

生物兼容液相色谱仪与多角度光散射检测器联用测定人血白蛋白及其二聚体杂质分子量

LC-475

摘要：本文介绍了采用岛津生物兼容液相色谱仪 Nexera Bio 联合多角度光散射检测器测定人血白蛋白分子量的应用案例。利用体积排阻色谱（SEC）对样品进行分离，运用示差检测器和多角度光散射检测器进行检测，此方法操作简便，快速，成本低，可用于人血白蛋白及其杂质的绝对分子量测定。

关键词：多角度光散射检测器 人血白蛋白 分子量 聚集体

技术特点：

- ❖ 生物兼容液相色谱仪采用耐腐蚀和惰性材质，可以有效避免高盐流动相对输液泵的腐蚀，并有效减少蛋白质与金属表面的相互作用，确保分析结果的准确性和稳定性。
- ❖ 本方法无需依赖传统分子量对照品或复杂样品预处理步骤，在简化实验流程、节省时间的同时，能够直接测定人血白蛋白及其杂质的绝对分子量。

人血白蛋白（Human Serum Albumin, HSA）是血浆中含量最丰富的蛋白质，占血浆总蛋白的 40% ~ 60%，在维持血浆胶体渗透压、物质转运、营养支持、抗炎及免疫调节等方面发挥着重要作用。此外，HSA 在临床上广泛应用于失血性休克、创伤、低蛋白血症等疾病的治疗，近年来也在生物技术领域展现出新的应用前景，如作为药物递送纳米载体和氧运输载体，进一步证明了其在现代医学与生物技术中的重要地位。

随着生物制药及临床应用对 HSA 纯度和聚集状态要求的不断提高，分子量及聚集态分析逐渐成为质

量控制的核心指标。目前常用的 SDS-PAGE 方法虽能分辨蛋白主链大小，但需对样品进行还原、热变性等复杂预处理，流程耗时较长，主要提供定性信息，且难以有效区分单体与多聚体，重现性及定量精度均有限。

本文通过将尺寸排阻色谱（SEC）与多角度光散射（MALS）和示差折光检测器（RID）联用，可在色谱柱上实时分离并表征 HSA 的不同组分。MALS 通过测量溶液中高分子样品散射光强与浓度的关系，无需分子量标准品，即可直接获得绝对分子量信息，且对样品损伤小，操作简便高效。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津生物兼容液相色谱系统（Nexera Bio）。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

输液泵：LC-20AD XR

柱温箱：CTO-20A

检测器 2：MALS*

MALS*：多角度光散射检测器

脱气机：DGU-20A 5R

自动进样器：SIL-20AC XR

检测器 1：RID-20A

1.2 分析条件

色 谱 柱 : SHIMSEN Ankylo SEC-300 (300 mm × 7.8 mm I.D., 3.0 μm)
岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 380-01215-10

流 动 相 : 0.05 M 磷酸盐缓冲液 (含 0.3 M NaCl, 10% ACN, pH 6.8)

流 速 : 0.8 mL/min 柱 温 : 30°C

进 样 体 积 : 20 μL

■ 标准溶液和样品配制方法

牛血清白蛋白 (BSA) 溶液 (用于校正检测器响应常数): 称取牛血清白蛋白 2.00 mg, 用超纯水定容至 1 mL, 配制成浓度为 2.00 mg/mL 的待测溶液。

人血白蛋白样品溶液: 取市售人血白蛋白母液适量, 加水稀释成 20.00 mg/mL 的溶液。

■ 结果与讨论

3.1 MALS 测定分子质量原理

当分子被激光照射时, 散射光的强度与其分子量有直接相关, 这种关系可以用光散射 Rayleigh 方程来进行描述。当从 10°角 (小角度) 来测量低浓度样品光散射强度时, Rayleigh 方程可以简化为: $R_{LALS} = k \times (dn/dc)^2 \times c \times M_w$ 。其中, R_{LALS} 为小角度散射光强, 可由 MALS 检测器检测得到; k 为小角度 LALS 响应常数, 可通过已知分子量的标准溶液校正得到; c 为浓度, 单位为 mg/mL; M_w 为重均分子量。

