



酚酸-透明质酸钠接枝物的制备及体外抗氧化研究

张晓月^{1)*} 王晓娜^{2)*} 蒋敏¹⁾ 韩婷婷²⁾ 龚劲松¹⁾ 李清娜¹⁾ 杨素珍²⁾ 史劲松^{1)**}

(¹⁾ 江南大学生命科学与健康工程学院, 无锡 214122; (²⁾ 山东福瑞达生物股份有限公司, 济南 250101)

摘要 目的 以透明质酸钠 (sodium hyaluronate, HA) 为研究对象, 利用酚酸对其修饰改性以期获得抗氧化活性更好甚至新活性的分子结构。方法 采用自由基介导的接枝方法制备 5 种不同的酚酸-透明质酸钠接枝物, 选出接枝度最高的接枝物进行合成条件优化。通过红外光谱 (infrared spectroscopy, IR)、紫外光谱 (ultraviolet spectrum, UV)、核磁共振氢谱 (¹H NMR spectroscopy, ¹H NMR)、场发射扫描电镜 (field emission scanning electron microscopy, FESEM)、热重分析法 (thermogravimetry analysis, TGA) 对接枝物进行表征, 通过测定接枝物对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH·)、2,2-联氮-(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS⁺·) 及超氧阴离子自由基 (O₂^{·-}) 清除能力反应出接枝物的体外抗氧化能力。结果 在相同条件下, 5 种酚酸-透明质酸钠接枝物中接枝度最高的是阿魏酸-透明质酸钠接枝物 (ferulic acid-sodium hyaluronate FA-HA), 对 FA-HA 合成条件行进优化, 得到最高的接枝度为 (16.59±0.31) mg/g。通过 IR、UV、¹H NMR、FESEM、TGA 验证了接枝物的形成, 推测可能形成了酯键。分子质量检测结果表明, 通过本方法得到的接枝物的分子质量有小幅下降但分子分布均一性提高, 平均分子质量为 31.5 ku。FESEM 结果显示, 接枝物呈现紧密相连的片状结构, 表面相对光滑。热重分析 (TGA) 结果表明, 接枝物的热稳定性降低。体外抗氧化实验结果表明, 在 0.25~10 g/L 浓度范围内, FA-HA 对 DPPH·、ABTS⁺· 和 O₂^{·-} 的最大清除率分别为 (83.76±4.86)%、(76.95±5.06)% 和 (83.08±2.51)%, 高于原 HA 及 FA。结论 自由基接枝法成功将 FA 与 HA 接枝在一起, 且接枝后的 FA-HA 具有更好的体外抗氧化活性, 为酚酸-HA 接枝物的深入研究和开发应用提供了理论依据。

关键词 透明质酸钠, 酚酸, 阿魏酸, 自由基接枝, 抗氧化
中图分类号 O636.1

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0413

透明质酸是一类由 β -D 葡萄糖醛酸和 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖重复排列聚合构成的阴离子糖胺聚糖, 作为一种广泛存在于动物与人体组织及细胞外基质中的多糖, 其生物相容性良好、生物活性多样, 已被广泛应用于医药、化妆品、食品等领域。与其他多糖相似, 分子链上丰富的活性羟基与活泼氢赋予了透明质酸一定的抗氧化活性^[1], 但由于分子结构复杂、制备方法多样使其抗氧化活性容易受到多种因素的影响^[2], 如高瑞昌等^[3]发现, 随着分子质量下降, 低分子透明质酸对羟基自由基的清除率以及还原力增大, 但是不同分子质量之间的低分子透明质酸清除羟基自由基能力相差不大, 而当分子质量进一步下降时, 清除率反而减小。鉴于以上, 利用透明质酸分子链上氨基、羧基等反应活性基团, 对其修饰改性以期获得抗氧化活性更好甚至

具有新活性的分子结构是透明质酸功能化修饰与调控的重要策略之一^[4-10]。

酚酸是一类广泛存在于植物体中的非黄酮多酚, 研究显示, 其不仅可以通过结构中的酚羟基提供活泼氢使自由基猝灭, 还可以提高胞内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 等抗氧化酶活性, 从而在机体中发挥优异的抗氧化效果^[11]。近些年, 包括食品、化妆品等多个领域的研究者致力于将酚酸接枝于多糖糖链以提高抑菌、抗氧化等活性或挖掘新功能^[12]。迄今为止, 通过酶法、乙二胺法、自由基

* 并列第一作者。

** 通讯联系人。

Tel: 0510-85327353, E-mail: Shijs@163.com

收稿日期: 2023-10-30, 接收日期: 2024-02-28

介导法等手段均成功实现了酚酸与多糖的接枝, 研究结果显示, 由于受到原料、试验条件等影响, 这些接枝物的接枝水平各异, 但与原多糖相比, 大多数接枝物不仅在理化性质(包括溶解度、稳定性等)上发生了不同程度的变化, 在抗氧化和抑菌活性等方面也得到了提升^[13-14]。在这些制备方法中, 自由基介导法因具备经济环保、简单安全等优点而备受关注, 虽然通过该方法已成功实现了多种酚酸-多糖的成功接枝, 如阿魏酸(ferulic acid, FA)-果胶^[15]、没食子酸-壳聚糖^[16-18]等, 但尚未见到应用于酚酸-透明质酸接枝的研究报道。除此之外, 目前酚酸-多糖接枝物研究多集中在食品包装材料或药物/食品功能成分载体领域, 而透明质酸在化妆品领域应用更为广泛, 对其进行酚酸接枝改性后是否会赋予其更高的抗氧化能力甚至新的功能, 进而扩大其在化妆品领域的应用范围值得关注。同时, 相较于阳离子、高反应活性的壳聚糖, 呈负电荷的透明质酸是否也能够通过自由基接枝法实现成功接枝, 与不同结构酚酸接枝的程度是否存在差异等均值得探究。

鉴于以上, 本研究以透明质酸钠(sodium hyaluronate, HA)为研究对象, 首次尝试通过自由基介导法将酚酸接枝到HA上, 首先制备了5种不同的酚酸-HA接枝物, 比较不同酚酸结构得到的接枝物的接枝度, 从中选出接枝度最高的种类, 再对其接枝反应条件(底物质量比、反应时间等)进行单因素条件优化, 随后, 采用包括紫外光谱(ultraviolet spectrum, UV)、红外光谱(infrared spectroscopy, IR)、核磁共振氢谱(¹H NMR spectroscopy, ¹H NMR)、热重分析法(thermogravimetry analysis, TGA)以及场发射扫描电镜(field emission scanning electron microscopy, FESEM)等方法对其理化性质进行表征分析。在此基础上, 对接枝物体外抗氧化活性进行研究, 为酚酸-HA接枝物的深入研究和开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

HA (34.4 ku) 由山东焦点福瑞达有限公司提供; 维生素C (Vc)、FA、没食子酸(gallic acid, GLA)、丁香酸(syringic acid, SA)、苯甲酸(benzoic acid, BA)、龙胆酸(gentisic acid, GTA)、福林酚、焦性没食子酸、1,1-二苯基-2-3

硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、K₂S₂O₈购于上海麦克林生化科技有限公司; 其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。3 500 u透析袋购于大连美仑生物技术有限公司。

