



مقاله
کامل پژوهشی

فصلنامه مواد و فناوریهای پیشرفته

Journal Homepage: www.jamt.ir

تهیه و مشخصه‌یابی ریزکرات ژلاتین- سدیم آلژینات- جنیپین به روش تشکیل کمپلکس پلی- الکترولیت

مجید رستگار رامشه، علی اصغر بهنام‌قادر*، علی خانلرخانی

پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، مشکین دشت، البرز، ایران

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۳۹۸/۱۰/۱۷
دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۹/۰۱/۱۸
پذیرش قطعی: ۱۳۹۹/۱۲/۱۴

کلیدواژه‌ها:

ریزکرات،
ژلاتین،
سدیم آلژینات،
جنیپین،
پلی‌الکترولیت

چکیده

بسیارهای تخریب‌پذیر زیستی با ماهیت غیرسمی و زیست‌سازگار، در مهندسی بافت و رهایش دارو کاربرد دارند. مصرف ریزذرات بسیار طبیعی، به صورت مستقل یا در ترکیب با مواد دیگر، با کاربردهای گوناگون از جمله زیست‌مواد تزریقی‌پذیر، در حال گسترش است. در این پژوهش، برهم‌کنش بسیاری از زیستی ژلاتین و سدیم آلژینات در ساخت ریزکرات، مطالعه شد. برهم‌کنش این دو بسیار، متأثر از pH، بار الکتریکی و غلظت آن‌ها است و واکنش الکترواستاتیک بین پروتئین‌های با بار مثبت و پلی‌ساکاریدهای آنیونی، منجر به تشکیل فازهای محلول و نامحلول می‌شود؛ بنابراین، تأثیر نسبت مخلوط کلونیدی و pH، در هم‌تابشی بررسی گردید. در ابتدا، وزن مولکولی ژلاتین با روش حلال‌زدایی، باریک شد و رنگ‌نگاری ژل‌تراوایی (GPC)، خروج ژلاتین با وزن مولکولی کم را تأیید کرد. بررسی مایع شناور مخلوط‌های کلونیدی با آزمون طیف‌سنجی مرئی فرابنفش (UV-Vis)، نشان داد که هم‌تابشی بهینه، در نسبت ژلاتین به سدیم آلژینات برابر چهار و pH برابر ۳/۶۵ رخ داده است. طی این فرایند، ریزکرات در اندازه ۱۰ تا ۲۵ میکرومتر با سطوحی صاف تشکیل شد و با افزایش مقدار جنیپین، تمایل به هم‌نشینی ذرات مستقل ریزکرات بیشتر می‌شود. تغییر اندک ژلاتین در طیف دورنگ‌نمایی دورانی (CD)، برهم‌کنش با سدیم-آلژینات را نشان می‌دهد و مشاهده گروه عاملی آمید در طیف‌سنجی فرورسرخ تبدیل فوریه (FTIR) نیز، آن را تأیید می‌کند. نتایج دمانگاشت آزمون DSC، نشان‌دهنده افزایش دمای تخریب ریزکرات دارای مقادیر بیشتر جنیپین بوده است.

<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.214580.1070>

URL: http://www.jamt.ir/article_127693.html

JAMT: Vol. 9, No. 3, (Autumn 2020), 63-78

Preparation and Characterization of Microspheres Based on Gelatin-Sodium Alginate-Genipin by the Formation of Polyelectrolyte Complex

Majid Rastegar Ramsheh, Aliasghar Behnamghader*, Ali Khanlarkhani

Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center (MERC), MeshkinDasht, Alborz, Iran

Paper History:

Received: 2020-01-07
Revised in revised form: 2020-04-06
Accepted: 2021-03-04

Abstract

The Biodegradable polymers with non-toxic and biocompatible nature have applications in tissue engineering and drug delivery. The use of natural polymer microbeads independently or in combination with other materials is gaining ground in various applications including injectable biomaterials. In this research, the interaction of gelatin and sodium alginate biopolymers was investigated in the manufacture of

*عهده دار مکاتبات

نشانی: ایران، البرز، مشکین دشت، پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، تلفن: ۰۲۶-۳۶۲۸۰۰۴۰، دورنگار: -

پیام نگار: a-behnamghader@merc.ac.ir

Please cite this article as: Rastegar Ramsheh, M., Behnamghader, A. A., Khanlarkhani, A., "Preparation and characterization of microspheres based on gelatin-sodium alginate-genipin by the formation of polyelectrolyte complex", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 9, No. 3, (2020), 63-78. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.214580.1070>).

2783-0829/© 2020 The Author(s). Published by MERC. This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Keywords:
Microsphere,
Gelatin,
Na Alginate,
Genipin,
Polyelectrolyte

microsphere. The interaction between these two polymers was influenced by their pH, charge, and concentration. The electrostatic reaction between positively charged proteins and anionic polysaccharides led to the formation of soluble and insoluble phases. Therefore, the effect of pH and colloidal ratio was examined on the Coacervation. First, gelatin molecular weight was narrowed by Desolvation method, and GPC confirmed the elimination of low molecular weight gelatin. The supernatants of colloidal mixtures were analyzed by UV-Vis test, and the results revealed that optimum coacervation occurred at a gelatin/sodium alginate ratio of four and a pH value of 3.65. During this process, microsphere formed with smooth surfaces in a size range of 10-25 μm . An increase in the amount of genipin raised the aggregation tendency in independent microbeads. A slight change of gelatin in Circular Dichroism (CD) reflected the interaction with sodium alginate, which was confirmed by the amide functional group in the Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. Results of Thermogram of Differential Scanning Calorimetry (DSC) indicated an increase in the degradation temperature of microspheres containing higher amounts of genipin.

<https://doi.org/10.30501/jamt.2021.214580.1070>

URL: http://www.jamt.ir/article_127693.html

۱- مقدمه

واکنش‌ها در محلول‌های آبی پروتئین و پلی‌ساکارید،

تحت تأثیر عوامل درونی سامانه، مانند pH، قدرت یونی، تراکم بار الکتریکی، نسبت دو بسپار، غلظت کلی بسپارها و عوامل فرایند، مثل حرارت و فشار قرار می‌گیرند. در غلظت‌های پایین، انحلال هم‌زمان^۴ رخ می‌دهد و با افزایش غلظت، برهم‌کنش‌های تجمعی، گاه به تنهایی و گاه همراه با جدایش فازی، منجر به تشکیل کمپلکس هم‌انباشته^۵ می‌شود [۱۱]. هم‌انباشتی، برهم‌کنش دو بسپار با بار مخالف آنیونی و کاتیونی است که می‌تواند در شرایط مناسب، دچار جدایش فازی شود و فاز غنی از پلی‌الکترولیت، به نام هم‌انباشته تشکیل دهد. فاز هم‌انباشته، به نسبت، کوچک و متراکم و فاز مایع، غنی از بسپار است و با فاز رقیقی با حجم بسیار بزرگ‌تر که به عنوان فاز تعادلی یا فاز مایع شناور^۶ شناخته می‌شود، همراه است [۱۲]. پروتئین‌ها در بالای نقطه ایزوالکتریک (pI \approx 5) اغلب، بار منفی دارند. بنابراین، در pH زیر این نقطه، می‌توانند با پلی‌ساکاریدهای با بار منفی (pKa \approx 3)، برهم‌کنش الکترواستاتیک داشته باشند [۱۳].

پژوهش‌هایی پیرامون این موضوع انجام شده است. خلیل^۷، به منظور کپسوله کردن بیفیدوباکتریوم^۸، سدیم-آلژینات^۹ - جنپین^{۱۰} - ژلاتین^{۱۱} را به ترتیب با ژلاتین خوکی [۱۴] و ماهی [۱۵] ترکیب کرد. یون^{۱۲}، برای افزایش استحکام فیلم‌های ژلاتین-سدیم آلژینات از جنپین به عنوان اتصال‌دهنده عرضی استفاده کرد [۱۶]. همچنین دوی^{۱۳} و همکاران نشان

در دهه‌های اخیر، پژوهشگران علاقه فراوانی به طراحی و بهینه‌سازی سامانه‌های چندفازی بسپارهای^۱ طبیعی، همچون پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها از خود نشان داده‌اند [۱ و ۲]. کنترل و مدیریت برهم‌کنش این درشت‌مولکول‌ها، می‌تواند عاملی در توسعه فرایندهای نوین سنتز این مواد از قبیل ریزذرات باشد. به طور عمده برهم‌کنش این دو بسپار، الکترواستاتیک و از نوع جاذبه است که در ابتدا به صورت کمپلکس‌های محلول درون‌بسپاری و با پیشرفت فرایند و کاهش pH، به صورت کمپلکس‌های میان‌بسپاری و در نهایت، به صورت فازی غنی یا توده‌شده از دو بسپار تشکیل می‌شود [۳].

ریزذرات، ذرات جامد یا پراکنده با اندازه‌ای در محدوده ۱ تا ۱۰۰۰ میکرومتر [۴] و شامل ریزکپسول‌ها و ریزکرات^۲ هستند. گردش مالی ریزکرات در سال ۲۰۱۶ حدود ۳/۹۸ میلیارد دلار بوده است و انتظار می‌رود این رقم تا سال ۲۰۲۲ به ۶/۶۸ میلیارد دلار برسد و نرخ رشد ترکیب سالانه^۳ را از ۲۰۱۷ تا ۲۰۲۲، به ۹/۰۲ درصد افزایش دهد [۵]. از بسپارهای مصنوعی و طبیعی فراوانی، به منظور آماده‌سازی میکروذرات و نانوذرات استفاده می‌شود [۶ و ۷]. بسپارهای طبیعی نسبت به بسپارهای مصنوعی، مزیت‌های فراوانی دارند که می‌توان به غیرسمی بودن، زیست‌تخریب‌پذیری بودن و زیست‌سازگار بودن اشاره کرد [۸-۱۰]. از جمله کاربردهای این ذرات، تهیه پودر، انتقال دارو و فاز حامل ماده معدنی در خمیرهای تزریقی‌پذیر است.

⁴ Co-Solubility

⁵ Coacervation

⁶ Supernatant

⁷ Khalil

⁸ Bifidobacterium

⁹ Sodium Alginate

¹⁰ Genipin

¹¹ Gelatin

¹² Yun

¹³ Devi

¹ Polymers

² Microsphere

³ Compound Annual Growth Rate

۲-۱-۲- تهیه ریزکرات ژلاتین - سدیم آلزینات

ترکیب ژلاتین و سدیم آلزینات (ویسکوزیته ≥ 2000 سانتی‌پواز در 25 درجه سلسیوس با نسبت $M/G=1/56$ ، سیگما آلدریج) در نسبت‌های مختلف آماده و تغییرات pH (Metrohm، سوئیس)، در محیط آبی اندازه‌گیری شد و از نظر هم‌انباشتی بررسی شدند. از مخلوط سورفکتانت‌های Tween 80 (مرک) و Span 80 (مرک) با HLB برابر 7 با استفاده از رابطه (1) و جنیبن به غلظت یک درصد وزنی/ حجمی (خلوص 98 درصد، Challenge Bioproducts، تایوان)، برای تهیه ریزکرات در محیط روغنی به شرح طرح‌واره شکل (1) استفاده شد.

