

辐照交联透明质酸的降解特性研究

张 丽 张丽叶*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 用甲基丙烯酸缩水甘油酯(GM)对透明质酸(HA)进行接枝改性,制备交联透明质酸衍生物(GMHA),通过辐照获得透明质酸凝胶。分光光度计测定吸光度表明所制备的 HA 凝胶是一种可降解的生物材料。其稳定性受到制备条件 and 环境条件的影响:如 HA 的分子量为 70 万时在相对长时间内比分子量为 10 万时表现的相对稳定;当分子量相同,辐照剂量为 1 kGy 时降解明显,辐照剂量为 5 kGy 时表现出较好的稳定性;HA 凝胶在中性环境条件下容易引起降解,在 pH=4 时表现的相对稳定;中低温度有利于 HA 凝胶的稳定,在高温 50℃时降解迅速。

关键词: 透明质酸; 交联; 透明质酸凝胶; 稳定性

中图分类号: TQ050.425

引 言

透明质酸(HA)是一种线型聚阴离子黏多糖,是人和动物皮肤、玻璃体、软骨组织和关节滑液的重要组成部分。天然的 HA 除具有高度粘弹性、可塑性、渗透性以外,还具有良好的生物相容性。但是,天然 HA 水溶性极强,在组织中易扩散和降解,体内存留时间较短,所以在应用上受到限制^[1-2]。

近年来,为了使 HA 能够更好更广泛的应用于医药保健等领域,可以通过对 HA 进行化学修饰或者交联,从而改善它的水溶性和降解特性^[3]。有文献报道 HA 及其交联衍生物已被用作类固醇类药物、多肽和蛋白类药物及各种抗癌药物的运送载体。这类新型药物载体能够明显延长药物在用药部位的存留时间,降低生物降解率,提高生物利用度,减少其不良反应^[4-5]。

陈森军等^[6]利用甲基丙烯酸缩水甘油酯(GM)接枝到 HA 链上的方法,通过将改性生成的 GMHA 产物用 γ 射线辐照获得交联的方法,无需引发剂或者催化剂就获得纯度高且无毒的交联 HA 凝胶衍生物。在此实验结果的基础上,本文通过测定葡萄糖醛酸的方法综合考察了该方法制备得到的 HA 凝胶的降解稳定性,并且分别在分子量、辐照剂量、

GMHA 浓度等制备条件和 pH、温度、NaCl 浓度等环境条件下对 HA 凝胶稳定性的影响进行了研究。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

透明质酸(分子量 100 万,400 万,700 万),山东福瑞达公司;三乙胺,分析纯,天津市福晨化学试剂厂;甲基丙烯酸缩水甘油酯,分析纯,日本三菱公司;四丁基溴化铵,分析纯,天津市津科精细化工研究所;唑啉,分析纯,北京化学试剂公司;四硼酸钠,分析纯,北京北化精细化学品有限责任公司。

Co⁶⁰源,北京原子高科金辉辐射技术有限公司;DHG-9076A 真空干燥箱,上海申立玻璃仪器有限公司;722S 分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司。

1.2 交联 HA 凝胶的制备

取 HA 0.05 g,放入 20 mL 去离子水中,待溶解均匀后依次添加 1 mL 三乙胺,1 mL 甲基丙烯酸缩水甘油酯,0.054 g 四丁基溴化铵等,旋转搅拌 24 h,60℃恒温培养 30 min。将反应液用丙酮立即沉淀,并将沉淀物洗涤 2 次后干燥至恒重。将干燥后的白色固体配制成不同浓度的溶液,在不同辐照剂量下进行 γ 射线辐照,剂量率为 20 Gy/min,即得交联 HA 凝胶。

1.3 HA 凝胶降解性测定

通过测定葡萄糖醛酸含量来表征 HA 凝胶的降解情况^[7-8]。将样品试管置于冰水浴中,用酸式滴定管缓慢的向每管中加入 0.025 mol/L 四硼酸钠硫酸(使用之前在 4℃冰箱内贮存至少 2 h)5 mL,将其

