

文章编号:1000-582X(2007)07-0121-03

GPC-RI-MALLS 技术测定羟乙基淀粉 的分子量及分子量分布

吴扬兰^a,王远亮^a,徐世荣^a,杨亚联^b,王喜云^a

(重庆大学 a.生物工程学院;b.机械传动国家重点实验,重庆 400030)

摘要:羟乙基淀粉是一种优良的血浆代用品,作者介绍了用凝胶渗透色谱(GPC)-示差检测(RI)-多角度激光光散射(MALLS)联用技术测试羟乙基淀粉的分子量和分子量分布的实验技术,给出了测试折光指数增量 dn/dc 值、分子量和分子量分布实验步骤和方法,并对其分析测试过程中的关键实验技术及实验结果进行了详细的讨论。该方法以 CH_3COOH/CH_3COONa 溶液作为流动相,实验获得了满意的结果,可作为羟乙基淀粉分子量和分子量分布测试的常规分析方法。

关键词:激光光散射法;GPC;羟乙基淀粉;代血浆产品;分子量;分子量分布;测定

中图分类号:R927.11

文献标志码:A

1 研究背景

羟乙基淀粉(hydroxyethyl starch HES)为玉米支链淀粉经酸水解,然后在碱性条件下经羟乙基化而成^[1],其与氯化钠的灭菌水溶液(HES注射液)是一种优良的血浆代用品,常常用于失血性休克的治疗和血液稀释。作为高分子化合物,其临床疗效及过敏反应的发生与其分子量高低及分子量分布密切相关,其平均分子量的大小及其分布状况是评价其药用价值、控制生产和改进产品质量的主要根据和一项重要指标。多数学者认为,高分子量的贺斯,由于体内停留时间过长,若输入量大,可导致凝血机制和血小板受损;而中分子量低取代级的贺斯对凝血功能的影响较小^[2],Jamnicki等^[3]观察到贺斯200/0.5对血凝固也有影响。因而寻找一种快速准确地测定其分子量及其分布的方法成为研究和控制羟乙基淀粉质量的一项重要工作。目前常用的方法有粘度法、凝胶渗透色谱法(GPC)等。粘度法是用乌氏粘度计测量其特性粘度值,根据特性粘度与分子量之间的关系公式计算出其粘均分子量,但该方法不能直接求出绝对平均分子量,而是间接地通过经验公式计算,所以会带来较大的误

差;凝胶渗透色谱法(GPC)常用的检测高聚物分子量大小的方法之一,其原理是大分子溶液流过凝胶柱时大分子按体积大小顺序流出,依据分子量对流出体积的对应关系来测定大分子的分子量,它可以同时给出数均分子量(M_n)、重均分子量(M_w)、分布系数(M_w/M_n)等,但GPC需要相同物质作为标样,如用不同的标准品将有不同的结论,因此该法所给出的是分子量的相对值。激光光散射是一种绝对的检测方法,结果不依赖于标样。GPC-十八角激光光散射联用技术兼具了GPC法和光散射法的特点,不需要标准样品,能快速、准确地测定出高分子的绝对重均分子量、数均和Z均分子量及分子量分布^[4-7]。笔者拟对凝胶渗透色谱-示差检测-多角度激光光散射联用技术测试羟乙基淀粉(hydroxyethyl starch HES)的分子量和分子量分布的关键实验技术进行研究和讨论。

2 试验部分

2.1 实验仪器及实验条件

仪器名称:GPC-RI-DAWN EOS 十八角度激光散射联用系统,美国怀雅特公司购买。组件名称:Agilent 1100 单元泵,TSK-G4000PWXL(7.8 mm×300 mm),

收稿日期:2007-03-22

基金项目:国家自然科学基金(30270395,50305037);重庆大学创新基金资助项目。

作者简介:吴扬兰(1973-),女,重庆大学讲师,博士研究生,主要从事药物分析和生物医学工程研究,(E-mail) wuyanglan@yaho.com.cn。

TSK-GEL GuardPWXL (6.0 mm × 40 mm), Wyatt-DAWN EOS 十八角度激光光散射仪(WyattTechnology Co, USA), Wyatt-OPTILAB rEx 示差检测器和 Astra V 激光光散射数据采集及处理软件。

