

## 透明质酸的 GPC/SEC-MALLS 分析

### 作者

Jasmin Preis\*,  
Friedhelm Gores 和  
Günter Reinhold  
\* 安捷伦科技有限公司

### 摘要

本应用简讯介绍了透明质酸的可靠 GPC/SEC-MALLS 分析。该方法的优势在于可获得绝对摩尔质量，而带浓度检测器的传统 GPC/SEC 则只能提供表观摩尔质量。

## 前言

透明质酸 (HA) 是由葡萄糖醛酸和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖双糖单元连接构成的大分子。HAs 的分子量范围为 5000–20000000 Da，其中多达 25000 个双糖单元可以连接在一起。透明质酸广泛应用于医疗和化妆品领域。

GPC/SEC 是测量透明质酸摩尔质量分布的首选方法。结合使用在线多角度光散射和示差折光检测器可以获得真实摩尔质量。用于光散射数据评估的折射率增量 (dn/dc) 可通过在线或离线 (使用专用仪器) 确定或从文献中引用<sup>[1]</sup>。

## 实验部分

见表 1。

## 结果与讨论

高摩尔质量样品的 GPC/SEC 分析要求较低的流速并且在 GPC/SEC 中的浓度较低，以避免剪切引起的链延伸和过载效应。因此，在分析高摩尔质量 HAs 时，需要对 GPC/SEC 条件和色谱柱进行载样量、流速、填料粒径和孔径方面的优化。

大粒径 (10  $\mu\text{m}$ ) 和大孔隙率 Agilent SUPREMA 色谱柱可以避免这些问题，并实现无相互作用的色谱分析，有利于在使用 PBS pH 7.4 作为流动相时实现准确的 GPC/SEC 测量。

表 1. 仪器和样品条件

	条件
泵	等度泵 流速: 0.5 mL/min 流动相: 磷酸盐缓冲液 (PBS), pH 7.4
进样系统	自动进样器 进样量: 100 $\mu\text{L}$
色谱柱	Agilent SUPREMA 10 $\mu\text{m}$ 预柱, 8 $\times$ 50 mm (货号 SUA080510) Agilent SUPREMA 10 $\mu\text{m}$ 30 $\text{\AA}$ , 8 $\times$ 300 mm (货号 SUA0830103e1) Agilent SUPREMA 10 $\mu\text{m}$ 10000 $\text{\AA}$ , 8 $\times$ 300 mm (货号 SUA0830101e4) Agilent SUPREMA 10 $\mu\text{m}$ 10000 $\text{\AA}$ , 8 $\times$ 300 mm (货号 SUA0830101e4)
样品浓度	0.5 mg/mL
检测器	示差折光 (RI) 检测器 多角度光散射检测器 (MALLS), $\lambda = 638 \text{ nm}$
检测器设置	Agilent ReadyVLS-葡聚糖/普鲁兰多糖试剂盒 (货号 PSS-VLSKITR1PD20)
软件	Agilent WinGPC

由于缺乏高摩尔质量校准标样，建议采用光散射检测。这种检测技术还可以测量真实摩尔质量。通过 GPC/SEC-MALLS 测定摩尔质量时，考虑了 HA 的含水量 (可高达 12% 左右)。

使用透明质酸 dn/dc 值 0.165 评估光散射数据<sup>[2]</sup>。

图 1 显示了 RI 检测器测得的片段浓度以及在线测定的摩尔质量。样品回收率接近 100%，表明所有物质均从色谱柱洗脱出来。随着洗脱体积的增大，摩尔质量明显降低，证明在摩尔质量方面实现了分离。

