

# 生物兼容液相色谱仪与多角度光散射检测器联用测定猪 I 型胶原蛋白及其杂质分子量

LC-450

**摘要：** 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测定猪 I 型胶原蛋白分子量。利用体积排阻色谱 (SEC) 对样品进行分离, 运用紫外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, 可用于胶原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 I 型胶原蛋白 分子量

## 技术特点：

- ❖ 生物兼容液相色谱系统有效减少了样品与金属表面的接触, 尤其适用于蛋白质等生物大分子的分析, 避免了样品发生非特异性吸附或降解, 确保胶原蛋白的稳定性与完整性。
- ❖ 本方法能够直接测定胶原蛋白及其杂质的绝对分子量, 无需依赖外部校准标准, 测定结果更具可靠性, 且适用于复杂样品的分析。
- ❖ 无需使用分子量对照品或复杂的样品预处理步骤, 简化了实验流程, 显著节省实验时间并减少实验误差。

I 型胶原蛋白是常见的胶原蛋白, 广泛存在于皮肤、骨骼、肌腱和结缔组织中。它由两条  $\alpha 1$  链和一条  $\alpha 2$  链组成, 形成高生物相容性和生物力学性质的三螺旋结构, 具有高拉伸强度、低免疫性、良好的止血性能及促进细胞生长的特性, 广泛应用于组织工程和再生医学, 如人工皮肤、骨骼修复材料和外科缝合线。

随着市场需求增长, 企业纷纷开发相关医疗产品, 市场潜力巨大。然而, 质量控制技术、标准和规范相对滞后, 影响了产品质量和行业发展。分子量

是判断 I 型胶原蛋白纯度的重要指标, 现行标准 YY/T 1805.2-2021 采用 SDS-PAGE 测定分子量, 但该方法前处理复杂, 耗时长, 不适合批量处理。

本文旨在研究用光散射法测定胶原蛋白的重均分子量及分布系数。光散射法通过分析高聚物溶液散射光强度与分子量的关系, 是测定高聚物绝对分子量的常用方法。本文采用 SEC 分离样品, 并结合紫外和 MALS 检测器测定 I 型胶原蛋白的绝对分子量, 无需分子量对照品, 操作简便快速。

## ■ 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	脱气机 : DGU-20A 5R
输液泵 : LC-20AD XR	自动进样器 : SIL-20AC XR
柱温箱 : CTO-20A	检测器 1 : SPD-20A
检测器 2 : MALS*	

MALS\*: 多角度光散射检测器

### 1.2 分析条件

色谱柱 : SHIMSEN Ankylo SEC-300 (300 mm  $\times$  7.8 mm I.D., 3.0  $\mu$ m)  
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 : 40°C  
进 样 体 积 : 20 μL 检测波长 : 210 nm

## ■ 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。

猪 I 型胶原蛋白样品溶液: 用 0.5% 乙酸水溶液将猪 I 型胶原蛋白配制成浓度为 5.00 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:  $R_{LALS} = k \times (dn/dc)^2 \times c \times Mw$ 。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;  $dn/dc$  为折光指数增量;  $c$  为浓度, 单位为 mg/mL;  $Mw$  为重均分子量。

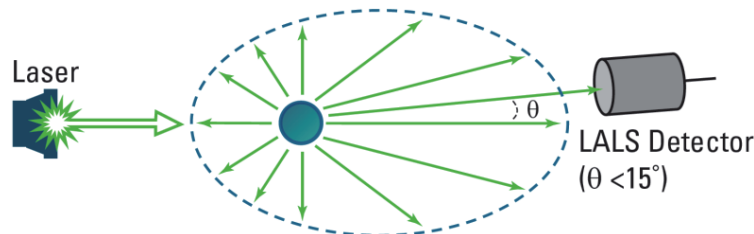


图 1 小角度光散射 (LALS) 示意图

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, 所以本文将紫外检测器与 MALS 联用, 得到不同分子量占比, 计算重均分子量  $Mw$ 、数均分子量  $Mn$ 、Z 均分子量  $Mz$  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 UV 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  $Mw$  为 66400 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 2 所示。通过 SECview 软件计算得到 LALS 响应常数为  $3.9779 \times 10^{-7}$ , 紫外检测器响应常数为  $1.3624 \times 10^6$ 。

