

文章编号: 2095—0411 (2011) 01—0043—05

# 发酵液中透明质酸含量检测方法的优化与比较<sup>\*</sup>

王利群<sup>1</sup>, 孙晓慧<sup>1</sup>, 曹利民<sup>2</sup>, 陈萦慈<sup>1</sup>, 赵 婕<sup>1</sup>

(1. 常州大学 制药与生命科学学院, 江苏 常州 213164; 2. 常州方圆制药有限公司, 江苏 常州 213000)

**摘要:** 对透明质酸含量检测方法 CTAB 比浊法和 Bitter—Muir 法进行了优化, 并用于发酵液中透明质酸含量的检测。优化结果为: CTAB 比浊法最佳检测波长为 400nm, CTAB 溶液质量浓度为 5g/L, 反应温度为室温, 络合时间为 3min, 回归线性方程  $y=0.0071x-0.1018$ ,  $R=0.9999$ , 发酵液中加标平均回收率 101.29%, 平均 RSD 值为 0.70%; Bitter—Muir 法最佳检测波长为 540nm, 水浴时间为 10min, 线性回归方程  $y=0.0058-0.1993x$ ,  $R=0.9965$ , 发酵液中加标平均回收率 83.87%, 平均 RSD 值为 2.70%。结果表明, 用于发酵液中透明质酸含量的检测, CTAB 比浊法更准确、更精确、更高效。

**关键词:** 透明质酸; 含量检测; CTAB 比浊法; Bitter—Muir 法; 发酵液

中图分类号: Q 503

文献标识码: A

## Comparison and Optimization of Two Quatitative Assays of Hyaluronic Acid in Fermentation Broth

WANG Li—qun<sup>1</sup>, SUN Xiao—hui<sup>1</sup>, CAO Li—min<sup>2</sup>, CHEN Ying—ci<sup>1</sup>, ZHAO Jie<sup>1</sup>

(1. School of Pharmaceutical Engineering and Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. Changzhou Fangyuan Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhou 213000, China)

**Abstract:** The Bitter—Muir method and CTAB turbidimetric method were optimized to assay the concentration of hyaluronic acid in fermentation broth. The optimum conditions of CTAB method are wavelength 400nm, 5g/L CTAB, room temperature, and reaction time 3min. The regression equation is  $y=0.0071x-0.1018$ ,  $R=0.9999$ . The precision and recovery of this method are within 0.70% and 101.29%, respectively. The optimum conditions of Bitter—Muir method are wavelength 540nm, reaction time 10min. The regression equation is  $y=0.0058-0.1993x$ ,  $R=0.9965$ . The precision and recovery of this method are within 2.70% and 83.87%, respectively. The results showed that CTAB method is superior to Bitter—Muir method in terms of accuracy, precision and efficiency.

**Key words:** hyaluronic acid; quantitative analysis; CTAB turbidimetric method; Bitter—Muir method; fermentation broth

透明质酸 (Hyaluronic acid, 简称 HA), 是由 (1— $\beta$ —4) D—葡萄糖醛酸 (1— $\beta$ —3) N—乙酰基—D—氨基葡萄糖的双糖重复单位所组成的一种线性聚阴离子电解质, 为高分子酸性粘多糖<sup>[1]</sup>。作为

人体所必须的生理活性物质, HA 广泛分布在机体的各种组织中, 与正常生理活动密切相关。自 1934 年 Meyer 和 Palmer 首次从牛眼的玻璃体中分离出 HA 以后, 由于它具有良好的亲水性、黏弹

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2010—11—02

作者简介: 王利群 (1972—), 女, 江苏常州人, 副教授。

性、应变性、渗透性以及生物相容性,目前已被广泛地应用于化妆品、保健食品、临床医学和药物载体等方面<sup>[2]</sup>。从公鸡冠、人脐带、动物眼球中可以提取 HA,但原料有限,成本高。随着 HA 应用范围不断扩大,提取法生产的 HA 已不能满足医药和化妆品生产的需求,目前 HA 主要来源于产量较高的发酵法生产<sup>[3,4]</sup>。