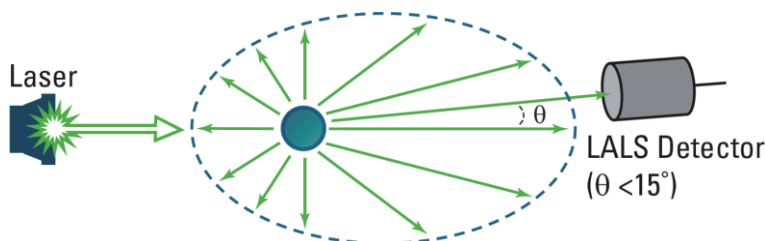
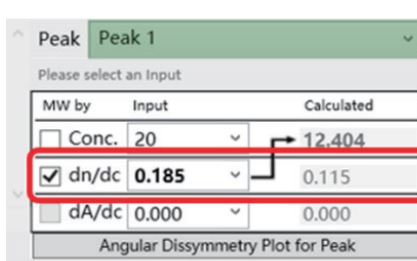


图 1 小角度光散射 (LALS) 示意图

dn/dc 为折光指数增量, 该参数的准确性直接影响计算结果。在数据处理时需根据样品类型输入已知的 dn/dc 值。例如, 本案例中通过相关资料查得 $dn/dc=0.185$, 在软件界面框选目标峰后, 需在指定参数栏手动输入该值 (见下图红框标注), 系统将结合 R_{LALS} 信号自动计算分子量。



MW by	Input	Calculated
<input type="checkbox"/>	Conc. 20	12.404
<input checked="" type="checkbox"/>	dn/dc 0.185	0.115
<input type="checkbox"/>	dA/dc 0.000	0.000

Angular Dissymmetry Plot for Peak

图 2 基于光散射的分子量计算参数输入界面示例

如需得到分子量分布, 还需浓度型检测器计算不同分子量的占比, 所以本文将示差折光检测器与 MALS 联用, 得到不同分子量占比, 计算重均分子量 M_w 、数均分子量 M_n 、Z 均分子量 M_z 及分子量分布系数。

测定目标化合物分子量前, 需要通过已知分子量的同类型标准溶液校正 LALS 和 RID 检测器的响应常数, 本实验标准溶液为牛血清白蛋白 (BSA) 溶液, 它与待测样品均为蛋白类型, 结构接近。

3.2 标准溶液牛血清白蛋白谱图及仪器响应常数

牛血清白蛋白重均分子量 M_w 为 66430 Da, 采用 1.2 中的相关条件分析牛血清白蛋白 (BSA) 标准溶液, 得到其谱图如图 3 所示。通过 SECview 软件计算得到 LALS 响应常数为 4.8628×10^{-7} , 示差折光检测器响应常数为 1.5079×10^0 。

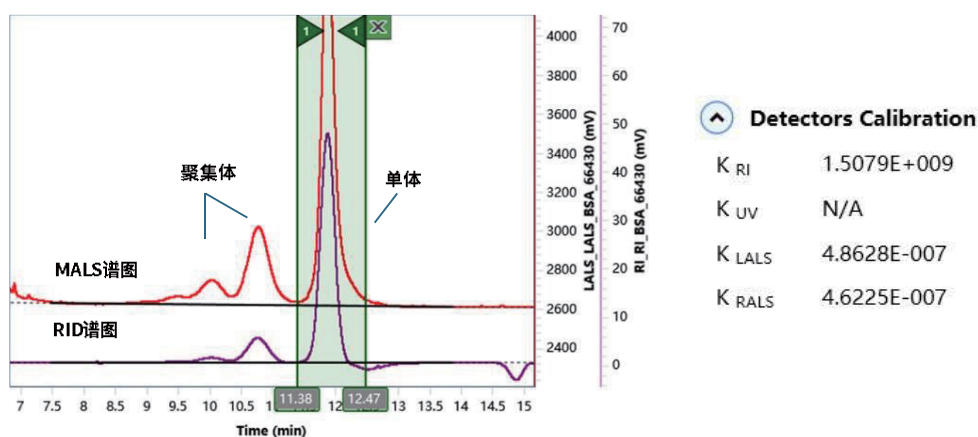


图 3 BSA 溶液谱图及检测响应常数

3.3 质控样品牛血清白蛋白谱图及分子量测定结果

利用 3.2 中获得的响应因子对牛血清白蛋白样品进行分析, 考察分子量测定的准确性。采用 SEC+MALS 测得牛血清白蛋白单体的重均分子量 M_w 为 65712 Da, 理论 M_w 为 66430 Da, 偏差为 1.08%; 分子量测定准确性较高。

