

# 基于凝胶渗透色谱-激光光散射联用技术的聚天冬氨酸分子量测定方法的建立

刘蕊<sup>1</sup>, 马博凯<sup>1</sup>, 勾新磊<sup>1</sup>, 周明强<sup>1,2\*</sup>

(1. 北京市理化分析测试中心, 有机材料检测技术与质量评价北京市重点实验室, 北京 100089;  
2. 北京市科学技术研究院分析测试技术重点实验室, 北京 100089)

**摘要:** **目的** 建立利用凝胶渗透色谱-激光光散射联用技术(gel permeation chromatography-multi-angle light scattering, GPC-MALS)对聚天冬氨酸分子量及分子量分布进行测定的方法。**方法** 以市售聚天冬氨酸产品为样品, 研究凝胶色谱柱的类型和样品浓度对检测结果的影响, 利用 GPC-MALS 同时测定聚天冬氨酸的数均分子量、重均分子量和分子量分布等参数。**结果** 采用 Shodex Protein KW-803 凝胶色谱柱, 样品浓度为 18.5 mg/mL 时, 可以得到较好的实验结果, 聚天冬氨酸分子量和分子量分布测定的相对标准偏差分别为 1.8%和 0.7%。**结论** 该方法操作简单, 精密度良好, 适用于聚天冬氨酸分子量及分子量分布的测定。**关键词:** 聚天冬氨酸; 分子量及分子量分布; 凝胶渗透色谱-激光光散射联用技术

## Establishment of determination method for the molecular weight of polyaspartic acid by gel permeation chromatography-multi-angle light scattering

LIU Rui<sup>1</sup>, MA Bo-Kai<sup>1</sup>, GOU Xin-Lei<sup>1</sup>, ZHOU Ming-Qiang<sup>1,2\*</sup>

(1. Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing Key Laboratory of Organic Materials Testing Technology & Quality Evaluation, Beijing 100089, China; 2. Beijing Academy of Science and Technology Key Laboratory of Analysis and Testing Technology, Beijing 100089, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of molecular weight and molecular weight distribution of polyaspartic acid (PASP) by gel permeation chromatography-multi-angle light scattering (GPC-MALS). **Methods** Influences of the gel column type and concentration of sample on the detection results were studied taking commercially available polyaspartic acid products as samples. The number average molecular weight, weight average molecular weight and molecular weight distribution were simultaneously determined by GPC-MALS. **Results** The better results were obtained when the sample concentration was 18.5 mg/mL using the Shodex Protein KW-803 gel column. The relative standard deviations of molecular weight and molecular weight distribution were 1.8% and 0.7% respectively. **Conclusion** This method is simple and accurate, which can be used for the determination of the molecular weight and molecular weight distribution analysis of PASP.

**KEY WORDS:** polyaspartic acid; molecular weight and molecular weight distribution; gel permeation chromatography-multi-angle light scattering

\*通讯作者: 周明强, 助理研究员, 主要研究方向为药物材料分析。E-mail: 111-aaaddd@163.com

\*Corresponding author: ZHOU Ming-Qiang, Research Assistant, Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China. E-mail: 111-aaaddd@163.com

## 1 引言

聚天冬氨酸(polyaspartic acid, PASP)是一种天然存在于软体动物体内的氨基酸类聚合高分子物质。近些年,利用天然氨基酸单体人工合成的聚天冬氨酸水溶性高分子多肽具有无毒、无公害和生物降解性好等特性<sup>[1]</sup>,已成为一种世界公认的绿色高分子化学品,广泛应用于食品、医药卫生、农业及日用化工等众多领域<sup>[2]</sup>。其中在农业方面,由于一定分子量大小的聚天冬氨酸可以富集土壤中的氮、磷、钾及微量元素等,强化作物对多种元素的全面吸收,因此聚天冬氨酸可以作为一种新型肥料增效剂被广泛应用于我国农业生产领域,它能有效提高植物对肥料的利用率,提高农作物的产量和品质<sup>[3]</sup>。在医药方面,聚合物胶束聚乙二醇-聚天冬氨酸可用作包埋抗肿瘤药物-顺铂的药物载体,这种聚合物胶束作为药用载体可使难溶药物增溶,且具有靶向作用,能降低药物对正常组织和器官的毒副作用<sup>[4,5]</sup>。然而,聚天冬氨酸的分子量大小对于其增效作用的发挥具有关键作用。因此,对聚天冬氨酸的分子量及分子量分布的测定成为该产品研发和质量控制过程中的重要环节之一。

