

凝胶渗透色谱法测定低分子量肝素钠相对分子量及其分布

LC-105

摘要：本本文建立了一种使用岛津 Prominence GPC 凝胶渗透色谱系统对低分子量肝素钠的重均分子量及分子量分布进行测定的方法。本方法采用低分子量肝素钠作为标准品，由 GPC 软件进行窄分布标样校正法计算，建立相对分子量校准曲线，采用三阶方程拟合。对低分子量肝素钠未知样品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复性，结果表明低分子量肝素钠样品的 ΔMn 均小于其 r_m 值， ΔD 均小于其 r_D 值。本方法可用于快速、准确测定低分子量肝素钠的分子量。

关键词：凝胶渗透色谱法 低分子量肝素钠 相对分子量及其分布

低分子量肝素钠 (Heparin Low-Molecular-Mass, CAS: 9041-08-1) 具有抗凝血酶 III (AT III) 依赖性抗 Xa 因子活性，药效学研究表明低分子量肝素钠对体内、外血栓，动、静脉血栓的形成有抑制作用，本品能刺激内皮细胞释放组织因子凝血途径抑制物和纤溶酶原活化物，分子量 > 6000D 制剂影响凝血功能 APTT 略延长，本品不作为溶栓药，但对溶栓药有间接协同作用。产生抗栓作用时，出血可能性小。临床应用及研究显示，肝素除具有抗凝血作用外，还具有其他多种生物活性和临床用途，包括降血脂作用、抗中膜平滑肌细胞 (SMC) 增生、促进纤维蛋白溶解等作用。此外，低分子肝素是由肝素原料药作为原料进一步加工成的一大类抗血栓的药物，具有更为广泛的临床医学用途，成为治疗急性静脉血栓和急性冠脉综合症 (心绞痛、心肌梗塞) 等疾病的首选药物。

准确测定低分子量肝素钠的重均分子量及其分子量分布是控制其质量的重要指标之一。利用岛津凝胶渗透色谱，根据低分子量肝素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 (WS-090(X-087)-99) 中采用凝胶渗透色谱法对低分子量肝素钠的重均分子量及分布宽度进行测定。本文建立了岛津 Prominence GPC 凝胶渗透色谱测定低分子量肝素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)，SPD-20A (紫外检测器)，CBM-20A (系统控制器) 和 LCsolution Ver. 1.26 (色谱工作站)，GPC 数据处理软件。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: TSK-G2000SWXL

流动相: 28.4 g/L 硫酸钠水溶液 (1 mol/L 稀硫酸调节 pH=5.0)

流速: 0.5 mL/min

进样体积: 25 μ L

柱温: 37°C

1.3 标准品以及样品制备

标准溶液配制: 称取低分子量肝素钠标准品 0.02 g 溶解在 2 mL 流动相中，配制成浓度为 10 mg/mL 的标准品供试液，经 0.45 μ m 滤膜过滤后，上机测试。样品测试溶液亦同样处理。

实验结果

2.1 低分子量肝素钠标准样品色谱图

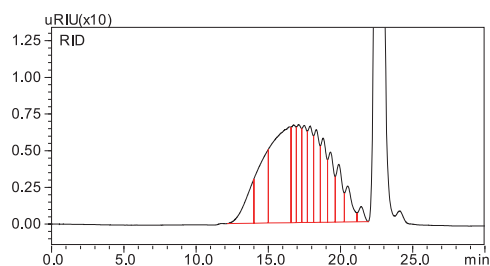


图1 肝素钠标准品RID色谱图

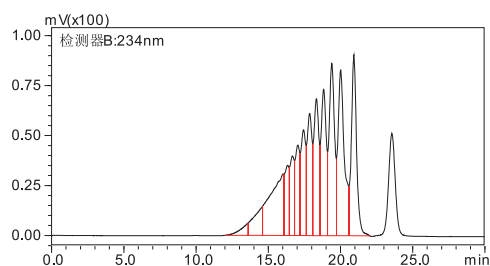


图2 肝素钠标准品SPD-20A色谱图

2.2 相对分子量校准曲线

按照《中国药典 2010 版》要求，通过保留时间将紫外检测器与示差折光检测器中的色谱峰一一对应，根据对应峰的时间间隔校准 RID 检测器和 SPD-20A 检测器采集的色谱图的时间间隔。计算比率 r 和 f ，求出各点的分子量，以 RID 检测器的保留时间对分子量利用三阶拟合建立校准曲线。

