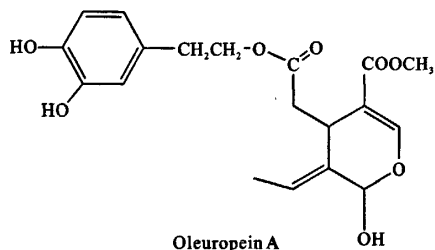
图 1 环烯醚萜类化合物的基本结构分类

Fig. 1 Structure classification of iridoid compounds

Genipin 是闭环环烯醚萜苷的水解产物,目前尚未见到用裂环环烯醚萜化合物改性明胶的报导。作者以从油橄榄叶中提取的裂环环烯醚萜 Oleuropein A 为代表,初步研究了其与明胶的交联反应机理,并对其交联改性的明胶薄膜的物理机械性能和稳定性进行了测试。结果表明:裂环环烯醚萜化合物 Oleuropein A 也是一种良好的明胶交联改性剂。



Genipin



Oleuropein A

图 2 Genipin, Oleuropein A 的结构

Fig. 2 Structure of Genipin, Oleuropein A

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

机械性能测试仪: Model # 1122 Instron Test Frame (数据处理软件: Test Works, Version 3.07), MTS System Corp., USA; 紫外-可见光谱仪: Model 14NT-UV-Vis, AVIV Instrument Inc., Lakewood, N J, USA; DSC 分析仪: MC-DSC-4100; Calorimetry Science Corporation, UT; 控温水浴振荡仪: SHAK-R-BATH, LAB-LINE Corp., NJ, USA; Oleuropein A 由 Sigma Chemical Company (MO, USA) 提供; B 型牛皮食用明胶: Bloom 强度 240 g, Sigma (St Louis) 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 用 UV 分析 Oleuropein A 在反应体系中的变化 在 25 mL 锥形瓶中,加入 5 mL pH 值为 7.5 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)和 2.5 mg Oleuropein A,配成质量分数 0.05% 的溶液,然后置于 35 ℃ 的水浴中振荡。在 Model 14NT-UV-Vis 紫外-可见光谱仪上分别测量 Oleuropein A 溶液在 0.25, 2, 4, 8, 16, 24 h 时在 200~300 nm 波长范围内的吸收光谱。

1.2.2 明胶薄膜的成型方法 在实验中,如无特别说明,所采用的明胶溶液质量分数为 10% 且用 pH 值为 7.5 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)配制。将干明胶质量分数 1%~10% 的 Oleuropein A 加入 10 mL 明胶溶液中,搅拌均匀后倒进直径 10 cm 的培

养皿中,轻轻转动培养皿使溶液分布均匀,在 35 ℃ 下静置 24 h (交联和成膜同时进行),然后在室温下自然干燥。

1.2.3 改性明胶薄膜的物理机械性能测试方法 待测试样在进行机械性能测试前,在 $T=23\text{ }^{\circ}\text{C}$, $HR=50\%$ 的恒温恒湿箱中平衡 48 h。薄膜样品的拉伸强度、断裂伸长率按 GB/T13735-1992 测定,应力—应变曲线下的面积为薄膜的韧度,以拉断单位体积的薄膜所做的功($\text{J}/\text{cm}^{[3]}$)表示。

1.2.4 DSC 分析 DSC 分析在 MC-DSC-4100 上进行。该仪器可以同时分析 3 个样品。在进行 DSC 分析前,明胶薄膜在 $T=23\text{ }^{\circ}\text{C}$, $HR=50\%$ 的恒温恒湿箱中平衡 48 h,然后截取 150~200 mg 的样品密封于样品皿中进行测试。实验中采用的测试参数为:加热范围 30~130 ℃,升温速度 1.5 ℃/min,平衡时间 600 s。

