# 强化交联促进透明质酸凝胶的抗酶解能力

陆柳伸， 郑梦玲， 郝梦瑶， 王 武， 辛 瑜*
（江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

**摘要：** 为了强化透明质酸凝胶抗酶解能力，开发了初次交联-强化交联的偶联制备模式，并通过正交试验来确定最佳的交联条件。通过化学发光法测定透明质酸酶降解透明质酸凝胶后得到的产物，并由此计算凝胶的降解率。通过气相色谱法测定凝胶酸解后甘油含量并计算交联度。此外，检测了强化交联对透明质酸凝胶细胞毒性、遗传毒性以及溶血毒性的影响。结果表明，经过强化交联后（最优条件：35 ℃，0.05 mol/L NaOH，1.5 h，透明质酸单体/交联剂比例 8∶1）。此后 24、48、72 h 降解率分别由初次交联后的 9.76%、16.79%、20.45%到降低至强化交联后的 6.85%、7.56%、12.4%；交联度由初次交联后的 16.53%上升到强化交联后的 54.52%。此外，强化交联后的凝胶在毒性检测中细胞毒性维持在 1 级，无明显致突变性，溶血度符合一般生物材料安全要求。

**关键词：** 透明质酸凝胶；强化交联；酶解
**中图分类号：**Q539+7　**文章编号：**1673-1689(2019)07-0017-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.07.003

# Promote the Anti-Enzymatic Degradation Stability of Hyaluronic Acid Hydrogel Using Enhanced-Crosslinking

*LU Liushen*， *ZHENG Mengling*， *HAO Mengyao*， *WANG Wu*， *XIN Yu**
（School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

**Abstract：** To promote the anti-enzymatic degradation stability of hyaluronic acid hydrogel，an enhanced-crosslinking strategy was employed，and the most appropriate model was confirmed in orthogonal test. The degradation ratio was determined using a chromogenic reaction with released hyaluronic acid monomer. The cross-linking ration was calculated according to the content of glycerin detected with gas chromatography. In addition，the cytotoxicity，mutagenicity and hemolytic toxicity of the enhanced gel were also carefully checked. After an optimized strengthen cross-linking（35 ℃，0.05 mol/L NaOH，reaction for 1.5 h，BDDE/HA at 1∶8），the anti-enzymatic degradation stability was dramatically decreased compared that of first crosslinked gel；the degradation ratios were decreased from 9.76% to 6.85%，16.79% to 7.65% and 20.45% to 12.4% at 24，48 and 72 h respectively；and the crosslinking degree was increased from 16.53% to 54.52%. Additionally，after the enhanced-crosslinking，the cytotoxicity，mutagenicity and hemolytic toxicity of the gel were

**收稿日期：** 2016-12-16
**基金项目：** 国家自然科学基金青年基金项目(21306064)。
* **通信作者：** 辛 瑜(1982—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事生物大分子与配体相互作用及高效亲和制备方面的研究。
E-mail：yuxin@jiangnan.edu.cn
**引用本文：** 陆柳伸，郑梦玲，郝梦瑶，等. 强化交联促进透明质酸凝胶的抗酶解能力[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(07)：17-25.

detected as in the safety scale of biomaterials.

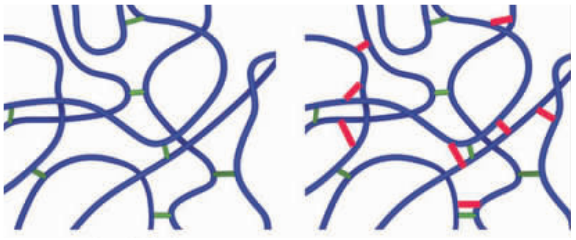
**Keywords**: hyaluronic acid hydrogel, enhanced-crosslinking, enzymatic degradation

透明质酸(hyaluronic acid,HA)又称玻璃酸、玻尿酸，是由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰葡萄糖胺以 β-1,4 和 β-1,3 糖苷键交替连接而成的线性高分子粘多糖[1],通常以钠盐形式广泛存在于动物组织的细胞外基质中,如皮肤、眼睛玻璃体、滑液和血液等[2]。其相对分子量一般在 $10^4$~$10^7$ 之间。1934 年 Meyer 和 Palmer[3]最先在从牛眼玻璃体中分离得到 HA,由于 HA 特殊的理化性质[4-5],广泛应用于临床、诊断、食品和化妆品行业中[6-9]。目前,HA 主要利用微生物发酵法进行大规模生产[10-11]。

HA 是细胞外基质和细胞间质的主要成分,在维持细胞和组织的结构完整以及细胞内外的环境平衡中起到重要作用,并且对细胞的生理功能有重大影响。HA 在水溶液中与水分子结合形成氢键,因此具有良好的保水性,经研究发现[12],HA 分子可以保留其自身质量的 500 ~ 1 000 倍的水,被誉为“天然保湿因子”。HA 在水溶液中呈网状结构,使其拥有特殊的流变学性质即粘弹性。HA 具有保湿护肤、抗衰老的功能,还有营养皮肤、润滑性和增稠等作用,因此,富含透明质酸的化妆品目前在国际上被誉为“仿生化妆品”。注射用透明质酸凝胶已经广泛用于整形行业,如 Restylane、YVOIRE、润百颜、海薇等国内外品牌。