对应分子量计算公式如下

$$r = \frac{\sum \text{RID}_i}{\sum \text{UV}_{234i}}$$

$$f = \text{Mn}_a / r$$

$$\text{Mi} = f \times \text{RID}_i / \text{UV}_{234i}$$

式中： Mn_a 为标准品的数均分子量；

$\sum \text{RID}$ 为示差检测器色谱图峰面积之和；

$\sum \text{UV}_{234}$ 为紫外检测器色谱图峰面积之和；

RID_i 为 i 积分点的示差色谱图的峰面积；

UV_{234i} 为 i 积分点的紫外色谱图的峰面积；

Mi 为 i 积分点的分子量。

根据上述公式，计算得到低分子量肝素钠标准品的 13 个积分点的保留时间以及其分子量信息如表 1 所示。得到校准曲线图如图 3 所示。线性相关系数见表 2。

表1 低分子量肝素钠保留时间以及其分子量信息

| 编号 | 保留时间 (min) | | 重均分子量 (Mw) |
|----|------------|---------|------------|
| | RID | SPD-20A | |
| 1 | 13.992 | 13.592 | 18156 |
| 2 | 14.992 | 14.592 | 12905 |
| 3 | 16.459 | 16.033 | 8874 |
| 4 | 16.760 | 16.331 | 6465 |
| 5 | 17.105 | 16.667 | 5722 |
| 6 | 17.482 | 17.037 | 4923 |
| 7 | 17.887 | 17.433 | 4306 |
| 8 | 18.318 | 17.858 | 3618 |
| 9 | 18.792 | 18.326 | 2963 |
| 10 | 19.297 | 18.827 | 2323 |
| 11 | 19.874 | 19.390 | 1675 |
| 12 | 20.492 | 20.007 | 1024 |
| 13 | 21.424 | 20.922 | 389 |

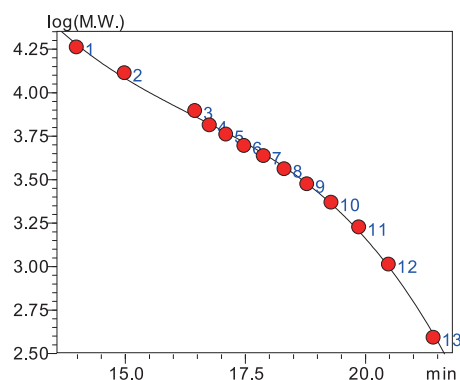


图3 低分子量肝素钠校准曲线图

表2 低分子量肝素钠校准曲线相关系数

| Third Order : $aX^3 + bX^2 + cX + d$ ($X = x - T.LIMIT$) | |
|--|-----------------------|
| $a = -4.507e-003$ | $b = 0.222c = -3.799$ |
| $d = 26.236$ | |
| $T.LIMIT = 0 \text{ min}$ | |
| $R^2 = 0.9982$ | |
| $R = 0.9991$ | |
| $Dispersion = 0.018$ | |

2.3 实际样品分析

将制备好的样品 1 和 2 溶液注入凝胶渗透色谱分析，样品 1 的 RID 色谱图如图 4 所示，SPD-20A 色谱图如图 5 所示，分子量分布如图 6 所示。样品 2 的 RID 色谱图如图 7 所示，SPD-20A 色谱图如图 8 所示分子量分布如图 9 所示。用 GPC 软件计算出样品的分子量及分子量分布，见表 3。