凝胶渗透色谱-激光光散射联用技术(gel permeation chromatography-multi-angle laser light scattering, GPC-MALS)是测定高分子物质分子量大小及分子量分布的一项先进技术<sup>[6]</sup>。利用凝胶渗透色谱-激光光散射联用技术,可同时测定物质的数均分子量(number average molecular weight,  $M_n$ )、重均分子量(weight average molecular weight,  $M_w$ )和分子量分布(the polydispersity index,  $M_w/M_n$ )等多项参数<sup>[7]</sup>。由于与色谱技术联用,尤其适用于混合样品各组分分析测定,并可实现自动化检测,具有操作简便,测定快速等优点。且不需要使用结构相似的标准物质进行标准曲线的校正。本实验室以市售的聚天冬氨酸产品为研究对象,建立了基于凝胶渗透色谱-激光光散射联用技术(gel permeation chromatography-multi-angle light scattering, GPC-MALS)的聚天冬氨酸分子量及分子量分布的测定方法,并给以改进和优化,现已将其应用于实际的检测工作中,为多家企业提供相应的检测服务,并取得了较好的实验结果。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

凝胶渗透色谱-激光光散射联用仪(配备 DAWN HELEOS-II 十八角度激光光散射检测器和 Optilab rex 示差检测器,美国 Wyatt 公司); 515 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司); XS205 天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); Milli-Q 纯水仪(美国 Millipore 公司); KQ-600DV 超声清洗机(中国昆

山市超声仪器有限公司)。

牛血清白蛋白(albumin bovine V, 纯度 95%, 北京索莱宝科技有限公司)。

样品:市售聚天冬氨酸产品。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 溶液配制

磷酸盐缓冲溶液:称取 1.22 g(精确至 0.001 g)二水合磷酸二氢钠和 4.37 g(精确至 0.001 g)十二水合磷酸氢二钠,用纯水溶解并定容至 1 L,用磷酸调节 pH 接近 7.0,用水相微孔滤膜过滤,超声脱气 15 min,备用。

#### 2.2.2 样品处理

准确称取 1.0 g 聚天冬氨酸样品(精确至 0.0001 g),用磷酸盐缓冲溶液溶解,超声 30 min,定容至 50 mL。准确移取样品溶液 10 mL 于 50 mL 容量瓶中,用磷酸盐缓冲溶液定容,混匀,过水相微孔滤膜,待测。

#### 2.2.3 色谱条件

凝胶渗透色谱-激光光散射联用仪:配备 DAWN HELEOS-II 十八角度激光光散射检测器和 Optilab rex 示差检测器;凝胶色谱柱:保护柱(Shodex Protein KW-G)和分析柱(Shodex Protein KW-803)联用;流动相:“2.2.1”中配制的磷酸盐缓冲溶液,  $pH \approx 7.0$ ;流速:0.5 mL/min;柱温:40 °C;进样量:200  $\mu$ L。

## 3 结果与讨论

### 3.1 色谱条件的优化

研究了 Shodex Protein KW 系列和 Shodex OHpak SB 系列 2 种不同类型的凝胶色谱柱对测定聚天冬氨酸分子量及分子量分布的洗脱和分离效果。结果表明,Shodex Protein KW-803 凝胶色谱柱对测定聚天冬氨酸分子量及分子量分布具有更好的洗脱和分离效果(图 1 和表 1)。