人体中 HA 含量减少会使皮肤变得粗糙并产生皱纹,会导致关节炎、动脉硬化和脑萎缩等疾病,也会产生早老症[13-18]。为了补充人体内 HA 含量,可以通过口服透明质酸来补充,其效果明显,已在欧美、日本等发达国家应用于保健食品中。美国透明质酸保健食品在近几年有许多品牌上市,如 Natural Max 公司生产的 Beauty Fast 胶囊,Source Naturals 公司生产的含 HA 的胶丸和片剂等。我国台湾和大陆也有产品陆续上市，如口服美容胶原透明质酸、瑞尔水缘胶囊等。

由于透明质酸凝胶在人体内会被自身透明质酸酶降解,从而限制了其应用[19-21]。为了增强凝胶的机械强度以及在人体内的滞留时间，目前常用 BDDE 以及 DVS 等交联剂进行交联[22-24]。为了进一步强化透明质酸凝胶的稳定性,作者拟采用初次交联-强化交联偶联的制备模式,见图 1。在透明质酸凝胶成型后进一步加固凝胶颗粒的结构,以此来提高透明质酸凝胶的抗酶解能力。




初次交联形成绿色的连接,强化交联形成红色连接

**图 1　初次交联-强化交联偶联的模式**

**Fig. 1　Schematic of the primary and enhanced cross-linking of HA**

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

透明质酸(相对分子质量 $1.7\times10^6$):购自华熙福瑞达生物医药有限公司;润百颜、艾丽薇、海薇、瑞兰：福瑞达生物医药有限公司;1,4-丁二醇缩水甘油醚(BDDE)、透明质酸酶、小鼠胚胎成纤维细胞和葡萄糖醛酸:Sigma 公司;遗传毒性 Ames 试剂盒:汇智泰康生物技术有限公司;无水乙醇、硫酸、氯化钠、氢氧化钠和硼砂等:由江南大学试剂科提供。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 透明质酸凝胶的制备及初次交联条件的筛选**　HA 交联采用的工艺流程见图 2。HA 交联反应与 NaOH 的浓度、反应温度、反应时间及 HA 与 BDDE 的摩尔比有关。通过设计一个四因素四水平的正交试验来确定最佳交联条件,其因素水平表见表 1。

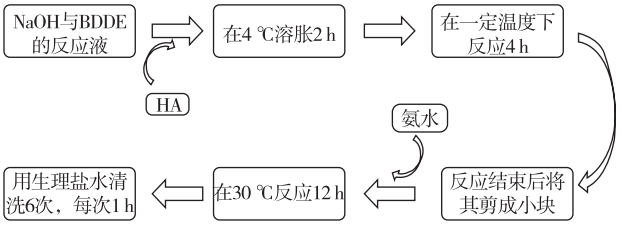



**图 2　HA 交联的工艺流程**

**Fig. 2　Process of crosslinking of HA**

表 1　HA 初次交联的因素水平表

Table 1　Factor level table for primary crosslinking of HA

| 水平 | 温度/℃ *A* | [NaOH]/(mol/L) *B* | 时间/h *C* | BDDE/HA *D* |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 40 | 0.10 | 3.0 | 1:2 |
| 2 | 45 | 0.20 | 3.5 | 1:4 |
| 3 | 50 | 0.30 | 4.0 | 1:6 |
| 4 | 55 | 0.40 | 4.5 | 1:8 |

**1.2.2　透明质酸钠含量的测定**　透明质酸钠(SH)是由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖组成的非均一的物质，其中含有多种不同相对分子质量的透明质酸钠分子，因此不能用均一物质的测定方法来测量透明质酸钠质量浓度。采用改良的咔唑法[25-26]来测定透明质酸钠的质量浓度，透明质酸钠分子在酸性条件下被水解成 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖，其中 D-葡萄糖醛酸能与咔唑发生显色反应，在 530 nm 波长处有最大吸收，且吸光值与 D-葡萄糖醛酸质量浓度成正比，以吸光值(*A*)对葡萄糖醛酸质量浓度(*C*)做线性回归方程，得到回归方程：$A=0.015\ 3C-0.007\ 2$，$R^2=0.998\ 6$。表明葡萄糖醛酸质量浓度在 0~50 μg/mL 范围内，*A* 与 *C* 呈良好的线性关系。此方法通过回归方程来确定葡萄糖醛酸质量浓度，进而计算出透明质酸钠的质量浓度。

透明质酸钠质量浓度 (mg/mL)=$C_i\times401.3\div194.1\div1\ 000\times200$

式中，$C_i$ 为葡萄糖醛酸的质量浓度(μg/mL)；401.3 为透明质酸钠单体相对分子质量；194.1 为葡萄糖醛酸相对分子质量；200 为稀释倍数。

**1.2.3　透明质酸凝胶强化交联**　为了提高交联透明质酸凝胶的理化性质，将初次交联所得的凝胶进行强化交联，并通过 NaOH 的浓度、反应温度、反应时间及 HA 与 BDDE 的摩尔比这 4 个因素来设计一个四因素四水平的正交试验，见表 2，以此确定强化交联的最佳条件。