1.2 仪器

天平, 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司; 冷冻干燥机, 北京照生行仪器设备有限公司; 红外光谱仪, 美国尼高力仪器公司; 酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司; 多头磁力搅拌器, 江苏科析仪器有限公司; 恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司; 生化培养箱, 上海博迅实业有限公司; 场发射扫描电子显微镜SU8200, 日立科学仪器(北京)有限公司。

1.3 接枝物的制备

参照文献^[15-16]制备酚酸-HA, 略有修改, 具体为: 在具塞锥形瓶中, 取250 mg HA溶于50 ml水中, 加入250 mg不同酚酸(FA、GLA、SA、BA、GTA)与50 mg Vc, 通过三通接口连接充满氮气的气球, 在氮气保护下活化30 min后, 加入1 ml浓度为1 mol/L的H₂O₂, 在室温下搅拌反应12 h, 反应结束后离心取上清, 在3 500 u的透析袋中透析48 h, 冷冻干燥, 得到白色粉末。

1.4 接枝度(GD)的测定

采用福林酚法^[19]进行测定, 将酚酸溶液稀释成不同质量浓度的标准溶液, 绘制标准曲线, 取1 ml用蒸馏水配置的0.1 g/L样品溶液于试管中, 加入5 ml 20%福林-酚试剂, 混合均匀, 黑暗中于30℃反应10 min, 加入2 ml Na₂CO₃溶液, 混合物在黑暗中静置2 h, 在760 nm处测定吸光度。将0.1 g/L的5种酚酸溶液稀释成梯度质量浓度的标准溶液(0.01~0.5 g/L), 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算不同酚酸-透明质酸接枝物的质量浓度, 再根据以下公式计算接枝物的接枝度:

$$GD/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\text{接枝物中酚酸的质量}/\text{mg}}{\text{接枝物总质量}/\text{g}} \quad (1)$$

1.5 合成条件优化

1.5.1 HA与FA质量比的影响

通过单因素法对HA与FA质量比进行条件优化。将H₂O₂:Vc摩尔比设置为4:1, 反应时间为12 h, 将HA与FA质量比设置为1:2、1:1、2:1、4:1, 按照1.3的流程进行实验, 反应结束后, 冻干得到产物, 进行接枝度测定。

1.5.2 H₂O₂:Vc摩尔比的影响

通过单因素法对H₂O₂与Vc摩尔比进行条件优

化。将HA与FA质量比设置为2:1,反应时间为12 h,将H₂O₂与Vc摩尔比设定为2:1、4:1、9:1、18:1,按照1.3的流程进行实验,反应结束后,冻干得到产物,进行接枝度测定。

1.5.3 反应时间的影响

通过单因素法对反应时间进行条件优化。将H₂O₂与Vc摩尔比设置为4:1,将HA与FA质量比设置为2:1,将时间设置为3、6、12、24、48 h,按照文1.3的流程进行实验,反应结束后,冻干得到产物,进行接枝度测定。

1.6 接枝物的表征

1.6.1 分子质量检测

使用凝胶渗透色谱法测定分子质量。准确称取2 mg接枝物以及原HA样品,蒸馏水溶解,0.22 μm滤膜过滤。色谱条件为:Waters 1525高效液相色谱仪(配2410示差折光测器和Empower工作站)进行检测,色谱条件为:色谱柱为UltrasphereTM Linear 300 mm×7.8 mm ID,流动相为0.1 g/L NaNO₃水溶液,流动速度为0.5 ml/min,检测温度为40°C。

1.6.2 UV表征

精密称取不同样品溶解于50%甲醇中,在200~400 nm紫外波长范围内进行全波长扫描分析,记录图谱。

1.6.3 IR表征

称取样品与溴化钾按照1:100的质量比进行混合后压片,在500~4 000 cm⁻¹的波数范围内进行扫描,记录图谱。

1.6.4 ¹H NMR表征

取新核磁管,用丙酮洗涤3次,放入烘箱烘干后取出待用。称取50 mg待测样品用重水溶解后转移至核磁管在核磁共振仪中进行检测,扫描频率为400 MHz,记录图谱。

1.6.5 TGA表征

采用TGA测定各个的样品热稳定性。以20 ml/min的速度将气体转换为氮气,并以10°C/min速率将样品从30°C加热至800°C。

1.6.6 FESEM微观结构观察

将接枝物粘在导电胶上,进行喷金处理,在扫描电压3.0 kV条件下,扫描电镜观察微观空间结构。

1.7 体外抗氧化实验

1.7.1 DPPH·清除能力测定

参考文献[20]进行DPPH·清除能力测试,

方法略有改动。无水甲醇溶解DPPH,配置0.6 g/L DPPH·工作液,避光保存备用。实验前使用甲醇继续稀释母液,调节至其在517 nm下吸光度为0.80±0.02。向96孔板中依次加入100 μl HA、FA-HA、FA(浓度为根据接枝度计算出相应浓度下FA-HA中相应的FA浓度)样品溶液与等体积DPPH·工作液,混合均匀,避光条件反应30 min,在517 nm处测定吸光度值(A)。以等体积蒸馏水代替样品作为空白对照,同法测定吸光度,按下式计算DPPH·清除率(Q):

$$Q = \frac{1-(A_s-A_b)}{A_c} \times 100\% \quad (2)$$

其中,A_s为样品组吸光度值;A_b为DPPH溶液换为无水甲醇的吸光度值;A_c为空白组吸光度值。

1.7.2 ABTS⁺·清除能力测定

参考文献[21]测定2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate),ABTS⁺·)清除能力。5 ml ABTS⁺·溶液(7 mmol/L)与88 μl K₂S₂O₈溶液(140 mmol/L)混合,密封后静置16 h,使用前将上述ABTS⁺·溶液用无水乙醇稀释至734 nm处吸光度值为0.70±0.02,得到ABTS⁺·工作液。将200 μl ABTS⁺·工作液,加入10 μl HA、FA-HA、FA(浓度为根据接枝度计算出相应浓度下FA-HA中相应的FA浓度)样品溶液中,混合物在30°C避光孵育6 min,在734 nm处测量吸光度值,以蒸馏水代替样品溶液作为空白对照,以同法测定吸光度值。按下式计算ABTS⁺·清除率(Q):

$$Q = \frac{A_c-A_s}{A_c} \times 100\% \quad (3)$$

其中,A_s和A_c分别为样品和对照组的吸光度值。

1.7.3 O²⁻·清除能力测定

O²⁻·是由邻苯三酚在弱碱环境中自身氧化分解产生。参照文献[22],取1 ml不同浓度HA、FA-HA、FA(浓度为根据接枝度计算出相应浓度下FA-HA中相应的FA浓度)样品溶液与4.5 ml Tris-HCl缓冲液(pH8.2,50 mmol/L)在25°C下混匀,再加入0.3 ml 45 mmol/L的邻苯三酚试剂,迅速混匀,25°C下反应5 min,迅速加入10 mol/L浓盐酸1 ml终止反应,在320 nm处测定吸光度值A₁,以相同体积的蒸馏水代替样品测得吸光度值A₀。按下式计算O²⁻·清除率(Q):