高效快速地测定发酵液中 HA 的含量不仅能提高筛选透明质酸高产菌株的效率,而且对发酵条件的优化及工艺控制有非常重要的意义。目前最常用的测定发酵液中 HA 含量的方法是 Bitter—Muir 法<sup>[5]</sup>,其原理是用强酸将 HA 裂解成单糖单位,通过葡萄糖醛酸与吡唑显色反应间接测定 HA 含量。最近有报道采用更简便的 CTAB 比浊法<sup>[6-8]</sup>,其原理是 HA 在溶液中可与十六烷基溴化铵(CTAB)等阳离子表面活性剂发生络合反应,产生混浊现象,并在一定浓度范围内遵循朗伯—比尔定律。本研究对上述两种方法分别进行优化,并比较二者用于检测发酵液中 HA 含量的优劣。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

主要仪器:G53 紫外可见分光光度计。

试剂:透明质酸标准品(医用级);发酵液(12.5g/L 蛋白胨,12.5g/L 酵母粉,12.5g/L 葡萄糖,2g/L NaCl,0.4g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ );CTAB 溶液(2.5g 或 0.5g CTAB 溶于 100mL 2%NaOH 溶液中,2.5g CTAB 溶于 100mL 2%NaCl 溶液中);吡唑试液(25mg 吡唑溶于 20mL 无水乙醇中)。

### 1.2 方法

HA 的初步纯化:将发酵液与 0.1%十二烷基磺酸钠(SDS)等体积混合,室温温浴 10min 以释放细胞外壁附着的 HA。经 4 500r/min 离心 10min,去除菌体,取上清液,加入 2.5 倍体积无水乙醇,在 4℃ 静置 1h,12 000r/min 离心取沉淀,加入与发酵液等体积的去离子水溶解<sup>[9]</sup>。取上述初步纯化的 HA 溶液 1mL,分别采用 CTAB 比浊法<sup>[7]</sup>和改良 Bitter—Muir 法<sup>[5]</sup>进行 HA 含量测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 CTAB 比浊法

#### 2.1.1 缓冲溶液对反应体系的影响

文献[6]采用乙酸缓冲液配制 HA 标准液,文献[7]则直接用去离子水配制 HA 标准液。为考察不同缓冲溶液对 HA—CTAB 反应体系吸光度的影响,本实验分别称取 9mg HA 标准品溶解于 100mL 乙酸缓冲液、磷酸缓冲液、Tris—HCl 缓冲液和去离子水中,配制成浓度均为 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 HA 标准液。并分别与 25g/L 的 CTAB 溶液反应 10min,在 200—800nm 波长范围内进行扫描。实时谱图显示不同缓冲溶液对 HA—CTAB 反应体系的吸光度值基本无影响。因此,为了节约试剂,简化实验步骤,后续实验采用去离子水配制 HA 标准液。

#### 2.1.2 CTAB 溶液配制对反应体系的影响

文献[7]将 CTAB 溶于 NaCl 溶液中,而文献[6]则将 CTAB 溶于 NaOH 溶液中。本实验考察了 CTAB 溶液的配制对 HA—CTAB 反应体系吸光度的影响。将 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 HA 标准溶液分别与 25g/L CTAB (NaCl) 溶液和 25g/L CTAB (NaOH) 溶液反应 10min,在 200—800nm 波长范围内进行扫描。由图 1 可知,HA—CTAB (NaCl) 反应体系的吸光度非常小,接近于 CTAB 溶液的吸光值,基本观察不到混浊现象;而 HA—CTAB (NaOH) 反应体系的吸光度较大,混浊现象明显。说明在碱性条件下,HA 与 CTAB 的络合反应较充分。另外,吸光度太小,实验误差对测量结果的影响较大。因此,后续实验采用将 CTAB 溶于 NaOH 溶液。

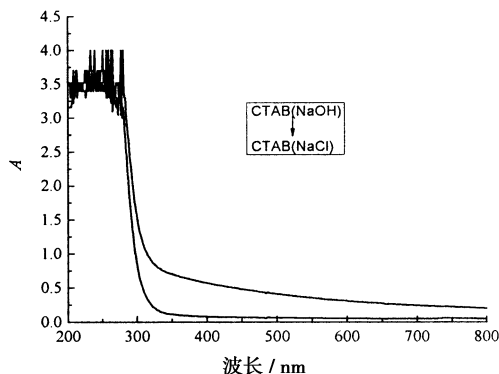


图 1 不同 CTAB 溶液与 HA 反应体系的扫描光谱

Fig. 1 The spectral curves of the HA—CTAB complex with different CTAB concentrations

