

# 低分子量羟丙甲纤维素的分子量及其分布的测定

刘广楨<sup>1</sup>, 沈永<sup>2</sup>, 彭健<sup>2</sup>, 杨蕙如<sup>1</sup>, 凌霄<sup>1\*</sup>, 孙会敏<sup>3\*</sup>, 赵寅恒<sup>4</sup>(1.山东省食品药品检验研究院, 济南 250101; 2.山东省医疗器械产品质量检验中心, 济南 250101; 3.中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 4.美国怀雅特技术公司, 北京 100082)

**摘要:** 目的 测定低分子量羟丙甲纤维素的分子量及其分布。方法 利用高效体积排阻色谱-示差折光检测器-多角激光光散射检测器(HPSEC-RID-MALLS)技术, 以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 硝酸钠-甲醇(95:5)为流动相, 采用 Shodex OHpak SB-804 HQ (8.0 mm×300 mm)凝胶柱进行检测。结果 低分子量羟丙甲纤维素的平均分子量测定误差≤2%, 数均分子量和分子量分布误差均≤5%, 结果准确可靠。结论 利用 HPSEC-RID-MALLS 技术可测定低分子量羟丙甲纤维素的分子量及其分布。**关键词:** 低分子量羟丙甲纤维素; 高效凝胶色谱法; 多角度激光光散射; 分子量; 分子量分布

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)05-0569-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.05.010

引用本文: 刘广楨, 沈永, 彭健, 等. 低分子量羟丙甲纤维素的分子量及其分布的测定[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(5): 569-571.

## Determination of the Molecular Weight and Its Distribution of Low Molecular Weight Hypromellose

LIU Guangzhen<sup>1</sup>, SHEN Yong<sup>2</sup>, PENG Jian<sup>2</sup>, YANG Huiru<sup>1</sup>, LING Xiao<sup>1\*</sup>, SUN Huimin<sup>3\*</sup>, ZHAO Yin heng<sup>4</sup>  
(1. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China; 2. Shandong Quality Inspection Center for Medical Device, Jinan 250101, China; 3. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 4. America Wyatt Co., Ltd., Beijing 100082, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To determine the molecular weight and its distribution of low molecular weight hypromellose. **METHODS** High performance size exclusion chromatography in conjunction with refractive index detector and eighteen-angle laser light scatter detector(HPSEC-RID-MALLS), was performed on the Shodex OHpak SB-804HQ(8.0 mm×300 mm) column, using 0.1 mol·L<sup>-1</sup> sodium nitrate-methanol(95:5) as mobile phase. **RESULTS** The error of the weight-average molecular weight of low molecular weight hypromellose was ≤2%, and the error of number-average molecular weight and molecular weight distribution of low molecular weight hypromellose were ≤5%. The results were accurate and reliable. **CONCLUSION** It can be used to determine the molecular weight and its distribution of low molecular weight hypromellose by HPSEC-RID-MALLS.

**KEYWORDS:** low molecular weight hypromellose; HPSEC; MALLS; molecular weight; molecular weight distribution

羟丙甲纤维素作为药用辅料, 主要用于包衣材料膜材、控速材料、稳定剂、助悬剂、黏合剂和增黏剂等; 根据分子量级别不同用途不同, 低分子量级别(分子量<100 000)的羟丙甲纤维素用于片剂包衣材料, 高分子量级别(分子量>100 000)的可作为片剂骨架的阻滞剂, 有延缓药物释放的作用<sup>[1-6]</sup>。羟丙甲纤维素为高分子聚合物, 功能性与其分子量高低及分子量分布密切相关。高分子聚合物分子量常用重均分子量( $M_w$ )、数均分子量( $M_n$ )和黏均分子量( $M_\eta$ )等表示, 分子量分布常用重均分子量和数均分子量的比值( $M_w/M_n$ )表示。重均分子量的测定方法有光散射法和质谱法等, 数均分子量的测定方法有凝胶色谱法、端基滴定法和