تمامی مراحل بر روی همزن مکانیکی (IKA، آلمان) و در دمای (1 ± 50) درجه سلسیوس انجام شد. در انتها، روغن ریزکرات با استون، حذف و خشک‌سازی انجامی با خشک‌کن انجامی⁶ (مدل FD15، ایران) انجام شد.

جدول 1. نام‌گذاری نسبت‌های مختلف ژلاتین - سدیم آلزینات با

اتصال‌دهنده عرضی و بدون اتصال‌دهنده عرضی

نام‌گذاری	A: سدیم- آلزینات (درصد وزنی)	G: ژلاتین (درصد وزنی)	C: اتصال‌دهنده عرضی (میلی- مول بر گرم)
A1G1	1	1	0
A1G2.25	1	2/25	0
A1G3	1	3	0
A1G3.5	1	3/5	0
A1G4	1	4	0
A1G4.75	1	4/75	0
A1G4C0.1	1	4	0/1
A1G4C0.5	1	4	0/5

رابطه (1). محاسبه HLB از ترکیب دو امولسیون‌کننده A و B

$$\% (A) = \frac{100 (X - HLB_{(B)})}{HLB_{(A)} - HLB_{(B)}}$$

$$\% (B) = 100 - \% (A)$$

دادند که شرایط بهینه تشکیل کمپلکس ژلاتین - سدیم آلزینات، در نسبت 3/5 به 1 با pH برابر 3/7 قرار دارد [17]. در این پژوهش‌ها، به سورفکتانت کمکی برای حصول به موازنه آب-دوستی - چربی‌دوستی¹ (HLB) متناسب با روغن و تغییر ساختار پروتئین درحین واکنش اشاره‌ای نشده است. در تحقیق حاضر، برای تهیه ریزکرات به روش پلی‌الکترولیت، از ژلاتین، سدیم آلزینات، جنیبن و به‌طور خاص، ترکیب دو سورفکتانت، در رسیدن به HLB مطلوب، بهره‌گیری شد. با حلال‌زدایی، ژلاتین با وزن مولکولی پایین جدا گردید و خروج آنها با رنگ‌نگاری ژل‌تراوایی² (GPC) بررسی شد و تغییرات ساختار فضایی ژلاتین در واکنش با سدیم آلزینات، در آزمون طیف-سنجی دورنگ‌نمایی دورانی (CD) تحلیل شد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱-۲- فرایند تهیه ریزکرات ژلاتین - سدیم آلزینات به روش

تشکیل کمپلکس پلی‌الکترولیت

۲-۱-۱- آماده‌سازی ژلاتین با وزن مولکولی باریک

در بسیاری از بسپارها، توزیع وزن مولکولی باریک³، رفتار آن را قابل پیش‌بینی می‌کند. ژلاتین در این پژوهش، از نوع A (پوست خوک با درجه بلوم 300، متوسط جرم مولکولی: 50000 تا 100000، سیگما آلدریج) بود که وزن مولکولی آن با استفاده از استون (خلوص: 99/5 درصد، مرک) به روش حلال‌زدایی⁴، باریک شد [18] تا رفتار آن، کمتر تحت تأثیر مقادیر متفاوت وزن مولکولی قرار گیرد. پس از ته‌نشینی⁵ ژلاتین با وزن مولکولی بالا، محلول باقی‌مانده، سانتریفیوژ (یونیورسال مدل PIT320، قطران شیمی، ایران) شد و مایع شناور، در آزمون طیف‌سنجی مرئی فرابنفش ارزیابی گردید. با انحلال دوباره ژلاتین و انجام مجدد این فرایند، رسوب نهایی برای تهیه ریزکرات استفاده شد. به‌منظور جداسازی استون، ظرف حاوی ذرات ژلاتین، در آن 40 درجه سلسیوس قرار گرفت.

¹ Hydrophilic-Lipophilic Balance

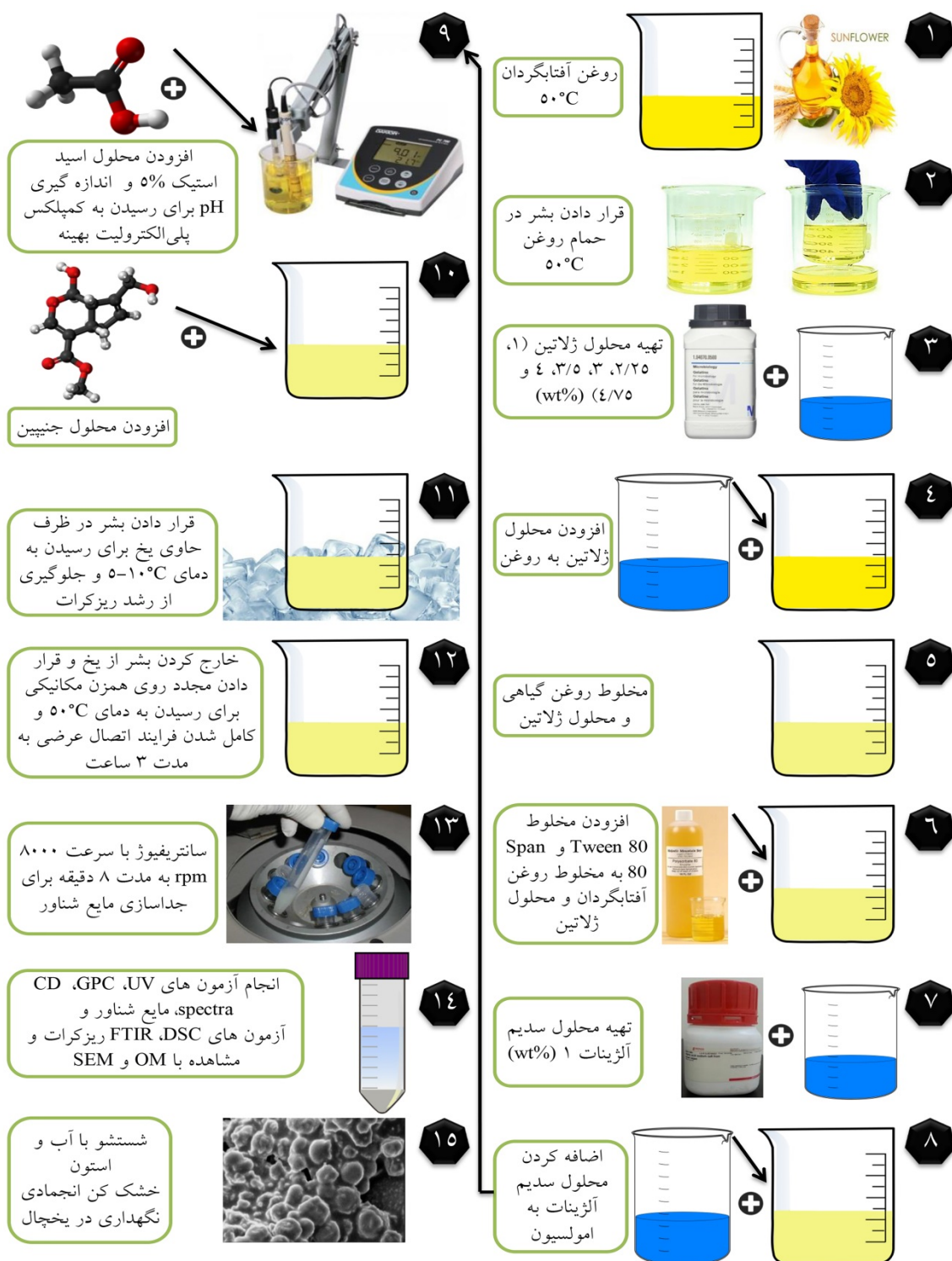
² Gel Permeation Chromatography

³ Narrow

⁴ Desolvation

⁵ Sedimentation

⁶ Freeze Dryer



شکل 1. فرایند آماده‌سازی ریزکرات ژلاتین-سدیم آلژینات به روش تشکیل کمپلکس پلی الکترولیت

۲-۲-۲- مشخصه یابی

۲-۲-۱- طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش¹ (UV-vis)

برای بررسی وجود ژلاتین در محلول شناور حاصل از حلال‌زدایی با نسبت‌های مختلف دو بسپار، از طیف‌سنج نوری

۲-۲-۲- رنگ‌نگاری ژل‌تراوایی (GPC)

اندازه‌گیری متوسط وزن مولکولی ژلاتین خارج‌شده از روش حلال‌زدایی، با دستگاه شیمادزو LC-20A و ستون ژل

¹ Ultraviolet-Visible Spectroscopy

۲-۲-۵- طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)^۷

شناسایی گروه‌های عاملی موجود در نمونه‌های ژلاتین-سدیم آلژینات و ترکیب آن‌ها، با طیف‌سنجی فروسرخ در محدوده طیف $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ ، به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر BRUKER مدل VECTOR 33 و پودر برمید پتاسیم به‌عنوان ماده حامل، انجام شد.

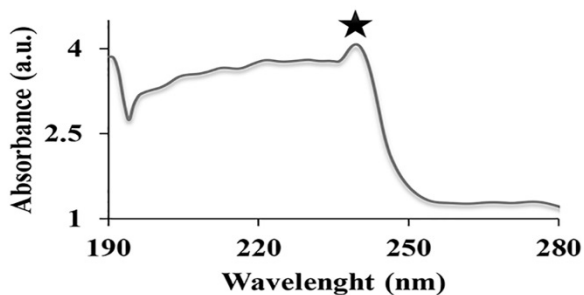
۲-۲-۶- آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)^۸

شکل و اندازه ذرات تولیدشده، با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و ولتاژ کاری ۱۵ کیلوولت بررسی شد. پوشش‌دهی نمونه‌ها به کمک لایه نازکی از طلا انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش و رنگ‌نگاری ژل-تراوایی مایع شناور حاصل از حلال‌زدایی ژلاتین

برای شناسایی اسیدهای آمینه، از طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش در طول موج $190-400$ نانومتر استفاده شد. جذب گروه‌های رنگ‌بر^۹ در $240-210$ نانومتر، مشخصه پیوند پپتیدی در مولکول ژلاتین است [۱۹ و ۲۰] و قله جذبی ژلاتین در 239 نانومتر (شکل ۲) مشاهده شد.



شکل ۲. جذب در مایع شناور حاصل از رسوب ژلاتین روش حلال‌زدایی

ژلاتین استفاده‌شده در این آزمون، دارای متوسط جرم مولکولی $100000-50000$ دالتون بود. مایع شناور جمع‌آوری‌شده از مرحله اول حلال‌زدایی، به نسبت رسوب حاصل، وزن پایین‌تری دارد. طبق داده‌های جدول (۲)، وزن

رنگ‌نگاری Ultrahydrogel 250 با استاندارد ASTM D5296 در دمای 40 درجه سلسیوس و نرخ جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه با فاز متحرک استونیتریل/نیترات سدیم $0/1$ مولار انجام شد.