图 2 显示了透明质酸样品的质量分布，包括累积分布。

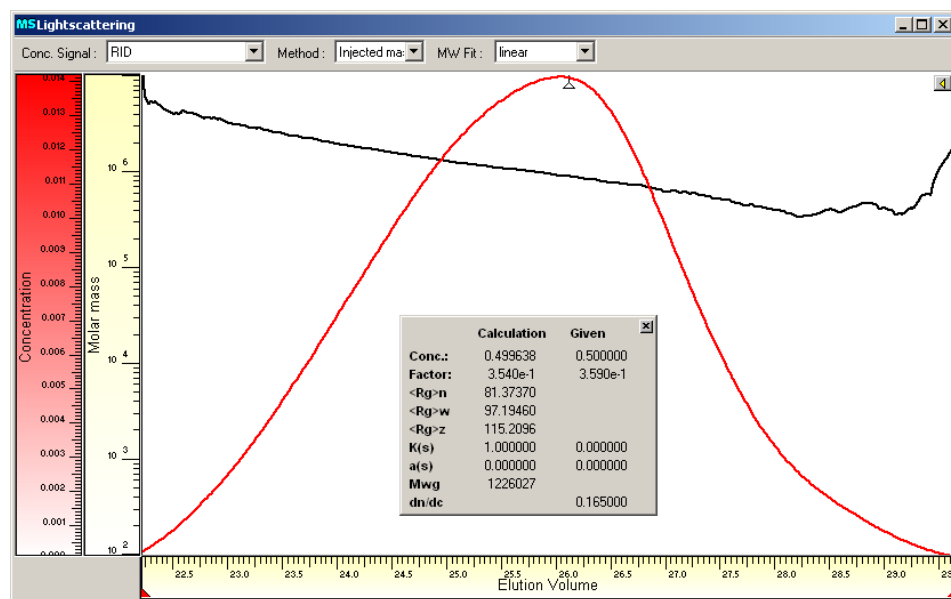


图 1. 透明质酸样品的曲线 (红色: RI-检测器曲线 (浓度), 黑色: 实测摩尔质量 (MALLS))

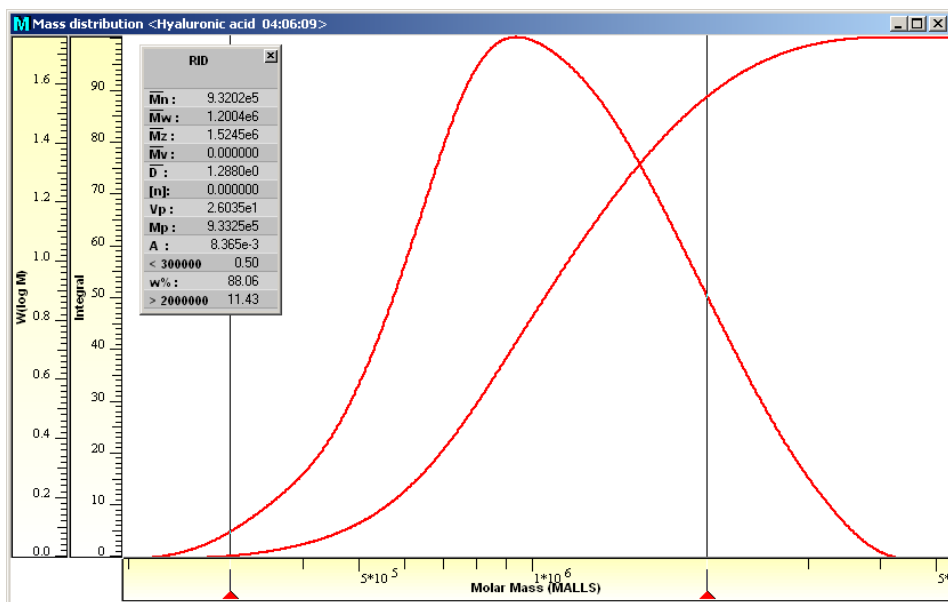


图 2. 透明质酸样品的摩尔质量分布与累积分布

表 2 显示了使用普鲁兰多糖标准品，通过常规校准（仅 RI，表观摩尔质量）和 GPC/SEC-MALLS 分析获得的透明质酸样品的摩尔质量平均值。通过光散射法测得的重均分子量 (Mw) 仅为通过传统普鲁兰多糖校准曲线获得的结果的 1/3。由于 GPC/SEC 根据溶液中的流体动力学尺寸进行分离，通过常规校准和 GPC/SEC-MALLS 分析获得的摩尔质量差异表明，在给定摩尔质量下，普鲁兰多糖链的流体动力学尺寸明显小于相同摩尔质量的 HA。

表 2. 通过 RI 检测与 MALLS 测得的分子量比较

	普鲁兰多糖校准*	MALLS
Mn [Da]	1224000	932000
Mw [Da]	3818000	1200000
Mp [Da]	1398000	933000

\* 最高分子量标准品：Mp = 2500000 Da

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

RA44973.5730439815

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2020, 2023  
2023 年 3 月 2 日, 中国出版  
5994-5701ZHCN

## 结论

使用 Agilent SUPREMA 色谱柱可以对透明质酸进行 GPC/SEC-MALLS 分析，该色谱柱具有优化的填料粒径和孔径，可提供稳定的分离和可靠的结果。基于普鲁兰多糖标准物质的常规校准和 RI 检测获得的 Mw 是实际值的三倍。使用 MALLS 等绝对检测可以测量真实平均分子量。

## 参考文献

- Gupta, R. C. *et al.* Veterinary Pharmacology and Toxicology, Volume 6, 2019
- Lavrenko, P. N.; Linow, K-J; Gornitz, E. *In* Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992, pp 517–531