$$Q = \frac{A_0-A_1}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

其中, A_0 为空白组吸光度值, A_1 为加入样品组吸光度值。

1.8 数据处理

应用 Excel 软件进行数据分析, 计算结果以平均值±标准差表示, 所得结果进一步采用 Graphpad Prism 及 Origin 作图。

2 结果与讨论

2.1 酚酸-HA 自由基接枝反应机理

在酚酸-多糖接枝共聚物的制备方法中, Vc/H_2O_2

氧化还原体系因具有经济环保、反应温和等优点而被广泛使用^[10]。在本研究中, 利用 Vc/H_2O_2 氧化还原体系在氮气保护下, 通过自由基介导的方式, 将酚酸成功接枝到 HA 上, 其合成机理如图 1 所示。 Vc/H_2O_2 在室温下反应生成 $Asc^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 自由基, 生成的 $Asc^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 自由基攻击 HA 羟基中的氢原子, 从而生成 HA 多糖自由基。最后, 酚酸分子通过共价键的方式与 HA 多糖自由基形成酚酸-透明质酸接枝共聚物。

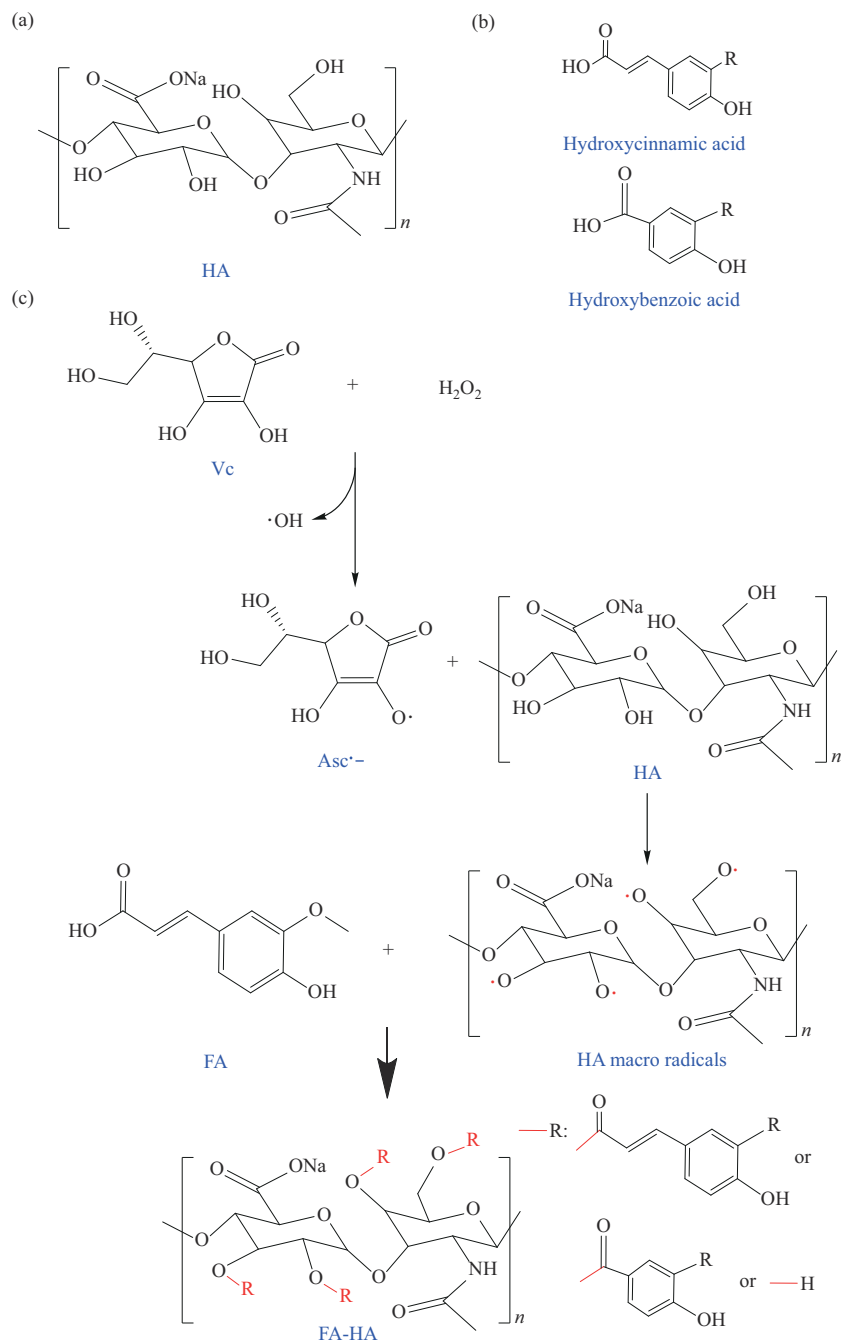


Fig. 1 Diagram of FA-HA reaction mechanism

2.2 接枝度分析

接枝度被认为是酚酸是否成功接枝到多糖糖链的重要指标^[23]。接枝度的高低受到多种因素影响^[24-26]，如酚酸的溶解性、酚酸结构（取代基种类、数量、位置等）等。表1为在相同条件下，5种酚酸与HA接枝后的接枝度。数据比较可见，在本实验条件下，5种酚酸均能与HA形成接枝共聚物，但接枝度有明显差异。与其他四种羟基苯甲酸类衍生物（SA、BA、GTA、GLA）相比，属于羟基肉桂酸的FA接枝度（ (11.92 ± 0.31) mg/g）最高，与Eom等^[23]的研究报道一致，这可能是由于羟基肉桂酸的苯乙烯基比苯甲酸的羧基活性更强，反应活性更高；此外，四种羟基苯甲酸中接枝度依次为GLA>SA>GTA>BA。Liu等^[24]发现，当羟基在羟基苯甲酸的对位上时可以获得较高的接枝度，但邻位羟基则表现出较大的接枝抑制作用，除此之外，当只有一个甲氧基时可以提高接枝活性。表1数据可见，分子结构中不仅有对位羟基且羟基数量最多的GLA反应活性最高（ (6.01 ± 0.60) mg/g），SA结构中虽然也有对位羟基，但两个甲氧基反而抑制了反应活性，使其接枝度次于GLA（ (5.71 ± 1.11) mg/g），GTA虽然在苯环结构中有两个羟基，但由于邻位羟基对其接枝有较大的抑制作用^[24]，导致其接枝度（ (2.45 ± 0.20) mg/g）并不高。因此，后续实验选择FA-HA作为实验样品。

Table 1 Grafting degrees of different phenolic acid-HA copolymer

Sample name	Grafting rate/(mg·g ⁻¹)	Kinds of phenolic acid
FA-HA	11.92±0.31	Hydroxycinnamic acid
GLA-HA	6.01±0.60	Hydroxybenzoic acid
SA-HA	5.71±1.11	Hydroxybenzoic acid
BA-HA	2.02±0.42	Hydroxybenzoic acid
GTA-HA	2.45±0.20	Hydroxybenzoic acid