表 2　HA 强化交联的因素水平表

Table 2　Factor level table for enhanced-crosslinking of HA

| 水平 | 温度/℃ *A* | [NaOH]/(mol/L) *B* | 时间/h *C* | BDDE/HA *D* |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 30 | 0.05 | 1.5 | 1:2 |
| 2 | 35 | 0.10 | 2.0 | 1:4 |
| 3 | 40 | 0.15 | 2.5 | 1:6 |
| 4 | 45 | 0.20 | 3.0 | 1:8 |

**1.2.4　透明质酸凝胶的降解率**　取 0.5 g HA 凝胶，加 300 U/mL 的透明质酸酶溶液 2 mL，37 ℃下反应 24、48、72 h，取 0.2 mL 加无水乙醇 4.8 mL，用滤器过滤得到 1 mL 溶液，加 PBS 至 8 mL，作为甲液。另取 HA 凝胶 0.5 g，加 0.5 mol/L 的硫酸溶液 10 mL，沸水浴水解 15 min，定容至 100 mL，作为乙液[27]。分别取甲液和乙液各 1 mL，用改良的咔唑法测定溶液中糖醛酸的质量浓度。

$$降解率=\frac{甲液中葡萄糖醛酸的质量浓度}{乙液中葡萄糖醛酸的质量浓度}$$

**1.2.5　透明质酸凝胶交联度的测定**　将最佳交联条件得到的凝胶用酸水解后，所得的甘油的量用气相色谱法检测[28]，以此来确定交联度。

样品处理：取凝胶 2.5 g，加 2.5 mol/L HBr 5 mL，沸水浴水解 50 min，用 NaOH 调节 pH 至中性，冷冻干燥，加 4 mL 无水乙醇过滤，滤液用于气相色谱测定。

色谱条件：色谱柱：HP-INNOWAX(30 mm×0.25 mm×0.25 mm)；柱温：100 ℃；20 ℃/min 程序升温至 230 ℃，并保持 0.5 min；柱流速：8.0 mL/min；分流比：1:1；进样量：1 μL；进样口温度：250 ℃；检测器温度：270 ℃；载气：氮气；检测器：氢火焰离子化检测器。

**1.2.6　透明质酸凝胶的红外光谱**　将初次交联得到的凝胶和强化交联得到的凝胶冷冻干燥，做 FT-IR，与未交联的透明质酸作对比。

**1.2.7　透明质酸凝胶的细胞毒性**　根据 GB/T16886 国家标准[29]，透明质酸凝胶需进行体外细胞毒性测试。其中浸提条件：浸提介质为 10% 血清细胞培养液，浸提比例为每 0.2 克样品加 1 mL 浸提介质，浸提温度为 37 ℃，浸提时间为 24 h。采用小鼠胚胎成纤维细胞，用细胞培养液配制成 $1\times10^4$ 个/mL 的细胞悬液，在 96 孔板中加入 100 μL 的细胞悬浮液。在 37 ℃、5% 的 $CO_2$ 培养箱中培养 48 h，弃去原培养液，每孔加入 200 μL 的空白对照液以及透明质酸凝胶，每组设立 8 个孔。并在 37 ℃、5% 的 $CO_2$ 培养箱中培养 48 h。接着加入 20 μL 噻唑蓝(MTT，质量浓度为 5 mg/mL)，置含 5% 二氧化碳培养箱，在(37±2) ℃下培养 5 h，弃去孔内液体，并加入 200 μL DMSO，用酶标仪在 570 nm 和 630 nm 处测吸光值，其结果根据细胞的相对增生率(RGR)来判断，见表 3。其中 2 级毒性以内的测试材料生物安全性

均符合要求。

$$RGR=\frac{实验组吸光值}{对照组吸光值}\times 100\%$$

表 3 细胞相对增生率与细胞毒性的分级关系

Table 3 Relationship between cell relative proliferation rate and cytotoxicity grade

| RGR | 细胞毒性分级 |
|---|---|
| ≥100% | 0 |
| ≥80% | 1 |
| ≥50% | 2 |
| ≥30% | 3 |
| ≥0 | 4 |

**1.2.8 透明质酸凝胶的 Ames 试验** 根据 GB15193.4 的要求[30],采用平板渗入法在加与不加 S9 混合液的条件下对 TA97、TA98、TA101 和 TA102 共 4 株菌株进行 Ames 试验,并统计回变菌落数。受试物透明质酸凝胶设立 4 个剂量:5、50、500、5 000 μg/皿,同时设立空白对照(自发回变)、溶剂对照(200 μL/皿的无菌水)以及阳性对照(2-氨基芴、甲基磺酸甲酯、敌克松、1,8-二羟基蒽醌)。其中每个剂量组做 3 个培养皿,并在相同条件下重复 2 次试验。其结果根据回变率(MR,受试物回变菌落数/自发回变菌落数)来判断,若 MR≥2,则结果判断为阳性结果,若 MR<2,则结果判定为阴性结果。

