

# 凝胶过滤色谱法测定玻璃酸钠相对分子质量及其分布

LC-103

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津 Prominence GPC 系统对玻璃酸钠的重均分子量及分子量分布进行测定。本方法采用聚苯乙烯硫酸酯钠盐作为标准品, 由 GPC 软件将进行普适校正计算, 建立相对分子量校准曲线, 采用线性回归方程。对未知样品 1 和 2 进行重均分子量及分子量分布进行测定, 考察数均分子量及多分散系数的重现性, 结果表明两个样品重复分析两次的  $\Delta M_n$  均小于其  $m$  值,  $\Delta D$  均小于其  $rD$  值。本方法可用于快速、准确测定玻璃酸钠分子量。

**关键词:** 凝胶过滤色谱法; 玻璃酸钠; 相对分子质量及其分布

玻璃酸钠 (sodium hyaluronate, SH), 又称透明质酸钠, 是广泛存在于动物组织细胞间质中的一种酸性黏多糖, 其结构为葡糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖双糖单位重复连接, 重均分子量  $M_w$  为 105~107。玻璃酸钠的  $M_w$  不同, 其药理作用有很大差别, 重均分子量  $M_w$  不小于 400,000, 分布宽度  $M_w/M_n$  小于 3.0 的玻璃酸钠用于滴眼剂或药用辅材; 重均分子量  $M_w$  为 600,000~1,500,000, 分布宽度  $M_w/M_n$  小于 3.0 的玻璃酸钠用于骨科; 重均分子量  $M_w$  为 1,000,000~2,000,000,

分布宽度  $M_w/M_n$  小于 3.0 的玻璃酸钠用于眼科手术。

准确测定玻璃酸钠的重均分子量  $M_w$  及其分子量分布是控制其质量的重要指标之一。凝胶过滤色谱法根据玻璃酸钠分子体积的大小实现分离, 具有快速、简便和不受杂质干扰等特点, 在 2010 版中国药典 (WS1-(x072)2011Z) 中采用凝胶过滤色谱法对玻璃酸钠的重均分子量及分布宽度进行测定。本文建立了岛津 Prominence 凝胶渗透色谱测定玻璃酸钠重均分子量及分布宽度的方法。

## 实验条件

### 1.1 仪器

本实验使用岛津 Prominence GPC 系统。具体配置为 LC-20AD (输液泵), SIL-20A (自动进样器), CTO-20A (柱温箱), RID-10A (示差折光检测器), CBM-20A (系统控制器) 和 LCsolution Ver. 1.26 SP1 (色谱工作站), GPC for LCsolution 数据处理软件。

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shodex OHpak SB-806 HQ 8.0 mm I.D.

× 300 mm L.

流动相: 0.2 M NaCl

流速: 0.5 mL/min

进样体积: 100  $\mu$ L

柱温: 35°C

计算方法: 采用线性回归方程, 普适校正法计算 (标准品 K 值为 0.00018,  $\alpha$  值为 0.65; 玻璃酸钠 K 值为 0.00057,  $\alpha$  值为 0.75)。

### 1.3 样品制备

标准溶液配制: 以流动相配制质量浓度为 0.1% 的聚苯乙烯硫酸酯钠盐作为分子量校准曲线, 标准曲线的分子量分布表见表 1。

表 1 标准工作液分子量分布表

标准样品	分子量 $M_p$
STD1	129000
STD2	305000
STD3	673000
STD4	976000
STD5	2350000

样品制备: 将 10 mg/mL 的液体样品用流动相稀释 10 倍配制成 0.1% 溶液, 静置过夜, 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后进样分析。

## 实验结果

### 2.1 聚苯乙烯硫酸酯钠盐标准样品色谱图

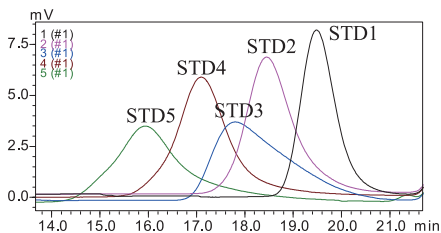


图 1 聚苯乙烯硫酸酯钠盐标准品色谱图

### 2.2 相对分子量校准曲线

由 GPC 软件进行普适校正计算线性回归方程，相对分子量的校准曲线如图 2 所示。

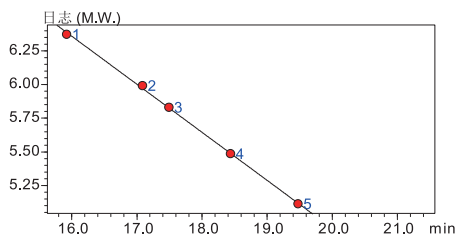


图 2 相对分子量校准曲线

### 2.3 实际样品分析

将制备好的样品 1 和 2 溶液注入凝胶过滤色谱分析，色谱图如图 3 和 5 所示，分子量分布如图 4 和 6 所示。用 GPC 软件计算出样品的分子量及分子量分布，见表 2。