2.3 接枝反应条件优化分析

图2a显示了HA与FA质量比对接枝度的影响。图中可见，随着HA与FA质量比的提高，接枝度呈先上升后下降的规律，在2:1时接枝度达到最高，因此本研究选择HA:FA最佳质量比为2:1。图2b显示了H₂O₂:Vc摩尔比对接枝度的影响。图中可见，随着摩尔比的增加，接枝度先不断上升，在9:1时接枝度达到最大，继续增加摩尔比后接枝度明显下降，因此后续实验采用H₂O₂:Vc最佳摩尔比为9:1。图2c显示了反应时间对接枝度的影响。图中可见，在反应时间3~24 h内，接枝度随着反应时间延长不断增加，在24 h时接枝度达到最大，当反应时间继续延长，接枝度明显下降，因此本研究选择最佳反应时间为24 h。综上，在HA:FA质量比为2:1、H₂O₂:Vc摩尔比为9:1、接枝反应时间24 h时接枝度最高，为 (16.59 ± 0.31) mg/g。

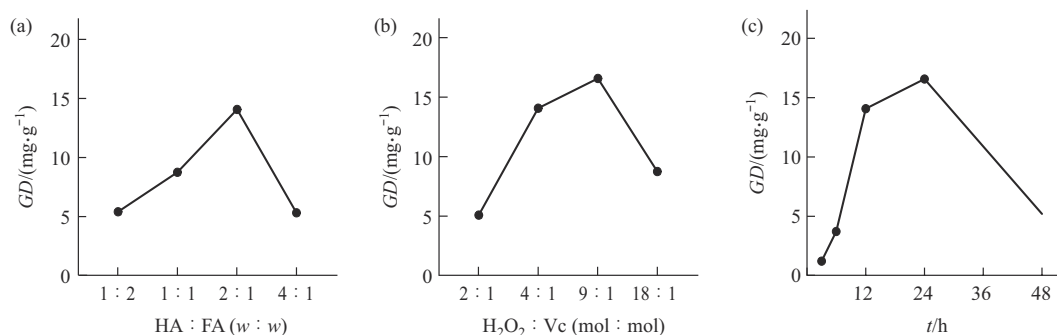


Fig. 2 The effect of different reaction conditions on grafting rate

2.4 分子质量检测分析

由图3可知，接枝改性后，与原HA相比（34.4 ku），接枝物的分子质量有所下降（31.5 ku），但分子质量分布均一性提高，这是由于H₂O₂与Vc反应原理主要是由于两者产生Asc·-和·OH自由基，Asc·-和·OH自由基夺取糖链上的氢原子形成多糖自由基，在这个过程中由于多糖糖链中的氢原子被

剥夺，氢键作用力减弱，导致多糖主链或者支链断裂，从而造成了分子质量的下降，该现象也出现在其他多糖接枝反应的文献报道中^[27-28]。

2.5 UV图谱和IR图谱分析

图4为FA、HA以及FA-HA的UV和IR图谱。图4a可见，HA的在250~400 nm的UV中无明显的吸收峰，而FA-HA在330 nm处出现了特征吸收

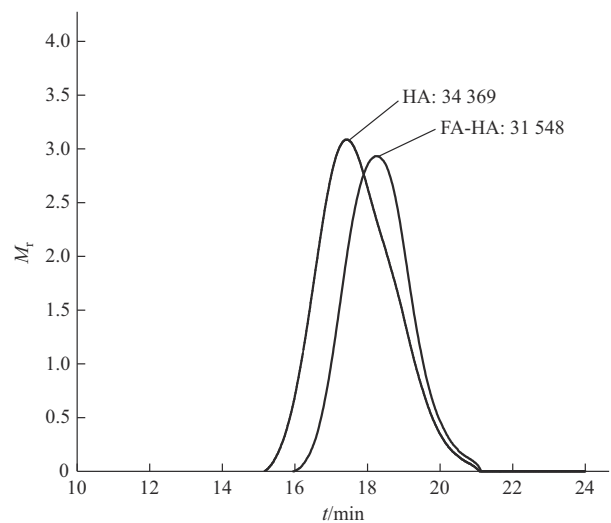


Fig. 3 Molecular mass of different samples

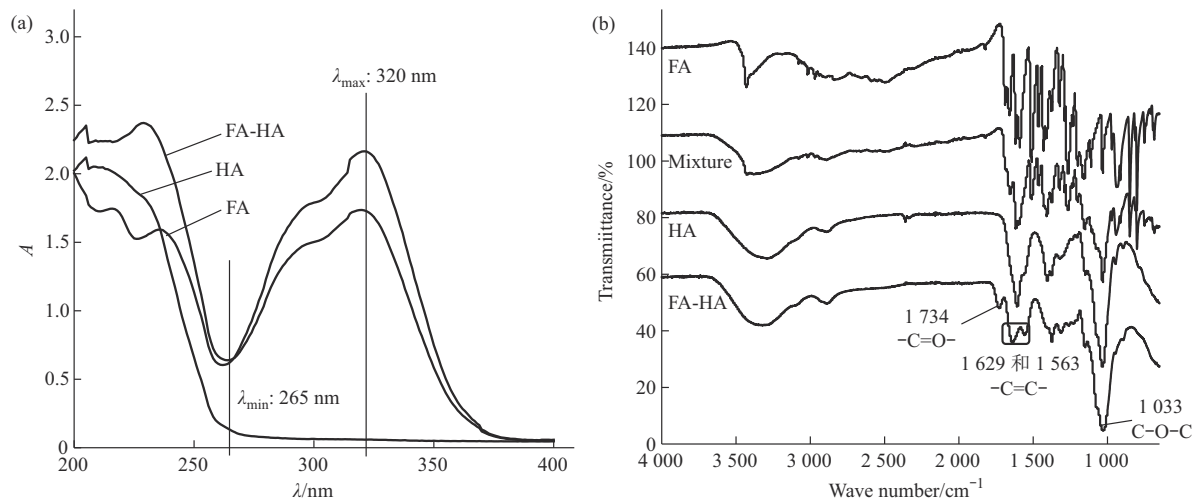


Fig. 4 UV spectra (a) and IR spectra (b) of different samples

2.6 ¹H NMR图谱分析

HA、FA以及FA-HA的¹H NMR结果如图5所示。由图可知，HA的特征质子峰主要分布在 δ 2.0~6.0之间，在 δ 6.0~8.0之间无质子峰，FA的苯环特征质子峰主要分布在 δ 6.0~8.0之间，而在FA-HA图中可见，除了 δ 2.0~6.0与HA相对应的质子峰外，在 δ 6.0~8.0之间出现与FA相对应的苯环特征质子峰^[17]，说明FA成功引入HA。

2.7 TGA分析

HA、FA以及FA-HA的TGA和导数热重分析(derivative thermogravimetry, DTG)曲线如图6所示。由图6a可知，HA主要有两个阶段的失重，第一个阶段是180~280℃，主要是由于多糖的支链断裂导致的，第二阶段在280~500℃，是由于是

