

生物兼容液相色谱仪与多角度光散射检测器联用测定透明质酸钠分子量

LC-427

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透明质酸钠分子量。采用体积排阻色谱 (SEC) 对样品进行分离，示差折光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，可用于透明质酸钠绝对分子量的测定。

关键词： 多角度光散射检测器 透明质酸钠 分子量

技术特点：

- ❖ 参考标准 YY/T 0308-2015，采用多角度光散射检测器测定透明质酸钠绝对分子量；
- ❖ 本方法无需分子量对照品即可测定得到目标化合物绝对分子量，且准确性较高。

透明质酸钠是一种天然直链多糖，由 (1 → 4)-β-D- 葡萄糖醛酸和 (1 → 3)-2- 乙酰氨基 -β-D- 葡萄糖结合而成的双糖结构单元所组成。根据透明质酸钠的特性，对其进行深加工后制成的医用透明质酸钠凝胶是一种无毒、可溶于水、生物相容性良好的新型生物材料，用于眼科手术、关节腔润滑，还可用于外科手术预防术后组织粘连。

标准 YY/T0308-2015 附录 B 采用光散射法测定重均分子量及其分子量分布系数。光散射法是测定高

聚物绝对分子量的方法，高分子溶液可视为不均匀介质，当光通过它时，入射光就会发生散射，其散射光强度远高于纯溶剂，且与高聚物的分子量、溶液浓度、散射光角度和折光指数增量 (dn/dc) 密切相关。

本文参考标准 YY/T0308-2015，采用 SEC 法分离样品后，多角度光散射检测器 (MALS) 测定透明质酸钠绝对分子量，无需分子量对照品，测量范围为 10~5000 kDa，分子量涵盖范围广，且操作简便快速。

■ 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-20A XR
柱温箱：	CTO-20AC	检测器 1：	RID-20A
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.118	检测器 2：	MALS* (LenS3)
MALS*：	多角度光散射检测器		

1.2 分析条件

色谱柱：	TSKgel G5000PWxl 7.8 mm I.D.×30 cm×13 μm	柱温：	30℃
流动相：	0.2 mol/L NaCl 溶液		
流速：	0.5 mL/min		
进样体积：	20 μL		

■ 标准溶液和样品配制方法

普鲁兰 (Mw 736000) 标准溶液: 准确称取普鲁兰 (Mw 736000) 标准品约 1 mg, 用超纯水定容至 1 mL, 浓度为 1.00 mg/mL。

普鲁兰 (Mw 343000) 质控溶液: 准确称取普鲁兰 (Mw 343000) 标准品约 1 mg, 用超纯水定容至 1 mL, 浓度为 1.00 mg/mL。

透明质酸钠样品: 将透明质酸钠用超纯水稀释, 稀释后浓度约为 1.0 mg/mL。

■ 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。

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 及 RID 检测器的响应常数, 本实验标准溶液为普鲁兰 (Mw 736000), 它也是一种多糖, 与透明质酸钠结构接近。

3.2 标准溶液普鲁兰谱图及仪器响应常数

根据标准品证书, 得知普鲁兰 (Mw 736000) 的折光指数增量 $dn/dc = 0.149$ mL/g, 重均分子量 Mw 为 736000 Da。采用 1.2 中条件分析普鲁兰 (Mw 736000) 标准溶液, 得到其谱图如图 1 所示。通过 MALS 检测器软件计算得到 LALS 响应常数为 1.8266×10^{-7} , 示差折光检测器响应常数为 3.8270×10^9 。

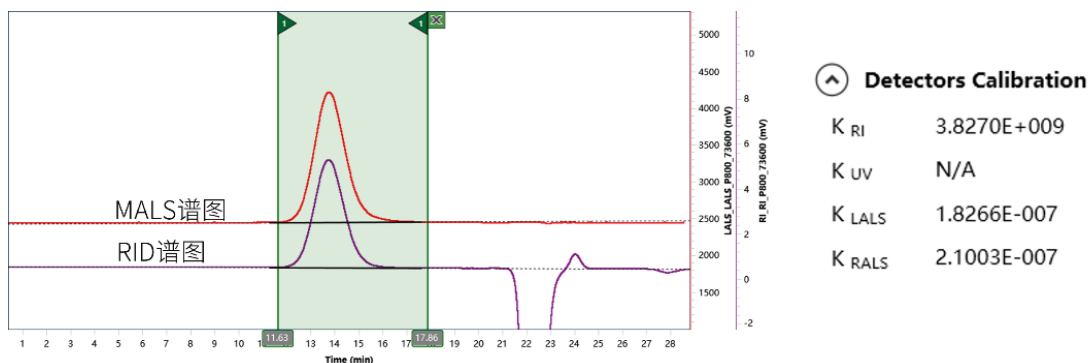


图 1 普鲁兰 (Mw 736000) 谱图及检测响应常数

3.3 质控样品普鲁兰谱图及分子量测定结果

将普鲁兰 (Mw 343000) 作为质控样品, 考察方法分子量测定的准确性。采用 SEC+MALS 测得普鲁兰 (Mw 343000) 的重均分子量 Mw 为 334967 Da, 理论 Mw 为 343000 Da, 偏差为 2.34%, 分子量测定准确性较高。