### 3.2 样品浓度对检测结果的影响

为了验证本方法的准确性,分别配制了 3 个不同浓度的样品进行测定。实验结果见表 2,由表 2 可知,不同浓度样品的测定结果具有较好的平行性,其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于 5%。高浓度样品的重均分子量( $M_w$ )测定结果的 RSD 最低为 1.9%,而低浓度样品分子量分布系数( $M_w/M_n$ )测定结果的 RSD 最低为 0.8%。这是由于高浓度样品的进样量较高,信噪比较高,分子量测定结果的重复性较低、中浓度样品更差;另一方面由于低浓度样品的进样量较低,在色谱柱上能够得到完全的洗脱和分离。因此,样品的浓度对测定聚天冬氨酸分子量及其分子量分布有重要影响,选择适当的样品浓度进行测定能够得到更佳的实验结果。

### 3.3 方法的精密度

结合上述实验结果, 取中浓度样品溶液(18.5 mg/mL), 并采用优化后的色谱条件, 连续进样 6 针, 对聚天冬氨酸的分子量及分子量分布测定的精密度进行测定。表 3 是聚天冬氨酸的分子量及分子量分布的精密度检测结果, 由表 3 可以看出, 样品分子量和分子量分布测定的 RSD 分别为 1.8% 和 0.7%, 表明本方法具有良好的精密度。

### 4 结 论

本研究以市售聚天冬氨酸样品为研究对象, 建立了基于凝胶渗透色谱-激光光散射联用技术测定聚天冬氨酸分子量及其分子量分布的方法。与色谱技术的联用使其适用于混合样品中各组分的分析测定, 具有简便、快速、精密度好等诸多优点。该方法适用于聚天冬氨酸及其产品增效尿素的分子量及分子量分布的测定。