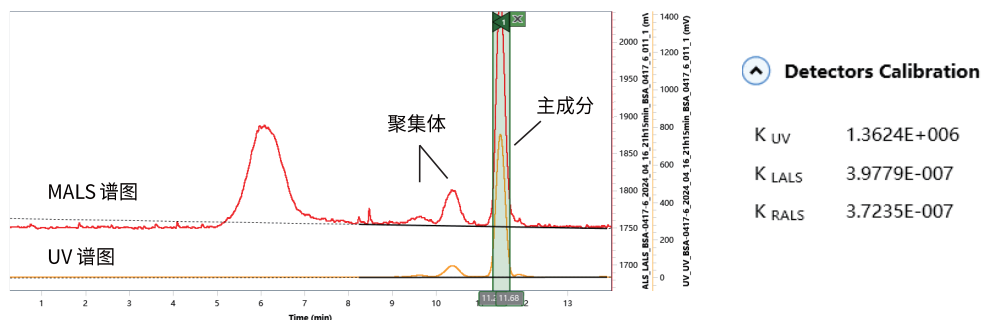


图 2 BSA 溶液谱图及检测响应常数

### 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 测得牛血清白蛋白的重均分子量  $M_w$  为 66517 Da，理论  $M_w$  为 66400 Da，偏差为 0.18%，分子量测定准确性较高。

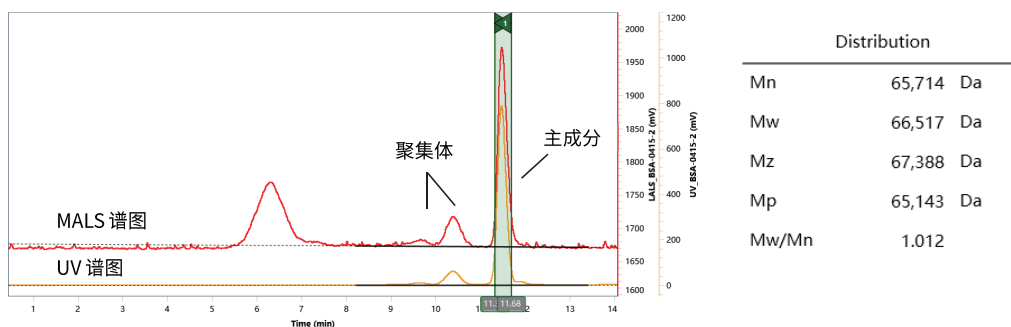


图 3 质控样品牛血清白蛋白谱图及分子量分布

### 3.4 猪 I 型胶原蛋白样品谱图及分子量测定结果

对猪 I 型胶原蛋白样品进行分析，如图 4 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 531053 Da， $M_w/M_n$  为 1.01；2 号峰重均分子量  $M_w$  为 1583770 Da， $M_w/M_n$  为 1.108，具体分子量分布见图 4。

2 号峰分子量约为 1 号峰的三倍，由此推测 1 号峰为猪 I 型胶原蛋白单体峰，2 号峰为猪 I 型胶原蛋白三聚体峰，分子量偏差 0.59%。

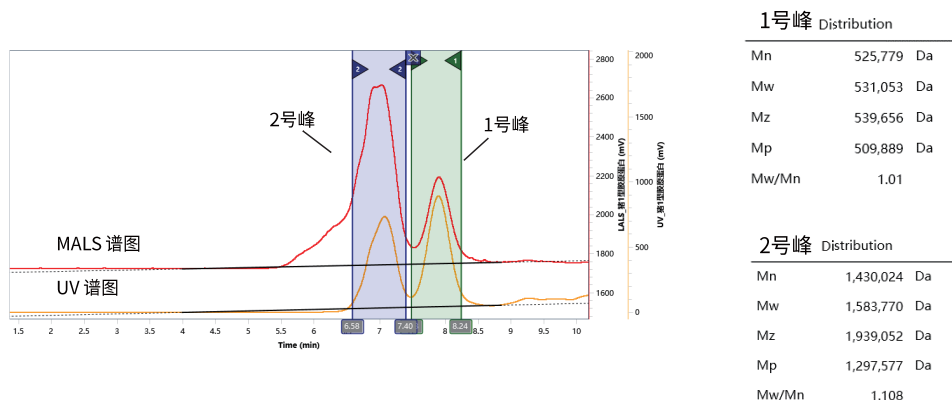


图 4 猪 I 型胶原蛋白样品谱图及分子量分布

## ■ 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) 测定猪 I 型胶原蛋白及其杂质的分子量。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，能够准确测定猪 I 型胶原蛋白的绝对分子量。

岛津应用云