#### 2.1.3 不同浓度反应体系的全波长扫描图谱

为选择合适的检测波长范围,将浓度分别为

30、60、90、120 和 150 $\mu\text{g/mL}$  的 HA 标准液与 25 $\text{g/L}$  CTAB 溶液反应 10min 后, 在 200—800nm 波长范围内进行扫描, 结果如图 2。

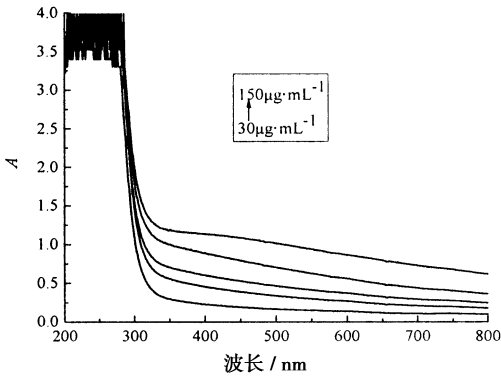


图 2 不同浓度的 HA 标准液与 CTAB 反应体系的扫描光谱  
Fig. 2 The spectral curves of the HA-CTAB complex with different HA concentrations

透明质酸是一种酸性粘多糖, 没有紫外吸收, 但在 250nm 附近出现吸收峰, 这是反应体系中过量的 CTAB 的特征吸收峰。在一个较宽的波长范围 (350—800nm) 内, 各种浓度 HA 标准液的反应液光谱曲线分布都较均匀。

2. 1. 4 最佳波长的确定

为确定最佳检测波长, 分别在 400、500、600 和 700nm 处测定 30—150 $\mu\text{g/mL}$  标准液反应体系的吸光度, 并回归方程。由表 1 可知, 在上述波长处, 吸光度与 HA 标准液浓度均有较好的线性相关性, 但 400nm 处  $R$  值 (0.999 8) 最高。因此本实验选择 400nm 为最佳检测波长。

表 1 基于不同波长的回归方程

Table 1	The regression equations based on different wavelengths		
波长/nm	回归方程	$R$	
400	$y=0.007\ 4x-0.034\ 2$	0.999 8	
500	$y=0.005\ 1x-0.033\ 4$	0.998 7	
600	$y=0.004\ 5x-0.065\ 7$	0.991 2	
700	$y=0.003\ 5x-0.050\ 0$	0.995 4	

2. 1. 5 CTAB 溶液浓度的优化

当温度低于 25 $^{\circ}\text{C}$  时, 质量浓度为 25 $\text{g/L}$  的 CTAB 溶液中有固体析出, 给检测带来不便。为适应常温检测 HA 含量的要求, 经计算将 CTAB 降为 5 $\text{g/L}$ , 并考察两种不同质量浓度 CTAB 溶液体系对标准曲线建立的影响。由图 3 可知, 将反应体系中 CTAB 降低至 5 $\text{g/L}$  时, 标准曲线具有更好的线性相关性。因此, 后续实验采用 5 $\text{g/L}$  CTAB 溶液作为反应体系。

2. 1. 6 反应时间的优化

将 30—150 $\mu\text{g/mL}$  的 HA 标准溶液与 CTAB

溶液反应不同时间后, 测定 400nm 处的吸光度 ( $A_{400}$ ), 每个质量浓度 3 个平行样, 绘制标准曲线。由图 4 可知, 在 3min 时,  $R$  值已经达到 0.999 8, 符合绘制标准曲线的要求。因此, 为了建立更加快速并且准确的 HA 检测方法, 实验采用反应时间为 3min。

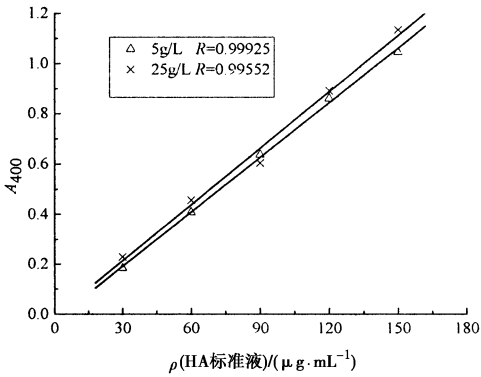


图 3 不同 CTAB 浓度下的标准曲线  
Fig. 3 Standard curves under the different CTAB concentrations