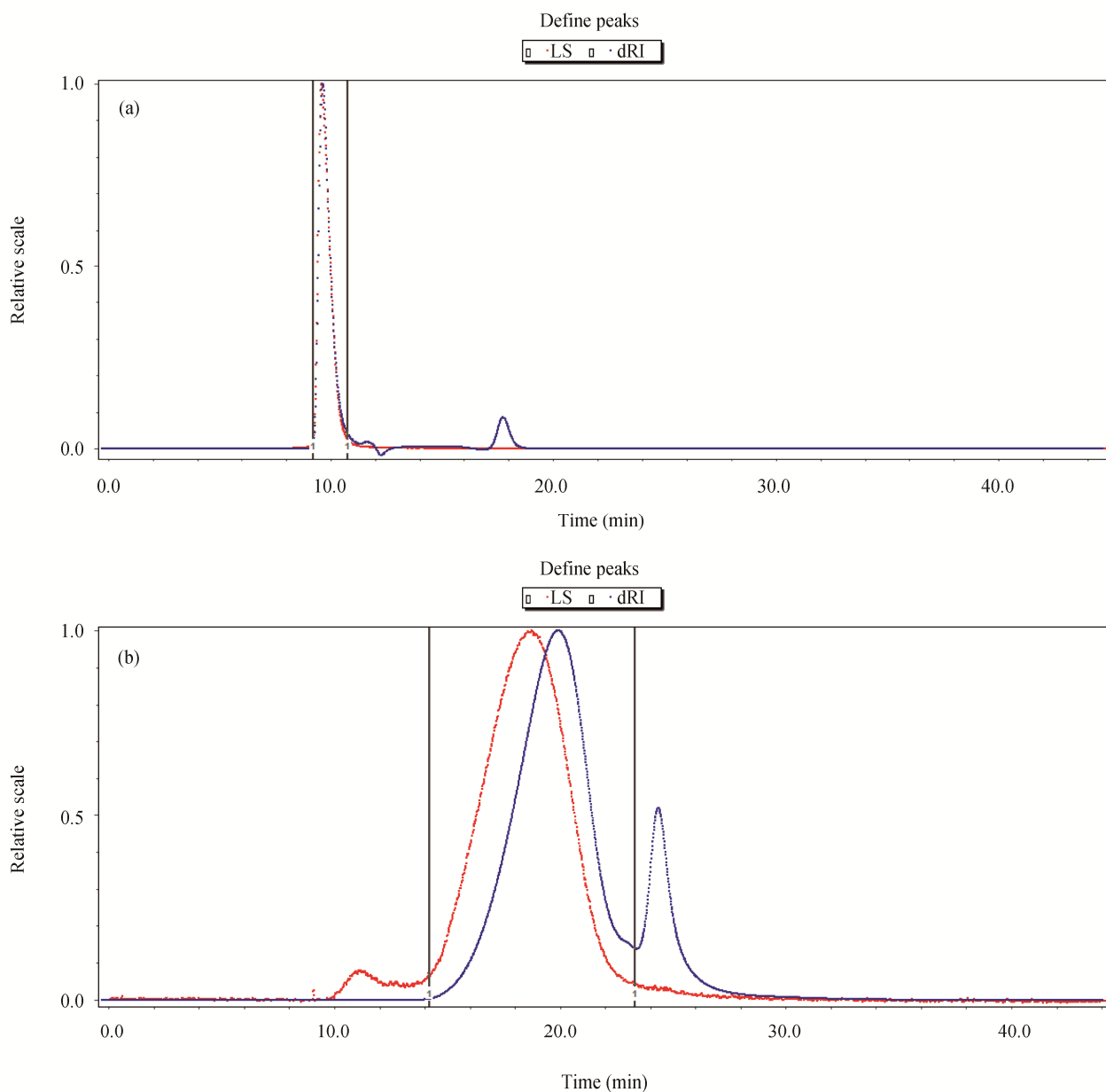


图 1 不同类型凝胶色谱柱对聚天冬氨酸分子量及分子量分布测定的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of determination of molecular weight and molecular weight distribution of polyaspartic acid using different types of gel chromatographic columns

(a): Shodex OHpak SB-802; (b): Shodex Protein KW-803

表 1 不同类型色谱柱对聚天冬氨酸分子量及分子量分布的测定结果

Table 1 Determination results of molecular weight and molecular weight distribution of polyaspartic acid using different types of gel chromatographic columns

| 色谱柱                   | 出峰时间(min)     | 重均分子量(Mw, g/mol)    | 数均分子量(Mn, g/mol)    | 分子量分布系数(Mw/Mn) |
|-----------------------|---------------|---------------------|---------------------|----------------|
| Shodex OHpak SB-802   | 9.215~10.759  | $4.860 \times 10^3$ | $4.809 \times 10^3$ | 1.011          |
| Shodex Protein KW-803 | 14.218~23.317 | $5.680 \times 10^3$ | $3.747 \times 10^3$ | 1.516          |

表 2 不同浓度聚天冬氨酸的重均分子量及分子量分布测定结果( $n=3$ )Table 2 Determination results of molecular weight and molecular weight distribution of different concentrations of PASP ( $n=3$ )

| 样品检测浓度(mg/mL) | 重均分子量(Mw, g/mol) | RSD(%)              | 分子量分布系数(Mw/ Mn) | RSD(%) |     |
|---------------|------------------|---------------------|-----------------|--------|-----|
| 低浓度样品         | 10.3             | $5.934 \times 10^3$ | 2.3             | 1.423  | 0.8 |
|               |                  | $5.962 \times 10^3$ |                 | 1.441  |     |
|               |                  | $6.192 \times 10^3$ |                 | 1.444  |     |
| 中浓度样品         | 18.5             | $5.913 \times 10^3$ | 2.1             | 1.506  | 0.9 |
|               |                  | $5.863 \times 10^3$ |                 | 1.489  |     |
|               |                  | $5.680 \times 10^3$ |                 | 1.516  |     |
| 高浓度样品         | 42.6             | $5.786 \times 10^3$ | 1.9             | 1.235  | 1.0 |
|               |                  | $5.651 \times 10^3$ |                 | 1.211  |     |
|               |                  | $5.869 \times 10^3$ |                 | 1.221  |     |

