



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115850737 A

(43) 申请公布日 2023.03.28

(21) 申请号 202211489357.1 A61L 27/20 (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.25 A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

(71) 申请人 尚诚怡美(成都)生物科技有限公司

地址 610000 四川省成都市温江区成都海  
峡两岸科技产业开发园科兴路西段  
188号25#

(72) 发明人 洪涛 徐震梅 高钧

(74) 专利代理机构 成都为知盾专利代理事务所

(特殊普通合伙) 51267

专利代理师 李汉强

(51) Int. Cl.

C08J 3/12 (2006.01)

C08J 3/24 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

C08K 5/1515 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法,属于医用材料领域。制备方法包括以下步骤:制备质量浓度为0.5%~1%的透明质酸钠溶液,制备交联剂(BDDE)反应液,将交联剂反应液进行温度控制,维持在80℃~90℃,将透明质酸钠溶液置于喷射装置中,通过喷嘴将透明质酸钠溶液呈雾状喷出至交联剂反应液中,加入超纯水进行稀释,冷却至1℃~25℃,过滤后得到交联透明质酸微球。本发明解决了传统制备交联透明质酸的不均一性和继而产生的细胞毒性以及制备耗时过长等问题,具有均一性高、无毒性、制备过程简单、耗时少、效率高和制备成本低等优点。

1. 一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 制备透明质酸钠溶液:将透明质酸钠加入于超纯水中,搅拌至透明质酸钠完全溶解,制得质量浓度为0.5%~1%的透明质酸钠溶液;

(2) 制备交联剂反应液:将交联剂加入于超纯水中搅拌至完全溶解,制得质量浓度为1%~20%的交联剂溶液,再加入氢氧化钠,搅拌至完全溶解,继续搅拌使其混合均匀,制成交联剂反应液;

(3) 交联剂反应液温度控制:将所述交联剂反应液放置于控温容器中,设定温度在80℃~90℃,并保持;

(4) 将所述透明质酸钠溶液置于喷射装置中,通过喷嘴将透明质酸钠溶液呈雾状喷出至步骤(3)的交联剂反应液中,形成含有交联透明质酸微球的交联剂反应液;

(5) 取步骤(4)中含有交联透明质酸微球的交联剂反应液,加入超纯水进行稀释,并采用冰浴冷却至1℃~25℃,终止交联反应,过滤后得到交联透明质酸微球。

2. 根据权利要求1所述的一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法,其特征在于,步骤(1)中加入的透明质酸钠与步骤(2)中加入的交联剂的质量比为(10~20):1。

3. 根据权利要求1所述的一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法,其特征在于,在步骤(2)中,所述交联剂与所述氢氧化钠的质量比为10:1。

4. 根据权利要求1所述的一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法,其特征在于,所述交联剂为1,4-丁二醇二缩水甘油醚。

5. 根据权利要求1所述的一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法,其特征在于,步骤(5)中加入的超纯水与步骤(2)中加入的超纯水的体积比为5:1。

## 一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医用材料领域,特别涉及一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法。

### 背景技术

[0002] 透明质酸是一种高分子多糖,其结构单元为双糖(葡萄糖醛酸-2-N-乙酰氨基葡萄糖, $\beta$ -1,3连接),结构单元之间采用 $\beta$ -1,4连接,分子量可达一千万。透明质酸在哺乳动物细胞间质广泛存在,是细胞间质的重要组成部分,具有多种生理功能。

[0003] 在医学美容领域,透明质酸是一种重要的生物材料。原因在于其分子中含有较多羟基,可以结合较多的水分子,对于人体皮肤的健康,具有重要作用。20世纪90年代,有人采用交联剂对透明质酸进行交联,使得交联后的透明质酸不易被体内的酶降解,同时具有较好的强度,优化了其流变学性能,使其在皮肤填充领域的应用成为现实。