1.2.5 明胶膜的溶解度和吸水膨胀度测试 明胶膜溶解度和吸水膨胀度测试参照 A. Geniadios 等人^[10]的方法:切取 20 mm×20 mm 的经过恒温恒湿平衡调节过的薄膜试样 2 片,分别称重(记为 W_1, W_2),将其中一片(W_1)放入一个 50 mL 的锥形瓶中,加入 30 mL 蒸馏水(同时加入 0.5 g 重氮化钠(NaN_3)以防止细菌生长),在 25 ℃ 的水浴中振荡 24 h 强化溶解,然后取出明胶薄膜,通过布氏漏斗抽滤,称重(记为 W'_1)。经过溶解试验的薄膜和未经过溶解试验的对照样分别放入称重过的表面皿上,在 105 ℃ 的烘箱中干燥 24 h 后称重,减去表面皿的质量后所得干燥试样的质量分别记为 W''_1, W''_2 。

明胶薄膜自身的水分质量分数

$$R = (W_2 - W'_2) / W'_2$$

明胶薄膜的溶解度(%) = $[(1-R) \times W_1 - W''_1] / [(1-R) \times W_1] \times 100$

明胶薄膜的吸水膨胀度(%) = $[(W'_1 - W''_1) / W''_1] \times 100$

2 结果与讨论

2.1 环烯醚萜与明胶的反应机理探讨

关于环烯醚萜(如 Genipin)与含氨基的化合物(如明胶)反应的机理,目前已有一些研究报导^[11-12],但尚无明确的结论。这一点和戊二醛与胶原(明胶)的反应机理的争论有相似之处^[13]。

J. E. Park 等人^[11]研究了 Genipin 与最简单的含氨基化合物甲胺的反应,该反应可以形成一种水溶性蓝色颜料。他们将反应混合物通过 Bio-Gel P-

2 树脂交换柱,获得了 G1~G5 共 5 个组分。G1~G4 4 个组分都是蓝色颜料,其中最先洗脱出的组分 G1 着色力最强;最后洗脱的组分 G5 无色,紫外—可见分光光谱分析显示它的 $\lambda_{\text{max}} = 292\text{ nm}$,是生成上述蓝色颜料的中间体。实验表明,Genipin 与甲胺在 PBS 中于 70 ℃ 反应 5 h 后,反应混合物中的主要组分仍然是 G5。J. E. Park 等人采用 ^1H NMR、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY、 ^{13}C NMR 及 HMBC 等方法,证实 G5 的形成机理,见图 3。这表明 Genipin 在 PBS 中以 3 种处于平衡状态的同分异构体形式存在;其与含氨基的化合物(如胶原)产生交联的机理应该与戊二醛相似,而且很可能是以单个分子参与交联反应的。

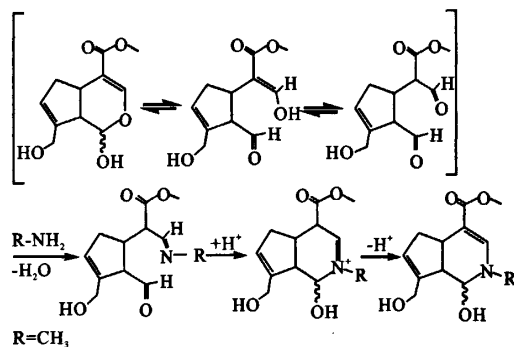


图 3 genipin 与甲胺反应的中间产物(G5)的形成机理

Fig. 3 Proposed formation mechanism of the intermediate(G5) from genipin with methylamine

作者用 Oleuropein A 在 PBS 稀溶液中进行的 UV 光谱分析显示, Oleuropein A 在 PBS 中振荡 0.25, 2, 4, 8, 16, 24 h 后,其紫外吸收光谱没有明显变化, λ_{max} 始终在 242 nm,见图 4。这一结果说明, Oleuropein A 在与明胶发生交联反应前也没有发生自聚,是以单分子参与交联反应的。