表 3 聚天冬氨酸的分子量及分子量分布的精密度测定结果

Table 3 Precision results of molecular weight and molecular weight distribution of PASP

|                  | 1                   | 2                   | 3                   | 4                   | 5                   | 6                   | 平均值                 | RSD(%) |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------|
| 重均分子量(Mw, g/mol) | $5.913 \times 10^3$ | $5.867 \times 10^3$ | $5.863 \times 10^3$ | $5.680 \times 10^3$ | $5.721 \times 10^3$ | $5.937 \times 10^3$ | $5.830 \times 10^3$ | 1.8    |
| 分子量分布(Mw/Mn)     | 1.506               | 1.515               | 1.489               | 1.516               | 1.511               | 1.499               | 1.506               | 0.7    |

## 参考文献

- [1] 肖凤龙, 卫民, 赵剑. 聚天冬氨酸合成与应用研究进展[J]. 生物质化学工程, 2014, 48(6): 50-55.  
Xiao FL, Wei M, Zhao J. Progress in synthesis and application of poly-aspartate [J]. Biomas Chem Eng, 2014, 48(6): 50-55.
- [2] 余定华, 曹辉, 黄和. 聚天冬氨酸功能高分子材料研究进展[J]. 生物加工过程, 2013, 11(2), 65-72.  
Yu DH, Cao H, Huang H. Research progress of functional polymer materials of poly-aspartate [J]. Biomas Chem Eng, 2013, 11(2), 65-72.
- [3] 刘红卫. 聚天冬氨酸和多肽肥料应用展望[J]. 黑龙江农业科学, 2010, (7): 162-164.  
Liu HW. Application prospect of poly aspartate and peptide fertilizer [J]. Heilongjiang Agric Sci, 2010, (7): 162-164.
- [4] Nishiyama N, Kataoka K. Preparation and characterization of size-controlled polymeric micella containing cis-dichlorodiammineplatinum(II) in the core [J]. J Control Release, 2001, 74: 83-94.
- [5] Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, *et al.* Inhibition of cisplatin into polymeric micelle [J]. J Control Release, 1996, 39: 351-356.
- [6] 王喜云, 王远亮, 吴扬兰, 等. 凝胶渗透色谱-十八角激光光散射仪(GPC-MALLS)的应用: 浓度、流量、温度对高分子量分子量及其分布的影响[J]. 光散射学报, 2007, 19(1): 19-54.

Wang XY, Wang YL, Wu YL, *et al.* Use of gel permeation chromatography/eighteen-angle laser scattering (GPC/MALLS): The effect of concentration, flow speed, temperature for macromolecules weight and distribution [J]. *J Light Scatter*, 2007, 19(1): 19-54.

- [7] 赵明媛, 徐学林, 任玲玲, 等. 凝胶渗透色谱-激光光散射法测量葡聚糖重均分子量的影响条件[J]. *计量学报*, 2010, 31.

Zhao MY, Xu XL, Ren LL, *et al.* The effects of concentration and flow rate on dextran molecular weight by gel permeation chromatography-laser light scattering method [J]. *Acta Metrolog Sin*, 2010, 31.

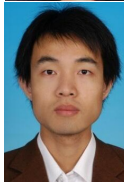
(责任编辑: 刘 丹)

## 作者简介



刘蕊, 助理研究员, 主要研究方向为高分子材料的分子量及其性能检测研究与应用。

E-mail: liurui\_mail@163.com



周明强, 助理研究员, 主要研究方向为药物材料分析。

E-mail: 111-aaaddd@163.com