

玻璃酸钠 dn/dc 值测定方法研究

张丽容^{1,2}, 宋玉娟², 李京², 范慧红², 王悦^{2*}, 刘博^{2*} (1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264003; 2. 中国食品药品检定研究院, 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

摘要:目的 建立玻璃酸钠(sodium hyaluronate, SH)折光指数增量(dn/dc 值)的通用测定方法,为实现SH相对分子质量与相对分子质量分布的准确测定奠定基础。方法 采用不同仪器、流动相和样品对SH的 dn/dc 值进行研究。结果 SH在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸钠溶液中更稳定, dn/dc 值的相对标准偏差(RSD)均小于 1.0% ($n=3$),建立了 dn/dc 值的准确测定方法。结论 新建测定方法简便、快速、准确,解决了SH的 dn/dc 值测定困难的问题,也为其他高分子物质相对分子质量与相对分子质量分布的精准测定提供了新的方法。

关键词:玻璃酸钠;相对分子质量;分子排阻色谱-多角度激光光散射联用法;折光指数增量;Calypso II 梯度混合仪

doi:10.11669/cpj.2025.04.010 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)04-0407-05

Determination Method of the dn/dc of Sodium Hyaluronate

ZHANG Lirong^{1,2}, SONG Yujuan², LI Jing², FAN Huihong², WANG Yue^{2*}, LIU Bo^{2*} (1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264003, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a universal method for determining the refractive index increment(dn/dc)of sodium hyaluronate (SH), laying the foundation for achieving accurate determination of SH molecular weight and molecular weight distribution. **METHODS** Various instruments, mobile phases, and samples were used to study the dn/dc of SH. **RESULTS** SH was more stable in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium nitrate solution, and the relative standard deviation(RSD)of dn/dc was less than 1.0% ($n=3$). **CONCLUSION** The newly established determination method is simple, fast, and accurate, solving the problem of difficult determination of SH dn/dc both domestically and internationally for many years. It also provides new methods and ideas for determining the dn/dc of other polymer substances.

KEY WORDS: sodium hyaluronate; molecular mass; size exclusion chromatography-multi angle laser light scattering (SEC-MALLS); refractive index increment(dn/dc); Calypso II composition-gradient system

玻璃酸钠(sodium hyaluronate, SH),也称为玻尿酸钠或透明质酸钠,系从鸡冠或微生物发酵液中提取的酸性黏多糖,由D-葡萄糖醛酸和N-乙酰-D-氨基葡萄糖双糖单位构成的糖胺聚糖钠盐^[1]。因具有黏弹性高、生物相容性强及无毒副作用等优点^[2],被广泛用于眼科、关节疾病、软组织修复、药物递送系统与组织工程支架等临床医药领域,近年来,在靶向治疗方面的应用也越来越多^[3-15]。

不同相对分子质量SH的生物活性存在较大差异,甚至与同一受体结合会表现出完全相反的生物效应^[16-19]。在医药领域,为保证SH的安全性,欧洲药典11.0(EP11.0)^[20]、日本药局方18版(JP18)^[21]及我国的国家药品标准WS1-(x072)2011Z^[1]均收录了不同用途SH相对分子质量与相对分子质量分布检查项,方法主要为黏度法和体

积排阻色谱法(size exclusion chromatography, SEC),但上述方法都存在一定的局限。黏度法专属性差,不能给出相对分子质量分布信息;SEC法没有对照品,不同品牌市售对照品会导致测定误差较大^[22-23]。

分子排阻色谱-多角度激光光散射联用法(SEC-MALLS)不需要对照品,能同时获得相对分子质量与相对分子质量分布、分子尺寸、构造形态、高分子支化度等信息^[24-25],是一种能够全面掌握SH关键质量属性的方法。该方法的关键是准确测定折光指数增量(dn/dc 值)后计算高分子摩尔质量^[26]。而SH的 dn/dc 值测定操作烦琐,不易找到平台峰,重现性差,导致目前国内外相对分子质量标准一直无法统一和提高。