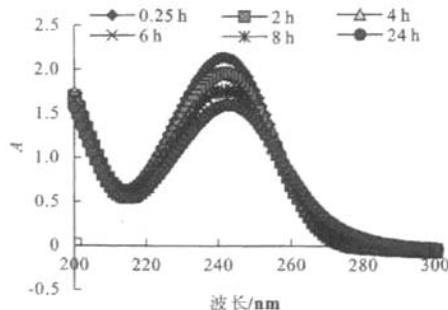


图 4 Oleuropein A 在 PBS 中放置不同时间后的紫外吸收光谱

Fig. 4 UV spectra for oleuropein A in PBS solution at different storage time

2.2 关于明胶薄膜成型方法的探讨

A. Bigi^[3]等人在用 Genipin 改性明胶薄膜时,采用的是 10 mL 质量分数 5% 的明胶溶液,在直径为 6 cm 的表面皿中自然干燥成膜后,再用 10 mL Genipin 溶液对明胶膜进行交联改性的方法。作者在以前用转谷氨酰胺酶(mTG) 改性明胶薄膜的过程中发现,这种先成膜后交联改性的方法不仅费时,而且膜干燥后易翘曲。通过对比试验,采用了交联改性和成膜同时进行的方法,所得明胶膜的物理机械性能明显高于先成膜后交联改性的产品。因此,在试验中仍然采取用 Oleuropein A 交联改性和成膜同时进行的方法。测试结果表明,用 Oleuropein A 作为交联剂并按照 1.2.1 所述方法成型的改性明胶膜的综合性能明显优于 Bigi 等人的结果。

2.3 Oleuropein A 用量对薄膜物理机械性能的影响

为了考察交联剂 Oleuropein A 的用量对明胶薄膜机械性能的影响,作者按照 1.2.1 所述的方法,加入不同比例的 Oleuropein A 后,在培养皿中进行浇铸成膜实验,再按 1.2.2 所述的方法测量其物理机械性能,结果见表 1。

从使用的角度来说,希望所制备的可食性明胶薄膜既有较高的抗张强度和韧度,又有较低的最大伸长率。从表 1 可以看出,随着 Oleuropein A 用量的增加,明胶膜的抗张强度、韧度都有显著提高,断裂伸长率下降;但当 Oleuropein A 的用量超过干明胶质量分数的 6%后,这些趋势已不明显,这说明此时交联程度已接近饱和。

表 1 Oleuropein A 用量对明胶薄膜机械性能的影响
Tab.1 Effect of Oleuropein A on the mechanical properties of gelatin films

Oleuropein A 质量分数/%	抗张强度/ MPa	断裂 伸长率/%	韧度/ (J/cm ³)
0	1.86±0.24	192±24	1.75±0.12
2	2.84±0.28	115±18	2.44±0.14
4	4.05±0.32	78±13	2.86±0.20
6	4.45±0.39	68±15	3.20±0.22
8	4.55±0.35	66±12	3.31±0.17
10	4.69±0.32	65±16	3.35±0.11

2.4 Oleuropein A 的用量对改性明胶薄膜热稳定性的影响

图 5 是用 2% 和 6% Oleuropein A 交联改性明胶薄膜的 DSC 曲线。作者所采用的 DSC 分析仪可以同时测量 3 个试样,并在得到基础数据后利用配套的 CpCalc 程序直接给出热变性的温度 T_i 及此过程中的焓变 ΔH 和 熵变 ΔS 。用不同用量的 oleuropein A 交联改性的明胶膜的热变性参数见表 2。

表 2 Oleuropein A 用量对明胶薄膜热稳定性的影响
Tab.2 Effect of Oleuropein A dosage on the thermal property of gelatin films

Oleuropein A 质量分数/%	T_i /℃	ΔH /(J/g)	ΔS /(J/(g·K))
0	61.6±2.3	12.1±0.6	0.036±0.006
2	87.5±2.8	19.2±0.5	0.054±0.005
4	96.4±1.7	24.0±0.9	0.065±0.005
6	100.5±1.2	28.8±0.4	0.077±0.005
8	102.2±1.5	30.0±0.6	0.080±0.007
10	104.3±1.9	30.9±0.7	0.082±0.006