۲-۲-۳- طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی (CD)^۱

مطالعه تغییرات کیفی و کمی ساختار دوم پروتئین، با اسپکتروپلاریمتری^۲ انجام می‌شود که برهم‌کنش بزرگ مولکول‌ها را با نور قطبیده چپ‌گرد و راست‌گرد، اندازه‌گیری می‌کند. pH نمونه‌های آزمایش‌شده، بین $3/9$ تا $4/9$ قرار داشت و از محلول‌هایی با غلظت $0/1$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با دمای 25 درجه سلسیوس در ترکیب‌ها استفاده شد. ابتدا دستگاه، کالیبره و از کووت^۳ کوارتز با قطر 1 میلی‌متر و حجم 160 میکرولیتر با طول مسیر عبور نور معادل $0/5$ سانتی‌متر استفاده شد. نتایج براساس واحد بیضی‌واری مولی^۴ گزارش شد. طیف دورنگ-نمایی دورانی (CD) با دستگاه اسپکتروپلاریمتر (مدل Aviv 215) در محدوده فرابنفش دور (رویش طیف $190-260$ نانومتر) و فواصل 1 نانومتر ثبت شد. سرعت روبش طول‌موج، توسط تک‌فام‌ساز نشری، 120 نانومتر بر دقیقه بود. بدون تغییر در شکل کلی، اغتشاشات موجود در نتایج طیف‌های حاصل از خط پایه، اصلاح و پردازش^۵ شد.

۲-۲-۴- گرماسنجی پویشی تفاضلی (DSC)^۶

این آزمون برای ترکیبات ژلاتین-سدیم آلژینات با شبکه‌ای‌ساز جنیپین و بدون شبکه‌ای‌ساز جنیپین، به وسیله دستگاه Mettler Toledo مدل DSC 1 پس از کالیبره شدن با ایندیوم انجام شد. نمونه‌ها به وزن $0/1 \pm 7$ میلی‌گرم در قالب آلومینیومی و با استفاده از محیط نیتروژن خشک، در محدوده 30 تا 400 درجه سلسیوس و نرخ حرارتی 10 درجه سلسیوس بر دقیقه، حرارت داده شدند.

¹ Circular Dichroism Spectrometer

² Spectropolarimetry

³ Cuvettes

⁴ Molar Ellipticity

⁵ Smoothing

⁶ Differential Scanning Calorimetry

⁷ Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

⁸ Scanning Electron Microscope

⁹ Chromophore

بار کلی اسیدآمین مثبت است و با افزایش غلظت پروتئین و انحلال در آب، یون H^+ محیط، جذب گروه کربوکسیل و آمین می‌شود و pH، اندکی تغییر می‌کند. یافته‌های جدول (۳) نشان داد در غلظت ثابت سدیم آلژینات، با افزایش ژلاتین، pH کاهش و در غلظت ثابت ژلاتین، با افزایش سدیم آلژینات، pH افزایش یافت و از اسیدیته محیط کم شد. در pH حدود ۷، گروه‌های کربوکسیل ($-COOH$) حاضر در ژلاتین و سدیم آلژینات به (COO^-) تغییر می‌یابند و در اثر دافعه آنیونی- آنیونی، انحلال آن‌ها افزایش می‌یابد. کمترین انحلال نیز در pH حدود ۵/۵-۲/۵ رخ می‌دهد [۲۲] که با کاهش pH به زیر ۲/۵، گروه‌های $-NH_2$ پروتون از دست داده و یونیزه می‌شوند. از این رو، دافعه الکترواستاتیک بارهای مشابه، علت اصلی انحلال دوباره می‌باشد [۲۳]. در نسبت‌های وزنی ژلاتین به سدیم آلژینات، از ۵/۵ تا حداکثر ۲۰ درصد توده‌های هم‌انباشته مشاهده شد و بقیه ترکیبات، فاقد توده‌های ماکروسکوپی بود. نتیجه می‌شود که نسبت بالاتر بسپارهای زیستی، منجر به تعامل بیشتر میان-مولکولی و افزایش اندازه توده‌ها می‌شود. مطالعات دوی، این نتیجه را تأیید می‌کند [۱۷].

جدول ۳. pH نسبت‌های مختلف ژلاتین- سدیم آلژینات (درصد وزنی / حجمی) با دمای 50 ± 1 درجه سلسیوس در محیط آبی

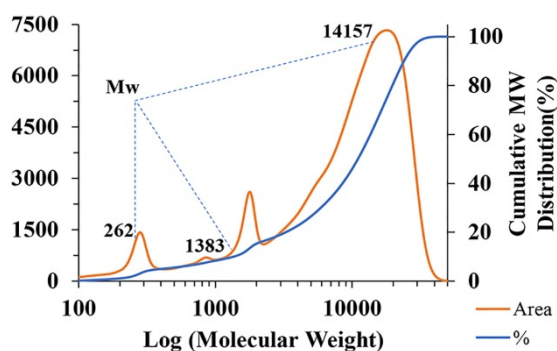
ژلاتین (درصد وزنی / حجمی)						سدیم آلژینات (درصد وزنی / حجمی)
۶	۵	۳/۵	۲	۱	۰	
۴/۸۸	۴/۸۹	۴/۸۹	۴/۸۵	۴/۸۴	۷	۰
۴/۹	۴/۸۶	۴/۸۹	۴/۸۶	۴/۹۳	۶/۹۹	۰/۰۱
۴/۹۳	۴/۸۹	۴/۹۲	۴/۹۶	۵/۱	۶/۹۸	۰/۰۵
۴/۹۵	۴/۹۹	۵/۰۱	۵/۱۱	*۵/۴۸	۶/۹۶	۰/۱
۵/۰۱	۵/۰۴	۵/۱۶	۵/۳۶	۵/۵۲	۶/۷۹	۰/۲
۵/۰۸	۵/۱۳	۵/۲۷	۵/۴۹	۵/۶۱	۶/۶۳	۰/۳
۵/۱۵	۵/۱۸	۵/۳۷	۵/۵۱	۵/۶۶	۶/۵۶	۰/۴
۵/۲	۵/۲۹	۵/۴۱	۵/۵۳	۵/۷۶	۶/۴۹	۰/۵
۵/۲۵	۵/۳	۵/۴۲	۵/۵۴	۵/۷۹	۶/۴۷	۰/۶
۵/۲۸	۵/۳۳	۵/۴۶	۵/۵۷	۵/۸۳	۶/۴۵	۰/۷
۵/۲۸	۵/۳۴	۵/۴۶	۵/۵۸	۵/۸۶	۶/۳۴	۰/۸
۵/۳۱	۵/۳۶	۵/۴۲	۵/۵۹	۵/۹۲	۶/۲۵	۰/۹
۵/۲۷	۵/۳۴	۵/۴۲	۵/۵۷	۵/۹۲	۶/۲۳	۱

* خانه‌های مشکی نشان‌دهنده تشکیل توده‌های ماکروسکوپی است.

مولکولی متوسط وزنی ژلاتین خارج‌شده در زمان‌های بازداری مختلف، حدود ۲۶۲، ۱۳۸۳ و ۱۴۱۵۷ گرم بر مول می‌باشد که به ترتیب ۱۸، ۱۶ و ۶۶ درصد ژلاتین خارج‌شده را شامل می‌شود. با خروج ژلاتین در محدوده وزنی ۱۴۱۵۷-۲۶۲ گرم بر مول، ژلاتین باریک‌شده فاقد مولکول‌هایی با وزن پایین است و انتظار می‌رود ترکیبات حاوی این ژلاتین، در دمای ذوب، ژلی شدن، ویژگی‌های مکانیکی و G' (مدول برشی ذخیره)، رفتار یکنواخت‌تری از خود نشان دهد [۲۱]. حذف این مولکول‌ها قبل از پیوند عرضی؛ با بهبود در پایداری شکل ذرات؛ مانع از تشکیل توده می‌شود و از تجمع بیشتر ذرات حین نگهداری نیز جلوگیری می‌کند [۱۸].

جدول ۲. تغییرات Mw, Mn, Mz و PDI ژلاتین خارج‌شده از A1G4 در زمان‌های بازداری مختلف

متغیر (گرم / مول)	زمان بازداری (ثانیه)		
	۳۶۰	۵۱۰	۶۵۰
وزن مولکولی متوسط عددی (Mn)	۹۴۷۱	۱۱۴۶	۲۳۳
وزن مولکولی متوسط وزنی (Mw)	۱۴۱۵۷	۱۳۸۳	۲۶۲
وزن مولکولی متوسط (Mz)	۱۸۳۸۹	۱۵۶۶	۲۸۴
توزیع وزن مولکولی (PDI)	۱/۴۹	۱/۲	۱/۱۲



شکل ۳. رنگ‌نگار توزیع تجمعی وزن مولکولی ژلاتین مایع شناور حاصله از اولین مرحله حلال‌زدایی

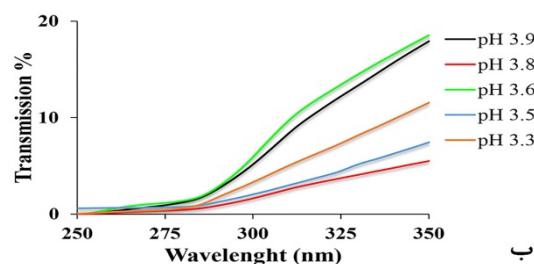
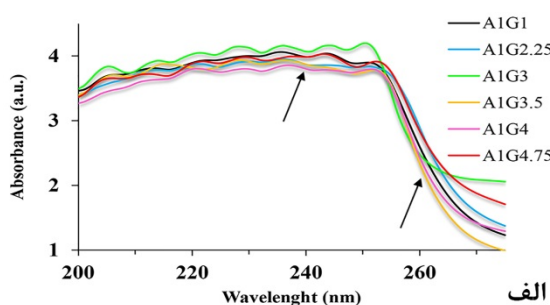
۳-۲- pH ترکیب‌های محلول ژلاتین- سدیم آلژینات در دو محیط آبی و روغن آفتابگردان

جهت ارزیابی رفتار بسپارها قبل از اختلاط در محیط روغنی، pH آن‌ها در محیط آبی بررسی شد. افزایش سدیم-آلژینات و انحلال در آب، موجب افزایش یون H^+ حاصل از گروه کربوکسیل و کاهش pH محیط می‌شود. در pH اسیدی،

بازده هم‌انباشته بهینه نیز، در پنج pH اندازه‌گیری شد (شکل ۴ ب) که بالاترین بازده در pH برابر ۳/۷۵ مشاهده شد.

۳-۴- ارزیابی تغییرات صورت‌بندی پروتئین در برهم‌کنش با پلی‌ساکارید با طیف‌سنجی دو رنگ‌نمایی دورانی

صورت‌بندی پروتئین‌ها با هرگونه تغییری، از جمله شرایط شیمی فیزیکی و اتصال، می‌تواند بر طیف‌های مرئی - فرابنفش و دورنگ‌نمایی دورانی تأثیر بگذارد، از این رو، آزمایش طیف‌سنجی دورانی، بر درک کلی از چگونگی واکنش‌های پروتئین - پلی‌ساکارید، مؤثر است.