本研究通过优化获得了可准确测定国内外多种

基金项目:国家药典会标准提高课题资助(65号)

作者简介:张丽容,女,硕士研究生 研究方向:药物分析与质量控制;宋玉娟,女,硕士,副主任药师 研究方向:多糖类药物质量控制。张丽容和宋玉娟为共同第一作者 * **通讯作者:**王悦,女,硕士,副主任药师 研究方向:多糖类药物质量控制 Tel: (010)53851530; 刘博,男,博士,副研究员 研究方向:生化药物分析 Tel: (010)53851264

不同相对分子质量范围的 SH dn/dc 值的溶液体系;并通过比较 SH 在不同流动相、方法和仪器的结果差异,建立了采用梯度混合仪自动化测定 dn/dc 值的方法,能快速、准确地测定其相对分子质量与相对分子质量分布,为标准提高奠定基础,为国内外产品的安全有效性提供数据支持。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(LC-20AD 泵, DGU-20A3 脱气装置, SIL-20AC 自动进样器, 日本岛津公司); Calypso II 梯度混合仪、多角度激光光散射仪(DAWN HELLOS II)、DNDC 仪(Optilab T-rEX)(美国怀雅特公司);Mittler XPE205 电子天平(美国梅特勒集团); CALYPSO 2.4.1.6 和 ASTRA 8.1.0.14 采集及处理软件。

1.2 试药、试剂

国内外不同相对分子质量范围的 SH 样品 10 个,见表 1(A1, B2 ~ B6, C7 ~ C8, D9 ~ D10); 硝酸钠、硫酸钠、氯化钠为分析纯; 屈臣氏纯净水; Proclin 300(色谱纯); 归一化样品右旋糖酐(SIGMA 公司)。

表 1 10 种不同相对分子质量范围的玻璃酸钠(SH)样品
Tab.1 Ten sodium hyaluronate (SH) samples with different relative molecular mass ranges

Sample number	Relative molecular mass/ $\times 10^3$
A1	1 000
B2	400
B3	1 000
B4	1 000
B5	1 600
B6	2 000
C7	1 100
C8	1 400
D9	1 800
D10	1 800

2 方法

2.1 流动相的选择-Zimm 图法测定第二维里系数(A_2)

流动相: 0.2 mol · L⁻¹ 氯化钠溶液(称取氯化钠 11.9 g, 加屈臣氏水溶解至 1 000 mL, 双层 0.22 μm 滤膜过滤, 再加 0.2 mL Proclin 300, 超声 10 min, 即得)、0.1 mol · L⁻¹ 硫酸钠溶液(另取硫酸钠 14.2 g, 同 0.2 mol · L⁻¹ 氯化钠溶液方法制备)、0.1 mol · L⁻¹ 硝酸钠溶液(另取硝酸钠 8.5 g, 同 0.2 mol · L⁻¹ 氯化钠溶液方法制备)。

供试品溶液制备: 精密称取 A1 样品约 25 mg(按干燥品计), 置 50 mL 量瓶中, 分别加上述 3 种流动相 5 mL, 手动振荡使样品漂浮, 再次加约 40 mL 流动相静置过夜, 使样品充分溶胀, 定容至刻度, 混匀。用移液枪分别取该溶液 0、1、2、3、4、5、6 mL, 流动相 6、5、4、3、2、1、0 mL, 配成 7 个浓度梯度, 依次注入已用归一化对照品校正的 DAWN HELLOS II, 连接 Optilab T-rEX 作为浓度源, 平行进样 2 次, 通过 ASTRA 软件计算其结果。

2.2 不同方法及仪器测 dn/dc 值

2.2.1 称重法 供试品溶液制备 精密称取 SH(按干燥品计)各 20 mg, 置 50 mL 量瓶中, 分别加 0.1 mol · L⁻¹ 硫酸钠溶液、0.1 mol · L⁻¹ 硝酸钠溶液 5 mL, 手动振荡使样品漂浮, 再次加约 40 mL 流动相静置过夜, 使样品充分溶胀, 定容至刻度, 混匀。分别称取该溶液 0、1、2、3、4、5、6 mL, 流动相 6、5、4、3、2、1、0 mL, 配成 7 个浓度梯度, 依次注入 Optilab T-rEX, 通过 ASTRA 软件计算其结果。