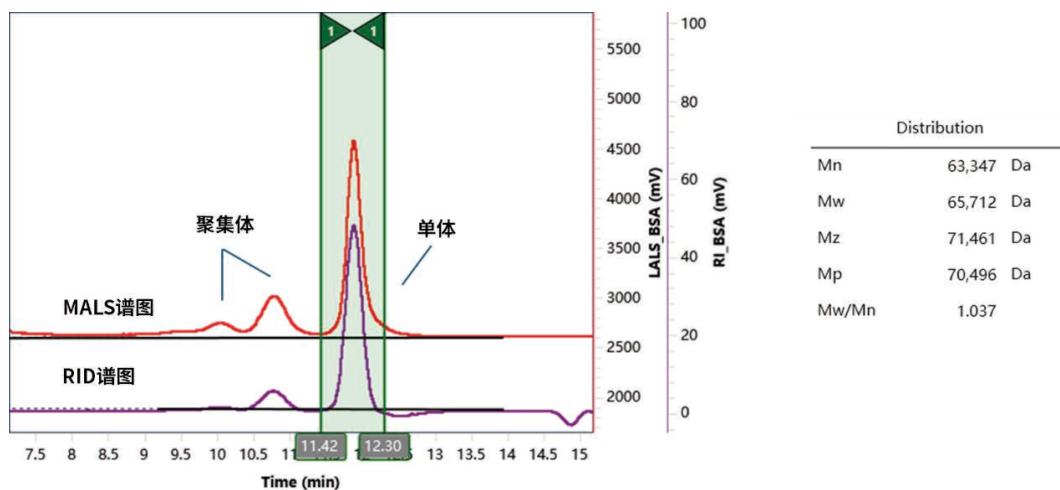


图 4 质控样品牛血清白蛋白谱图及分子量分布

3.4 人血白蛋白样品谱图及分子量测定结果

对人血白蛋白样品进行分析，如图 5 所示：有两个较为明显的色谱峰，通过 SECview 软件计算得到 1 号峰重均分子量 M_w 为 64762 Da， M_w/M_n 为 1.065，为人血白蛋白的单体峰；2 号峰重均分子量 M_w 为 128427 Da， M_w/M_n 为 1.013，为二聚体峰；根据峰面积归一法可得单体相对含量为 99.13%，二聚体相对含量为 0.87%；具体分子量分布见图 5。

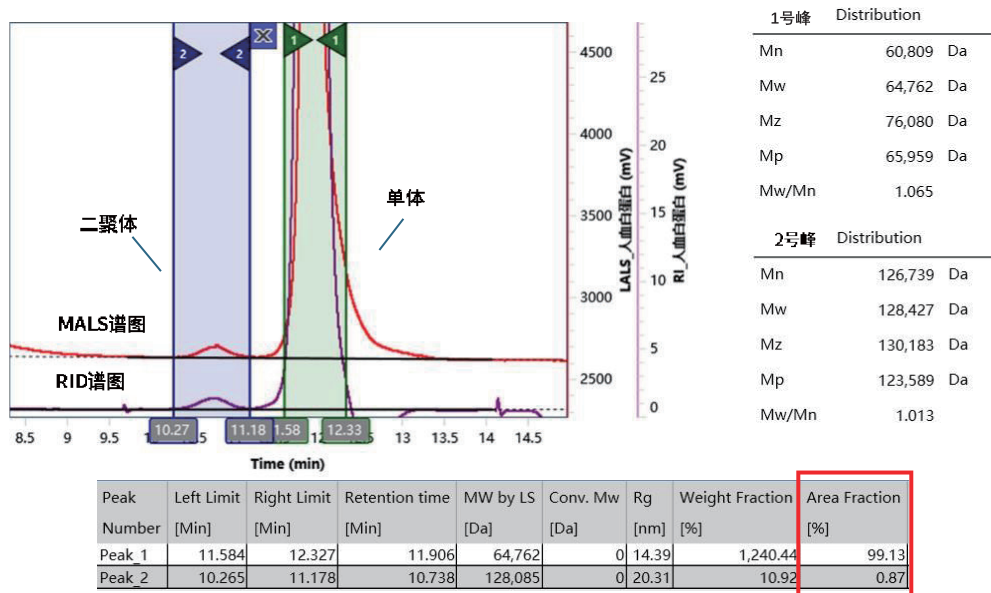


图 5 人血白蛋白样品谱图及分子量分布

■ 结论

本文采用岛津生物兼容液相色谱仪 Nexera Bio 联合多角度光散射检测器 (MALS) 测定人血白蛋白及其二聚体杂质的分子量及其相对含量。该方法无需复杂的样品前处理，操作简便，有效缩短实验时间并降低实验误差。同时，在无需分子量对照品的条件下，能够准确测定人血白蛋白的绝对分子量。

岛津应用云