收稿日期: 2009-02-25

第一作者: 女,1978 年生,硕士生

* 通讯联系人

E-mail: lyzhang@mail.buct.edu.cn

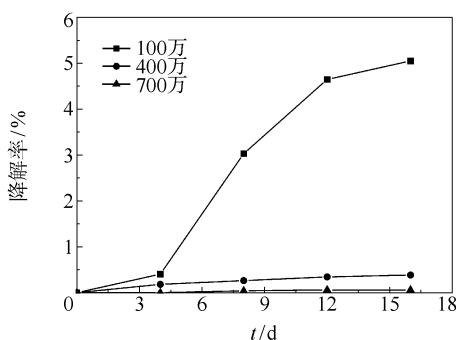
溶液混匀并置沸水浴中煮沸 20 min 后取出,冷却至室温。各试管内均加入咪唑乙醇溶液 0.2 mL,待充分溶解后,置于室温 2 h。用 0 号管(和样品管等量的去离子水)做对照,用分光光度计测定 550 nm 处各样品管的吸光度。经透明质酸钠水解后生成的葡萄糖醛酸能与咪唑试剂作用产生紫色,生成的颜色深浅与葡萄糖醛酸质量分数成正比。吸光度的大小和葡萄糖醛酸质量分数成正相关,进而反映 HA 的降解情况^[9]。

2 结果与讨论

2.1 制备条件对 HA 凝胶稳定性的影响

2.1.1 分子量

分子量对 HA 凝胶的影响如图 1 所示,由图 1 可以看出,随着时间的增加,分子量大的 HA 交联而成的凝胶在相对长时间内比较稳定,降解缓慢。而分子量小的 HA 交联而成的凝胶在 4 d 时间后降解速度明显增快。由于高分子量的透明质酸在单位体积内发生交联的几率以及程度都高于低分子量的透明质酸,因此高分子量容易获得高交联度,HA 凝胶相对比较稳定,可以保持相对较长时间。



$w(\text{GMHA}) = 5\%$, 辐照剂量 3 kGy

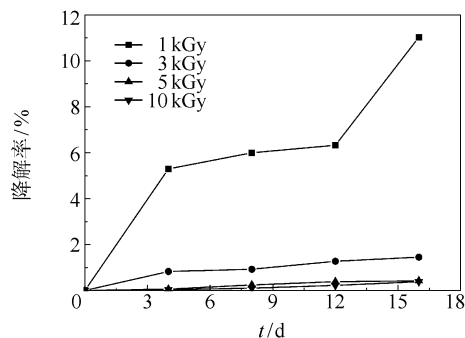
图 1 分子量对 HA 凝胶降解性影响

Fig.1 The effect of the molecular weight on the degradation of HA gels

2.1.2 辐照剂量

辐照剂量对 HA 凝胶的影响如图 2 所示,由图 2 可见,随着辐照剂量的增加,HA 凝胶趋向于更稳定,剂量为 1 kGy 时 HA 凝胶随着时间的增加,降解明显,而当辐照剂量达到 5 kGy 时,基本上不受时间延长的影响,能较稳定的保持半个月以上。由于高辐照剂量能够产生较多的自由离子,HA 分子间发生碰撞交联反应的几率也大大增加,因此高辐照剂量有利于提高交联度,有利于凝胶的稳定性。但是