2.2.2 Calypso II 梯度混合法 供试品溶液制备同“2.2.1”项, 流动相为 0.1 mol · L⁻¹ 硝酸钠溶液。

色谱条件及采集方法: pump 1 接供试品溶液, pump 3 接流动相, 分 6 个线性梯度, 进样体积为 2 mL, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 延迟时间 60 s, Optilab T-rEX 检测温度为 35 °C, 平行测定 3 次; 同时用 CALYPSO 和 ASTRA 软件进行数据的采集与处理, 其中 CALYPSO 软件直接用 Optilab T-rEX 作为浓度源进行计算, ASTRA 软件采用理论浓度代入进行计算得到 dn/dc 值。

3 结果与讨论

3.1 溶剂的选择

为评估 SH 在不同流动相中的溶解状态, 本研究引入了第二维里系数(A_2)对 SH 在溶液中的状态进行表征。 A_2 表征了高分子“链段”与溶剂分子之间的相互作用, 是检验溶剂良性程度的指标, A_2 越大, “链段”与溶剂分子间的扩张作用越强, “链段”越舒展, 证明当前溶剂为更良溶剂^[27]。本研究采用 Zimm 图法测定了 0.5 mg · mL⁻¹ 的 SH 在 0.2 mol · L⁻¹ 氯化钠溶液、0.1 mol · L⁻¹ 硫酸钠溶液和 0.1 mol · L⁻¹ 硝酸钠溶液中的 A_2 , 结果见表 2 和图 1。所测 SH 在 0.1 mol · L⁻¹ 硝酸钠溶液中的 A_2 最大, 可见 0.1 mol · L⁻¹ 硝酸钠溶液为更适合 SH 的良溶剂。

国内外法定标准中均使用 0.2 mol · L⁻¹ 氯化钠

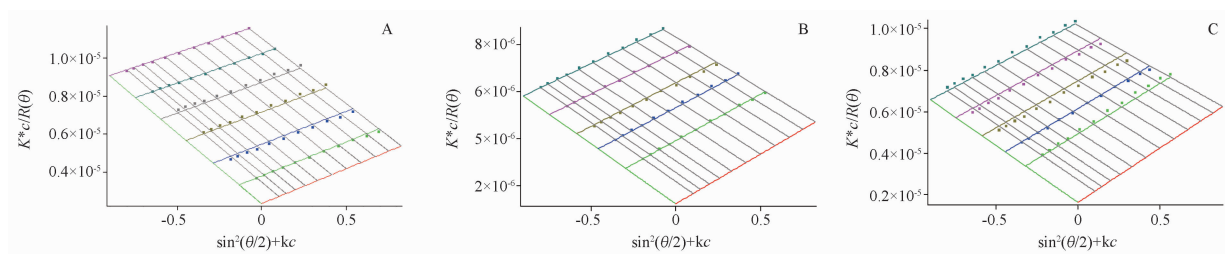
表2 不同溶剂下SH的第二维里系数(A_2)

Tab. 2 Second virial coefficient(A_2) of SH in different solvents

Solvent	$A_2/\text{mol} \cdot \text{mL} \cdot \text{g}^{-2}$
0.2 mol · L ⁻¹ NaCl	4.431 × 10 ⁻³ (±1.227%)
	4.251 × 10 ⁻³ (±3.097%)
0.1 mol · L ⁻¹ Na ₂ SO ₄	4.362 × 10 ⁻³ (±3.522%)
	4.255 × 10 ⁻³ (±2.316%)
0.1 mol · L ⁻¹ NaNO ₃	6.047 × 10 ⁻³ (±1.420%)
	5.838 × 10 ⁻³ (±1.854%)