渗透压法等, 黏均分子量的测定方法有黏度法。目前, 羟丙甲纤维素常采用黏度法对分子量进行控制, 但黏度法无法对分子量分布进行控制。而高效体积排阻色谱-示差折光检测器-多角激光光散射检测器(HPSEC-RID-MALLS)技术结合了凝胶色谱法和光散射法的优点, 可同时对重均分子量( $M_w$ )、数均分子量( $M_n$ )和分子量分布( $M_w/M_n$ )进行测定。因此, 本研究参考有关文献<sup>[7-10]</sup>, 采用 HPSEC-RID-MALLS 测定低分子量羟丙甲纤维素的分子量及其分布。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱系统, 含 G1311A 型四元泵、G1322A 型脱气机、G1329A 型自动进

基金项目: “重大新药创制”国家科技重大专项(2017ZX09101001)

作者简介: 刘广楨, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0531)81216550 E-mail: lgzsfda@163.com \*通信作者: 凌霄, 女, 博士, 主任药师 Tel: (0531)81216550 E-mail: xiaol6551@126.com 孙会敏, 男, 博士, 主任药师 Tel: (010)67095721 E-mail: sunhm@126.com

样器、G1316A 型柱温箱和 G1362A 型示差折光检测器(美国 Agilent 公司); DAWN HELEOS-II 型 18 角度激光光散射检测器和 Astra 6.1.2 软件(美国 Wyatt 公司); CP225D 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

牛血清白蛋白(Sigma, 批号: WXBC4274V); 氯化钠为基准试剂; 甲醇、异丙醇和甲苯为色谱纯试剂; 硝酸钠为分析纯试剂。

羟丙甲纤维素为市售样品(聊城阿华制药股份有限公司, 批号: 20170801; 湖州展望药业有限公司, 批号: 20170903; 亚仕兰集团公司, 批号: 0001171055; 陶氏化学有限公司, 批号: 2F12012N31; 信越化学工业株式会社, 批号: 6056262)。

## 2 方法与结果

### 2.1 测定原理

根据中国药典 2015 年版四部分分子排阻色谱法中分子量与分子量分布的计算公式,  $M_n = \sum RI_i / \sum (RI_i/M_i)$ ,  $M_w = \sum (RI_i M_i) / \sum RI_i$ ,  $D = M_w/M_n$ ,  $M_n$  为数均分子量;  $M_w$  为重均分子量;  $D$  为分布系数;  $RI_i$  为供试品在保留时间  $i$  时的峰高;  $M_i$  为供试品在保留时间  $i$  时的分子量; 对分子量与分子量分布 ( $M_n$ 、 $M_w$  和  $D$ ) 的测定需要采用系列分子量标准物质和适宜的 GPC 软件。但到目前为止尚未查询到有羟丙甲纤维素系列分子量标准物质销售, 因此本研究采用 HPSEC-RID-MALLS, 不需要羟丙甲纤维素系列分子量标准物质, 借助 Astra 软件, 即可实现分子量与分子量分布 ( $M_n$ 、 $M_w$  和  $D$ ) 的测定。

### 2.2 测定方法

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱: Shodex OHpak SB-804 HQ(8.0 mm×300 mm)凝胶柱; 流动相: 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 硝酸钠-甲醇(95:5); 流速: 0.5 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 35 °C; 进样量: 100 μL; 检测器: 示差折光检测器与 18 角度激光光散射检测器联用; 检测器温度: 35 °C; 检测波长: 690 nm(DAWM HELEOS-II 激光光散射检测器)。

**2.2.2 相关参数的确定** 采用 HPSEC-RID-MALLS, 借助 Astra 软件, 对分子量与分子量分布 ( $M_n$ 、 $M_w$  和  $D$ ) 测定, 需要查询羟丙甲纤维素的  $dn/dc$  值, 对示差折光常数、激光常数和延迟体积进行测定, 并对多角激光检测器各检测角度进行归一化处理, 以保证检测结果准确可靠。

$dn/dc$  值: 采用 0.163 mL·g<sup>-1</sup>(美国 American Polymer Standards Corporation 提供资料)。