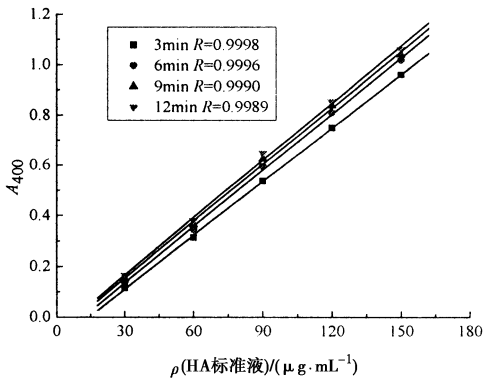


图 4 HA-CTAB 反应时间对标准的影响曲线

Fig. 4 Impact of HA-CTAB complex reaction time

2. 1. 7 反应温度的确定

将 30—150 $\mu\text{g/mL}$  的 HA 标准液与 CTAB 溶液分别在 20、25、30 和 35 $^{\circ}\text{C}$  温度下反应 3min 后, 在 400nm 下测定吸光度 ( $A_{400}$ ), 并绘制标准曲线。由图 5 可知, 温度对较低浓度的 HA 标准液反应体系的吸光度基本没有影响, 对高浓度的 HA 标准液反应体系的吸光度有一定影响。但温度对标准曲线的线性相关性基本没有影响。因此为简化实验步骤, 确定选择室温作为反应温度。

2. 1. 8 CTAB 浊度法标准曲线

将为 30—150 $\mu\text{g/mL}$  的 HA 标准溶液与 5 $\text{g/L}$  CTAB 溶液在室温下反应 3min 后, 测定 400nm 处的吸光度值, 绘制标准曲线如图 6。

2. 2 Bitter-Muir 法

### 2.2.1 最佳波长的确定

通过对透明质酸和硫酸咔唑反应体系进行全波长扫描,选择最大吸收峰处的波长作为最佳测量波长。由图 7 可知,该反应体系的最佳测量波长为 540nm。

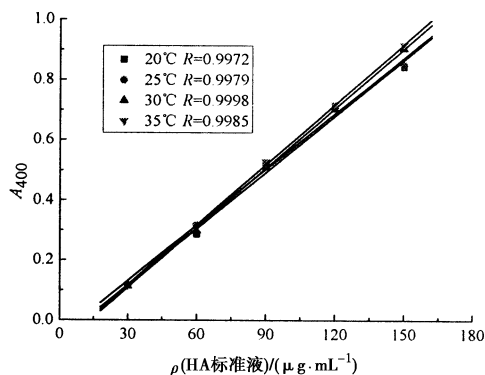


图 5 温度对 CTAB 法的影响

Fig. 5 Impact of temperature on CTAB method

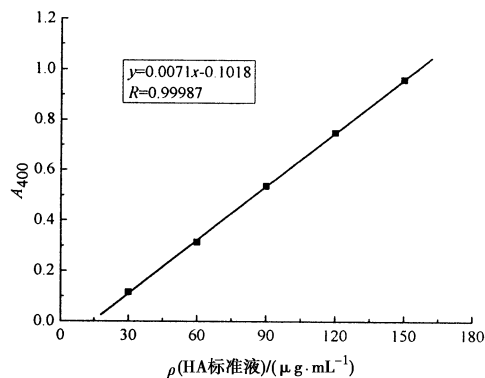


图 6 CTAB 浊度法标准曲线

Fig. 6 The standard curve of CTAB method

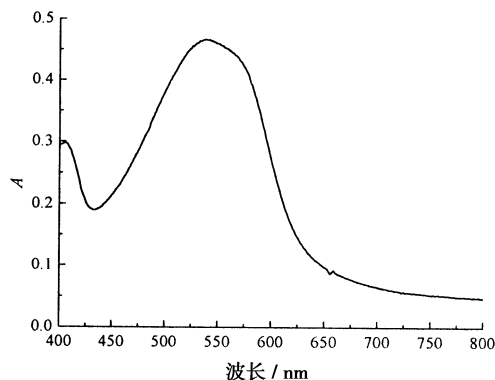


图 7 HA-咔唑吸收曲线图

Fig. 7 HA-carbazole absorption curve

### 2.2.2 最佳反应时间的确定

配制 90 μg/mL 的 HA 标准溶液,取 1mL 标准液加入 3mL 浓硫酸,在沸水浴中加热 10min,在冰浴中不断冷却至室温,加入 0.2mL 咔唑试液,在 40℃ 水浴中分别反应 2—12min,测定各反应时