2.2 实验过程

2.2.1 折光指数增量 dn/dc 值的求取

1) 试样溶液配制。分别称取一定量的羟乙基淀粉(HES)样品,置于5 mL容量瓶中,用适量流动相稀释溶解后定容,分别编号为HES1到HES9,让其过夜放置。

2) dn/dc 值的测试。 dn/dc 值的测试工作是在 Wyatt-OPTILAB rEx 示差检测器上进行的。其简单测试步骤如下。

1) 打开 dn/dc 测试模板并设好有关的参数。

2) 打开 PURGE 阀,用手动进样器吸取一定量的流动相将 Wyatt-OPTILAB rEx 示差检测器冲洗干净,再关闭 PURGE 阀,清零后,开始运行数据采集。

3) 用手动进样器吸取一定量的流动相注入 Wyatt-OPTILAB rEx 示差检测器样品池中,再将样品溶液按表1编号HES1到HES9顺序经0.2 μm 的水相过滤头注入示差检测器进行测量和收集数据,最后吸取一定量的流动相注入检测器中。

4) 用 Astra V 数据处理软件处理所收集的实验数据。主要步骤是:定基线→定峰→输入相关峰浓度。获得羟乙基淀粉在醋酸盐缓冲液中的 dn/dc 值为 $0.1350 \pm 0.0014 \text{ mL/g}$ (见图1所示)。

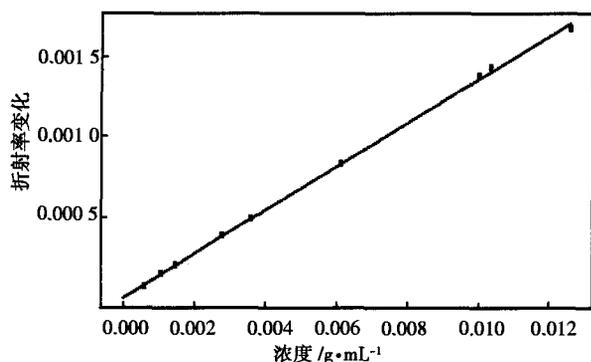


图1 dn/dc 值的求取图

2.2.2 羟乙基淀粉分子量和分子量分布测定

1) 实验条件

实验用羟乙基淀粉由一医药公司提供,乙酸从天津市光复精细化工研究所购买(为高效液相色谱淋洗剂)、乙酸钠为分析纯固体样品,从重庆北碚化学六厂

购买,以醋酸盐缓冲液为流动相,流动相经0.2 μm 水系过滤膜低真空度过滤,测试柱温30 $^{\circ}\text{C}$;示差折光检测器温度30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长690 nm;流速:1 mL/min;进样体积:20 μL ;试样溶液浓度:2~6 mg/mL。

2) 试样溶液配制

称取一定量的羟乙基淀粉,置于10 mL容量瓶中,用适量醋酸盐缓冲液流动相稀释溶解后定容。

3) 样品测定条件

羟乙基淀粉分子量和分子量分布的测定是在 GPC-十八角激光光散射仪联用系统上于690 nm下测定的,十八角激光光散射仪测定的角度从16.9 $^{\circ}$ ~155.4 $^{\circ}$ 。11角为90 $^{\circ}$ 散射角,此时的激光强度最稳定,受杂散光干扰最小,取其作为定峰及定基线基准。分子量和分子量分布测量时将样品溶液稀释后经0.2 μm 的水系过滤头经凝胶渗透色谱、示差检测和光散射检测联用法测量。凝胶渗透色谱柱和示差检测器的温度均为30 $^{\circ}\text{C}$ 。