峰，该特征吸收峰是由于FA苯环的共轭体系引起的，该结果与文献报道^[15, 24, 29]相一致，表明FA成功接枝到HA糖链上。

如图4b所示，与未修饰HA相比，FA-HA在1 563 cm⁻¹和1 629 cm⁻¹出现了FA芳香环的C = C伸缩振动特征吸收峰，与FA相比，FA-HA在1 033 cm⁻¹出现了HA的C—O—C伸缩振动特征吸收峰，此外，相较于物理混合物组，FA-HA在1 734cm⁻¹处出现了一个新的特征吸收峰，这可能是两者接枝形成的酯羰基(C = O)^[17]，红外光谱的变化进一步说明FA已成功共价接枝到HA糖链上，且两者有可能是通过形成酯键接枝。

碳骨架断裂导致的(碳酸化阶段)。FA主要有三个阶段的失重，第一阶段在30~120℃，主要是水分的蒸发，第二阶段是220~280℃，主要是由于支链断裂导致的，第三阶段在280~500℃，是由于碳骨架断裂导致的(碳酸化阶段)。FA-HA主要有三个阶段的失重，第一阶段在30~120℃，主要是水分的蒸发，第二阶段是200~300℃，主要是由于支链断裂导致的，第三阶段在280~500℃，是由于碳骨架断裂导致的(碳酸化阶段)。由图6b可知，HA和FA分别在262℃和236℃失重率达到最大，而FA-HA在234℃达到最大失重率，说明FA-HA的热稳定性低于HA与FA，这可能是由于在接枝过程中其分子间和/或分子内氢键相互作用被破坏，在其他文献中也有报道^[22, 30]。

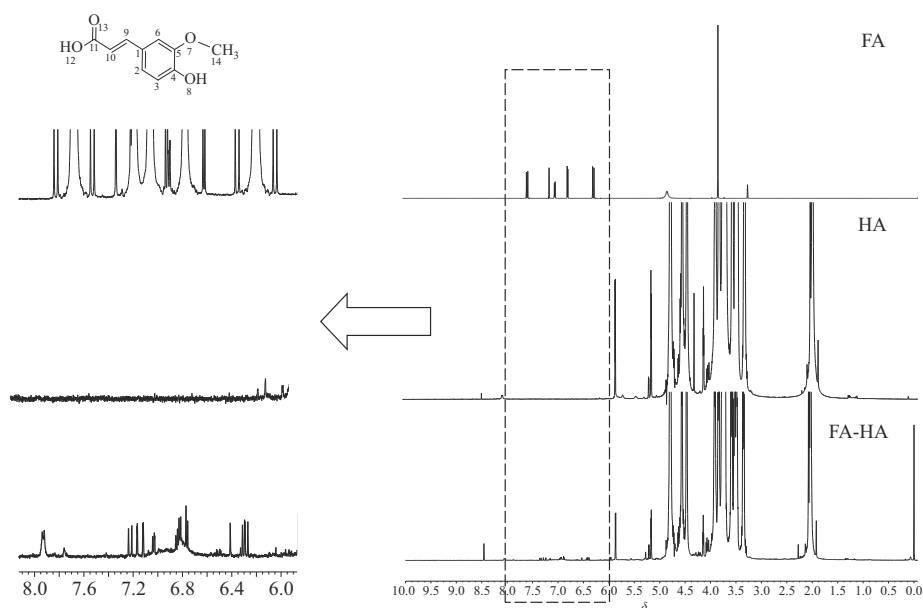
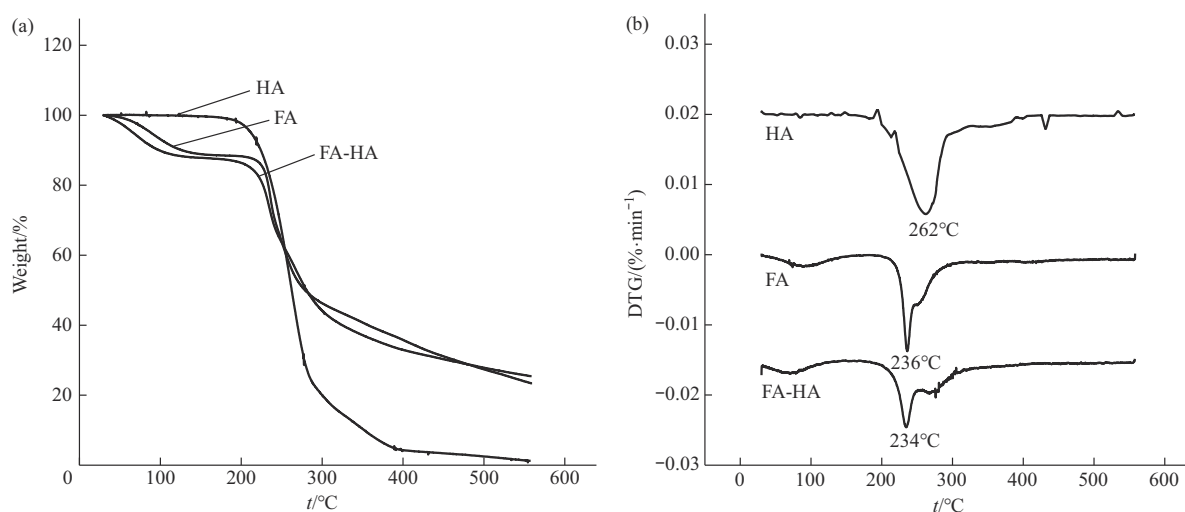
Fig. 5 ^1H NMR spectra of HA, FA and FA-HA

Fig. 6 UV TGA (a) and DTG (b) of different samples

2.8 FESEM观察

利用扫描电镜观察HA接枝前后的表面形貌(图7)。在接枝前,由于较强的分子间与分子内氢键,导致HA在视野下呈现出相对粗糙的形态(图7a);图7b是FA的形态,其呈现出典型的晶体结构;图7c是HA与FA的物理混合物形态图,可以看出HA与FA有明显的物理界限,二者的表面结构都没有发生明显的变化;在接枝后,FA-HA(图7d)的分子形态发生较大的变化,视野下可见紧密相连的网状结构,表面相对光滑,这可能是由于接

枝改性后HA分子间和分子内氢键减少造成的,该现象在其他多糖-酚酸接枝物中也有类似报道^[28, 31]。

2.9 体外抗氧化功效评价实验

2.9.1 DPPH·清除能力测定结果

如图8所示,HA、FA以及FA-HA均具有DPPH·清除能力,且呈浓度依赖关系。比较可见,在浓度0.25~10 g/L范围内,HA对DPPH·的清除率在5.20%~17.73%范围内,而FA-HA对DPPH·的清除能力始终优于原HA组,且随着浓