شکل ۴. آزمون UV، الف) ترکیب نسبت‌های مختلف ژلاتین به سدیم آلژینات یک درصد در pH برابر ۳/۷۵، ب) ترکیب ژلاتین - سدیم آلژینات با نسبت ۴ به ۱ در pH های متفاوت

کلاژن خالص، دو باند منفی و مثبت را به ترتیب در ۱۹۸~ و ۲۲۱~ نانومتر نشان داد [۲۹ و ۳۰]. طیف‌های CD ژلاتین نیز، دو قله را نشان می‌دهند، قله منفی در محدوده ۲۰۸ نانومتر و قله مثبت در محدوده ۲۳۰ نانومتر که به ترتیب مربوط به صورت‌بندی مارپیچ تصادفی و مارپیچ سه‌گانه ژلاتین است [۳۱]. این قله مثبت با حداکثر قله کلاژن در ۲۲۱~ نانومتر، مطابقت دارد [۳۲-۳۴]. نسبت میزان شدت قله مثبت در ۲۲۰ نانومتر به میزان شدت قله منفی در ۱۹۸ نانومتر $(R_{pp})^1$ ، معیار مناسبی از محتوای ویژگی صورت‌بندی مارپیچ سه‌گانه کلاژن

شیندی^۱ و ناگارسنکر^۲ [۲۴] نشان دادند pH بهینه حاوی بیشترین کمپلکس پلی‌الکترولیت، در محدوده ۴-۳/۵ است. در پژوهش ساراوانان^۳ [۲۵]، القاء هم‌انباشتی‌های پکتین - ژلاتین با پنج اسید و هم‌انباشتی ژلاتین - سدیم آلژینات تنها با اسید استیک انجام گرفت که فقط هم‌انباشتی با اسید استیک مشاهده شد. براساس این گزارش، سایر اسیدها نیز باعث رسوب شدند که می‌تواند به علت ته‌نشینی اسید آلژینیک آزاد نامحلول در آب از محلول سدیم آلژینات، هنگام افزودن اسید قوی مانند اسیدکلریدریک باشد؛ در نتیجه، قادر به تشکیل کمپلکس با ژلاتین نیست. در این پژوهش، اسید استیک ۵ درصد حجمی / حجمی (خلوص ۹۹/۸۵ درصد، مرک) به محیط آب و روغن اضافه شد تا با کاهش pH به ۳/۷۵ نسبت به نقطه ایزوالکتریک پروتئین و افزایش بار مثبت آن، شرایط مناسب‌تری برای برهم‌کنش بسپارها به وجود آید. همه نمونه‌ها با pH برابر ۳/۷۵، ده دقیقه در ۵۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند و مایع شناور آن‌ها برای آزمایش UV و تعیین درصد بهینه ترکیب ژلاتین - سدیم آلژینات، جدا شدند.

۳-۳- تعیین نسبت و pH بهینه نمونه ژلاتین - سدیم آلژینات

در ترکیب‌های ژلاتین - سدیم آلژینات، محلول با شدت جذب‌های^۴ متفاوتی مشاهده شد. نسبت بهینه، محلولی با حداقل جذب و حداکثر هم‌انباشتی است. محلول در مقادیر بالاتر سدیم آلژینات، گرانبوی بیشتری داشت که منجر به جدایش ضعیف و کاهش بازده شد. با افت pH به کمتر از ۴، بار آنیونی سدیم آلژینات کاهش و بار مثبت پروتئین افزایش می‌یابد؛ بنابراین برای موازنه برهم‌کنش با ژلاتین، سدیم آلژینات کمتری نیاز است [۲۵]. جذب مایع‌های شناور در pH برابر ۳/۷۵، با دو تکرار در ۱۱۰۰-۱۹۰ نانومتر در کووت ۱ سانتی-متر اندازه‌گیری شد. جذب اختصاصی ژلاتین، سدیم آلژینات و جینیین به ترتیب ۲۴۰، ۲۶۰ و ۲۴۰ نانومتر می‌باشد [۱۹ و ۲۶] و [۲۷]. برهمین‌اساس، نتایج آزمون UV، نسبت بهینه ژلاتین - سدیم آلژینات را ۴ به ۱ [۲۴] و سپس ۳/۵ به ۱ [۲۸] تأیید می‌کند (شکل ۴ الف). همچنین تأثیر تغییر pH بر میزان درصد

¹ Shinde

² Nagarsenker

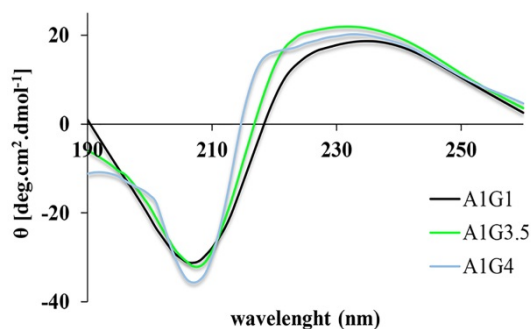
³ Saravanan

⁴ Absorbance

⁵ Conformation

⁶ Ratio of Positive to Negative Peaks

مربوط می‌باشد [۴۶]. پیوند عرضی ژلاتین- جنینین، از طریق حمله هسته‌دوست گروه‌های آمین نوع اول لیزین به کربن سوم در ساختار حلقوی جنینین شکل می‌گیرد [۴۷ و ۴۸] و نتیجه‌ی آن، باز شدن حلقه دی‌هیدروپیران و تشکیل آمین نوع سوم است. متعاقب آن، واکنشی آهسته‌تر منجر به فرایند پیوند عرضی با واکنش از نوع جانشینی هسته‌دوست توسط گروه آمین لیزین از باقی‌مانده ساختار ژلاتین می‌شود. مرحله پایانی تشکیل ماده پیوند عرضی شده، دوپاره‌سازی^۲ به واسطه واکنش-های رادیکالی و پیوند عرضی درون‌مولکولی و بین‌مولکولی جنینین حاوی ساختار هتروسیکلیک با گروه‌های آمین I پروتئین‌ها می‌باشد.



شکل ۵. مقایسه ساختار دوم ژلاتین مایع شناور نسبت‌های مختلف ژلاتین- سدیم‌آلژینات با استفاده از طیف دو رنگ‌نمایی دورانی در ناحیه ۱۹۰-۲۴۰ نانومتر، واحد بیضی‌واری ($\text{deg cm}^2\text{dmol}^{-1}$)

پژوهش سانداراواگان^۳ [۴۹] نشان می‌دهد؛ قرارگیری ۲۴ ساعته سلول‌های فیبروبلاست L929 در معرض یک واحد میلی‌مول جنینین، سمیت سلولی خفیفی به وجود می‌آورد، درحالی‌که ۵ و ۱۰ میلی‌مول، باعث تعداد قابل‌توجهی مرگ سلولی می‌شود. اتصال عرضی ریزکپسول‌های ژلاتین- چیتوسان نیز توسط حسین و همکاران [۵۰] با افزودن جنینین به میزان ۰/۳-۰/۱ میلی‌مول بر گرم بسیار انجام شده است. در پژوهش حاضر، برای پیوند عرضی از محلول جنینین یک درصد، به میزان ۰/۱ میلی‌مول بر گرم استفاده شد. به این منظور، پودر جنینین به حلال دی‌متیل سولفوکساید^۴ (خلوص ۹۹ درصد، مرک) اضافه شد.

در محلول است. واسپرستی^۱ نسبی کلاژن، طیفی با شدت کمتر در حدود ۲۲۱ نانومتر و همچنین مقدار پایین‌تری از R_{pn} را نشان می‌دهد [۳۵ و ۳۶]. افزایش R_{pn} نشان‌دهنده تجمع مولکول‌های کلاژن است [۳۷ و ۳۸]. در این آزمون، مقدار نقطه صفر بیضی‌واری، ۲۱۹-۲۱۴ نانومتر (شکل ۵) و R_{pn} برابر ۰/۷۱-۰/۴۹ (جدول ۴)، از مقدار گزارش شده برای کلاژن خالص در محدوده R_{pn} (۰/۱۳-۰/۱۰)، بیشتر بود [۳۹]. به تغییر ساختار پروتئین در اثر حضور عوامل خارجی، توجه شده است. برای مثال، می‌توان به افزایش Cr^{3+} تا غلظت ۲۷۵ میکرومول بر گرم کلاژن و عدم تخریب آن [۳۷] و تأثیر سولفات‌های آلومینیم و کروم در حضور فیبریل‌های کلاژن نوع I و تغییرات ساختاری در آن اشاره کرد که افزایش Al^{3+} ، پایداری کلاژن را کاهش می‌دهد؛ درحالی‌که، افزایش Cr^{3+} موجب کاهش پیوند هیدروژنی و افزایش آب‌گریزی پروتئین می‌گردد [۳۶]. آلژینات نیز، موجب تغییری اندک در ساختار دوم ژلاتین می‌گردد. مقادیر بالاتر سدیم‌آلژینات، افزایش R_{pn} بیشتری را نشان داد که می‌توان آن را به غلظت پایین‌تر ژلاتین و جمع شدن و انباشتگی بیشتر ماریچ سه‌گانه ژلاتین، مرتبط دانست. بیشترین و کمترین تغییر به ترتیب در A1G2.25 و A1G4.75 دیده می‌شود. در نمونه‌هایی با R_{pn} پایین‌تر، ممکن است برهم‌کنش ژلاتین- سدیم‌آلژینات در سطح مولکول ژلاتین باشد و ساختار بن ماریچ سه‌گانه ژلاتین، بعد از پیوند با سدیم‌آلژینات حفظ شود و تغییر صورت‌بندی در آن جدی نباشد. حفظ صورت‌بندی ماریچ سه‌گانه ژلاتین یا زیست-موادهای پایه کلاژن حین آماده‌سازی، در عملکرد موردنظر مهم است [۴۰].

۳-۵- افزودن پیونددهنده عرضی و واکنش با پروتئین

افزودن پیونددهنده عرضی، موجب تراکم در شبکه بسپارها و افزایش استحکام ساختاری آن‌ها می‌شود [۴۱]. جنینین، پیونددهنده عرضی با زیست‌سازگاری بالا و سمیت سلولی پایین است [۴۲] که توان بسپارش دارد [۴۳] و در حضور اکسیژن، باعث پیوند عرضی گروه‌های آمین و تولید رنگدانه‌های آبی تیره می‌شود [۴۴ و ۴۵]. غلظت رنگ محلول، به‌طور مستقیم به نسبت جنینین و مدت‌زمان پیوند عرضی،

² Dimerization

³ Sundararaghavan

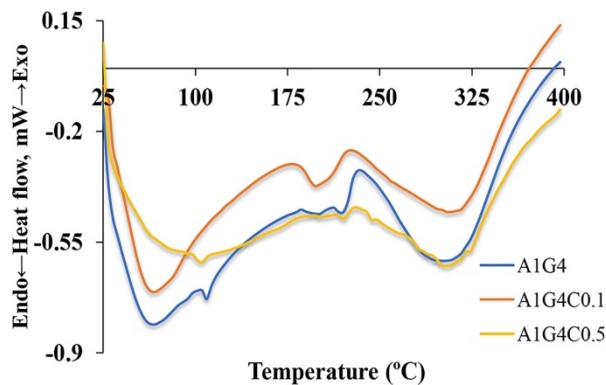
⁴ Dimethyl Sulfoxide

¹ Denaturation

جدول ۴. مقادیر طول‌موج و R_{pn} ترکیبات ژلاتین- سدیم آلزینات

$R_{pn} \pm 0.01$	بیشینه بیضی‌واری			تقاطع	کمینه بیضی‌واری			نمونه
	CD		λ [nm]		CD		λ [nm]	
	[deg.cm ² .dmol ⁻¹]	[mdeg]			[deg.cm ² .dmol ⁻¹]	[mdeg]		
۰/۶۰	۰/۳۱۹	۱۸/۶	۲۳۵	۲۱۸	-۰/۵۳۴۹۳	-۳۱/۲	۲۰۷	A1G1
۰/۷۱	۰/۴۲۹۴	۲۵/۱	۲۳۴	۲۱۹	-۰/۶۰۱۵۵	-۳۵/۱	۲۰۸	A1G2.25
۰/۶۸	۰/۳۷۵۵	۲۱/۹	۲۳۲	۲۱۷	-۰/۵۴۸۶۴	-۳۲/۰	۲۰۸	A1G3.5
۰/۵۶	۰/۳۴۵۳	۲۰/۲	۲۳۳	۲۱۴	-۰/۶۱۰۶۹	-۳۵/۶	۲۰۷	A1G4
۰/۴۹	۰/۲۳۲۶	۱۳/۶	۲۳۶	۲۱۹	-۰/۴۷۶۹۹	-۲۷/۸	۲۰۷	A1G4.75

درجه سلسیوس نشان می‌دهد. دره پهن گرماگیر در محدوده ۱۰۰-۶۰ درجه سلسیوس مربوط به خروج آب از ریزکرات است. رویداد دوم حرارتی، شامل شکستن زنجیره‌های پروتئین و گسیختگی پیوندهای پپتیدی است [۵۲] که در دره حدود ۳۰۰ درجه سلسیوس مشاهده می‌شود. صورت‌بندی ماریپچ آلفا در دماهای کمتر از ۴۰ درجه سلسیوس وجود دارد و افزایش دما، منجر به تضعیف پیوندهای بین‌مولکولی و تبدیل آن به صورت‌بندی ماریپچ تصادفی می‌شود [۵۳].