这里也需要指出并不是辐照剂量越大越好,随着辐照剂量的进一步增大,因辐照而产生的交联与降解的动态平衡就会向降解偏移,可能会随着辐照剂量的增大交联度反而降低。



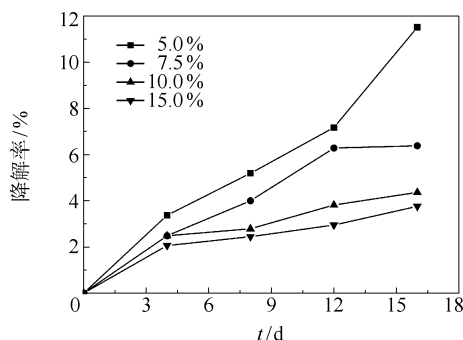
$w(\text{GMHA}) = 5\%$, HA 原始分子量为 100 万

图 2 辐照剂量对 HA 凝胶降解性的影响

Fig.2 The effect of the irradiation dosage on the degradation of HA gels

2.1.3 GMHA 质量分数

GMHA 初始质量分数的增加对 HA 凝胶的稳定性影响如图 3 所示。由图 3 可以看出。随着质量分数的增加,HA 凝胶的稳定性也在增加。这可以解释为,在高质量分数下,单位体积内 HA 数量比较多,分子之间靠的比較近,在辐照下产生的自由基比較接近且数量多,因而比较容易发生交联反应。所以在高质量分数下辐照得到的 HA 凝胶交联度比较高,相对比较稳定。



辐照剂量 3 kGy, HA 分子量为 100 万

图 3 GMHA 质量分数对 HA 凝胶稳定性的影响

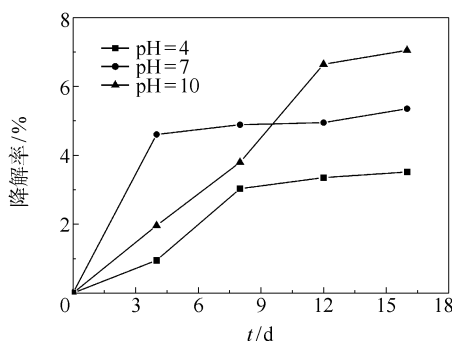
Fig.3 The effect of the GMHA concentration on the degradation of HA gels

2.2 环境条件对 HA 凝胶稳定性的影响

2.2.1 pH

pH 对 HA 凝胶的影响如图 4 所示,由图 4 可见,在 $\text{pH} = 7$ 的时候,HA 凝胶在开始几 d 表现出较快的降解特性,随后表现的相对稳定。这表明在中

性条件下容易发生降解,但是降解到一定程度即保持较稳定状态。另外在 pH=4 的时候相对 pH=7, pH=10 表现的更为稳定,可能是碱性条件下容易引发 HA 的羧基的反应,引发 HA 凝胶的降解,而酸性条件有利于丙烯酸结构的稳定^[10-11]。



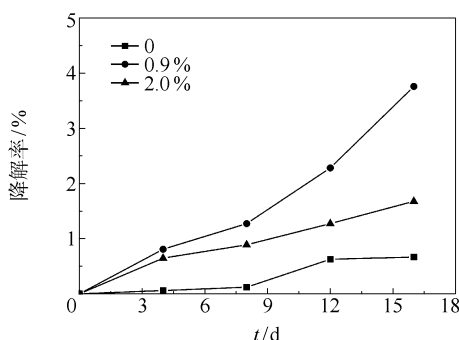
辐照剂量 3 kGy, $w(\text{GMHA}) = 5\%$, HA 分子量为 100 万

图 4 pH 对 HA 凝胶稳定性的影响

Fig. 4 The effect of the pH on the degradation of HA gels

2.2.2 NaCl 质量分数

离子强度对 HA 凝胶的影响如图 5 所示,由图 5 可以看出随着离子强度的增大 HA 凝胶的降解性增大,但是在 NaCl 质量分数为 0.9% 的条件下该凝胶的降解比较缓慢,说明在生理条件下该凝胶能保持一定的稳定性。但是随着离子强度增大稳定性会降低。



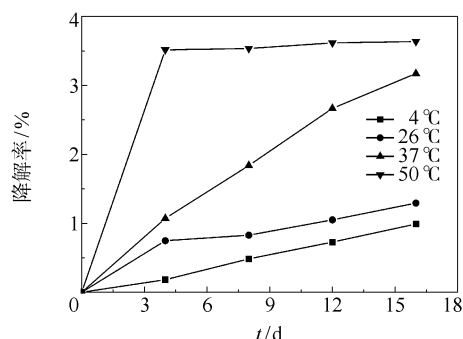
辐照剂量 3 kGy, $w(\text{GMHA}) = 5\%$, HA 分子量为 100 万