[0004] 交联透明质酸皮肤填充剂风靡一时,超过了传统的胶原填充、橡胶填充等填充材料,成为美容目的的真皮填充的主流生物材料。

[0005] 但是,交联透明质酸仍具有一定问题。由于透明质酸在水中溶解度较低,与交联剂混合时,呈粘稠状态,尽管尽力搅拌,但交联剂与透明质酸的混合体系仍不均匀,部分凝胶颗粒由于交联度高,与透明质酸结构差异较大,生物相容性不好,因此注射进入皮下后,易被人体免疫系统识别为异物,产生免疫反应(红肿、发炎),造成临床毒性问题。

[0006] 目前解决交联透明质酸不均一问题的方法是采用研磨和乳化的方式,然而研磨的制备过程需要经过冷冻、干燥、研磨、筛分、交联以及透析等操作,显而易见的是制备过程极其繁琐,耗时较长,期间会利用到多种设备,继而制备成本较高,且研磨后的交联透明质酸的均一度很难把握;除此之外,乳化的制备方式会添加乳化剂等物质,会在反应体系中额外引入新的物质,不易去除。

[0007] 因此,急需一种可制备高均一性交联透明质酸的新方法。

### 发明内容

[0008] 为解决以上技术问题,本发明的目的在于提供一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法,即采用喷雾法,将透明质酸溶液喷射到交联剂反应液中,得到均一的交联透明质酸微球。

[0009] 为实现上述目的,本发明所采用的技术方案如下:

一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法。包括以下步骤:

(1) 制备透明质酸钠溶液:将透明质酸钠加入于超纯水中,搅拌至透明质酸钠完全溶解,制得质量浓度为0.5%~1%的透明质酸钠溶液;

(2) 制备交联剂反应液:交联剂加入于超纯水中搅拌至完全溶解,制得质量浓度为1%~20%的交联剂溶液,再加入氢氧化钠,搅拌至完全溶解,继续搅拌使其混合均匀,制成交联剂反应液;

(3) 交联剂反应液温度控制:将所述交联剂反应液放置于控温容器中,设定温度在

80℃~90℃,并保持;

(4)将所述透明质酸钠溶液置于喷射装置中,通过喷嘴将透明质酸钠溶液呈雾状喷出至步骤(3)的交联剂反应液中,形成含有交联透明质酸微球的交联剂反应液;

(5)取步骤(4)中含有交联透明质酸微球的交联剂反应液,加入超纯水进行稀释,并采用冰浴冷却至1℃~25℃,终止交联反应,过滤后得到交联透明质酸微球。

[0010] 进一步地:步骤(1)中加入的透明质酸钠与步骤(2)中加入的交联剂的质量比为(10~20):1。

[0011] 进一步地:在步骤(2)中,所述交联剂与所述氢氧化钠的质量比为10:1。

[0012] 进一步地:所述交联剂为1,4-丁二醇二缩水甘油醚(以下称BDDE)。

[0013] 进一步地:步骤(5)中加入的超纯水与步骤(2)中加入的超纯水的体积比为5:1。

[0014] 在本发明的技术方案中,透明质酸钠的质量浓度通过透明质酸钠质量/超纯水质量计算所得;交联剂溶液的质量浓度通过交联剂质量/超纯水质量计算所得;还需要说明的是,在步骤(2)中添加氢氧化钠的作用在于创造交联反应的碱性环境,使得反应能够按照正确的机理发生。

[0015] 与现有技术相比,本发明的技术方案具有如下有益效果:

1)本发明采用喷雾法,将透明质酸溶液喷射到交联剂反应液中,由于喷射出的透明质酸雾滴体积小且大小形态高度相同,因此交联剂可以迅速包围雾滴且迅速发生交联反应,形成均一的交联透明质酸微球;

2)本发明制得的高均一性的交联透明质酸微球解决了传统方法制备交联透明质酸因不均一而造成的人体免疫排斥反应,发生红肿、发炎等不良情况,具有更优异的安全性;