شکل ۶. دمانگاشت DSC ریزکرات A1G4 با مقادیر متفاوت جنپین در نرخ حرارت‌دهی ۱۰ درجه سلسیوس بر دقیقه

پایداری ساختار ماریپچی در ژلاتین به محتوای کل آمینواسیدهای پرولیدین، نواحی غنی از پرولین و هیدروکسی-پرولین، وابسته است؛ زیرا هیدروکسی‌پرولین و پرولین مسئول پایداری ساختار ماریپچ سه‌گانه کلاژن [۵۴] و ژلاتین [۵۵] از طریق پیوند هیدروژنی بین مولکول آب آزاد و گروه هیدروکسیل هیدروکسی‌پرولین است. اتصال عرضی ژلاتین، از حرکت زنجیره‌های صفحات بتا و ماریپچ آلفا جلوگیری

۳-۶- گرماسنجی پوشی تفاضلی (DSC)

مطالعات دمانگاشت DSC، جهت ارزیابی برهم‌کنش الکترواستاتیک ژلاتین- سدیم آلزینات و پیوند عرضی آن انجام شد. منحنی، دو دره گرماگیر تبخیر آب و ذوب نمونه و قله گرمازای تخریب بسپارها را نشان می‌دهد؛ بنابراین تخریب نمونه و تغییرات حاصل از آن بر دمانگاشت، از دو جنبه؛ ابتدا اثر ژلاتین و سپس سدیم آلزینات؛ بررسی گردید.

بسپارهای طبیعی و مصنوعی حاوی گروه‌های آب‌دوست (مثل -CONH-)، برهم‌کنش‌های قدرتمندی با آب دارند که این رطوبت می‌تواند در ویژگی آن‌ها و مشخصه‌یابی مهم باشد [۵۱]. آب در پیوند با ژلاتین به سه صورت وجود دارد:

۱. مولکول‌های آب که با انرژی زیاد گروه‌های جاذب در داخل ساختار ماریپچ هستند.
۲. مولکول‌های آب خارج از ساختار ماریپچ که به‌واسطه گروه‌های قطبی ژلاتین و با پیوند هیدروژنی، غیرمتحرک شده‌اند.
۳. لایه‌های چندگانه آب که به‌صورت رطوبت تشکیل شده‌اند.

به‌طورکلی، پایداری ساختار ماریپچ سه‌تایی، وابسته به مجموعه پیوندهای هیدروژنی است که باعث جذب آب در مولکول می‌شوند.

دما مؤلفه‌ای است که بر صورت‌بندی ژلاتین اثرگذار است. یافته‌های دمانگاشت شکل (۶)، انرژی فرایند واکنش‌های گرماگیر، شامل باز شدن پیوند هیدروژنی و بازآرایی ماریپچ سه‌گانه به صورت‌بندی ماریپچ تصادفی را در بازه ۴۰-۲۵

تبخیر می‌گردد، به صورت‌های زیر دیده می‌شود [۶۲]:

۱. آب آزاد در ۶۰-۴۰ درجه سلسیوس؛

۲. آب پیوندی با گروه‌های هیدروکسیل تا ۱۲۰ درجه سلسیوس؛

۳. آب مرتبط با گروه‌های -COO- تا ۱۶۰ درجه سلسیوس.

تخریب سدیم‌آلژینات به شکل دهیدراتاسیون حلقه‌های ساکارید، شکستن پیوندهای گلیکوزیدی (C-O-C) زنجیره اصلی پلی‌ساکارید، دکربوکسیلاسیون، دکربونیل‌اسیون و شکستن پیوندهای C-H [۶۳] دلیلی بر قله گرمای تخریب است. یافته‌ها با مشاهدات سارمنتو^۳ [۶۴] و آنبندر^۴ [۶۵] به ترتیب در ۲۴۰ و ۲۴۷ درجه سلسیوس هماهنگی دارد. تشکیل کربنات سدیم و شکل‌گیری دیگر مواد کربناته نیز در بالاتر از ۳۰۰ درجه سلسیوس رخ می‌دهد [۶۶].

۳-۷- برهمکنش ژلاتین- سدیم‌آلژینات از دیدگاه طیف-سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)

با استفاده از FTIR، تشکیل گروه آمید در برهمکنش پلی‌الکترولیت گروه‌های کربوکسیل پلی‌ساکارید و آمین پروتئین، بررسی شد (شکل ۷). در طیف سدیم‌آلژینات، باندهای جذبی مشخصه ساختار پلی‌ساکارید، در اعداد موجی ۱۵۹۸ و ۱۴۱۵ cm^{-1} (کششی نامتقارن و متقارن گروه‌های کربوکسیلات نمکی [۶۷])، ۱۳۲۵ cm^{-1} (کششی C-O)، ۱۱۲۶ cm^{-1} (کششی C-C) و ۱۰۲۹ cm^{-1} (کششی C-O-C اتر) [۶۸-۷۰] مشاهده می‌شود. پروتئین‌ها از پلی‌پپتیدها با صورت-بندی‌های متفاوت تشکیل شده‌اند که با مشاهده قله‌های گروه آمید، مشخص می‌شوند. باند آمید نیز ترکیبی پیچیده، متشکل از مارپیچ سه‌گانه، صفحات چین‌دار بتا، مارپیچ تصادفی و پیچ‌ها می‌باشد [۷۱]. شاخص‌ترین طیف برای تجزیه و تحلیل ساختار دوم پروتئین، جذب در ناحیه آمید I است [۷۲] و معمولاً در محدوده ۱۷۰۰-۱۶۰۰ cm^{-1} ظاهر می‌شود و مکان دقیق آن به پیوند هیدروژنی و ساختار پروتئین بستگی دارد [۷۳].

کرده و با حفظ ساختار، موجب پیوند کمتر آن با آب می‌شود. مشاهدات قبلی هم بیان می‌کند که انتقال حرارتی مارپیچ-تصادفی^۱، به میزان جذب آب بستگی دارد [۵۶].

دمای واسپرستی (T_d) ژلاتین پیوند عرضی نشده، در حدود ۲۳۰ درجه سلسیوس است [۵۷] و تغییرات این دما، با میزان پیوند عرضی و رشد استحکام شبکه پروتئین ارتباط دارد. بنابراین، افزایش T_d در دمانگاشت؛ به علت افزایش پیوند کووالانسی حاصل از پیوند عرضی؛ خود را به صورت دره پهن گرماگیر نشان می‌دهد [۵۸ و ۵۹].

در افزایش جنینین از صفر به ۰/۵ میلی‌مول بر گرم، T_d حدود ۷ درجه سلسیوس افزایش می‌یابد که با یافته‌های تورس^۲ تطبیق دارد [۵۸]. تغییرات آنتالپی (ΔH)، نشان‌دهنده انرژی موردنیاز برای تخریب پیوندهای هیدروژنی، آمیدی و واندروالس است که مارپیچ‌های سه‌گانه ژلاتین را حفظ می‌کنند. جدول (۵) نشان می‌دهد؛ افزایش ΔH در نتیجه‌ی باز شدن پیوندهای هیدروژنی به صورت گرماگیر و شکستن پیوندهای کووالانسی میان‌مولکولی و درون‌مولکولی به صورت گرمازاست [۶۰]. پیوندهای هیدروژنی شامل: ۱. اتم‌های هیدروژن گلاسیسین و اکسیژن گروه کربوکسیل؛ ۲. مولکول‌های آب با گروه هیدروکسیل دو مولکول هیدروکسی پرولین؛ ۳. همکاری گروه هیدروکسیل هیدروکسی پرولین و اکسیژن گروه C=O با یک مولکول آب؛ ۴. پیوند بین گروه‌های CO- و NH- [۶۱] و پیوندهای واندروالس موجود در نواحی آب‌گریز در اسیدهای آمینه‌ای همچون والین و آلانین است. دره گرماگیر مربوط به جنینین نیز، در شکل دیده نمی‌شود؛ زیرا مقدار آن بسیار کم و با آمین مولکول ژلاتین، در تعامل است. آنتالپی جدول (۵)، با استفاده از تغییر آنتالپی‌های سوختن مولی محاسبه شده است.

جدول ۵. تغییرات آنتالپی ریزکرات A1G4 با تغییر مقدار جنینین

	A1G4	A1G4C0.1	A1G4C0.5
ΔH (J/g)	-۱۰۹/۱۵	-۷۱/۰۹	-۵۳/۸۵

آب موجود در سدیم‌آلژینات که طی عملیات حرارتی

³ Sarmento

⁴ Anbinder

¹ Helix-Coil

² Torres

طبق گزارش می^۵، جنپین قبل از پیوند عرضی بسپارها، می‌تواند پلیمریزه شود [۸۲] و باقی‌مانده گروه‌های آمین I در لیزین، هیدروکسی‌لیزین و آرژنین، با آن وارد واکنش می‌شوند. در ریزکرات A1G4C0.5، واکنش عرضی بین گروه‌های آمین و آلدئید انتهایی جنپین، از طریق واکنش شیف باز^۶ انجام می‌شود و به پیوندهای عرضی میان گروه‌های آمین نوع I در بسپار، منجر می‌شود. به این ترتیب این امر می‌تواند بر ارتعاشات کششی باندهای آمید I و II اثرگذار باشد. باندهای 1083 cm^{-1} ، 1414 cm^{-1} و 1650 cm^{-1} به ترتیب مربوط به مد خمشی داخل صفحه‌ای C-H حلقه [۸۳]، مد کششی حلقه [۸۴] و خمشی پیوند دوگانه C=C حلقه جنپین است [۴۳ و ۸۳].

باند 1101 cm^{-1} مشخص‌کننده C-N کششی نیتروژن سوم با اتم کربن آلیفاتیک مجاور در باقی‌مانده‌های لیزین و آرژنین است [۴۷ و ۸۳]. جذبی که در نزدیکی 1101 cm^{-1} وجود دارد متعلق به مولکول‌های جنپینی است که در واکنش شرکت نکرده‌اند و خود را به صورت جذب در 1083 cm^{-1} نشان می‌دهند. باند 877 cm^{-1} مشخص‌کننده باند جذبی مد کششی C-H ناحیه حلقه هتروسیکلیک است [۸۵]. قله‌های 1645 cm^{-1} و 1237 cm^{-1} مربوط به پیوندهای آمید؛ به علت پیوند عرضی ژلاتین با جنپین؛ جابجایی مختصری به 1650 cm^{-1} و 1244 cm^{-1} پیدا کرده است.