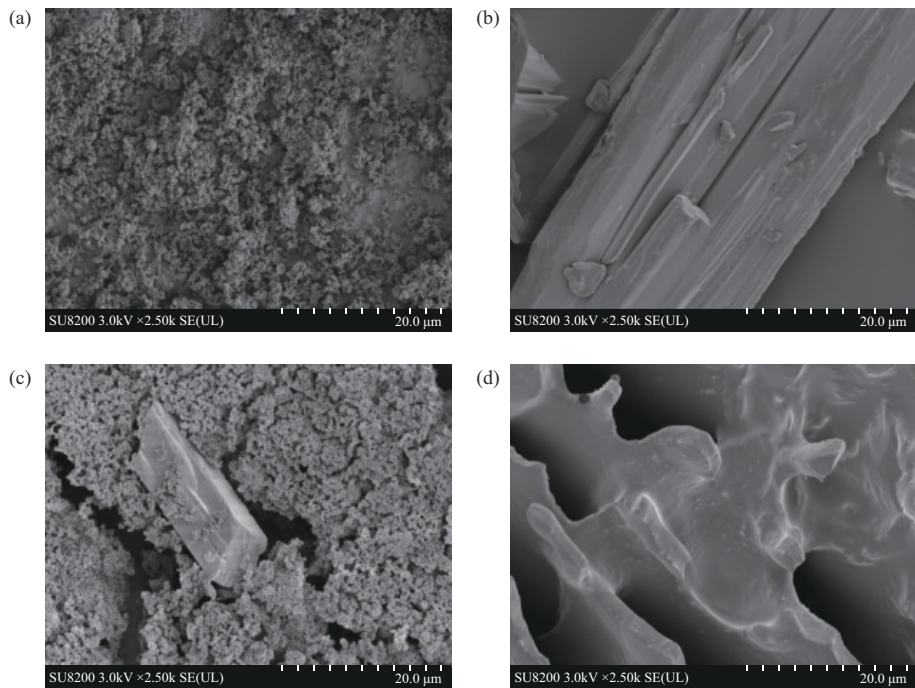


Fig. 7 Scanning electron micrographs of FA-HA copolymers
(a) HA; (b) FA; (c) mixture of HA and FA; (d) FA-HA.

度增加不断提高,清除能力显著优于HA,在10 g/L时清除率达到(83.76±4.86)%。游离FA在实验浓度范围内对DPPH·的清除能力也呈现出一定的浓度依赖性,但是其与FA-HA的清除能力几乎一致,

在最高浓度时(相当于FA浓度为165.9 mg/L)对DPPH·的最大清除率为(79.30±0.60)%。由此可知,HA糖链上接枝酚酸有助于提高其对DPPH·的清除能力,但与当量的FA相比无显著性提高。

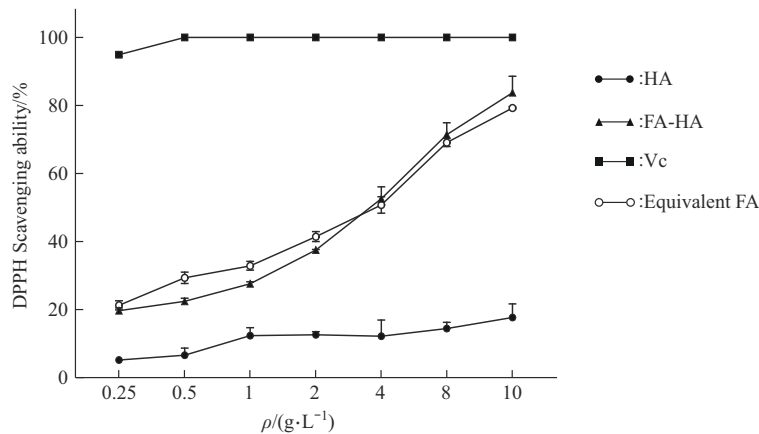


Fig. 8 Scavenging effect of HA and FA-HA copolymer on DPPH·

2.9.2 ABTS⁺·清除能力测定结果

如图9所示,在浓度0.25~10 g/L范围内,原HA对ABTS⁺·清除能力始终较弱,最大清除率为(4.67±2.45)%,而FA-HA对ABTS⁺·的清除率随着浓度提高不断增加,在10 g/L浓度时,接枝物对

ABTS⁺·的清除率为(76.95±5.06)%,在相应浓度下,游离FA的ABTS⁺·清除率为(66.06±2.20)%,显著低于FA-HA的清除率。由此可知,HA糖链上接枝酚酸有助于提高其对ABTS⁺·的清除作用。

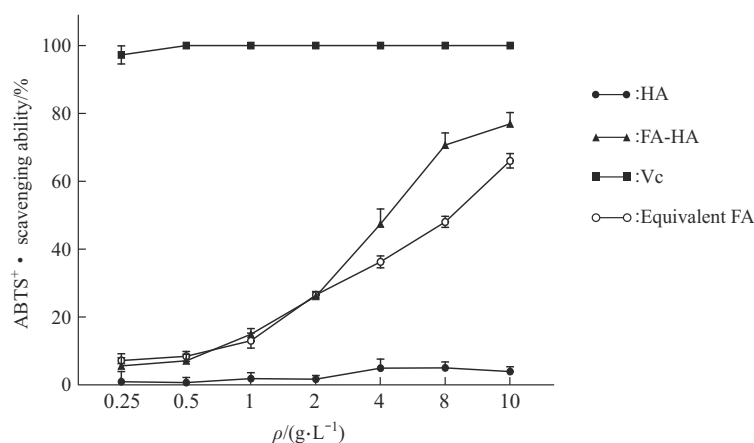


Fig. 9 Scavenging effect of HA and FA-HA copolymer on $\text{ABTS}^{+\cdot}$

2.9.3 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力测定结果

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 在一定条件下可生成羟基自由基、脂质过氧化物、过氧化氢等其他活性氧，从而造成机体的氧化损伤。如图10所示，原HA对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用较弱，在0.25~2 g/L浓度范围内几乎为零，在2~10 g/L范围内随着浓度提高而增加，在10 g/L时清

除率最高达到 $(16.00 \pm 3.14)\%$ 。而FA-HA对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力随着浓度的提高不断提高，在10 g/L时清除率达到 $(83.08 \pm 2.51)\%$ ，在相应浓度下，游离FA的清除率为 $(71.95 \pm 1.39)\%$ ，显著低于FA-HA。因此可以认为，HA糖链上接枝酚酸有助于提高其对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用。

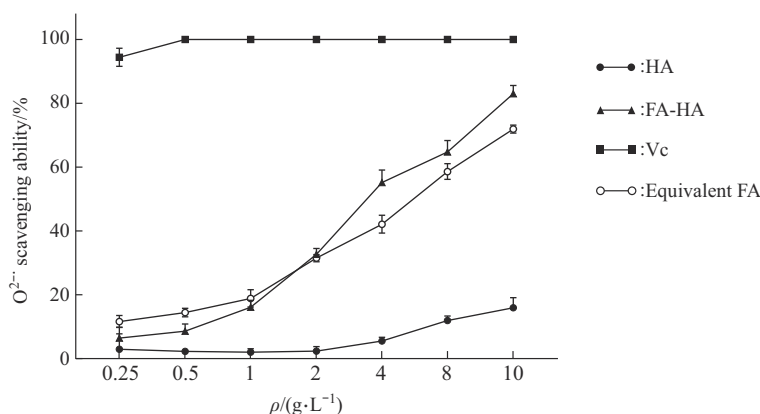


Fig. 10 Scavenging effect of HA and FA-HA copolymer on $\text{O}_2^{\cdot-}$

研究表明，过量自由基造成的机体氧化损伤与多种疾病的发生、发展紧密相关，因此开发抗氧化物质并利用其抑制过多自由基的产生或促进其清除在生命科学领域具有重要的意义。先前的研究报道发现，HA具有一定的抗氧化能力^[1, 3, 32]，且分子质量越小、暴露的活性基团越多，其抗氧化能力越强。从本研究结果可知，在体外原HA对DPPH、 $\text{ABTS}^{+\cdot}$ 以及 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 表现出一定的抑制效果，但在10 g/L浓度内的抑制率均不高于20%，这可能是由于在本实验中HA平均分子质量较大（34.4 ku）。