**1.2.9 透明质酸凝胶的溶血实验** 乙醚麻醉兔后,自心脏抽取血液 40 mL,加入4 mL 肝素抗凝,用生理盐水洗涤,离心至上清液不显红色,取 2 mL 上清液加入到 100 mL 生理盐水中,即得 2% 的兔红细胞混悬液[31]。各取凝胶 1 mL,加生理盐水至 2.5 mL,在 37 ℃恒温水浴 30 min,加 2% 的兔红细胞混悬液 2.5 mL,在 576 nm 处测其吸光值,并设立阳性对照组(蒸馏水)和阴性对照组(生理盐水),溶血度计算如下:

$$溶血度=\frac{样品吸光度-阴性对照组}{阳性对照组-阴性对照组}$$

一般认为生物材料的溶血度小于 5%,都是可以接受的。

## 2 结果与分析

### 2.1 透明质酸凝胶初次交联条件的筛选

HA 的交联条件根据降解率(R,%)的大小以及透明质酸钠的质量浓度来选择。降解率越小,说明凝胶的抗酶解能力越高,结果见表 4。可以看出,第 9 组实验得到的降解率在前 3 天都是最小的。通过极差分析可知,对交联反应的影响程度大小依次是 NaOH 的浓度、BDDE/HA、反应时间、反应温度。即 NaOH 的浓度影响最大,温度的影响最小。得到初次交联的最佳条件为:反应温度是 50 ℃,NaOH 的浓度是 0.1 mol/L,反应时间是 4.5 h,BDDE/HA 是 1:2。采用此条件得到的凝胶有最好的抗酶解能力。此凝胶连续 3 d 的降解率分别为 9.76%、16.79%、20.45%,透明质酸钠质量浓度为 28.84 mg/mL,接近市场现有水平,见表 5。所以选择此凝胶强化交联。

表 4 HA 初次交联

Table 4 Primary crosslinking of HA

| 水平 | 温度/℃ *A* | [NaOH]/(mol/L) *B* | 时间/h *C* | BDDE/HA *D* | 透明质酸钠质量浓度/(mg/mL) | 降解率/% $R_{24}$ | 降解率/% $R_{48}$ | 降解率/% $R_{72}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 21.95 | 12.34 | 23.54 | 24.77 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 14.60 | 33.17 | 40.95 | 41.87 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 8.92 | 31.86 | 54.88 | 63.96 |
| 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 8,49 | 21.71 | 43.98 | 60.85 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 3 | 12.17 | 23.59 | 38.03 | 52.24 |
| 6 | 2 | 2 | 1 | 4 | 11.19 | 28.54 | 40.37 | 65.96 |
| 7 | 2 | 3 | 4 | 1 | 18.44 | 17.47 | 31.84 | 39.17 |
| 8 | 2 | 4 | 3 | 2 | 14.98 | 22.95 | 36.85 | 56.87 |
| 9 | 3 | 1 | 3 | 4 | 27.46 | 10.21 | 17.34 | 21.53 |
| 10 | 3 | 2 | 4 | 3 | 25.44 | 13.09 | 22.12 | 32.53 |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 2 | 14.14 | 16.86 | 31.19 | 44.57 |
| 12 | 3 | 4 | 2 | 1 | 13.17 | 24.06 | 41.91 | 63.05 |
| 13 | 4 | 1 | 4 | 2 | 23.90 | 10.65 | 18.91 | 29.31 |

续表 4

| 水平 | 温度/℃ $A$ | [NaOH]/(mol/L) $B$ | 时间/h $C$ | BDDE/HA $D$ | 透明质酸钠质量浓度/(mg/mL) | 降解率/% $R_{24}$ | 降解率/% $R_{48}$ | 降解率/% $R_{72}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 14 | 4 | 2 | 3 | 1 | 34.00 | 17.80 | 24.67 | 32.16 |
| 15 | 4 | 3 | 2 | 4 | 11.63 | 27.71 | 35.61 | 68.15 |
| 16 | 4 | 4 | 1 | 3 | 9.25 | 38.05 | 53.83 | 70.48 |
| $K_1$/4 | 47.86 | 31.69 | 51.45 | 37.04 | | | | |
| $K_2$/4 | 53.56 | 40.38 | 56.33 | 43.16 | | | | |
| $K_3$/4 | 40.15 | 53.96 | 40.61 | 54.80 | | | | |
| $K_4$/4 | 47.28 | 62.81 | 40.47 | 53.85 | | | | |
| 极差 | 13.41 | 31.12 | 15.86 | 17.76 | | | | |
| 优水平 | $A_3$ | $B_1$ | $C_4$ | $D_1$ | | | | |