۳-۸- آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

تصاویر SEM از ترکیب هم‌انباشتی نمونه A1G4C0.5 در شکل (۸) ارائه شده است.

آزمون SEM، ماهیت کروی ذرات را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد کرات تشکیل‌شده؛ به علت پیوند عرضی؛ در کنار هم تجمع یافته‌اند. قطر ریزکرات تشکیل‌شده در نبود جنپین، حدود ۱۰ میکرومتر است؛ اما با افزودن مقدار پیونددهنده عرضی، اندازه ذرات بزرگ‌تر می‌شود. یافته‌های مشابهی در پژوهش‌های حسین و ماجی بر روی ریزکپسول‌های ژلاتین-چیتوسان (پیوند عرضی شده با جنپین)، افزایش ضخامت دیواره ذرات را نشان می‌دهد [۵۰].

باند آمید I، با ۸۰ درصد ارتعاشات کششی C=O که متصل به N-H خمشی داخل صفحه‌ای و کششی C-N می‌باشد، شناسایی می‌شود [۷۴]. قله این باند در 1645 cm^{-1} مشاهده شد که براساس یافته‌های یاکیمی^۱ [۷۵] حداکثر جذب در 1633 cm^{-1} ، ویژگی ساختار ماریچ تصادفی^۲ ژلاتین است و اغلب با ظهور باند آمید II در 1539 cm^{-1} تأیید می‌شود [۷۶]. ۶۰ درصد آمید II از گروه‌های خمشی N-H و ۴۰ درصد دیگر از گروه‌های کششی C-N تشکیل شده است [۷۴]. آمید III ترکیبی از قله‌ها بین ارتعاشات کششی C-H و خمشی N-H [۷۷ و ۷۸] در 1237 cm^{-1} ، از پیوندهای آمید و همچنین جذب ناشی از ارتعاشات جنبانه‌ای^۳ گروه‌های CH_2 ، متعلق به گلیسین و زنجیره‌های جانبی پرولین است [۷۹]. آمید A، نشان‌دهنده N-H کششی همراه با پیوند هیدروژنی است و ارتعاش کششی N-H آزاد در محدوده $3440-3400 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده می‌شود. اگر گروه N-H یک پپتید در تعامل با پیوند هیدروژنی باشد؛ موقعیت آن به بسامدهای پایین‌تر تغییر مکان می‌دهد.

قله‌هایی با عدد موجی 2823 cm^{-1} و 2917 cm^{-1} به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن C-H آلکان‌ها و آلکن‌ها از گروه CH_2 - است [۸۰]. دیگر قله‌های قابل توجه، 1161 cm^{-1} و 1031 cm^{-1} نیز به دلیل کششی کربوکسیلیک اسید و C-N کششی در آمین‌هاست. طیف FTIR، گروه عاملی آمین در 3440 cm^{-1} را تأیید می‌کند. قله گروه‌های آمین آزاد در ژلاتین، پهن و شدت آن در ریزکرات A1G4، کم است و در 1647 cm^{-1} (C=O باند کششی آمید) تشکیل کمپلکس به دلیل واکنش بین آمین ژلاتین و کربوکسیلیک آلزینات را در A1G4 تأیید می‌کند [۱۷]. براساس نتایج پژوهش‌های سیونکوسکا^۴ [۸۱]، به نظر می‌رسد جابجایی مختصر قله آمید I ژلاتین از 1645 cm^{-1} به 1647 cm^{-1} در ریزکرات، ناشی از تشکیل پیوند بین گروه‌های منفی آلزینات و بارهای مثبت ژلاتین است. معمولاً جابجایی باندها در طیف فرسرخ به سبب واکنش بین بسپارهای زیستی توسط برهم-کنش‌های الکترواستاتیک مشاهده می‌شود.

¹ Yakimets

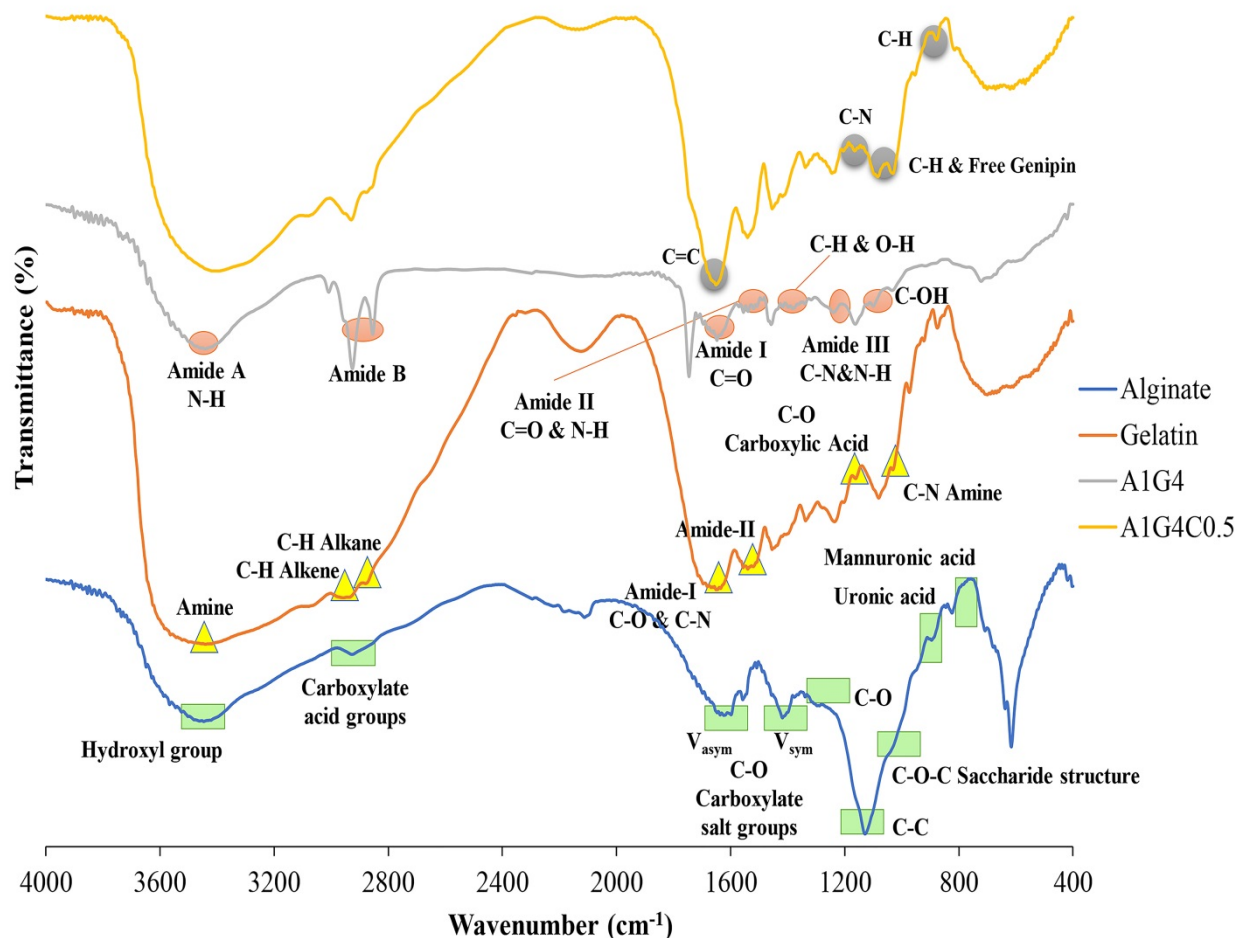
² Coiled Structure

³ Wagging

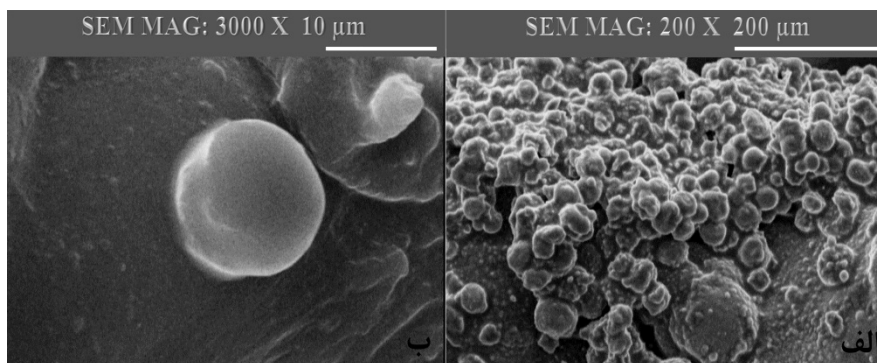
⁴ Sionkowska

⁵ Mi

⁶ Schiff Base



شکل ۷. طیف FTIR سدیم آلژینات، ژلاتین، A1G4 و A1G4C0.5



شکل ۸. تصویر SEM میکروساختار نمونه، الف) ریزکرکات A1G4C0.5 و ب) A1G4 در بزرگنمایی ۲۰۰ و ۳۰۰۰

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، برای دستیابی به ریزکرکات پایدار ژلاتین نوع A و سدیم آلژینات، از روش کمپلکس پلی‌الکترولیت استفاده شد. حضور مقادیر مختلف گروه‌های عاملی آمین و کربوکسیل در pHهای گوناگون و به دنبال آن، پیوند الکترواستاتیک همراه با شبکه‌ساز جنیپین، در نهایت منجر به بهترین بازده، در نسبت ژلاتین به سدیم آلژینات برابر ۴ و pH

برابر ۳/۶۵ گردید؛ اما از مهم‌ترین چالش‌های این پروژه، توده‌ای شدن و چسبیدن ریزکرکات به یکدیگر بود که استفاده از شبکه‌ساز، تاحدی این مشکل را کم کرد. در همین راستا، استفاده از مواد کمکی با بار منفی همچون سدیم کربوکسی‌متیل-سلولز توصیه می‌شود. به دلیل چسبیدن بخشی از ذرات به دیواره ظرف، محصول به دست آمده کمتر از حد انتظار بود. استفاده از دیگر روش‌های سنتز بدون نیاز به روغن، مانند