溶液做溶剂。研究团队之前已经采用“2.2.1”项下的方法测定了SH在0.2 mol · L⁻¹氯化钠溶液中的

dn/dc 值,实验发现进口企业不同批次间结果一致,企业之间甚至同一国产企业不同批次间差异较大^[22]。为证明0.1 mol · L⁻¹硝酸钠溶液为SH的更良溶剂,采取称重法测定SH样品分别在0.1 mol · L⁻¹硫酸钠溶液、0.1 mol · L⁻¹硝酸钠溶液中的 dn/dc 值,结果见表3。结果发现,10种样品测得结果差异大小与表2中各溶剂的 A_2 大小相互验证,说明溶剂的良性程度与SH在溶液中 dn/dc 值的稳定性程度一致,所以选择0.1 mol · L⁻¹硝酸钠溶液作为后续实验的流动相。



A - 0.2 mol · L⁻¹氯化钠溶液; B - 0.1 mol · L⁻¹硫酸钠溶液; C - 0.1 mol · L⁻¹硝酸钠溶液。

A - 0.2 mol · L⁻¹ sodium chloride solution; B - 0.1 mol · L⁻¹ sodium sulfate solution; C - 0.1 mol · L⁻¹ sodium nitrate solution.

图1 不同溶剂中SH测定的Zimm图

Fig. 1 Zimm plot of determination of SH in different solvents

表3 不同流动相下SH的折光指数增量(dn/dc 值)

Tab. 3 Refractive index increment(dn/dc) of SH in different mobile phases

Sample number	$dn/dc/\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	
	0.1 mol · L ⁻¹ Na ₂ SO ₄	0.1 mol · L ⁻¹ NaNO ₃
A1	0.177 6	0.156 1
B2	0.165 5	0.161 3
B3	0.169 3	0.157 7
B4	0.175 0	0.158 2
B5	0.155 5	0.160 5
B6	0.156 7	0.161 1
C7	0.163 6	0.157 6
C8	0.173 6	0.160 6
D9	0.179 7	0.156 3
D10	0.192 8	0.158 2

3.2 使用Calypso II测定 dn/dc 值结果分析

3.2.1 重复性 分别称取2份A1样品连续测定5次结果的相对标准偏差(RSD) < 1.0%,该方法重复性良好。重复性测定结果见表4。

3.2.2 线性范围 线性结果见图2,拟合度 r 均大于0.999 0,ASTRA和CALYPSO软件分别为0.999 5、0.999 6,表明SH在0.025 9~0.492 3 mg · mL⁻¹内线性良好。

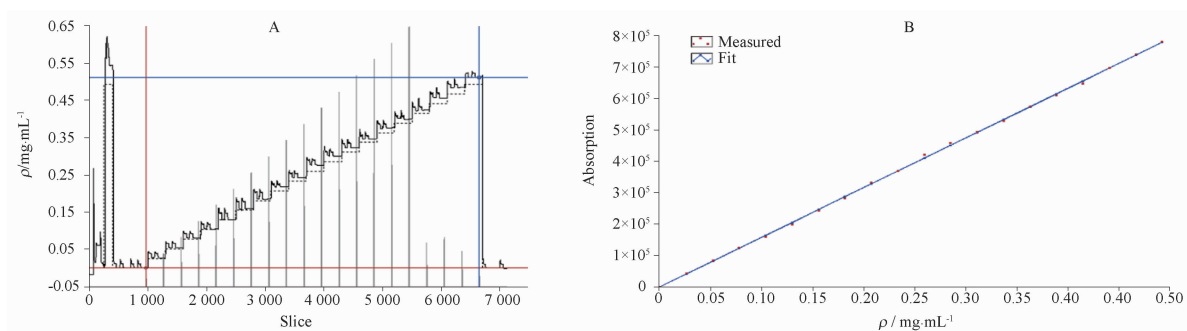
表4 SH的重复性测定结果

Tab. 4 Reproducibility test results of SH

Parameter	ASTRA 8.1.0.14		CALYPSO 2.4.1.6	
$dn/dc/\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	0.153 4	0.154 0	0.152 5	0.155 0
	0.152 1	0.152 9	0.153 1	0.154 3
	0.152 2	0.153 6	0.152 7	0.154 5
	0.152 0	0.154 2	0.152 4	0.154 5
	0.152 7	0.154 6	0.152 7	0.155 0
	Average	0.152 5	0.153 9	0.152 7
RSD/%	0.4	0.4	0.2	0.2