3)本发明采用一种新方法制备交联透明质酸微球,与现有的研磨和乳化制备方法相比,不仅制备步骤少、耗时短、操作简单、不引入杂质,还大大减少了制备成本,提高了生产效率。

## 具体实施方式

[0016] 为使本发明目的、技术方案和优点更加清楚,下面对本发明实施方式中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施方式是本发明的一部分实施方式,而不是全部的实施方式。基于本发明中的实施方式,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施方式,都属于本发明保护的范围。因此,以下提供的本发明的实施方式的详细描述并非旨在限制要求保护的本发明的范围,而是仅仅表示本发明的选定实施方式。

[0017] 实施例1:

在本实施例中,透明质酸钠取100g,制备质量浓度为0.5%的透明质酸钠溶液,透明质酸钠与BDDE的质量比为10:1;分别制备质量浓度为1%、2%、10%和20%的交联剂(BDDE)溶液。制备所需物质及用量如表1所示:

表1

物质	用量			
透明质酸钠	100g	100g	100g	100g
超纯水(步骤1)	20000ml	20000ml	20000ml	20000ml
BDDE	10g	10g	10g	10g
超纯水(步骤2)	1000ml	500ml	100ml	50ml
氢氧化钠	1g	1g	1g	1g
超纯水(步骤5)	5000ml	2500ml	500ml	250ml

一种喷雾法制备交联透明质酸微球的方法,包括以下步骤:

(1) 制备透明质酸钠溶液:取4份100g透明质酸钠分别加入于4份20000ml超纯水中,搅拌至透明质酸钠完全溶解,制得4份质量浓度为0.5%的透明质酸钠溶液;

(2) 制备交联剂反应液:取4份10gBDDE分别加入于1000ml、500ml、100ml和50ml的超纯水中搅拌至完全溶解,分别制得质量浓度为1%、2%、10%和20%的BDDE溶液,再向4份BDDE溶液中分别加入1g氢氧化钠,搅拌至完全溶解,继续搅拌使其混合均匀,制成4份BDDE反应液;

(3) 交联剂反应液温度控制:将所述4份BDDE反应液放置于控温容器中,设定温度在80℃,并保持;

(4) 将所述4份透明质酸钠溶液置于喷射装置中,通过喷嘴将透明质酸钠溶液成雾状喷出至步骤(3)的4份BDDE反应液中,形成4份含有交联透明质酸微球的BDDE反应液;

(5) 将步骤(4)中的4份含有交联透明质酸微球的BDDE反应液,分别加入5000ml、2500ml、500ml和250ml超纯水进行稀释,并采用冰浴冷却至1℃,终止交联反应,过滤后得到交联透明质酸微球。

[0018] 实施例2:

在本实施例中,取透明质酸钠100g,制备质量浓度为1%的透明质酸钠溶液,透明质酸钠与BDDE的质量比为20:1;分别制备质量浓度为1%、2%、10%、20%的交联剂(BDDE)溶液。

[0019] 在本实施例中交联透明质酸微球的制备方法同实施例1,其中,在步骤(3)中将温度设定为90℃,在步骤(5)中,冰浴冷却至25℃。制备时所需物质及用量如表2所示:

表2

物质	用量			
透明质酸钠	100g	100g	100g	100g
超纯水 (步骤 1)	10000ml	10000ml	10000ml	10000ml
BDDE	5g	5g	5g	5g
超纯水 (步骤 2)	500ml	250ml	50ml	25ml
氢氧化钠	0.5g	0.5g	0.5g	0.5g
超纯水 (步骤 5)	2500ml	1250ml	250ml	125ml

### 实施例3:

在本实施例中,取透明质酸钠100g,制备质量浓度为1%的透明质酸钠溶液,透明质酸钠与BDDE的质量比为10:1;分别制备质量浓度为1%、2%、10%、20%的交联剂(BDDE)溶液。