- World of Polysaccharides*, Vol. 14, (2012), 395-406. <https://doi.org/10.5772/50561>
- Turgeon, S. L., Schmitt, C., Sanchez, C., "Protein-polysaccharide complexes and coacervates", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Vol. 12, No. 4-5, (2007), 166-178. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.007>
 - Shivani, Sujitha, H., "Review article on microparticles", *International Journal of Pharmacy and Analytical Research*, Vol. 4, No. 3, (2015), 302-309. <https://www.ijpar.com/articles/2015/4/3>
 - "Microspheres market by type (hollow, solid), raw material (glass, ceramic, fly ash, polymer, metallic), application (construction composites, medical technology, cosmetics & personal care, automotive, oil & gas)-Global forecast to 2022", Report Code: AD 2998, (June 2017). <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/microsphere-market-1086.html>
 - Panyam, J., Labhassetwar, V., "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 55, No. 3, (2003), 329-347. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00228-4](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00228-4)
 - Jawahar, N., Meyyanathan, S. N., "Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review", *International Journal of Health & Allied Sciences*, Vol. 1, No. 4, (2012), 217-223. <https://doi.org/10.4103/2278-344x.107832>
 - Azadi, A., Hamidi, M., Rouini, M. -R., "Methotrexate-loaded chitosan nanogels as 'Trojan Horses' for drug delivery to brain: Preparation and in vitro/in vivo characterization", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 62, (2013), 523-530. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.004>
 - Yousefpour, P., Atyabi, F., Dinarvand, R., Vasheghani-Farahani, E. "Preparation and comparison of chitosan nanoparticles with different degrees of glutathione thiolation", *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 19, No. 5, (2011), 367-375. <http://daru.tums.ac.ir/index.php/daru/article/view/401>
 - Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., Cesaro, A., "Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 455, No. 1-2, (2013), 219-228. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.034>
 - Corredig, M., "Molecular understanding of the interaction of dairy proteins with other food biopolymers", *Dairy-Derived Ingredients*, Elsevier, (2009), 371-393. <https://doi.org/10.1533/9781845697198.3.371>
 - Aumiller, J., Davis, B., Keating, C., "Phase separation as a possible means of nuclear compartmentalization", *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol. 307, Elsevier, (2014), 109-149. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800046-5.00005-9>
 - De Kruijff, C., Weinbreck, F., de Vries, R., "Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Vol. 9, No. 5, (2004), 340-349. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.006>
 - Khalilah, A. K., Suhaimi, M., Rosfarizan, M., Arbakariya B. A., Siti, A. A., Farrah, A. D., Mohd Yazid, A. M., "Encapsulation of *bifidobacterium pseudocatenulatum* strain G4 within bovine gelatin-genipin-sodium alginate combinations: Optimisation approach using face central composition design-response surface methodology (FCCD-RSM)", *International Journal of Microbiology*, Vol. 2019, Article ID: 4208986, 11 pages, (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/4208986>
 - Khalilah, A. K., Suhaimi, M., Rosfarizan, M., Arbakariya B. A., Mohd Yazid, A. M., "Optimization of fish gelatin-alginate-genipin as encapsulating matrices for probiotic application using FCCD-RSM", *2012 IEEE Symposium on Humanities, Science and Engineering Research*, IEEE, (2012), 1283-1288. <https://doi.org/10.1109/shuser.2012.6268809>
 - Yun, L., Zhang, C., Zhao, J., Yi, G., Li, C., Ping, Z., "Preparation and properties of gelatin/sodium alginate (cross-linked with genipin) interpenetrating polymeric network films", *Acta Materiae Compositae Sinica*, Vol. 32, No. 4, (2015), 997-1006. <https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20140925.002>
 - Devi, N., Kakati, D., "Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex", *Journal of*
- روش دو مرحله‌ای نیز از جمله روش‌های جایگزین برای تهیه ریزکرات می‌باشد.
- موارد زیر را می‌توان از جمله نتایج این پژوهش برشمرد:
- استفاده از حلال‌زدایی ژلاتین، موجب خروج بخشی از بسپار می‌شود و جنبه‌های کاربرد مهمی دارد؛ بنابراین شایسته است در پژوهش‌های بعدی به آن توجه شود.
 - استفاده از مقدارهای بیشتر بسپارهای زیستی، منجر به تعامل بیشتر میان مولکولی و افزایش مقدار ریزکرات می‌شود. برای نخستین بار، استفاده از روش CD و نتایج R_{pn} ، تغییر ساختار ژلاتین را در واکنش با سدیم آلزینات و تشکیل هم‌انباشتی تأیید کرد.
 - دمای واسپرشتی ژلاتین، با افزایش میزان پیوند عرضی و استحکام شبکه پروتئین، نسبت مستقیم دارد.
 - ناپدید شدن قله‌ها در $1330-1030 \text{ cm}^{-1}$ ، تأییدی بر برهم‌کنش الکترواستاتیک گروه‌های کربوکسیل پلی-ساکارید و آمین پروتئین و شکل‌گیری هم‌انباشتی بین ژلاتین و سدیم آلزینات است.
 - ریزکرات سنتز شده در این پژوهش، در حضور جنیبین و عدم حضور آن، در حدود 10 تا 25 میکرومتر بود.
- ### 5- سپاسگزاری
- این مقاله، حاصل بخشی از پایان‌نامه مصوب دانشجویی در مقطع دکترا می‌باشد که با حمایت پژوهشگاه مواد و انرژی اجرا شده است. بدینوسیله از کلیه همکاران آن سازمان که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.
- ### مراجع
- Ramalapa, B., Crasson, O., Vandevenne, M., Gibaud, A., Garcion, E., Cordonnier, T., "Protein-polysaccharide complexes for enhanced protein delivery in hyaluronic acid templated calcium carbonate microparticles", *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 5, No. 35, (2017), 7360-7368. <https://doi.org/10.1039/c7tb01538k>
 - Ghosh, A. K., Bandyopadhyay, P., "Polysaccharide-protein interactions and their relevance in food colloids", *The Complex*

- Vol. 5, No. 6, (2010), p. e11043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011043>
34. Mitra, T., Sailakshmi, G., Gnanamani, A., Mandal, A. B., "Dicarboxylic acid cross-linking interactions improves thermal stability and mechanical strength of reconstituted type I collagen: Part I. oxalic acid", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 105, No. 1, (2011), 325-330. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1472-2>
 35. Mu, C., Li, D., Lin, W., Ding, Y., Zhang, G., "Temperature induced denaturation of collagen in acidic solution", *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, Vol. 86, No. 4, (2007), 282-287. <https://doi.org/10.1002/bip.20742>
 36. He, L., Cai, S., Wu, B., Mu, C., Zhang, G., Lin, W., "Trivalent chromium and aluminum affect the thermostability and conformation of collagen very differently", *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 117, (2012), 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.08.017>
 37. Wu, B., Mu, C., Zhang, G., Lin, W., "Effects of Cr³⁺ on the structure of collagen fiber", *Langmuir*, Vol. 25, No. 19, (2009), 11905-11910. <https://doi.org/10.1021/la901577j>
 38. Gayatri, R., Sharma, A. K., Rajaram, R., Ramasami, T., "Chromium (III)-induced structural changes and self-assembly of collagen", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 283, No. 1, (2001), 229-235. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4713>
 39. Karbassi, F., Haghbeen, K., Saboury, A. A., Rezaei-Tavirani, M., Ranjbar, B., "Calorimetric, spectrophotometric and circular dichroism studies on the impact of sodium dodecyl sulphate on the mushroom tyrosinase structure", *Biologia-Bratislava*, Vol. 59, No. 3, (2004), 319-326. http://biologia.savba.sk/59_3_04/Karbassi_F.pdf
 40. Gopal, R., Park, J. S., Seo, C. H., Park, Y., "Applications of circular dichroism for structural analysis of gelatin and antimicrobial peptides", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 13, No. 3, (2012), 3229-3244. <https://doi.org/10.3390/ijms13033229>
 41. Prádný, M., Kopeček, J., "Hydrogels for site-specific oral delivery. poly [(acrylic acid)-co-(butyl acrylate)] crosslinked with 4, 4'-bis (methacryloylamino) azobenzene", *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 191, No. 8, (1990), 1887-1897. <https://doi.org/10.1002/macp.1990.021910814>
 42. Yao, C. H., Liu, B. S., Chang, C. J., Hsu, S. H., Chen, Y. S., "Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials", *Materials Chemistry and Physics*, Vol. 83, No. 2-3, (2004), 204-208. <https://doi.org/10.1016/j.mathchemphys.2003.08.027>
 43. Touyama, R., Inoue, K., Takeda, Y., Yatsuzuka, M., Ikumoto, T., Moritome, N., "Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. II. on the formation mechanisms of brownish-red intermediates leading to the blue pigment formation", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 42, No. 8, (1994), 1571-1578. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.1571>
 44. Jin, J., Song, M., Hourston, D. J., "Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties", *Biomacromolecules*, Vol. 5, No. 1, (2004), 162-168. <https://doi.org/10.1021/bm034286m>
 45. Zhu, K., Slusarewicz, P., Hedman, T., "Thermal analysis reveals differential effects of various crosslinkers on bovine annulus fibrosis", *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 29, No. 1, (2011), 8-13. <https://doi.org/10.1002/jor.21189>
 46. Imsombut, T., Srisuwan, Y., Srihanam, P., Baimark, Y., "Genipin-cross-linked silk fibroin microspheres prepared by the simple water-in-oil emulsion solvent diffusion method", *Powder Technology*, Vol. 203, No. 3, (2010), 603-608. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2010.06.027>
 47. Butler, M. F., Ng, Y., Pudney, P. D. A., "Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 41, No. 24, (2003), 3941-3953. <https://doi.org/10.1002/pola.10960>
 48. Solorio, L., Zwolinski, C., Lund, A. W., Farrell, M. J., Stegemann, J. P., "Gelatin microspheres crosslinked with genipin for local delivery of growth factors", *Journal of Tissue Food Engineering*, Vol. 117, No. 2, (2013), 193-204. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.018>
 49. Coester, C., Langer, K., Von Briesen, H., Kreuter, J., "Gelatin nanoparticles by two step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake", *Journal of Microencapsulation*, Vol. 17, No. 2, (2000), 187-193. <https://doi.org/10.1080/026520400288427>
 50. Hermanto, S., Fatimah, W., "Differentiation of bovine and porcine gelatin based on spectroscopic and electrophoretic analysis", *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 1, No. 3, (2013), 68-73. <https://doi.org/10.14499/jfjps>
 51. Das, M., Suguna, P., Prasad, K., Vijayalakshmi, J., Renuka, M., "Extraction and characterization of gelatin: a functional biopolymer", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 9, No. 9, (2017), 239-242. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i9.17618>
 52. Eysturskarð, J., "Mechanical properties of gelatin gels; Effect of molecular weight and molecular weight distribution", Doctoral Thesis, (2010). <http://hdl.handle.net/11250/245635>
 53. Afzal, S., Khan, S., Ranjha, N., Jalil, A., Riaz, A., Haider, M., "The structural, crystallinity, and thermal properties of pH-responsive interpenetrating gelatin/sodium alginate-based polymeric composites for the controlled delivery of cetrizine HCl", *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 15, No. 1, (2018), 63-76. <https://doi.org/10.4274/tjps.64326>
 54. Lin, Y., Chen, Q., Luo, H., Lin, Y., "Preparation and characterization of N-(2-carboxybenzyl) chitosan as a potential pH-sensitive hydrogel for drug delivery", *Carbohydrate Research*, Vol. 342, No. 1, (2007), 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.11.002>
 55. Shinde, U., Nagarsenker, M., "Characterization of gelatin-sodium alginate complex coacervation system", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 71, No. 3, (2009), 313-317. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.56033>
 56. Saravanan, M., Rao, K., "Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 80, No. 3, (2010), 808-816. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.036>
 57. Sundarajan, P., Eswaran, P., Marimuthu, A., Subhadra, L., Kannaiyan, P., "One pot synthesis and characterization of alginate stabilized semiconductor nanoparticles", *Bulletin of the Korean Chemical Society*, Vol. 33, No. 10, (2012), 3218-3224. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2012.33.10.3218>
 58. Manickam, B., Sreedharan, R., Elumalai, M., "Genipin—the natural water soluble cross-linking agent and its importance in the modified drug delivery systems: An overview", *Current Drug Delivery*, Vol. 11, No. 1, (2014), 139-145. <https://doi.org/10.2174/15672018113106660059>
 59. Devi, N., Hazarika, D., Deka, C., Kakati, D. K., "Study of complex coacervation of gelatin a and sodium alginate for microencapsulation of olive oil", *Journal of Macromolecular Science, Part A*, Vol. 49, No. 11, (2012), 936-945. <https://doi.org/10.1080/10601325.2012.722854>
 60. Hu, Y., Liu, L., Dan, W., Dan, N., Gu, Z., "Evaluation of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate based ionic liquid systems as a suitable solvent for collagen", *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 130, No. 4, (2013), 2245-2256. <https://doi.org/10.1002/app.39298>
 61. Fratzl, P., *Collagen: Structure and mechanics, an introduction*, Springer, Boston, MA, (2008), 1-13. https://doi.org/10.1007/978-0-387-73906-9_1
 62. Gómez-Guillén, M. C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A., Montero, P., "Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study", *Food Hydrocolloids*, Vol. 16, No. 1, (2002), 25-34. [https://doi.org/10.1016/s0268-005x\(01\)00035-2](https://doi.org/10.1016/s0268-005x(01)00035-2)
 63. Fathima, N. N., Devi, R. S., Rekha, K. B., Dhathathreyan, A., "Collagen-curcumin interaction—A physico-chemical study", *Journal of Chemical Sciences*, Vol. 121, No. 4, (2009), 509-514. <https://doi.org/10.1007/s12039-009-0061-4>
 64. Rosenblum, G., Van den Steen, P. E., Cohen, S. R., Bitler, A., Brand, D. D., Opendakker, G., Sagi, I., "Direct visualization of protease action on collagen triple helical structure", *PLoS One*,