表 5 市场上透明质酸凝胶产品中透明质酸钠的质量浓度及降解率

Table 5 Content of HA and the degradation rate of HA with the products on the market

| 产品 | 透明质酸钠质量浓度/(mg/mL) | 降解率/% $R_{24}$ | 降解率/% $R_{48}$ | 降解率/% $R_{72}$ |
|---|---|---|---|---|
| 润百颜 | 21.14 | 11.28 | 14.47 | 18.95 |
| 艾丽微 | 22.89 | 7.58 | 10.53 | 16.31 |
| 海薇 | 15.82 | 13.53 | 17.12 | 20.88 |
| 瑞兰 | 21.11 | 9.50 | 13.85 | 24.35 |
| 初次交联 | 28.84 | 9.76 | 16.79 | 20.45 |
| 强化交联 | 29.03 | 6.85 | 7.56 | 12.40 |

## 2.2 透明质酸钠质量浓度的测定

透明质酸钠的质量浓度可以通过测定葡萄糖醛酸的质量浓度来计算得到,目前市场上透明质酸凝胶产品中透明质酸钠的质量浓度见表 5。筛选出抗酶解能力强并且透明质酸钠质量浓度接近目前市场现有产品的凝胶及交联条件。

## 2.3 透明质酸凝胶强化交联条件的筛选

以反应温度是 50 ℃,CNaOH 的浓度是 0.1 mol/L,反应时间是 4.5 h,BDDE/HA 是 1:2 为条件,将得到的透明质酸凝胶进行强化交联,所得的结果如表 6 所示。由表 6 可知,强化交联对初次交联的影响有增强作用也有减弱作用。其中第 1 组实验得到的降解率最小。通过极差分析可知,对交联反应的影响程度大小依次是反应时间、BDDE/HA、NaOH 的浓度、反应温度。即反应时间影响最大,温度的影响最小。采用反应温度是 35 ℃,CNaOH 的浓度是 0.05 mol/L,反应时间是 1.5 h,BDDE/HA 是 1:8 的条件将得到。此凝胶连续三天的降解率分别为 6.85%、7.56%、12.4%,透明质酸钠含量为 29.03 mg/mL。

表 6 HA 强化交联

Table 6 Enhanced-crosslinking of HA

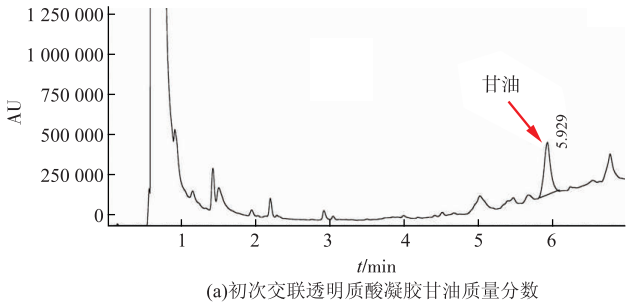
| 水平 | 温度/℃ $A$ | [NaOH]/(mol/L) $B$ | 时间/h $C$ | BDDE/HA $D$ | 透明质酸钠质量浓度/(mg/mL) | 降解率/% $R_{24}$ | 降解率/% $R_{48}$ | 降解率/% $R_{72}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 34.13 | 7.62 | 8.95 | 13.78 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 25.25 | 9.19 | 12.73 | 15.47 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 11.09 | 19.80 | 25.65 | 39.54 |
| 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 22.44 | 10.86 | 11.95 | 17.97 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 3 | 19.11 | 10.77 | 10.92 | 19.82 |
| 6 | 2 | 2 | 1 | 4 | 24.98 | 9.33 | 9.98 | 17.55 |
| 7 | 2 | 3 | 4 | 1 | 21.09 | 14.12 | 14.38 | 23.74 |
| 8 | 2 | 4 | 3 | 2 | 21.55 | 12.19 | 12.44 | 19.47 |
| 9 | 3 | 1 | 3 | 4 | 22.82 | 11.63 | 11.63 | 19.69 |
| 10 | 3 | 2 | 4 | 3 | 18.19 | 14.74 | 11.91 | 26.17 |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 2 | 18.68 | 12.18 | 13.48 | 21.30 |
| 12 | 3 | 4 | 2 | 1 | 16.95 | 21.72 | 21.72 | 30.06 |
| 13 | 4 | 1 | 4 | 2 | 17.25 | 14.29 | 16.48 | 28.39 |

续表 6

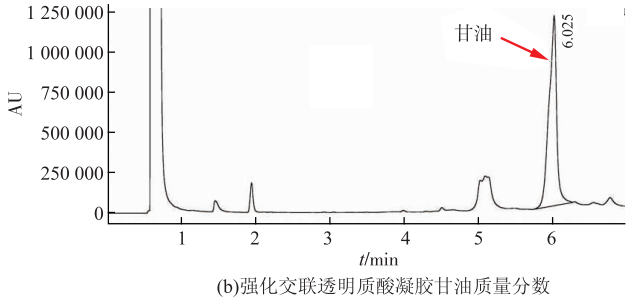
| 水平 | 温度/℃ *A* | [NaOH]/(mol/L) *B* | 时间/h *C* | BDDE/HA *D* | 透明质酸钠质量浓度/(mg/mL) | 降解率/% $R_{24}$ | 降解率/% $R_{48}$ | 降解率/% $R_{72}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 14 | 4 | 2 | 3 | 1 | 16.82 | 16.26 | 15.30 | 26.87 |
| 15 | 4 | 3 | 2 | 4 | 15.19 | 15.69 | 17,29 | 22.27 |
| 16 | 4 | 4 | 1 | 3 | 19.95 | 11.54 | 11.81 | 22.92 |
| $K_1$/4 | 21.10 | 20.08 | 18.54 | 23.27 | | | | |
| $K_2$/4 | 20.15 | 21.27 | 21.66 | 20.91 | | | | |
| $K_3$/4 | 24.31 | 26.86 | 26.39 | 27.11 | | | | |
| $K_4$/4 | 25.11 | 22.61 | 24.07 | 19.37 | | | | |
| 极差 | 4.96 | 6.78 | 7.85 | 7.74 | | | | |
| 优水平 | A2 | B1 | C1 | D4 | | | | |