4) 具体步骤

①打开 GPC-RI-EOS 联机软件模板并设好有关的参数,输入 dn/dc 值,准备采集实验数据。

②打开示差检测器的 PURGE 阀,用配备好的流动相将整个 GPC-RI-EOS 联用系统冲洗干净后,关闭示差检测器 PURGE 阀,清零。

③用手动进样器将样品溶液通过针头过滤器注入进样阀中,开始收集数据。

④用 Astra V 数据处理软件处理所收集的实验数据。主要数据处理步骤是:定激光基线和示差基线→定激光峰和示差峰→运行软件。羟乙基淀粉示差和11角激光峰谱图见图2所示,实验结果见表1所示。

表1 HES 分子量大小及其分布结果

样品	$M_w \times 10^{-4} (\text{g/mol})$	$M_n \times 10^{-4} (\text{g/mol})$	M_w/M_n
HES-1	1.115e+5(0.9%)	5.952e+4(4%)	1.873(4%)
HES-2	1.118e+5(1%)	6.183e+4(2%)	1.807(3%)
HES-3	1.145e+5(2%)	6.314e+4(5%)	1.813(5%)
HES19	1.065e+5(2%)	7.761e+4(3%)	1.373(4%)
20YTHES	1.012e+5(2%)	7.467e+4(3%)	1.356(4%)

说明: M_w 为重均分子量, M_n 为数均分子量了; M_w/M_n 分子量的分布系数。

3 讨论

1) 流动相的选择。考虑到羟乙基淀粉的 pH 值在4~6选择用有一定离子强度的乙酸盐缓冲溶液(pH

值为4)作为流动相,这样既减少了样品在GPC柱上的吸附,也阻止了在分离过程中样品分子间相互缔合为大分子,以保持其溶液中正常的分子形态。流动相中的微量杂质对谱图的信噪比影响大,当溶液流动相通过两层0.2 μm 过滤膜低真空度过滤后现用,信噪比较高。如流动相通过两层0.2 μm 过滤膜低真空度过滤后放置3~5 d后用,或流动相出厂的时间太长,则基线噪音将增大,信噪比降低。

2) 色谱柱的选择。由于所测试的羟乙基淀粉的分子量范围在几万到二十万之间,因此选择用TSK-G4000PWXL(7.8 mm \times 300 mm),其分子量分离范围为5 000~4 00000;同时在色谱柱前加一保护柱TSK-GEL GuardPWXL(6.0 mm \times 40 mm)对分离柱进行保护。

3) dn/dc 值对测试结果的影响。经实验测定30 $^{\circ}\text{C}$ 时,羟乙基淀粉在醋酸盐缓冲液中的 dn/dc 值为0.135 mL/g(见图1所示)。此折光指数增量值较大,使用仪器原配20 μL 的进样环进样可得到较强的激光信号(见图2所示)。这样微量的进样可以保证色谱峰不加宽,分离效果好。从实验原理得知随着 dn/dc 值的增加重均分子量将减少,这一点通过大量实验得以证实。因此折光指数增量 dn/dc 值的准确测试和选用十分重要。在 dn/dc 值的测试过程中应该尽量避免和减少各种原因造成的误差,建议在低浓度范围多配制样品溶液,测试时从低浓度到高浓度的顺序进行测量。

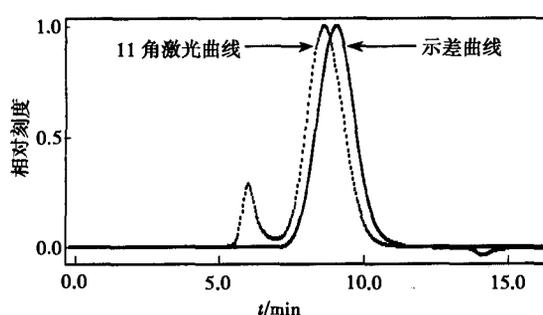


图2 羟乙基淀粉示差和11角激光峰谱图

4) 谱图分析 在所选定的色谱条件下,羟乙基淀粉分离良好,样品的示差和激光谱图呈现对称的正态分布峰,样品分子量分布较为均匀(见图2所示)。通过

该实验的数据处理过程发现,基线的确定和峰面积的选取,对实验结果有一定的影响,必须通过大量的实验进行摸索。从激光光散射仪的测定原理可知,激光光散射法测定的高分子的分子量为绝对分子量,当 dn/dc 值确定后,测试误差主要由仪器检测误差造成,可由仪器直接给出。在给定的测试条件下,测试结果表明羟乙基淀粉的重均分子量测定误差小于2%,数均分子量和分布宽度指数误差均不大于5%,实验获得了满意的结果,说明该方法可作为常规测定羟乙基淀粉的分子量及其分布的方法。