- and thermal degradation behavior", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 139, (2016), 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.044>
64. Sarmiento, B., Ferreira, D., Veiga, F., Ribeiro, A., "Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 66, No. 1, (2006), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.008>
 65. Anbinder, P. S., Deladino, L., Navarro, A. S., Amalvy, J. I., Martino, M. N., "Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: Interactions between active compound encapsulation polymers", *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, Vol. 1, No. 4, (2011), 80-87. <https://doi.org/10.4236/jeas.2011.1401>
 66. Soares, J., da, P., Santos, J. E., Chierice, G. O., Cavalheiro, E. T. G., "Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt", *Eclética Química*, Vol. 29, No. 2, (2004), 57-64. <https://doi.org/10.1590/s0100-46702004000200009>
 67. Lee, H., Ahn, S. H., Kim, G. H., "Three-dimensional collagen/alginate hybrid scaffolds functionalized with a drug delivery system (DDS) for bone tissue regeneration", *Chemistry of Materials*, Vol. 24, No. 5, (2011), 881-891. <https://doi.org/10.1021/cm200733s>
 68. Vieira, E. F. S., Cestari, A. R., Airoidi, C., Loh, W., "Polysaccharide-based hydrogels: Preparation, characterization, and drug interaction behaviour", *Biomacromolecules*, Vol. 9, No. 4, (2008), 1195-1199. <https://doi.org/10.1021/bm7011983>
 69. Smitha, B., Sridhar, S., Khan, A. A., "Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes", *European Polymer Journal*, Vol. 41, No. 8, (2005), 1859-1866. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.02.018>
 70. Kim, J. H., Jegal, J., Lee, K. H., "Optical resolution of α -amino acids through enantioselective polymeric membranes based on polysaccharides", *Journal of Membrane Science*, Vol. 213, No. 1-2, (2003), 273-283. [https://doi.org/10.1016/s0376-7388\(02\)00534-3](https://doi.org/10.1016/s0376-7388(02)00534-3)
 71. Hosseini Shirazi, F., Farhadi, E., Vakili Zahir, N., "Infrared spectrophotometry and its application in medicine", *Research in Medicine*, Vol. 29, No. 4, (2005), 379-386. <http://pejouhesh.sbmu.ac.ir/article-1-89-en.pdf>
 72. Benjakul, S., Oungbho, K., Visessanguan, W., Thiansilakul, Y., Roytrakul, S., "Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *priacanthus tayenus* and *priacanthus macracanthus*", *Food Chemistry*, Vol. 116, No. 2, (2009), 445-451. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.063>
 73. Uriarte-Montoya, M. H., Santacruz-Ortega, H., Cinco-Moroyoqui, F. J., Rouzaud-Sández, O., Plascencia-Jatomea, M., Ezquerria-Brauer, J. M., "Giant squid skin gelatin: Chemical composition and biophysical characterization", *Food Research International*, Vol. 44, No. 10, (2011), 3243-3249. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.018>
 74. Behnamghader, A., Chamansara, A., *Surface characterization of biocompatible materials: Principles and methods*, 1st Ed., Nokhbeگان Sharif (MERC), Tehran, (2019).
 75. Yakimets, I., Wellner, N., Smith, A. C., Wilson, R. H., Farhat, I., Mitchell, J., "Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state", *Polymer*, Vol. 46, No. 26, (2005), 12577-12585. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.10.090>
 76. Boskey, A., Camacho, N. P., "FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage", *Biomaterials*, Vol. 28, No. 15, (2007), 2465-2478. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.043>
 77. Kozłowska, J., Sionkowska, A., Skopinska-Wisniewska, J., Piechowicz, K., "Northern pike (*esox lucius*) collagen: Extraction, characterization and potential application", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 81, (2015), 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.002>
 78. Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., Duodu, K. G., "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*)", *Food Chemistry*, Vol. 86, No. 3, (2004), 325-332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.038>
 79. Jackson, M., Watson, P. H., Halliday, W. C., Mantsch, H. H., "Beware of connective tissue proteins: Assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human *Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 4, No. 7, (2010), 514-523. <https://doi.org/10.1002/term.267>
 49. Sundararaghavan, H. G., Monteiro, G. A., Lapin, N. A., Chabal, Y. J., Miksan, J. R., Shreiber, D. I., "Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 87, No. 2, (2008), 308-320. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31715>
 50. Hussain, M. R., Maji, T. K., "Preparation of genipin cross-linked chitosan-gelatin microcapsules for encapsulation of zanthoxylum limonella oil (ZLO) using salting-out method", *Journal of Microencapsulation*, Vol. 25, No. 6, (2008), 414-420. <https://doi.org/10.1080/02652040802025901>
 51. Hatakeyama, T., Hatakeyama, H., Nakamura, K., "Non-freezing water content of mono-and divalent cation salts of polyelectrolyte-water systems studied by DSC", *Thermochimica Acta*, Vol. 253, (1995), 137-148. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)02087-5](https://doi.org/10.1016/0040-6031(94)02087-5)
 52. Martucci, J., Vázquez, A., Ruseckaitė, R., "Nanocomposites based on gelatin and montmorillonite: Morphological and thermal studies", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 89, No. 1, (2007), 117-122. <https://doi.org/10.1007/s10973-006-7454-0>
 53. Zhang, Z., Li, G., Shi, B. I., "Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes", *Journal-Society of Leather Technologists and Chemists*, Vol. 90, No. 1, (2006), 23-28. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.460.7337&rep=rep1&type=pdf>
 54. Bigi, A., Boanini, E., Panzavolta, S., Roveri, N., "Biomimetic growth of hydroxyapatite on gelatin films doped with sodium polyacrylate", *Biomacromolecules*, Vol. 1, No. 4, (2000), 752-756. <https://doi.org/10.1021/bm0055854>
 55. Fernandez-Diaz, M. D., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C., "Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin", *Food Hydrocolloids*, Vol. 17, No. 3, (2003), 281-286. [https://doi.org/10.1016/s0268-005x\(02\)00078-4](https://doi.org/10.1016/s0268-005x(02)00078-4)
 56. Bigi, A., Borghi, M., Cojazzi, G., Fichera, A., Panzavolta, S., Roveri, N., "Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 61, No. 2, (2000), 451-459. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1010117401098>
 57. Giusti, P., Barbani, N., Lazzeri, L., Polacco, G., Cristallini, C., Cascone, M. G., *Gelatin-poly (vinyl alcohol) blends as bioartificial polymeric materials, Science and technology of polymers and advanced materials*, Prasad, P. N., Mark, J. E., Kandil, S. H., Kafafi, Z. H. (eds), Springer, Boston, MA (1998), 449-462. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0112-5_39
 58. Torres-Giner, S., Gimeno-Alcaniz, J. V., Ocio, M. J., Lagaron, J. M., "Comparative performance of electrospun collagen nanofibers cross-linked by means of different methods", *ACS Applied Materials & Interfaces*, Vol. 1, No. 1, (2008), 218-223. <https://doi.org/10.1021/am800063x>
 59. Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N., Rubini, K., "Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin", *Biomaterials*, Vol. 23, No. 24, (2002), 4827-4832. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00235-1](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00235-1)
 60. Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., Roveri, N., "Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking", *Biomaterials*, Vol. 22, No. 8, (2001), 763-768. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00236-2](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00236-2)
 61. Thakur, S., Govender, P. P., Mamo, M. A., Tamulevicius, S., Thakur, V. K., "Recent progress in gelatin hydrogel nanocomposites for water purification and beyond", *Vacuum*, Vol. 146, (2017), 396-408. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2017.05.032>
 62. Kim, S. J., Yoon, S. G., Kim, S. I., "Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogels composed of alginate and poly (diallyldimethylammonium chloride)", *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 91, No. 6, (2004), 3705-3709. <https://doi.org/10.1002/app.13615>
 63. Liu, Y., Zhang, C. J., Zhao, J. C., Guo, Y., Zhu, P., Wang, D. Y., "Bio-based barium alginate film: Preparation, flame retardancy

- Science Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 43, No. 10, (2005), 1985-2000. <https://doi.org/10.1002/pola.20669>
83. Socrates, G., *Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts.*, 3rd Ed., The University of West London, Middlesex, U.K., John Wiley and Sons: Chichester, (2001). <https://doi.org/10.1021/ja0153520>
84. Mallick, S. P., Sagiri, S. S., Singh, V. K., Behera, B., Thirugnanam, A., Pradhan, D. K., "Genipin-crosslinked gelatin-based emulgels: An insight into the thermal, mechanical, and electrical studies", *AAPS PharmSciTech*, Vol. 16, No. 6, (2015), 1254-1262. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0260-2>
85. Wang, L., Wang, Y., Qu, J., Hu, Y., You, R., Li, M., "The cytocompatibility of genipin-crosslinked silk fibroin films", *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, Vol. 4, No. 3, (2013), 213-221. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2013.43026>
- tissues", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, Vol. 1270, No. 1, (1995), 1-6. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(94\)00056-v](https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)00056-v)
80. D'Souza, L., Devi, P., Divya Shridhar, M. P., Naik, C. G., "Use of fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy to study cadmium-induced changes in padina tetrastromatica (hauck)", *Analytical Chemistry Insights*, Vol. 3, (2008), 135-143. <https://doi.org/10.4137/117739010800300001>
81. Sionkowska, A., Kaczmarek, B., Lewandowska, K., Grabska, S., Pokrywczyńska, M., Kloskowski, T., "3D composites based on the blends of chitosan and collagen with the addition of hyaluronic acid", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 89, (2016), 442-448. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.085>
82. Mi, F., Shyu, S., Peng, C., "Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin", *Journal of Polymer*