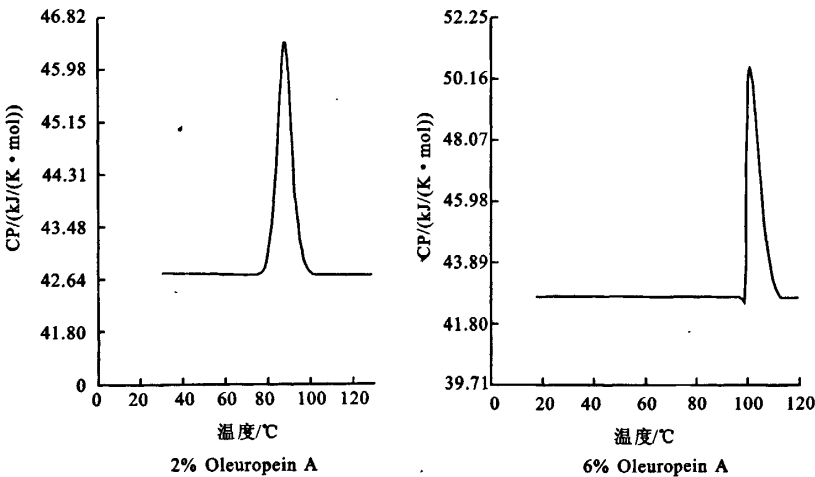


图 5 用不同量的 Oleuropein A 交联的明胶薄膜的 DSC 曲线
Fig.5 Effect of Oleuropein A dosage on the DSC of gelatin film

从表 2 可以看出,随着 Oleuropein A 用量的增加,明胶膜的热变性温度显著提高,当用量超过 6% 后,这种效果就不明显了。与 A. Bigi 等人用 Genipin 改性明胶薄膜^[3]的结果相比,在交联剂用量大致相当的前提下,Oleuropein A 对明胶膜机械性能和热稳定性的提高效果更明显一些。可能是 Oleuropein A 裂环上的酚羟基通过与明胶多肽侧链的一些基团产生氢键作用,从而对交联做出贡献。

2.5 Oleuropein A 用量对薄膜水溶性和吸水膨胀性的影响

用作食品包装的明胶膜遇水后的溶解度和吸水膨胀度越小,其使用性能就越好。图 6 显示了交联改性的明胶薄膜在水中的溶解度和吸水膨胀度随 Oleuropein A 用量的变化趋势。

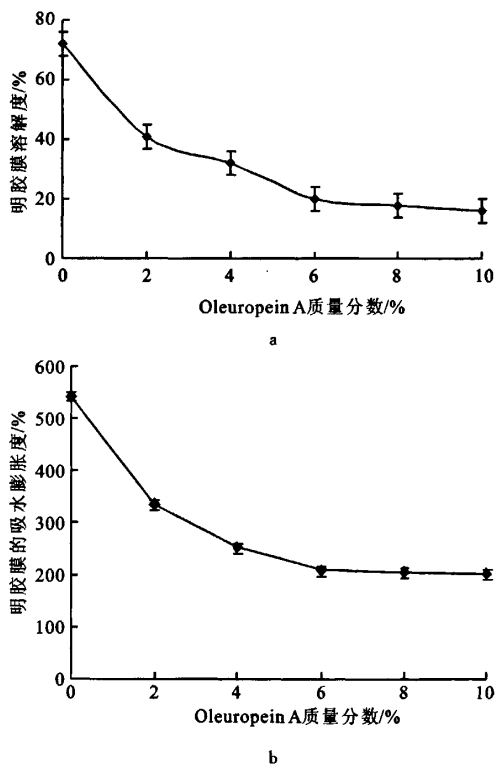


图 6 改性明胶膜的溶解度和吸水膨胀度随 Oleuropein A 用量的变化趋势

Fig. 6 Effect of Oleuropein A dosage on solubility and swelling of modified gelatin films

从图 6 可以看出,随着 Oleuropein A 用量的增加,薄膜的溶解度和吸水膨胀度都有变小的趋势。在图 2a 中,当 Oleuropein A 用量为干明胶质量分数 6% 时,明胶薄膜经过在 25 °C 水浴中振荡 24 h 的强化水溶性实验后,只有 20% 被溶解。按 R Mahmoud 等人^[14]总结的经验曲线,这相当于用这种薄膜包装含水量 15% 以下的肉制品,在 18 个月内薄膜不会因为吸水溶解而破坏——这是一个相当满意的结果;从图 2b 可以看出,当 Oleuropein A 用量为干明胶质量分数 6% 时,薄膜的吸水膨胀度为 208%,再增加 Oleuropein A 用量,薄膜吸水率下降的趋势已趋平缓。与未经 Oleuropein A 改性的对照试样相比(其溶解度和吸水膨胀度分别为 72% 和 542%),性能大为改善。同时,经过强化水溶性实验后的改性明胶薄膜虽然因吸水而膨胀,但仍然保持了原来的形状。