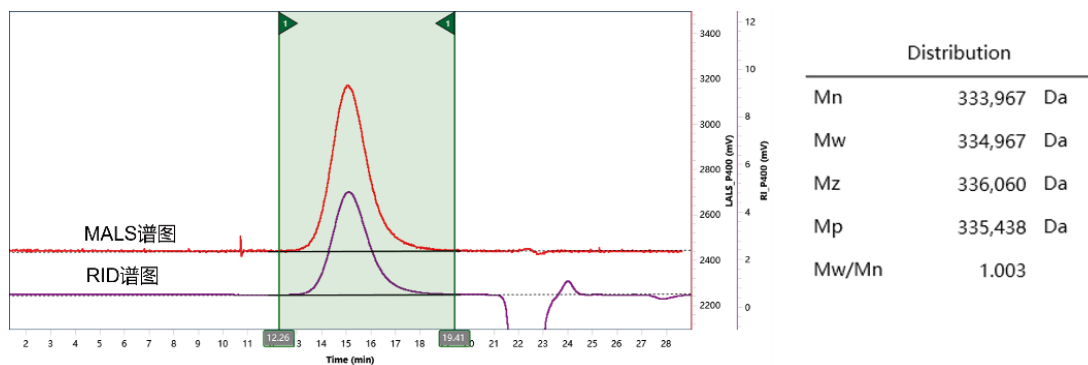


图 2 质控样品普鲁兰 (Mw343000) 谱图及分子量分布

3.4 透明质酸钠样品分子量测定结果

采用 1.2 中分析条件分析医用透明质酸钠样品。通过查阅文献得知，透明质酸钠的 $dn/dc = 0.1562 \text{ mL/g}$ ，软件计算得到样品 1 中透明质酸钠重均分子量 M_w 为 1020605 Da， M_w/M_n 为 1.104。样品 2 中透明质酸钠重均分子量 M_w 为 1170528 Da， M_w/M_n 为 1.038，具体结果如图 3、4 所示。

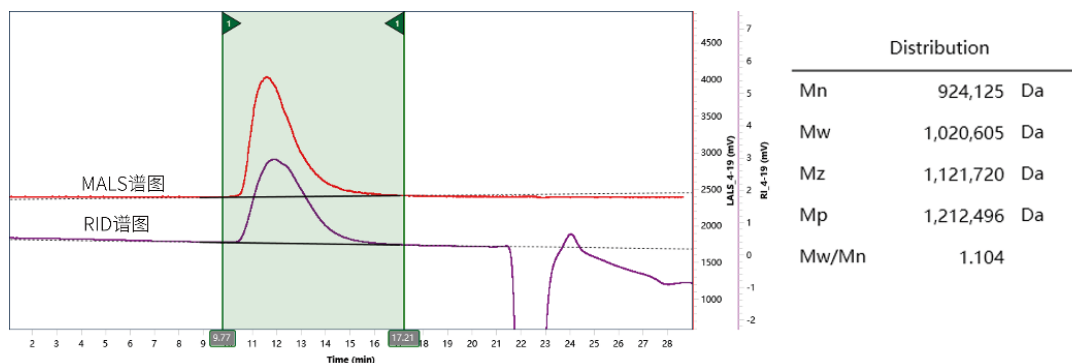


图 3 透明质酸钠样品 1 谱图及分子量分布

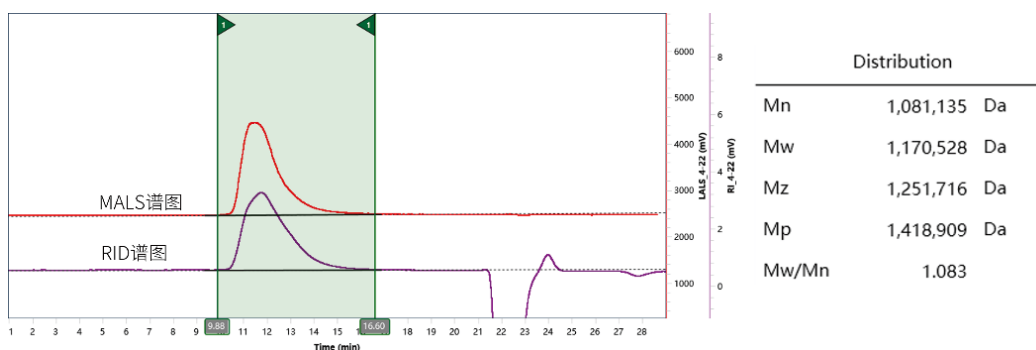


图 4 透明质酸钠样品 2 谱图及分子量分布

■ 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) 测定医用透明质酸钠分子量。通过普鲁兰 (Mw736000) 标准溶液校正 LALS 和 RID 响应常数, 质控样品普鲁兰 (Mw343000) 验证方法准确性, 最终测定得到目标物透明质酸钠的绝对分子量。本方法操作简便, 可在无分子量对照品的情况下, 测定透明质酸钠的绝对分子量。

岛津应用云