间的吸光值 ( $A_{540}$ )。由图 8 可知,随着显色反应的时间增加,吸光值逐渐变大,反应 10min 左右趋于稳定,因此选择 10min 作为最佳显色反应时间。

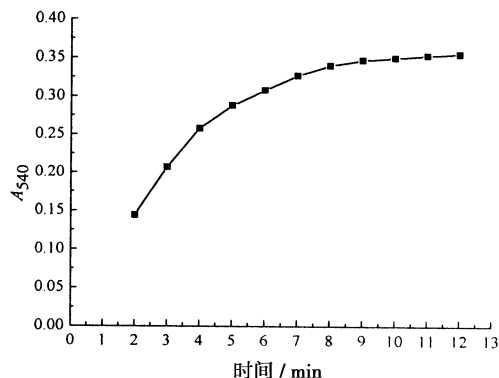


图 8 HA-咔唑反应体系吸光度随时间的变化

Fig. 8 Optical absorbance changes of the HA-carbazole complex with reaction time

### 2.2.3 Bitter-Muir 法标准曲线的建立

配制 30—180 μg/mL 的 HA 标准溶液,采用 Bitter-Muir 法测定  $A_{540}$ ,并绘制标准曲线。由图 9 可知,在没有杂质干扰的情况下,Bitter-Muir 法能够准确地测定透明质酸的含量。

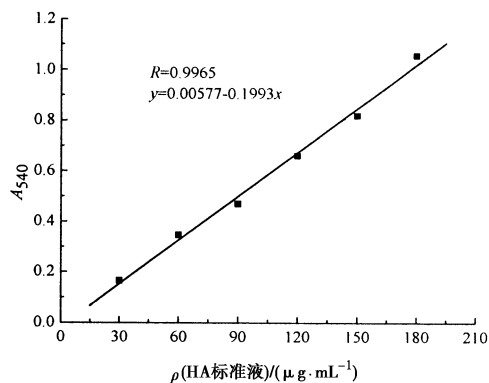


图 9 Bitter-Muir 法标准曲线

Fig. 9 The standard curve of Bitter-Muir method

### 2.3 两种方法准确性比较

取 2mL 发酵液,用 1.2.1 的方法进行预处理,上清液各取 0.5mL 加入 6 个离心管中,再各加入 0.5mL 质量浓度为 0、60、90、120、150 和 180 μg/mL 的 HA 标准溶液,混合均匀后进行乙醇沉淀和去离子水重溶。分别用优化的 CTAB 比浊法和 Bitter-Muir 法测定 HA 含量,并计算加标回收率。由表 2 可知,两种方法相比,CTAB 比浊法平均加标回收率更接近 100%,表明 CTAB 比浊法比 Bitter-Muir 法更准确。

表 2 两种测定方法准确性比较

Table 2 The accuracy comparison of two methods

样品	加标样量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	CTAB 比浊法				Bitter—Muir 法			
		回收标样量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )			平均回收率/%	回收标样量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )			平均回收率/%
1	30	28.82	28.12	29.33	95.86	27.80	26.22	27.80	90.91
2	45	45.00	44.86	45.78	100.47	38.82	35.57	35.60	81.74
3	60	62.34	60.12	63.22	103.16	46.72	48.38	50.21	80.73
4	75	74.38	78.76	77.04	102.30	58.86	56.18	60.72	78.12
5	90	94.06	94.29	94.29	104.68	79.57	78.72	79.67	88.13