3 结 语

Oleuropein A 主要以单分子通过 C-1、C-3 与明胶多肽侧链的氨基发生交联反应,其裂环上的酚羟基也可能通过与明胶多肽侧链的一些基团产生氢键作用,从而对交联做出贡献,因而是一种比 Genipin 效果更好的天然交联剂。当 Oleuropein A 用量为干明胶质量分数 6% 时,明胶薄膜的热变性温度提高 40 °C 左右;断裂伸长率下降到原来的 1/3,抗张强度提高及韧度提高 2~3 倍;水溶性、吸水膨胀度明显降低;这些性能的改变都有利于明胶更好地发挥其作为食品包装膜、药用胶囊及其它生物医学材料的使用性能。超过 6% 的用量后,上述使用性能的变化趋缓,可以推断,当 Oleuropein A 的用量达到干明胶质量分数的 6% 时,交联程度已接近饱和。

由于 Oleuropein A 是从油橄榄叶中提取的一种天然裂环环烯醚萜化合物,它与从梔子果实中提取的闭环环烯醚萜 genipin 一样,用于明胶的交联改性时,所得产品具有优良的体内相容性,是一类替代戊二醛等毒性较大的合成交联剂的理想材料。

参考文献(References):

- [1] 丁克毅, 刘军, Brown E B, 等. 转谷氨酰胺酶 (mTG) 改性明胶的物理性质研究[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25 (2): 8-12.

- DING Ke-yi, LIU Jun, Brown E B, et al. Research on the physical properties of gelatins modified via microbial transglutaminase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(2): 8-12. (in Chinese)
- [2] 丁克毅, 刘军, Brown E B, 等. 转谷氨酰胺酶 (mTG) 改性明胶可食性薄膜的制备[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(4): 1-4.
- Ding Ke-yi, LIU Jun, Brown E B, et al. Edible films prepared from microbial transglutaminase modified gelatins[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(4): 1-4. (in Chinese)
- [3] Bigi A, Cozzani G, Panzavolta S, et al. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin[J]. *Biomaterials*, 2002, 23: 4827-4832.
- [4] Ding K Y, Taylor M M, Brown E M. Effect of genipin on the thermal stability of hide powder[J]. *Journal of American Leather Chemists Association*, 2006, 101(10): 362-367.
- [5] Ding K Y, Taylor M M, Brown E M. Genipin-aluminum or -vegetable tannin combination, effect on the thermal stability of hide powder[J]. *Journal of American Leather Chemists Association*, 2007, 102(5): 362-367.
- [6] Sung H W, Huang R N, Huang L H, et al. Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, 42: 560-567.
- [7] Sung H W, Huang R N, Huang L H, et al. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring crosslinking reagent for biological tissue fixation[J]. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 1998, 13: 63-78.
- [8] Sung H W, Huang D M, Chang W H, et al. Gelatin-derived bioadhesives for closing skin wounds: an in vivo study[J]. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 1999, 10: 751-771.
- [9] Ayers S, Sneden T. Caudatosides A-F: new iridoid glucosides from *citharexylum caudatum*[J]. *J Nat Prod*, 2002, 65: 1621-1627.
- [10] Gennadios A, Handa A, Froning G W, et al. Physical properties of egg white-dialdehyde starch films[J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 1297-1302.
- [11] Park J E, Hahn T R, Park Y S. Separation and characterization of water soluble blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits[J]. *Agric Chem Biotechnol*, 2001, 44: 190-193.
- [12] Liang H C, Chang W H, Liang H F, et al. Crosslinking structure of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide[J]. *J of Applied Polymer Science*, 2004, 91: 4017-4026.
- [13] Blass J, Verriest C, Luau A, et al. Monomeric glutaraldehyde as an effective crosslinking reagent for proteins[J]. *Journal of American Leather Chemists Association*, 1976, 71: 121-127.
- [14] Mahmoud R, Savello P A. Solubility and hydrolyzability of films produced by transglutaminase catalytic crosslinking of whey protein[J]. *J Dairy Sci*, 1993, 76: 29-35.

(责任编辑:李春丽)