图 5 NaCl 质量分数对 HA 凝胶稳定性的影响

Fig. 5 The effect of the NaCl concentration on the degradation of HA gels

2.2.3 温度

温度对 HA 凝胶的稳定性如图 6 所示。由图 6 可以看出随着温度的升高,透明质酸的稳定性逐渐降低,而在 50℃ 高温下,HA 降解较快较多。中低温度有利于 HA 的稳定,而生理温度下该凝胶的稳定性有待提高。



辐照剂量 3 kGy, $w(\text{GMHA}) = 5\%$, HA 分子量为 100 万

图 6 温度对 HA 凝胶的稳定性的影响

Fig. 6 The effect of the temperature on the degradation of HA gels

3 结论

本文制备的 HA 凝胶是一种可降解的生物材料。分析了影响其稳定性的影响因素,HA 的分子量为 70 万时相比分子量为 10 万时表现的稳定;分子量相同时,辐照剂量为 5 kGy 时相比 1 kGy 时表现出较好的稳定性;高质量分数下辐照得到的 HA 凝胶交联度比较高,相对比较稳定。

参考文献:

- [1] 覃彩凤,王森,陈晓峰. 透明质酸的降解方法及工艺条件研究[J]. 食品科技, 2007, 32(4): 32-35.
- [2] 聂素云,卢文庆,冯晓健,等. 交联透明质酸的降解及其释药性能[J]. 功能材料, 2007, 38(2): 1907-1910.
- [3] 凌沛学,贺艳丽. 玻璃酸钠的临床研究应用进展[J]. 中国生化药物杂志, 1998, 19(4): 200-204.
- [4] 张伟,闫翠娥. 透明质酸及其衍生物药物载体[J]. 化学进展, 2006, 18(12): 1684-1690.
- [5] 陈景华,陈静涛,徐政,等. 聚乙二醇制备的透明质酸衍生物的生物降解性[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(2): 98-101.
- [6] 陈森军,张丽叶. 辐照交联改性透明质酸的研究[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2009, 36(3): 46-49.
- [7] 贺艳丽,陈建英,王玉玲. 交联透明质酸体外耐酶试验方法的研究[J]. 食品与药品, 2005, 7(1): 32-35.
- [8] Leach J B, Schmidt C E. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds[J]. Biomaterials, 2005, 26(2): 125-135.
- [9] Jeon O, Song S J, Lee K J, et al. Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic acid hydrogels

- cross-linked at various cross-linking densities[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 70: 251 – 257.
- [10] Zhao L, Xu L, Mitomo H, et al. Synthesis of pH-sensitive PVP/CM-chitosan hydrogels with improved surface property by irradiation [J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 64(3): 473 – 480.
- [11] Abatangelo G, Barbucci R, Brun P, et al. Biocompatibility and enzymatic degradation studies on sulphated hyaluronic acid derivatives[J]. Biomaterials, 1997, 18: 1411 – 1415.

Degradation characteristics of hyaluronic acid crosslinked by irradiation

ZHANG Li ZHANG LiYe

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: GM grafting method was adopted to prepare HA derivatives (GMHA) and get HA gels after exposing it under γ -ray. It was shown in the spectrophotometer test that HA gel was a degradable material. The stability of the gel was changed by the prepared condition and the environmental condition: the 700000 Da molecular weight was more stable than 100000 Da molecular weight. The 1 kGy of irradiation dosage was less stable than 5 kGy for the HA gels. The HA gel was much easier to degrade when pH at 7, and the low temperature was good for the gel to keep stable, it degraded rapidly at 50 °C.

Key words: hyaluronic acid; crosslinking; HA gels; stability