2.4 两种方法精确性比较

3 份发酵液经预处理后分别采用 CTAB 比浊法和 Bitter—Muir 法测定 HA 含量，同一份发酵液重复测定 5 次，计算平均值。由表 3 可知，CTAB 比浊法的 RSD 值比 Bitter—Muir 法小得多，表明 CTAB 比浊法比 Bitter—Muir 法更精确，在科研分析与 HA 的生产实践中更具有指导意义。

表 3 两种方法精确性比较

Table 3 The precision comparison of two methods

样品	CTAB 比浊法		Bitter—Muir	
	均值	$R_{s,d}/\%$	均值	$R_{s,d}/\%$
1	368.66	1.67	319.58	2.33
2	423.13	0.22	377.62	3.09
3	547.32	0.21	503.94	2.67

2.5 两种方法直接测定发酵液 HA 含量

为了比较发酵液中的杂质对两种检测方法的影响，用 HA 标准品配制浓度为  $90\mu\text{g}/\text{mL}$  的发酵液 ( $12.5\text{g}/\text{L}$  蛋白胨,  $12.5\text{g}/\text{L}$  酵母粉,  $12.5\text{g}/\text{L}$  葡萄糖,  $2\text{g}/\text{L}$  NaCl,  $0.4\text{g}/\text{L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 溶液，采用 CTAB 法和 Bitter—Muir 法分别直接测量 HA 含量。CTAB 法测定结果为  $98\mu\text{g}/\text{mL}$ ，相对误差为 8.89%。Bitter—Muir 法测定结果为  $52\mu\text{g}/\text{mL}$ ，相对误差为 42.22%，测定结果明显偏低。

表明发酵液成分对 CTAB 法影响较小，而对 Bitter—Muir 法影响很大。故经优化的 CTAB 法可直接用于发酵液中 HA 的含量检测，对发酵液的预处理只需去除菌体即可；Bitter—Muir 法由于误差极大无法直接应用于发酵液中 HA 的测定。

3 结 论

本研究在 CTAB 比浊法基础上，通过简化实验步骤与优化条件，去除了水浴步骤，缩短了反应时间，优化了 CTAB 溶液浓度和配制方法，并省略了用缓冲溶液配制 HA 标准液的步骤，建立了

更加简便、高效、快速、准确的改良 CTAB 法。改良 CTAB 法和 Bitter—Muir 法在没有杂质干扰的情况下都能比较准确地测定 HA 含量。Bitter—Muir 法需要在控制温度的条件下进行，在处理大批量发酵液样品时不如改良 CTAB 法简便快捷。Bitter—Muir 法测定发酵液中 HA 含量时必须经过预处理，否则误差很大；而改良 CTAB 法可直接测定发酵液中 HA 含量，且数值接近于真实值。改良 CTAB 法所用试剂温和，反应在常温下进行，相对于 Bitter—Muir 法使用的浓硫酸咔唑试液和沸水浴，安全性好，成本低。两者比较，改良 CTAB 法具有更高的精确性和准确性，在科研工作和 HA 生产实践中更有指导意义。

参考文献：

[1] 凌沛学, 贺艳丽, 郭学平, 等. 透明质酸 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.

[2] 生举正, 凌沛学, 王凤山. 透明质酸生物合成的研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30 (2): 135—138.

[3] 刘丽, 王强, 陈永浩. 微生物发酵生产透明质酸研究进展 [J]. 食品与发酵, 2009, 35 (2): 125—128.

[4] Yu H M, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of Escherichia coli for biosynthesis of hyaluronic acid [J]. Metab Eng, 2008, 10: 24—32.

[5] Bitter T, Muri H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. Anal Biochem, 1962, 4: 330—334.

[6] 文程, 于慧敏, 孙云鹏, 等. 高效测定发酵液中透明质酸含量的改良 CTAB 浊度法 [J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30 (2): 89—93.

[7] 陈永浩, 王强. 发酵液中透明质酸含量快速检测方法研究 [J]. 食品与发酵工业, 2009, 35 (1): 135—139.

[8] 刘屹然, 陈林海, 李宗伟, 等. 发酵液中透明质酸含量测定方法的比较研究 [J]. 河南师范大学学报, 2006, 34 (1): 102—105.

[9] Chong B F, Nielsen L K. Amplifying the cellular reduction potential of Streptococcus zooepidemicus [J]. Biotechnol, 2003, 100: 33—34.