## 2.4 透明质酸凝胶的交联度

所得的气相色谱图见图 3。通过计算得到 2.5 g 凝胶酸解得到甘油的摩尔数分别是 $4.91\times10^{-5}$ mol 和 $8.53\times10^{-5}$ mol,HA 双糖与甘油的摩尔比约为 4.2:1,假设 HA 的羟基与 BDDE 中所有的醚键均开环反应，得到初次交联得到的凝胶的交联度为 16.54%,强化交联得到的凝胶的交联度为 54.52%。




(a)初次交联透明质酸凝胶甘油质量分数




(b)强化交联透明质酸凝胶甘油质量分数

**图 3 将透明质酸凝胶完全酸解后,通过气相色谱测定甘油的质量分数(6.0 min)**

**Fig. 3 Determination of cross-link degree After an acidic hydrolyzation,the glycerol content was determined by GC chromatography,and the glycerol peak was at 6.0 min**

## 2.5 透明质酸凝胶的红外光谱分析

初次交联得到的凝胶、强化交联得到的凝胶以及未交联的透明质酸的 FT-IR 图谱见图 4。从图 4 可以看出，在 3 420$^{-1}$ cm 附近有羟基 O-H 或 N-H 吸收峰，在 1 660$^{-1}$ cm 附近有 C=O 吸收峰,在 1 400$^{-1}$ cm 附近有 C-N 吸收峰，在 1 050$^{-1}$ cm 附近有 C-O-C 吸收峰。说明初次交联、强化交联后得到的凝胶的特征吸收峰与未交联的透明质酸的特征吸收峰基本一致,符合规定。

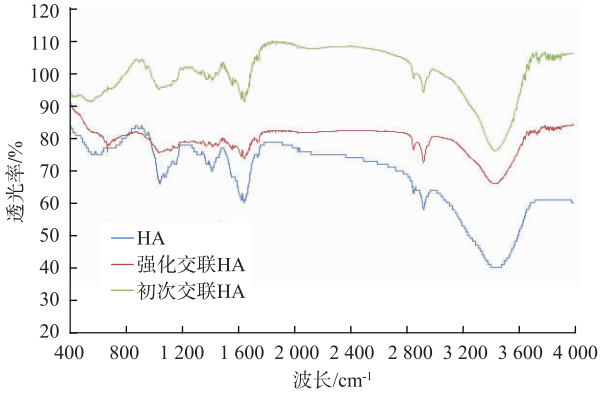



**图 4 红外光谱分析**

**Fig. 4 FT-IR spectra of different HA gels**

## 2.6 透明质酸凝胶的细胞毒性

通过计算得到透明质酸凝胶的细胞相对增生率(RGR)以及毒性级别见表 7。其中初次交联所得的凝胶在 570 nm 和 630 nm 处的 RGR 分别为 88.9%和 85.6%,均大于 80%,为一级毒性,强化交联所得的凝胶的 RGR 在 570 nm 和 630 nm 处分别为 85.5%和 80.9%,均大于 80%,为一级毒性,都符合要求。

表 7　透明质酸凝胶的细胞毒性分级

Table 7　Cytotoxicity grade for HA gels

| 组别 | RGR(570 nm) | RGR(630 nm) | 级别 |
|---|---|---|---|
| 空白对照 | 100% | 100% | 0 |
| 初次交联凝胶 | 88.9% | 85.6% | 1 |
| 强化交联凝胶 | 85.5% | 80.9% | 1 |

## 2.7　透明质酸凝胶的遗传毒性

其遗传毒性结果见表 8。可知，初次交联和强化交联所得的凝胶在加与不加 S9 混合物的条件下，其回变率(MR 值)均小于 2，判定为阴性结果，没有明显的致突变性。

表 8　透明质酸凝胶的 Ames 试验($\bar{x}\pm s$，$n$=3)