比较可知，FA的接枝成功显著提高了原HA的对DPPH、 $\text{ABTS}^{+\cdot}$ 以及 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力。

3 结 论

本文首次采用自由基介导法合成了酚酸-HA接枝物，这一新方法显著提高了原HA抗氧化性能。该反应条件简单温和，与原HA相比，接枝物平均分子质量稍有下降但分布均一性提高。研究首先比较了5种不同酚酸与HA的接枝能力，筛选出接枝度最高的FA-HA，随后经过单因素反应条件优化

提高了FA-HA接枝度。UV、¹H NMR、TGA等表征手段证明了接枝物的形成, IR分析表明, FA与HA以酯键共价结合。FESEM视野下FA-HA呈紧密相连的网状结构, 表面相对光滑。

参 考 文 献

- [1] 赵琳静, 宋小平, 黎方雅. 多糖及其衍生物抗氧化性质的研究进展. 上海工程技术大学学报, 2008, **22**(1): 44-47
Zhao L J, Song X P, Li F Y. J Shanghai Univ Eng Sci, 2008, **22**(1): 44-47
- [2] 陈辉. 罗非鱼眼透明质酸的提取、降解及其抗氧化性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2014
Chen H. Studies on Extraction, Degradation and Antioxidation of Hyaluronic Acid from Eyeball of Tilapia[D]. Zhengjiang: Jiangsu University, 2014
- [3] 高瑞昌, 陈辉, 李来好, 等. 低分子量罗非鱼眼透明质酸的制备及其抗氧化性研究. 食品工业科技, 2015, **36**(3): 60-64
Gao R C, Chen H, Li L H, *et al.* Sci Technol Food Ind, 2015, **36**(3): 60-64
- [4] Tiwari S, Bahadur P. Modified hyaluronic acid based materials for biomedical applications. Int J Biol Macromol, 2019, **121**: 556-571
- [5] Harrer D, Sanchez Armengol E, Friedl J D, *et al.* Is hyaluronic acid the perfect excipient for the pharmaceutical need?. Int J Pharm, 2021, **601**: 120589
- [6] Hill T K, Abdulahad A, Kelkar S S, *et al.* Indocyanine green-loaded nanoparticles for image-guided tumor surgery. Bioconjug Chem, 2015, **26**(2): 294-303
- [7] 石梦琳, 刘力嘉, 尚亚卓, 等. 疏水改性透明质酸的制备及性能. 日用化学工业, 2020, **50**(11): 776-782
Shi M L, Liu L J, Shang Y Z, *et al.* China Surfactant Deterg Cosmet, 2020, **50**(11): 776-782
- [8] 冉海燕, 洪慧, 诸超, 等. 肉桂酸改性透明质酸颗粒乳化剂的制备及性能. 功能高分子学报, 2019, **32**(1): 53-62
Ran H Y, Hong H, Zhu C, *et al.* J Funct Polym, 2019, **32**(1): 53-62
- [9] Chen Z, Lv J, Chen F, *et al.* Studies on telluric hyaluronic acid (TeHA): a novel antioxidant. J Mol Catal B Enzym, 2008, **55**(3/4): 99-103
- [10] Cai W D, Zhu J, Wu L X, *et al.* Preparation, characterization, rheological and antioxidant properties of ferulic acid-grafted curdlan conjugates. Food Chem, 2019, **300**: 125221
- [11] 石梦瑶, 赵薇, 杨安全, 等. 酚酸类化合物在化妆品中的原料制备与应用. 精细化工, 2024, **41**(2): 245-256+276
Shi M Y, Zhao W, Yang A Q, *et al.* Fine Chemicals, 2023, **41**(2): 245-256+276
- [12] 包舟杰, 王小永. 肉桂酸疏水性透明质酸的聚集及光谱性质. 华东理工大学学报(自然科学版), 2024, **50**(3): 371-376
Bao Z J, Wang X Y. Journal of East China University of Science and Technology, 2024, **50**(3): 371-376
- [13] 李金凤, 叶发银, 赵国华. 多糖-酚酸缀合物的合成及特性研究进展. 食品与发酵工业, 2017, **43**(2): 245-251
Li J F, Ye F Y, Zhao G H. Food Ferment Ind, 2017, **43**(2): 245-251
- [14] Liu J, Pu H, Liu S, *et al.* Synthesis, characterization, bioactivity and potential application of phenolic acid grafted chitosan: a review. Carbohydr Polym, 2017, **174**: 999-1017
- [15] 杨鹄隼, 左锋, 王坤, 等. 基于自由基介导的酚酸-柑橘果胶接枝共聚物制备及其理化特性. 食品科学, 2022, **43**(24): 60-66
Yang G J, Zuo F, Wang K, *et al.* Food Sci, 2022, **43**(24): 60-66
- [16] Hu Q, Wang T, Zhou M, *et al.* In vitro antioxidant-activity evaluation of gallic-acid-grafted chitosan conjugate synthesized by free-radical-induced grafting method. J Agric Food Chem, 2016, **64**(29): 5893-5900
- [17] Bai R, Yong H, Zhang X, *et al.* Structural characterization and protective effect of gallic acid grafted O-carboxymethyl chitosan against hydrogen peroxide-induced oxidative damage. Int J Biol Macromol, 2020, **143**: 49-59
- [18] Zhang W, Hadidi M, Karaca A C, *et al.* Chitosan-grafted phenolic acids as an efficient biopolymer for food packaging films/coatings. Carbohydr Polym, 2023, **314**: 120901
- [19] Xiao X, Qiao J, Wang J, *et al.* Grafted ferulic acid dose-dependently enhanced the apparent viscosity and antioxidant activities of Arabinoxylan. Food Hydrocoll, 2022, **128**: 107557
- [20] 杨眷偈, 许雪蓉, 张振军, 等. 文冠果芽茶与叶茶主要营养成分分析及抗氧化活性评价. 食品工业科技, 2022, **43**(15): 366-373
Yang J L, Xu X R, Zhang Z J, *et al.* Sci Technol Food Ind, 2022, **43**(15): 366-373
- [21] 邢丽杰, 逯霞, 唐宗贵, 等. 黑果枸杞籽油品质及体外抗氧化活性. 中国油脂, 2022, **47**(9): 90-94
Xing L J, Lu X, Tang Z G, *et al.* China Oils Fats, 2022, **47**(9): 90-94
- [22] 张强, 陆玲, 李建娜, 等. 茉莉花丙酮提取物的体外抗氧化作用研究. 食品工业, 2016, **37**(12): 102-104
Zhang Q, Lu L, Li J N, *et al.* Food Ind, 2016, **37**(12): 102-104
- [23] Eom T K, Senevirathne M, Kim S K. Synthesis of phenolic acid conjugated chitooligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity. Environ Toxicol Pharmacol, 2012, **34**(2): 519-527
- [24] Liu J, Liu S, Chen Y, *et al.* Physical, mechanical and antioxidant properties of chitosan films grafted with different hydroxybenzoic acids. Food Hydrocoll, 2017, **71**: 176-186
- [25] 黄宸, 刘伟佳, 谢晶, 等. 酚酸接枝壳聚糖对壳聚糖膜性能的影响及其保鲜应用. 食品与发酵工业, 2022, **48**(19): 162-168
Huang C, Liu W J, Xie J, *et al.* Food Ferment Ind, 2022, **48**(19): 162-168
- [26] Aljawish A, Muniglia L, Klouj A, *et al.* Characterization of films based on enzymatically modified chitosan derivatives with phenol compounds. Food Hydrocoll, 2016, **60**: 551-558
- [27] Karaki N, Aljawish A, Muniglia L, *et al.* Physicochemical characterization of pectin grafted with exogenous phenols. Food Hydrocoll, 2016, **60**: 486-493
- [28] Wei Z, Gao Y. Evaluation of structural and functional properties of chitosan-chlorogenic acid complexes. Int J Biol Macromol, 2016, **86**: 376-382

