

分子排阻色谱分析肝素钠分子量

袁斌 赵素丽 金燕
赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

凝胶色谱；示差检测器；宽分布分子量

目标

建立用分子排阻色谱分析肝素钠的平均分子量及分子量分布范围的方法。

引言

肝素钠（Heparin Sodium）是从猪或牛的肠粘膜中提取的硫酸氨基葡聚糖的钠盐，属粘多糖类物质。其分子为由五糖、六糖、糖醛酸和氨基糖经过不同位置相接形成的线性链状高分子结构，分子量在 3000 到 30000Da 范围。研究证明肝素钠有降血脂和抗凝血作用，临床上常用于治疗血管堵塞、动脉血栓，以及血液透析时防止体外凝血^[1]。目前中国药典^[2]、美国药典^[3]和欧洲药典^[4]均收载该产品用于临床抗凝血剂。临床药理表明其生理活性与其副作用跟其链状结构有关系，即与所使用的肝素钠平均分子量存在直接联系。为保证临床用药的安全性和有效性，对其分子量分布范围监控则显得尤其重要。

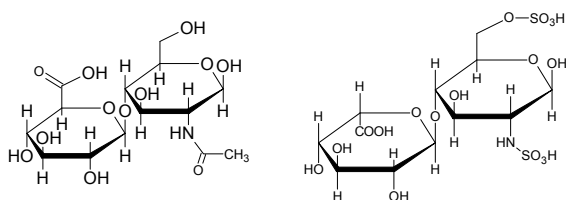


图 1. 肝素钠的两种糖分子单元

凝胶渗透色谱（Gel Permeation Chromatography, GPC），属于分子排阻色谱（Size Exclusion Chromatography）的范畴，用于测定聚合物高分子的平均分子量和分布范围，其分离基于不同分子量具有不同的摩尔体积，在与多孔凝胶接触时高分子的线性尺寸与凝胶的孔径存在不同的相对



关系而发生分离。大体积分子无法进入凝胶孔洞而被排阻，仅从凝胶颗粒间的空隙中通过，较先从柱上被洗脱，而小体积分子可以进入凝胶孔洞而受到更强的滞留，较缓慢的从柱上洗脱下来，从而实现不同尺寸的分子达到分离。通过该方法可快速地获得高分子的平均分子量及其分布范围情况。

高聚物分子大多由不同数目的分子单体通过聚合反应形成，具有分散性，使得表征高聚物分子的特性比小分子要复杂。通常采用统计学方法来获得高聚物分子的数均分子量（Mn）和重均分子量（Mw）及多分散性（DP）来阐述高分子的分子量特性^[5]。

数均分子量（Mn）：

$$M_n = \frac{\sum_0^n M_i N_i}{\sum_0^n N_i} \quad (1)$$

其中 M_i 为单体的分子量, N_i 为分子数目
重均分子量 (M_w) :

$$M_w = \frac{\sum_0^n M_i W_i}{\sum_0^n W_i} \quad (2)$$

其中 M_i 为单体的分子量, W_i 为分子的重量
多分散性 (polydispersity, PD) :

$$PD = M_w / M_n \quad (3)$$

本方法参考中国药典 (2015 版) 采用凝胶色谱法分析肝素钠的平均分子量。

三、实验部分

3.1 仪器和试剂

LPG-3400 SD (PN: 5040.0031)

WPS-3000 SL (PN: 5822.0010)

TCC-3000 SD (PN: 5730.0010), 配柱前预热和柱后冷却

RefractoMax-521 (PN: 5060.0050)

变色龙™色谱工作站 (Chromleon® 7.2), 安装 GPC 扩展功能包

TSK 预柱 (TOSOH): 6.0 × 40mm, 7μm (PN:08543)

色谱柱 1 (TOSOH) : TSK 4000 SWxl, 7.8 × 300mm,
8μm (PN:08542)

色谱柱 2 (TOSOH) : TSK 3000 SWxl, 7.8 × 300mm,
5μm (PN: 08541)

乙酸铵、水均为色谱纯;

肝素分子量系统适用性对照品 (USP RS, Cat#:1304038, Lot#: G1L413, 平均分子量: 16000Da)

肝素分子量对照品 (USP RS, Cat#:1304107, Lot#: F0L483)

3.2 分析条件

流动相: 0.1M 乙酸铵: 称取 7.706g 乙酸铵 (NH₄Ac) 并转移至 1L 容量瓶中, 用水溶解并定容至刻度, 摇匀, 用微孔 (0.45μm) 滤膜过滤。