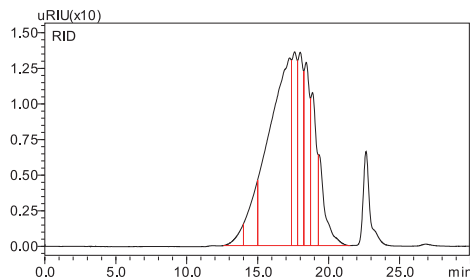


图4 样品 1 的 RID 色谱图

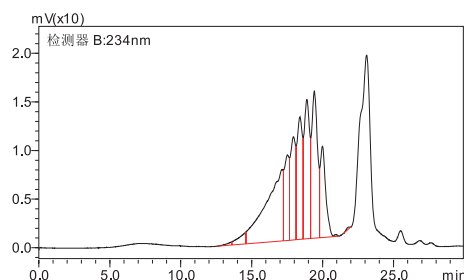


图5 样品 1 的 SPD-20A 色谱图

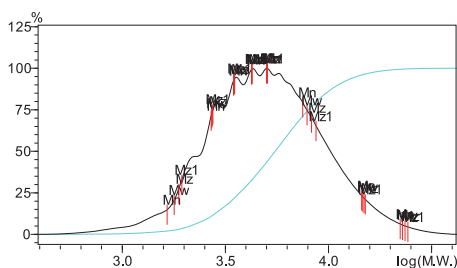


图6 样品1的分子量分布图

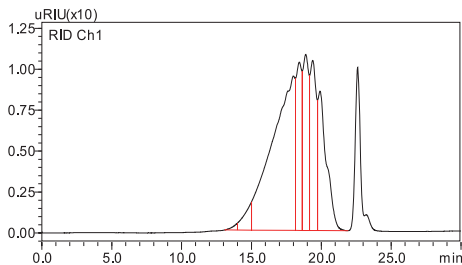


图7 样品2的RID色谱图

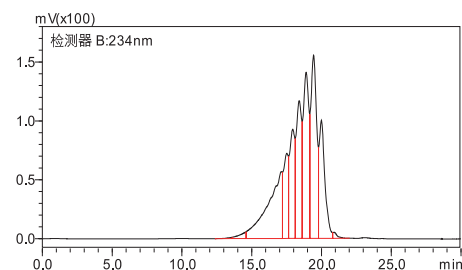


图8 样品2的SPD-20A色谱图

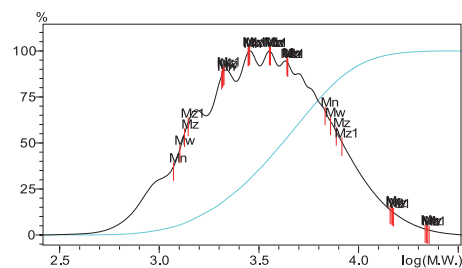


图9 样品2的分子量分布图

表3 样品分子量分布表

| 样品编号 | 样品1 | 样品2 |
|------------------|--------|--------|
| Mw | 6393 | 5783 |
| Mw < 2000 | 3.87% | 19.67% |
| Mw > 8000 | 23.34% | 12.15% |
| 2000 < Mw < 8000 | 71.16% | 67.71% |

2.4 重复性

分为测定方法的重复性,将制备好的样品1重复分析2次,用GPC软件计算出样品1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4,结果表明肝素钠样品重复分析两次的 ΔMn 小于其 r_m 值, ΔD 小于其 r_D 值

| | | |
|-------------|---------------------|---------|
| S1-1 | 3142 | 1.57834 |
| S1-2 | 3311 | 1.50141 |
| ΔMn | 169 (< r_m *) | |
| ΔD | 0.07693 (< r_D *) | |

* 样品S1两次测定值的 $r_m=322.65$, $r_D=0.09239$;其中 $r_m=0.1 Mn$,式中 Mn 表示数均分子量的平均值; $r_D=0.06D$,式中 D 表示多分散系数测定值的平均值。

表4 样品数均分子量 and 多分散系数的重复性考察

| 样品编号 | Mn | Mw/Mn (D) |
|------|----|-----------|
|------|----|-----------|

结论

使用岛津 Prominence GPC 系统对低分子量肝素钠的重均分子量及分子量分布进行测定。本方法采用低分子量肝素钠作为标准品,采用三阶拟合建立相对分子量校准曲线。对低分子量肝素钠未知样品进行重均分子量及分子量分布进行测定,考察了低分子量肝素钠未知样品数均分子量及多分散系数的重现性,结果表明低分子量肝素钠样品重复分析两次的 ΔMn 均小于其 r_m 值, ΔD 均小于其 r_D 值。本方法可快速、准确测定低分子量肝素钠样品的分子量。