3.2.3 不同采集软件测定结果比较 Calypso II测定结果见表5,同一样品平行测定3次RSD均小于1.0%,理论浓度和示差折光检测器作为浓度源所得结果误差小于1.2%,10种样品间的RSD为1.4%,证明Calypso II梯度混合法在0.1 mol · L⁻¹硝酸钠溶液中准确性和重复性良好,与称重法所得结果相互印证,可以替代称重法测定SH的 dn/dc 值。

实验采用的Calypso II梯度混合仪可以自动制备浓度梯度进样,无需称重计算即可获得准确的溶液浓度,国内外暂无使用该仪器进行SH的 dn/dc 值测定的相关报道。对比称重法需最少称重配制6个浓度溶液后手动进样的烦琐操作,新建方法实现了自动化分析,仅需配制1个原浓度为



A - 色谱图; B - 线性拟合图。

A - chromatogram; B - linear fitting graph.

图2 SH 线性范围结果图(CALYPSO 2.4.1.6)

Fig. 2 Linear range of SH(CALYPSO 2.4.1.6)

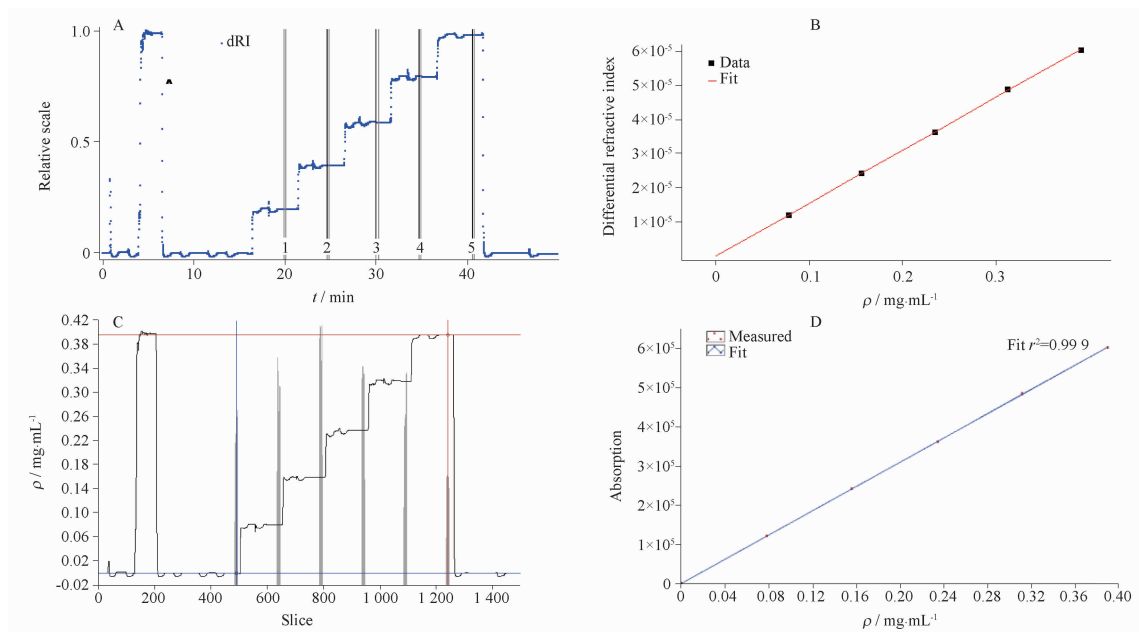
表5 SH 的 dn/dc 值测定结果。 $n = 3, \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$