Table 8　Ames test of HA gels($\bar{x}\pm s$，$n$=3)

| 组别 | 剂量/(μg/皿) | TA97 | | TA98 | | TA100 | | TA102 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | −S9 | +S9 | −S9 | +S9 | −S9 | +S9 | −S9 | +S9 |
| 自发回变 | | 32±3 | 36±3 | 12±2 | 14±2 | 43±4 | 45±3 | 78±5 | 82±6 |
| 蒸馏水 | 200 | 27±2 | 28±1 | 16±1 | 12±1 | 44±2 | 39±2 | 75±3 | 77±4 |
| 初次交联凝胶 | 5 | 38±2 | 42±2 | 13±1 | 16±1 | 56±2 | 64±3 | 102±6 | 113±5 |
| | 50 | 37±2 | 39±2 | 16±1 | 15±1 | 40±2 | 43±2 | 97±3 | 93±2 |
| | 500 | 31±2 | 33±2 | 17±1 | 19±1 | 47±2 | 52±2 | 87±2 | 92±2 |
| | 5000 | 29±2 | 34±2 | 15±1 | 18±2 | 46±2 | 49±2 | 99±2 | 106±7 |
| 强化交联凝胶 | 5 | 36±1 | 39±1 | 14±1 | 18±1 | 54±2 | 52±1 | 89±2 | 83±3 |
| | 50 | 43±2 | 37±2 | 19±2 | 21±1 | 44±1 | 62±3 | 99±4 | 87±4 |
| | 500 | 44±1 | 33±1 | 16±1 | 13±1 | 59±2 | 52±1 | 107±3 | 94±3 |
| | 5000 | 37±1 | 34±1 | 14±1 | 13±1 | 48±2 | 45±1 | 82±4 | 86±3 |
| 2-氨基芴 | 10 | | 863±76 | | 893±91 | | 915±87 | | |
| 甲基磺酸甲酯 | 1 | | | | | 974±93 | | 1085±116 | |
| 敌克松 | 50 | 963±89 | | 843±84 | | | | | |
| 1,8-二羟基蒽醌 | 50 | | | | | | | | 1121±153 |

## 2.8　透明质酸凝胶的溶血性

初次交联和强化交联所得的凝胶的溶血度见表 9。其中溶血度分别为 2.67%和 2.60%，均小于 5%，认为具有良好的生物相容性，没有明显的溶血性，符合一般生物材料溶血度的要求。

表 9　透明质酸凝胶的溶血度

Table 9　Hemolysis for HA gels

| 材料 | 溶血度/% |
|---|---|
| 初次交联凝胶 | 2.67 |
| 强化交联凝胶 | 2.60 |

# 3　结　语

通过初次交联-强化交联的偶联模式来制备透明质酸凝胶，得到初次交联凝胶和强化交联凝胶。设计四因素四水平的正交试验来确定初次交联的最佳条件：反应温度 50 ℃，氢氧化钠浓度为 0.1 mol/L，反应时间 4.5 h，透明质酸与交联剂的摩尔比为 2∶1；强化交联的最佳条件：反应温度 35 ℃，氢氧化钠浓度为 0.05 mol/L，反应时间 1.5 h，透明质酸与交联剂的摩尔比为 8∶1。并测得凝胶的透明质酸钠质量浓度从初次交联的 28.84 mg/mL 上升到强化交联的 29.03 mg/mL，没有较大的变化。分别用透明质酸酶降解凝胶，发现强化交联的凝胶的降解率下降了 30%左右，交联度提高了 3 倍多。其中初次交联凝胶的抗透明质酸酶降解效率接近市场现有水平，强化交联凝胶的抗透明质酸酶降解效率在原有水平有较大提升。通过 FT-IR 分析发现，凝胶的结构与 HA 相比基本没有变化，并且在细胞毒性、遗传毒性、溶血试验中，结果均符合要求。因此，本方法可以得到抗酶解能力强的凝胶，并且可以提高交联度。但是，透明质酸凝胶在人体内的滞留时间需要进一步通过实验证明。

## 参考文献:

[1] CHUAH C T,SARKO A,DESLANDES Y,et al. Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. 14. Triple-helical crystalline-structure of Curdlan and Paramylon hydrates[J]. **Macromolecules**,1983,16:1375-1382.

[2] OH E J,PARK K,KIM K S,et al. Target specific and long-acting delivery of protein,peptide,and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives[J]. **J Control Release**,2010,141(1):2-12.

[3] MEYER K,PALMER J W. The polysaccharide of the vitreous humor[J]. **J Biol Chem**,1934,107(3):629-633.

[4] TOMKAUFMANN KERSTIN MOHLE,HANS-JOMG HOFMANN,KLAUS ARNOLD. Molecular dynamics study of hyaluronic acid in water[J]. **Jan Theo-Chem**,1998,422:109-121.

[5] GIBBS D A,MERRIL E W,SMITH K A,et al. Rheology of hyaluronic acid[J]. **Biopolymers**,1968,6:777-791.

[6] WIK B H,WIK O. Rheology of hyaluronan and its derivatives[A]. Laurent T C. The Chemistry,Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its derivatives[C]. London:Portland Press,1998:25-32.

[7] LIESEGANG T J. Viscoelastic substance in ophthalmology[J]. **Survery Ophthalmol**,1990,34:268-293.

[8] MASUADA K,SAWA M,FUKADO Y,et al. Phase clinical study of sodium hyaluronate in penetrating keratoplasty[J]. **Jpn Pharmacol Ther**,1991,19:365-375.

[9] MCDONLAND J N,LEVICK J R. Effects of intra-articular hyaluronan on pressure-flow relation across synovium in anaesthetized rabbits[J]. **J Physiol**,1995,485:179-193.