流速: 0.6ml/min

柱系统: 依次连接预柱、色谱柱 1、色谱柱 2 用于分析

进样量: 25μl

柱温: 30°C, 柱后溶液恒温: 35°C

流通池温度: 35°C

3.3 溶液制备:

系统适用性溶液制备: 称取 5mg 肝素分子量系统适用性对照品, 用 1ml 流动相溶解并摇匀后使用。

对照品溶液: 称取 5mg 肝素分子量对照品, 用 1ml 流动相溶液溶解并摇匀后使用。

样品溶液: 称取 5mg 肝素样品, 用 1ml 流动相溶解后并用摇匀后使用。

四、实验与结果

4.1 系统适用性结果

取系统适用性对照品溶液 25μl 进入液相色谱仪并测试其响应信号, 结果见图 2

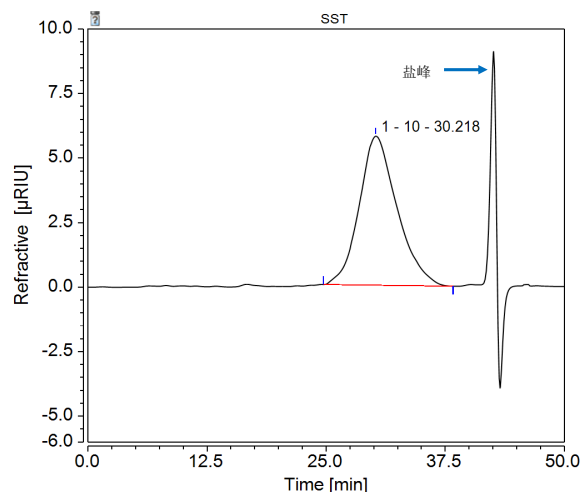


图 2. 系统适用性对照品溶液图谱

结果显示肝素系统适用性对照品峰与盐峰达到基线分离, 且计算所得的重均分子量 (M_w) 为 15686Da, 不超过标示值 (16000Da) 的 ±500Da 范围内, 符合药典方法要求, 故系统可满足样品测试要求。

4.2 分子量校准曲线

取肝素分子量对照品溶液 25μl 注入色谱仪并测试其响应信号, 结果见图 3

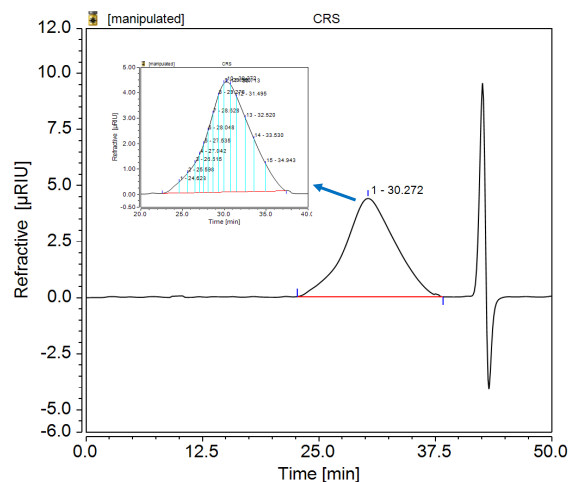


图 3. 分子量对照品溶液图谱

将分子量对照品峰按照对照品证书上所列的分子量(M)累积百分数信息(表1)分割成15个片段,每个小片的面积累积百分比与证书所列举的信息保持最大一致。

表 1. 肝素分子量对照品 - 分子量分布信息

| 序号 | 分子量 (Dalton) | 累积百分数 (%) |
|----|--------------|-----------|
| 1 | 6000 | 3.2 |
| 2 | 8000 | 10.4 |
| 3 | 10000 | 19.8 |
| 4 | 12000 | 31.7 |
| 5 | 14000 | 43.4 |
| 6 | 16000 | 55.5 |
| 7 | 18000 | 66.0 |
| 8 | 20000 | 74.4 |
| 9 | 22000 | 80.3 |
| 10 | 24000 | 84.4 |
| 11 | 26000 | 87.5 |
| 12 | 28000 | 90.1 |
| 13 | 32000 | 93.4 |
| 14 | 36000 | 95.6 |
| 15 | 40000 | 97.0 |

然后将15个小峰的保留时间(T)与对应的分子量对数值(LogM)配对,采用三次函数($\text{LogM}=aT^3+bT^2+cT+d$)形式进行校准,结果见图4