Tab. 5 The determination results of dn/dc of SH. $n = 3, \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$

Sample number	ASTRA 8.1.0.14			CALYPSO 2.4.1.6			Average
A1	0.154 2	0.154 6	0.153 9	0.154 5	0.155 0	0.154 6	0.154 5
B2	0.160 7	0.159 9	0.159 3	0.158 8	0.161 0	0.160 8	0.160 1
B3	0.156 3	0.155 5	0.156 0	0.156 6	0.156 9	0.156 4	0.156 3
B4	0.160 0	0.160 5	0.160 5	0.159 0	0.161 6	0.160 6	0.160 3
B5	0.157 6	0.157 1	0.156 5	0.158 3	0.159 5	0.159 7	0.158 1
B6	0.155 0	0.156 0	0.155 8	0.159 2	0.159 3	0.158 8	0.157 4
C7	0.154 5	0.156 4	0.156 0	0.155 1	0.155 8	0.156 5	0.155 7
C8	0.155 4	0.154 4	0.157 0	0.155 7	0.155 0	0.156 2	0.155 6
D9	0.154 5	0.154 6	0.155 2	0.156 8	0.156 4	0.156 7	0.155 7
D10	0.153 8	0.156 3	0.156 6	0.155 4	0.158 3	0.157 5	0.156 3

0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SH 溶液,就能通过 Calypso II 梯度混合仪获得 dn/dc 值,简便、准确、重复性良好,见

图3。但该方法对测定交联 SH dn/dc 值的适用性还有待考察。



A - ASTRA 梯度色谱图; B - ASTRA 拟合图; C - CALYPSO 梯度色谱图; D - CALYPSO 拟合图。

A - ASTRA gradient chromatogram; B - ASTRA fitting chart; C - CALYPSO gradient chromatogram; D - CALYPSO fitting chart.

图3 SH 的 dn/dc 值色谱图

Fig. 3 Chromatograms of SH dn/dc

4 小 结

本研究通过测定 3 种流动相中 SH 的 A_2 大小和 dn/dc 值在不同流动相中的稳定性数据相互佐证, 确定 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸钠溶液做流动相, 获得了可稳定测定 dn/dc 值的溶液体系; 新建 Calypso II 梯度混合仪自动化测定方法简便、快速、准确, 重复性良好, 解决了 SH 的 dn/dc 值测定繁琐的问题。目前国内外对 SH dn/dc 值的研究较少, 通过测定 A_2 来挑选合适溶解体系的相关研究尚属空白。通过本研究和所建方法能为高分子药物的相对分子质量测定和产品的标准提高提供新的依据。