示差折光常数的测定: 取基准氯化钠适量,

精密称定, 加水溶解并稀释制成 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 mg·mL<sup>-1</sup> 浓度的氯化钠标准溶液。用纯化水冲洗示差检测器的参比池与检测池, 至基线稳定, 依次将纯化水、氯化钠标准溶液(浓度从小到大)、纯化水注入示差检测器中, 进行数据采集。用 Astra 6.1.2 数据处理软件处理所采集的实验数据, 根据氯化钠水溶液的  $dn/dc$  值(0.174), 计算示差折光常数为  $5.1824 \times 10^{-4}$ 。

激光常数的测定: 用纯化水、异丙醇、甲苯来冲洗激光检测器整个通道至激光信号稳定, 将甲苯注入激光光散射检测器中, 进行数据采集。用 Astra 6.1.2 数据处理软件处理所采集的数据, 计算激光常数为  $3.1223 \times 10^{-5}$ 。

延迟体积的测定: 取牛血清白蛋白, 加流动相溶解并稀释制成 10 g·L<sup>-1</sup> 的溶液, 进样测定, 计算 MALLS 和 RI 之间的延迟体积为 0.2 mL。

归一化处理: 取牛血清白蛋白, 加流动相溶解并稀释制成 10 g·L<sup>-1</sup> 的溶液, 进样测定, 对各检测角度进行归一化处理。

**2.2.3 样品测定** 精密称取本品 25 mg, 置 250 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为样品溶液。精密量取样品溶液 100 μL, 注入 HPSEC-RID-MALLS 色谱系统, 进行数据采集。用 Astra 6.1.2 数据处理软件采集并处理实验数据, 直接得到样品的重均分子量、数均分子量和分子量分布。

### 2.3 测定结果

对市售的 5 个不同厂家 3 种取代型的低分子量羟丙甲纤维素进行测定, 样品的分子量及其分布图见图 1, 样品的重均分子量、数均分子量和分子量分布测定结果见表 1。结果表明低分子量羟丙甲纤维素的重均分子量测定误差 ≤ 2%, 数均分子量和分子量分布误差均 ≤ 5%, 结果准确可靠。

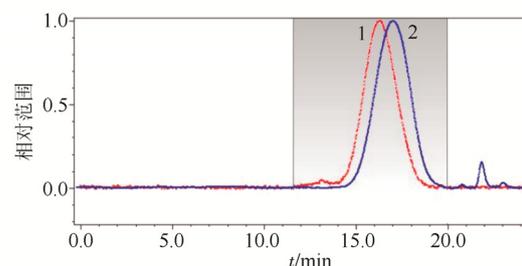


图 1 HPSEC-RID-MALLS 色谱图

1-光散射图谱; 2-示差图谱。

Fig. 1 HPSEC-RID-MALLS chromatograms  
1-MALLS; 2-RID.

表1 分子量及其分布测定结果

Tab. 1 Determination results of molecular weight and its distribution

No.	批号	型号	Mw	Mn	Mw/Mn
1	20170801	2910	23 760(±2.0%)	11 280(±4.2%)	2.106(±4.7%)
2	20170903	2910	17 230(±0.9%)	10 080(±2.5%)	1.709(±2.6%)
3	0001171055	2910	61 230(±0.5%)	31 550(±3.2%)	1.941(±3.2%)
4	2F12012N31	2208	94 980(±1.2%)	40 360(±4.6%)	2.354(±4.7%)
5	6056262	2906	65 750(±0.6%)	35 830(±2.9%)	1.835(±2.9%)

### 3 讨论

#### 3.1 方法的选择

凝胶渗透色谱法(GPC), 也称体积排阻色谱(SEC), 是根据大分子溶液流过凝胶柱时按分子大小顺序流出, 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, 它可以同时给出重均分子量、数均分子量及分子量分布, 该方法属于间接测定方法, 需使用不同分子量标准品绘制标准曲线, 如用不同的对照品将有不同的结论, 因此该法所给出的是分子量的相对值。激光光散射法是测定高分子物质重均分子量的直接方法, 是目前世界公认的最高效且最接近真实分子量的绝对方法。当激光光散射仪与凝胶渗透色谱联用时, 凝胶渗透色谱法实现不同分子量高聚物分子的分离, 分子按大小顺序依次进入激光光散射仪确定分子量, 绘制出分子量分布图, 能快速准确地测定物质的重均分子量、数均分子量及分子量分布。