[10] GAO Haijun,CHEN Jian,GUAN Zhizhong,et al. Study on hyaluronic acid (HA) production with shake flask fermentation by *Streptococcus zooepidemics* H23[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,1999,18(3):17-22.(in Chinese)

[11] LIU Jinlong,ZHAO Guoqun,LI Zhimin,et al. Effect of culture condition on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus equisimilis*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(2):209-214.(in Chinese)

[12] ZHANG Wei,YAN Cuie. Hyaluronic acid and its derivatives as drug carriers[J]. **Process in Chemistry**,2006,18(12):1684-1690.(in Chinese)

[13] HSING-WEN SUNG,YEN CHANGB,CHI-TUNG CHIUA,et al. Mechanical properties of a porcine aortic valve fixed with a naturally occurring crosslinking agent[J]. **Biomaterials**,1999,20(19):1759-1772.

[14] HSING-WEN SUNG,YEN CHANGB,CHI-TUNG CHIUA,et al. In vitro surface characterization of a biological patch fixed with a naturally occurring crosslinking agent[J]. **Biomaterials**,2000,21(13):1353-1362.

[15] CHEN-CHI TSAIA,YEN CHANGB,HSING-WEN SUNG,et al. Effects of heparin immobilization on the surface characteristics of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent(genipin):an in vitro study[J]. **Biomaterials**,2001,22(6):523-533.

[16] YEN CHANG,TSAI CHEN-CHI,LIANG HUANG-CHEN,et al. In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent(genipin)[J]. **Biomaterials**,2002,23(12):2447-2457.

[17] SUNG HSING-WEN,LIANG I-LIN,CHEN CHIUN-NAN,et al. Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent(genipin)[J]. **Journal of Biomedical Materials Research**,2001,55(4):538-546.

[18] HSING-WEN SUNG,RONG-NAN HUANG,LYNN L H,et al. Feasibility study of .a naturally crosslinking reagent for biological tissue fixation[J]. **Journal of Biomedical Materials Research**,1998,42(4):560-567.

[19] 刘华,李建勇,马贤鹏. 一种透明质酸的纯化方法[P]. 中国专利:CN 200810040864,2008-10-04.

[20] AGERP B,BERG P,& AERMARK,C. Non-animal stabilized hyaluronic acid:a new formulation for the treatment of osteoarthritis[J]. **Bio Drugs**,2005,19(1):23-30.

[21] EDSMAN K,HJELM R,LARKNER H,,et al. Intra-articular duration of DurolaneTM after single injection into the rabbit knee [J]. **Cartilage**,2011,2(4):384-388.

[22] 杨彪. BDDE 交联透明质酸凝胶修饰度的测定[D]. 济南:山东大学,2015.

[23] 曲建全. 化妆品用透明质酸钠的质量标准及检验方法研究[D]. 济南:山东大学,2013

[24] KENNE L,GOHIL S,NILSSON E M,et al. Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels-definitions and analytical methods[J]. **Carbohydrate Polymers**,2013,91(1):410-418.

[25] 中华人民共和国医药行业标准. 医用透明质酸钠凝胶 YY/T0308-2015[S]. 北京:中国标准出版社,2015.

[26] BITTER T ,MUIR H M . A modified uronic acid carbarbazole reation[J]. **Anal Biochem**,1962,4:330-333.

[27] CHEN Jianying，WANG Min，LIU Jie，et al. Preparation of cross-linked sodium hyaluronate gel for injection and research on its resistance to enzymatic degradation in vitro[J]. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**，2008，29（4）：262-265.（in Chinese）
[28] 杜国辉. 交联透明质酸的制备、性质及治疗骨关节炎疗效的研究[D]. 济南：山东大学，2010.
[29] WANG Xin，ZHU Xuetao，SHI Yanping. Experiment on the cytotoxicity of medical sodium hyaluronate[J]. **Food and Drug**，2006，8（2）：31-33.（in Chinese）
[30] GB15193.4-2003. 鼠伤寒沙门氏菌/ 哺乳动物微粒体酶试验[S].
[31] XING Dongwei，TANG Lan，ZHANG Minguang，et al. The haemolytic experiment of asparagus colloid[J]. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**，2005，16（11）：1067-1068.（in Chinese）

## 科　技　信　息

**欧盟评估一种麦芽糖淀粉酶的安全性**

2019 年 7 月 29 日，欧盟食品安全局（EFSA）发布关于来自转基因大肠杆菌（菌株 BLASC）的麦芽糖淀粉酶（maltogenic amylase）安全性的评估结果。

据了解，这种食品酶是由 Advanced Enzyme Technologies 公司用转基因大肠杆菌（菌株 BLASC）生产的。这种食品酶旨在用于烘焙和酿造过程以及生产葡萄糖浆的淀粉加工中。经过评估，专家小组得出结论，这种食品酶在预期使用条件下不会引起安全问题。

［信息来源］食品伙伴网. 欧盟评估一种麦芽糖淀粉酶的安全性 [EB/OL]. (2019-7-30). http://news.foodmate.net/2019/07/528163.html