- [29] Chen H, Duan X, Xu J, *et al.* Thermal-assisted synthesis of ferulic acid-chitosan complex in water and its application as safe antioxidant. *Int J Biol Macromol*, 2023, **227**: 384-390
- [30] Li C, Li J B. Preparation of chitosan-ferulic acid conjugate: structure characterization and in the application of pharmaceuticals. *Int J Biol Macromol*, 2017, **105**(Pt 2): 1539-1543
- [31] Lan W Q, Zhang B J, Liu S C, *et al.* Carbodiimide-mediated grafting of caffeic acid on chitosan to improve its physicochemical and biological properties: used for Pompano (*Trachinotus ovatus*) preservation. *Int J Food Sci Technol*, 2023, **58**: 4683-4696
- [32] Ke C, Sun L, Qiao D, *et al.* Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid. *Food Chem Toxicol*, 2011, **49**(10): 2670-2675

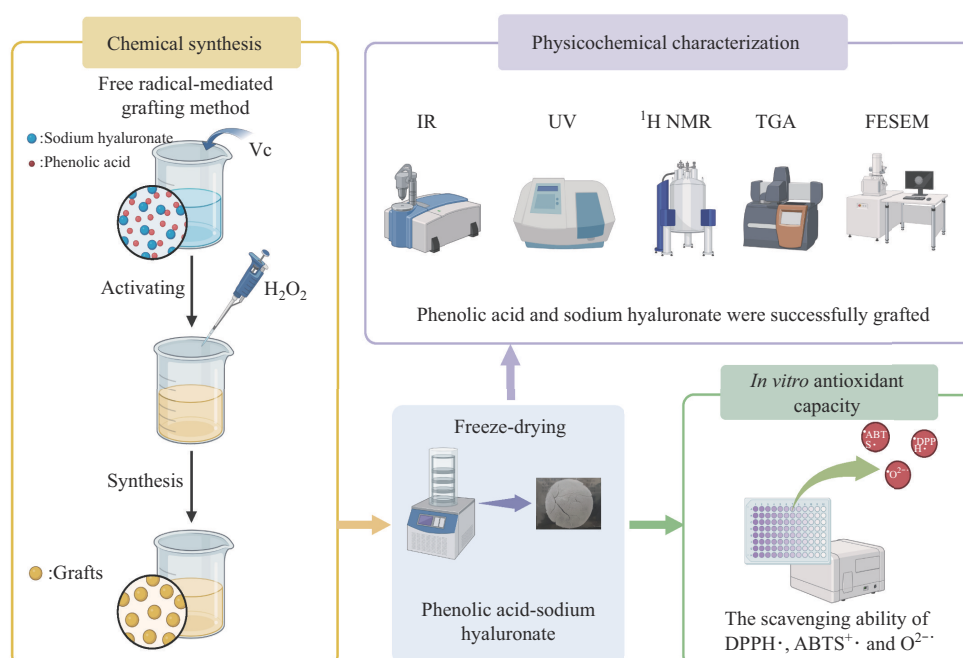
Preparation of Phenolic Acid-sodium Hyaluronate Copolymers and *in vitro* Antioxidant Activity Assessment

ZHANG Xiao-Yue^{1)*}, WANG Xiao-Na^{2)*}, JIANG Min¹⁾, HAN Ting-Ting²⁾, GONG Jin-Song¹⁾,
LI Qing-Na¹⁾, YANG Su-Zhen²⁾, SHI Jin-Song^{1)**}

¹⁾School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

²⁾Shandong Freda Biotechnology Co. Ltd., Jinan 250101, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Sodium hyaluronate (HA) was used as the research object to modify it with phenolic acid in order to obtain the molecular structure with better antioxidant activity or even new activity. **Methods** In this study, 5 kinds of phenolic acid-sodium hyaluronate was prepared by free radical-mediated grafting method, and the grafts with the highest grafting degree were selected to optimize the synthesis conditions. Then, grafts structure and physicochemical properties were analyzed. The grafts were characterized by IR, UV, ¹H NMR, FESEM and TGA spectra. The *in vitro* antioxidant capacity of grafts was determined by the scavenging ability of DPPH•, ABTS•+ and O₂²⁻. **Results** Among 5 kinds of phenolic acid-sodium hyaluronate, the grafting rate of ferulic acid-sodium hyaluronate copolymer (FA-HA) was highest, which was chosen as experimental sample in

* These authors contributed equally to this work.

** Corresponding author.

Tel: 86-510-85327353, E-mail: Shijs@163.com

Received: October 30, 2023 Accepted: February 28, 2024

the following tests. Firstly, the reaction conditions were investigated and the highest grafting rate was (16.59 ± 0.31) mg/g at the optimal preparation conditions. Then, FA-HA structure and physicochemical properties were analyzed. Data from UV, IR, ^1H NMR analyses, TGA showed that FA were successfully grafted to HA. Compared with HA, the results of gel permeation chromatography (GPC) showed that the molecular mass distribution of FA-HA copolymer decreased from 34.4 to 31.5 ku, but the uniformity of molecular distribution was improved. FESEM results showed that the structure of copolymer exhibited a closely connected lamellar structure with a relatively smooth surface. TGA results showed that thermal stability of FA-HA had a little decline. The antioxidant performance *in vitro* results showed that, during 0.25–10 g/L, FA-HA can eliminate $(83.76 \pm 4.86)\%$ DPPH $\cdot$, $(76.95 \pm 5.06)\%$ ABTS $^{+\bullet}$ and $(83.08 \pm 2.51)\%$ O $^{2-\bullet}$ respectively at 10 g/L. which were higher than that of native HA and FA. **Conclusion** FA and HA were successfully grafted together by free radical grafting, and the grafted FA-HA had better antioxidant activity *in vitro*, which provided a theoretical basis for further research and development of phenolic acid-HA grafts.

Key words sodium hyaluronate, phenolic acid, ferulic acid, free radical-mediated grafting, anti-oxidant

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0413