#### 3.2 色谱柱的选择

由于所测试的低分子量羟丙甲纤维素的分子量范围在 10 000~100 000, 可以溶解于水中, 因此应在此范围内选择适宜的水性凝胶色谱柱。曾试用过几个不同厂家的常用水性凝胶色谱柱, 发现部分厂家的水性凝胶色谱柱存在不同程度的柱流失现象; 由于常规的凝胶渗透色谱法采用示差折光检测器, 不受影响; 而激光光散射检测器与凝胶渗透色谱联用技术中增加了激光光散射检测器, 对柱流失现象比较敏感, 造成基线噪音增大, 干扰正常的检测操作。经试验最终确定 Shodex OHpak SB-804HQ(8.0 mm×300 mm)凝胶柱适用于低分子量羟丙甲纤维素的分子量及其分布的检测。

#### 3.3 流动相的选择

由于所测试的低分子量羟丙甲纤维素可以溶解于水中, 因此在常用的水相流动相(氯化钠溶液、

硫酸钠溶液和硝酸钠溶液)中进行选择, 试验发现硝酸钠溶液体系, 基线噪音较低, 信噪比较好。实验中常在流动相中添加一定量的叠氮化钠, 起到抑制微生物污染的作用; 对其进行改良采用甲醇替代叠氮化钠, 不但起到抑制流动相中微生物污染的作用, 还在一定程度上改善了色谱峰的峰形。经试验最终确定采用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 硝酸钠-甲醇(95:5)为流动相, 适用于低分子量羟丙甲纤维素的分子量及其分布的检测。

最终, 在所选定的色谱条件下, 测试结果表明低分子量羟丙甲纤维素的平均分子量测定误差 ≤2%, 数均分子量和分子量分布误差均 ≤5%, 实验获得了满意的结果, 说明该方法可作为测定低分子量羟丙甲纤维素的分子量及其分布的方法。

### REFERENCES

- [1] 中国药典. 四部[S]. 2015: 566-567.
- [2] 药用辅料手册. 原著第四册[S]. 2005: 343.
- [3] 罗明生, 高天惠, 宋民宪. 中国药用辅料[M]. 北京: 化学工业出版社. 2006: 712.
- [4] LI S Z, HUANG Z Y, REN X W, et al. Studies on the slow release characteristic parameters based on the interaction between drugs and HPMC [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(9): 1059-1064.
- [5] WANG M, WU W C, ZHANG D S. Effect of HPMC on release characteristics of cefaclor sustained-release tablets *in vitro* [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2015, 35(10): 127-130.
- [6] XU B Y, PAN Y F, PING L. Study on preparation of fluvastatin sodium extended-release tablet and its pharmacokinetics in beagle dogs [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(4): 421-425.
- [7] ZHANG W D, HU C M, ZHENG L X, et al. Determination of relative molecular mass and molecular mass distribution of pullulan by means of SEC-MALLS [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35(7): 1213-1217.
- [8] SONG Y H, DU Z H, YU P, et al. Determination of weight average molecular weight and molecular weight distribution of hydroxyethyl starch 130/0.4 by SEC-MALLS [J]. Qilu Pharm Affa(齐鲁药事), 2012, 31(3): 155-157.
- [9] HU C M, LU M, SHAO H, et al. Uncertainty analysis in determination of relative molecular weight of polysaccharide by size exclusion chromatography(SEC) coupled with multi-angle laser light scattering [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2015, 46(5): 514-518.
- [10] LIU Y, WANG W X, JIANG H. Isolation and molecular weight determination of *Poria Cocos*(Schw.) Wolf [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(11): 1402-1405.

收稿日期: 2019-04-17

(本文责编: 李艳芳)