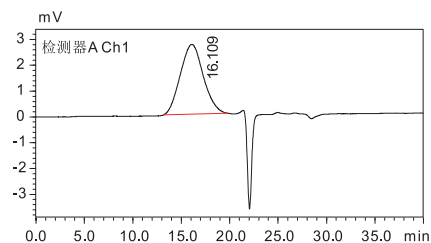


图 3 样品 1 的色谱图

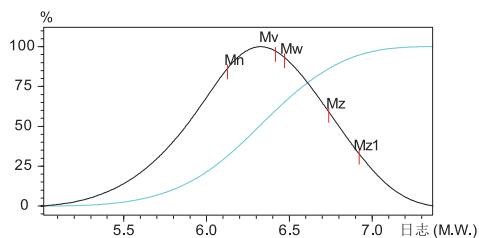


图 4 样品 1 分子量分布曲线

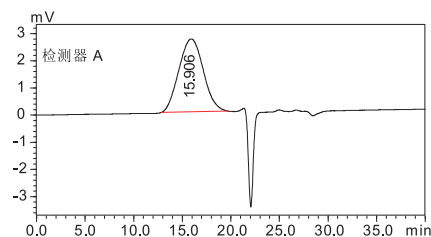


图 5 样品 2 的色谱图

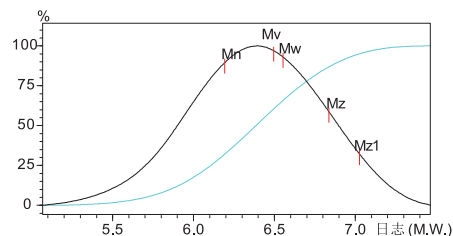


图 6 样品 2 分子量分布曲线

表 2 样品分子量分布表

样品编号	样品 1	样品 2
保留时间	16.109	15.906
Mn	1338837	1560034
Mw	2953458	3570261
Mz	5480687	6879496
Mw/Mn	2.20599	2.28858

### 2.4 重复性

为测定方法的重复性，将制备好的样品 1 和 2 溶液重复分析 2 次，用 GPC 软件分别计算出样品 1 和样品 2 重复分析 2 次所得到的数均分子量及多分散系数的重现性见表 3，结果表明两个样品重复分析两次的  $\Delta Mn$  均小于其  $rm$  值， $\Delta D$  均小于其  $rD$  值。

表 3 样品数均分子量和多分散系数的重现性考察

样品编号	Mn	Mw/Mn (D)
S1-1	1338837	2.20599
S1-2	1290130	2.22281
$\Delta Mn$	48707 (< $rm^*$ )	
$\Delta D$	0.01682 (< $rD^*$ )	
S2-1	1560034	2.28858
S2-2	1529216	2.33833
$\Delta Mn$	30818 (< $rm^*$ )	
$\Delta D$	0.04975 (< $rD^*$ )	

\* 样品 S1 两次测定值的  $rm=131448.4$ ,  $rD=0.13286$ ; 样品 S2 两次测定值的  $rm=154462.5$ ,  $rD=0.13881$ 。其中  $rm=0.01 M_n$ , 式中  $M_n$  表示数均分子量的平均值;  $rD=0.06D$ , 式中  $D$  表示多分散系数测定值的平均值。

## ■ 结论

使用岛津 Prominence GPC 系统对玻璃酸钠的重均分子量及分子量分布进行测定。本方法采用聚苯乙烯硫酸酯钠盐作为标准品, 建立相对分子量校准曲线, 采用线性拟合, 拟合方程为  $\log(M.W.)=ax+b$ ; 其中  $a = -0.3574001$ ,  $b = 12.07843$ ;  $R = 0.9996$ 。对未知样品 1 和 2 进行重均分子量及分子量分布进行测定, 考察数均分子量及多分散系数的重现性, 结果表明两个样品重复分析两次的  $\Delta M_n$  均小于其  $rm$  值,  $\Delta D$  均小于其  $rD$  值。本方法可用于快速、准确测定玻璃酸钠分子量。