[0020] 在本实施例中交联透明质酸微球的制备方法同实施例1,其中,在步骤(3)中将温度设定为85℃,在步骤(5)中,冰浴冷却至10℃。制备时所需物质及用量如表3所示:

表3

物质	用量			
透明质酸钠	100g	100g	100g	100g
超纯水 (步骤 1)	10000ml	10000ml	10000ml	10000ml
BDDE	10g	10g	10g	10g
超纯水 (步骤 2)	1000ml	500ml	100ml	50ml
氢氧化钠	1g	1g	1g	1g
超纯水 (步骤 5)	5000ml	2500ml	500ml	250ml

### 实施例4:

在本实施例中,取透明质酸钠100g,制备质量浓度约为0.67%的透明质酸钠溶液,透明质酸钠与BDDE的质量比约为13:1;分别制备质量浓度为1%、2%、10%、20%的交联剂(BDDE)溶液。

[0021] 在本实施例中交联透明质酸微球的制备方法同实施例1,其中,在步骤(3)中将温度设定为90℃,在步骤(5)中,冰浴冷却至20℃。制备时所需物质及用量如表4所示:

表4

物质	用量			
透明质酸钠	100g	100g	100g	100g
超纯水 (步骤 1)	15000ml	15000ml	15000ml	15000ml
BDDE	7.5g	7.5g	7.5g	7.5g
超纯水 (步骤 2)	750ml	375ml	75ml	37.5ml
氢氧化钠	0.75g	0.75g	0.75g	0.75g
超纯水 (步骤 5)	3750ml	1875ml	375ml	187.5ml

对以上实施例1~4所制得的交联透明质酸微球进行体外细胞毒性试验,操作为:使用常规方法干燥后混悬于生理盐水溶液中,制得交联透明质酸微球混悬液,其浓度以透明质酸钠计算,为20mg/ml,经高温湿热灭菌(F0值为8.0),制得交联透明质酸钠微球填充剂。

[0022] 按照《GBT16886.5-2017医疗器械生物学评价第5部分:体外细胞毒性试验》开展体外细胞毒性试验,样品为以上实施例1~4制备的交联透明质酸钠微球填充剂,对照品为市售传统工艺生产的交联透明质酸钠凝胶(交联剂为BDDE)。采用直接接触试验、形态学方法评价细胞损伤,结果如表5所示:

表5

观察时间	形态学观察结果	细胞毒性形态学定性分级
试验组 1 (实施例 1)	胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解, 无细胞增殖下降	0
试验组 2 (实施例 2)	胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解, 无细胞增殖下降	0
试验组 3 (实施例 3)	胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解, 无细胞增殖下降	0
试验组 4 (实施例 4)	胞浆内有离散颗粒, 无细胞溶解, 无细胞增殖下降	0
对照组	约 43%细胞呈圆缩、无胞浆内颗粒, 无大范围细胞溶解, 有 47%细胞生长抑制	2

由表5可见,采用本发明提供的由喷雾法制备的交联透明质酸微球填充剂,其细胞毒性形态学定性分级为0级,无细胞毒性反应,对照组细胞形态学定性分级为2级,有轻度细胞毒性反应。

[0023] 通过以上对比可知,本发明制备的交联透明质酸微球无细胞毒性(不发生红肿、发炎等情况),有效解决了传统(常规)混合交联工艺使得交联透明质酸不均匀继而产生细胞毒性的问题,以及与传统制备工艺相比操作更加简单、快速,拥有更高的生产效率。

[0024] 除此之外,本发明的制备过程与研磨法相比操作更简单、耗时更短、效率更高,与乳化法相比所制得交联透明质酸微球均一性更高、更纯净、无细胞毒性,因此在医学美容领域具有突出的安全效果。

[0025] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,上述优选实施方式不应视为对本发明的限制,本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明的精神和范围内,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。