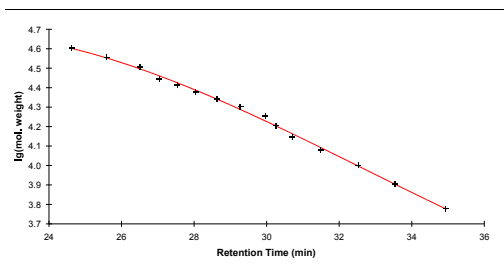


图 4. 分子量校准曲线

肝素钠分子量校准方程: $\text{LogM}=0.002T^3-0.0234T^2+0.6711T-1.3160$, 相关系数: $R=0.995$, 满足药典要求不小于0.99。

4.3 样品测试^[6]

取肝素样品溶液25 μL 注入色谱仪并测试其响应信号。将色谱峰分割成200个小峰,利用分子量校准曲线计算每个小峰的分子量,再结合每个小峰的峰高利用下式计算肝素样品的平均分子量

$$\text{平均分子量计算公式: } M_w = \frac{\sum_0^n M_i H_i}{\sum_0^n H_i} \quad (4)$$

其中 M_i 为通过校准曲线所计算得到的样品中每个小峰的分子量, H_i 为从色谱图中所测得的每个小峰的峰高。结果见表2

表 2. 样品测试结果

| 分子量 | |
|-----------------------------------|---------------|
| 数均分子量 (Mn) | 15713 |
| 重均分子量 (Mw) | 18423 |
| 分散度 (PD) | 1.17 |
| 分子量分布 | |
| 分布 1- 大于 24000Da 的累积百分数 (%) | 19.3 |
| 分布 2- 介于 8000-16000Da 的累积百分数 (%) | 43.8 |
| 分布 3- 介于 16000-24000Da 的累积百分数 (%) | 37.0 |
| 分布 2 与分布 3 的比值 | 1.18 |
| 药典限值与要求 | |
| 重均分子量 (Mw) | 15000~19000Da |
| 分子量大于 24000Da 的累积百分数 (%) | <20 |
| 分布 2 与分布 3 的比值 | >1.0 |

五 讨论

- 5.1 本方法参考中国药典对肝素钠分子量进行了分析，结果表明系统适用性、线性范围和准确度均符合药典要求，该方法可适用于肝素钠的分子量测定。
- 5.2 分子排阻色谱用于测定聚合物高分子的分子量是基于聚合物分子在色谱柱上的保留体积与相对应的分子量之间的相对关系所决定，能够影响聚合物分子的表现保留时间（表现保留体积）的系统因素都会对分子量的测定造成干扰，因此结果的准确性受到所选用的色谱柱、流动相流速及检测器的性能所影响。相同的对照品在不同仪器上进行测试时，所测得的分子量校准曲线工作范围会存在较大差别，因此在比较测试结果时应该明确测试条件^[5]。
- 5.3 肝素钠分子为宽分布聚合物，因此在药典方法中采用宽分布分子量对照品来进行分子量曲线校准，该类对照品中含有固定分数的不同质量的分子，但在实际测试时，对照品的保留体积会由于系统的柱外扩展效应导致峰展宽，在测试工作校准曲线时进行峰分割的结果会与理论值相差较大，测定结果与理论值则会有很大偏差，因此在测试时应尽量降低系统的峰展宽效应。
- 5.4 肝素钠分子中无紫外吸收基团，为无紫外吸收化合物，因此本方法中采用示差检测器检测肝素钠分子的响应值。而液体化合物的折光率受到环境温度的影响很大，为保证响应信号稳定，必须将检测器的流通池设置在恒温状态，同时为避免柱后流出液的温度与流通池温度不匹配，故将柱后流出液经过一恒温装置使其温度与流通池温度保持一致。

参考文献

- [1] Elaine Grey et al. Thromb Haemost, 919(2008):807-818
- [2] 中国药典二部（2015版），中国药典委员会，北京：中国医药科技出版社 2015
- [3] USP37-NF31, USP Monograph-heparin sodium, USP Convention, Rockville, MD, 2014
- [4] European pharmacopeia 7.0, monograph 0333, heparin sodium, EQDM, Strabough, France
- [5] Bernd Trathnigg, Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons(2000):8008-8034
- [6] Barbara Mulloy et al. Anal Bioanal Chem(2014) 406: 4815-4823

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

免费服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

ThermoFisher
SCIENTIFIC