参考文献:

- [1] SOMMERMEYER K, CECH F, SCHMIDT M, et al. Hydroxyethyl starch in clinical use: a physical-chemical characterization[J]. *Krankenhauspharmazie*, 1987(8):271.
- [2] BLAICHER AM, REITER WJ. The effect of hydroxyethyl starch on platelet aggregation in vitro[J]. *Anesth Analg*, 1998,86: 1318-1321.
- [3] JAMNICKI M, ZOLLINGER A, SEIFERT B, et al. Ompromised blood coagulation; an in vitro comparison of hydroxyethyl starch 130/0.4 and hydroxyethyl starch 200/0.5 using thrombelastography[J]. *Anesth Analg*, 1998, 87(5): 989-993.
- [4] 左渠. 激光散射原理及在分子科学中的应用[M]. 郑州:河南科学技术出版社,1994:48-229.
- [5] GHAZY R, EL-BARADIE B, EL-SHAER A, et al. Static laser light scattering (SLLS) investigations of the scattering parameters of a synthetic[J]. *Polymer Optics & Laser Technology* 1999(31):447-453.
- [6] 鲁德平,管蓉. 聚合物乳液研究中的静态和动态激光光散射技术[J]. *胶体与聚合物*, 2000, 18(2):41-43.
- [7] LIU YONGGANG, BO SHUQIN, ZHU YEJUAN, et al. Determination of molecular weight and molecular sizes of polymers by high temperature gel permeation chromatography with a static and dynamic laser light scattering detector[J]. *Polymer*, 2003, 44:7209-7220.

(下转第129页)

Characterization of the Inclusion Complexes of Nitrendipine with β -Cyclodextrin

WANG Jian-hua, LI Xing, XU Shi-rong

(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: To select the optimum process for the preparation of nitrendipine- β -CD inclusion complex, the nitrendipine- β -CD inclusion complexes were prepared through solid method, saturation solution method and ultrasonic method with orthogonal design. The property of inclusion complexes were studied on physical and chemical characteristics. The results testified the ultrasonic method was the best one in three methods. The optimum entrapment conditions were as follows: The ultrasonic power was 40kW, the ratio of β -CD to nitrendipine was 2:1, temperature was 40°C, reaction time was 70 min. The formation of compound nitrendipine- β -CD was confirmed and studied by microscope observation, X-Ray powder diffractometry and UV method. Inclusion complex can not only enhance 3.7 times the stability to light, but also gain 10.5 times the solubility of guest molecule.

Key word: nitrendipine; ultrasonic method; preparation of inclusion complex; orthogonal design

(编辑 张小强)

(上接第 123 页)

Determination of Molecular Weight and Distribution of Hydroxyethyl Starch (HES) by Means of GPC-RI-MALLS Technique

WU Yang-lan^a, WANG Yuan-liang^a, XU Shi-rong^a, YANG Ya-lian^b, WANG Xi-yun^a

(a. College of Bioengineering; b. State Key Laboratory of Mechanical Transmission, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: The author introduces a method and experimental procedures that determine dn/dc , molecular weight and its distribution of the hydroxyethyl starch (HES) by means of Gel Permeation Chromatography-Refractive index- Multi-angle laser light scattering detection (GPC-RI-MALLS) techniques. The key experimental technique and results are discussed. The method takes CH_3COOH/CH_3COONa as mobile phase and solvent. The experiment gets satisfactory results. It can be used as a routine method to determine the hydroxyethyl starch(HES) molecular weight and its distribution.

Key words: laser light scattering method; the hydroxyethyl starch(HES); plasma substitutes; GPC; molecular weight; molecular mass distribution; determination

(编辑 姚飞)