REFERENCES

- [1] WS1-(x072)2011Z. National drug standards[S]. 2011.
- [2] WU G T, KAM J, BLOOM J D. Hyaluronic acid basics and rheology[J]. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 2022, 30(3):301-308.
- [3] ZHANG X, WEI D, XU Y, *et al.* Hyaluronic acid in ocular drug delivery [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 264: 118006. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118006.
- [4] SHAO J, WAN J, ZHANG F, *et al.* Construction of hyaluronic acid-CeO conjugated composite nanoparticles and their activity efficiency in diabetic retinopathy alleviation[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2021, 17(11):2219-2225.
- [5] CHANG W H, LIU P Y, LIN M H, *et al.* Applications of hyaluronic acid in ophthalmology and contact lenses[J]. *Molecules*, 2021, 26(9):2485. DOI:10.3390/molecules26092485.
- [6] BRONSTONE A, NEARY J T, LAMBERT T H, *et al.* Supartz (sodium hyaluronate) for the treatment of knee osteoarthritis: a review of efficacy and safety[J]. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*, 2019, 12: 1179544119835221. DOI: 10.1177/1179544119835221.
- [7] LETIZIA MAURO G, SCATURRO D, SANFILIPPO A, *et al.* Intra-articular hyaluronic acid injections for hip osteoarthritis[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2018, 32(5):1303-1309.
- [8] WANG T, CHENG Y F, CHEN C, *et al.* Application progress of hyaluronic acid in burn plastic and cosmetic surgery[J]. *Chin J Aesthetic Med*(中国美容医学), 2020, 29(2):170-173.
- [9] JUNCAN A M, MOISA D G, SANTINI A, *et al.* Advantages of hyaluronic acid and its combination with other bioactive ingredients in cosmeceuticals [J]. *Molecules*, 2021, 26 (15): 4429. DOI:10.3390/molecules26154429.
- [10] RATAJCZAK P, MACIEJAK O, KOPCIUCH D, *et al.* Directions of hyaluronic acid application in cosmetology[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2023, 22(3):862-871.
- [11] JIANG H, XU Z. Hyaluronic acid-based nanoparticles to deliver drugs to the ocular posterior segment[J]. *Drug Deliv*, 2023, 30(1):2204206. DOI:10.1080/10717544.2023.2204206.
- [12] KIM H, PARK Y, STEVENTS M M, *et al.* Multifunctional hyaluronate-nanoparticle hybrid systems for diagnostic, therapeutic and theranostic applications [J]. *J Controlled Release*, 2019, 303:55-66.
- [13] LEI C, LIU X R, CHEN Q B, *et al.* Hyaluronic acid and albumin based nanoparticles for drug delivery [J]. *J Controlled Release*, 2021, 331:416-433.
- [14] LIU H, LIU A F, ZHANG Y, *et al.* The advantages and application strategies of hyaluronic acid scaffolds in cartilage repair engineering [J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*(中国组织工程研究), 2022, 26(34):5518-5524.
- [15] KIM Y S, GUILAK F. Engineering hyaluronic acid for the development of new treatment strategies for osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15):8662. DOI:10.3390/ijms23158662.
- [16] LI J Q, HUANG Y L, LI Y, *et al.* Mechanism and influencing factors in molecular weight degradation of non-cross-linked hyaluronic acid [J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*(中国组织工程研究), 2024, 28(5):747-752.
- [17] LEE B M, PARK S J, NOH I, *et al.* The effects of the molecular weights of hyaluronic acid on the immune responses [J]. *Biomater Res*, 2021, 25(1):27. DOI:10.1186/s40824-021-00228-4.
- [18] KARBOWNIK M S, NOWAK J Z. Hyaluronan; towards novel anti-cancer therapeutics [J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(5):1056-1074.
- [19] SCHAEFER L, TREDUP C, GUBBIOTTI M A, *et al.* Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology [J]. *FEBS J*, 2017, 284(1):10-26.
- [20] EP 11. 0 [S]. 2023;3993.
- [21] JP 18. Supplement [S]. 2021;1575.
- [22] SONG Y J, LI Y Y, FAN H H. Determination of molecular weight and molecular weight distribution of sodium hyaluronate and its preparations [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2014, 34(8):1444-1448.
- [23] SHANMUGA DOSS S, BHATT N P, JAYARAMAN G. Improving the accuracy of hyaluronic acid molecular weight estimation by conventional size exclusion chromatography [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1060:255-261.
- [24] HE S T, ZHANG W D, LÜ J, *et al.* Comparison of three methods for determining molecular weight of sodium hyaluronate [J]. *China Pharm*(中国药师), 2015, 18(6):929-931.
- [25] WANG H Y, GUO X P, LUAN Y H, *et al.* Determination of relative molecular mass and its distribution of sodium hyaluronate by size exclusion chromatography [J]. *Food Drug*(食品与药品), 2010, 12(4):232-235.
- [26] HAN Y, LI D, LI D, *et al.* Impact of refractive index increment on the determination of molecular weight of hyaluronic acid by multi-angle laser light-scattering technique [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):1858. DOI:10.1038/s41598-020-58992-7.
- [27] WYATT P J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules [J]. *Anal Chim Acta*, 1993, 272(1):1-40.

(收稿日期:2024-08-13)