多角度光散射在药物质量控制中的应用

张程程，何晶晶，樊　杰，潘红娟*

（中国医药工业研究总院上海医药工业研究院分析测试中心，上海 201203）

摘要：多角度光散射（MALS）技术是目前直接测定大分子药物相对分子质量及其分布的重要手段，在药物质量研究中的应用受到越来越多研究者的关注。本研究归纳总结了 MALS 的原理、特点及其在药物质量控制中的应用，主要包括采用 MALS 测定大分子药物、中药、药用辅料等的相对分子质量及其分布、粒径（水动力学半径）、均方根旋转半径、构象、聚集状态和支化度。MALS 具有准确度高、测定范围广等优点，可为药物的质量控制和标准的建立及修订提供可靠的技术支持。

关键词：多角度光散射；相对分子质量；粒径；构象；聚集体；片段；支化度

中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)08-1101-11

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.08.003

Application of Multi-angle Light Scattering in the Quality Control of Drugs

ZHANG Chengcheng, HE Jingjing, FAN Jie, PAN Hongjuan*

(*Analysis and Test Center of Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: At present, multi-angle light scattering (MALS) technique is an important method to directly determine the relative molecular weight and its distribution of macromolecular drugs. Its application in drug quality research has received more and more attention from researchers. The principles, characteristics and applications of MALS in drug quality control are summarized, including the uses of MALS for determination of the relative molecular weight and its distribution, particle size (hydrodynamic radius), root mean square radius of rotation, conformation, aggregation state, and degree of branching in macromolecular drugs, traditional Chinese medicines, and pharmaceutical excipients. MALS has the advantages of high accuracy and wide measurement range, which can provide a reliable technical support for the quality control of drugs and the establishment and revision of standards.

Key Words: multi-angle light scattering; relative molecular weight; particle size; conformation; aggregate; fragment; degree of branching

光散射技术起源于 20 世纪 80 年代，近十几年，光散射技术发展较快，多种不同的光散射检测器被陆续开发，包括直角光散射（right-angle light scattering，RALS）检测器、小角度光散射（low-angle light scattering，LALS）检测器和多角度光散射（multi-angle light scattering，MALS）检测器。目前，光散射技术在高分子化合物特征分析领域中占据重要地位，主要因其能解决大分子化合物的散射光强度会受到不同角度的影响而无法在 0° 角进行物理测量的难题。当前的 MALS 检测器有三角度、八角度和十八角度等型号，其中十八角度光散射检测器的应用较广泛，可同时与黏度检测器、紫外（UV）检测器或示差折光（differential refractive index，RI）检测器等联用，进一步扩大了测试应用范围。与黏度检测器联用，利用特性黏度测定相对分子质量，

收稿日期：2021-10-09

作者简介：张程程(1994—)，女，硕士研究生，专业方向：药品质量控制研究。

通信作者：潘红娟(1976—)，女，研究员，硕士生导师，从事药品质量控制研究及新技术和新方法在药物分析上的应用研究。

E-mail：panhongjuan@sinopharm.com

克服了黏度法不能提供相对分子质量分布信息的缺点，同时能得到 Mark-Houwink 方程中的 *k* 值和 *a* 值以判断样品的构象；与 UV 检测器或 RI 检测器等浓度型检测器联用，还可在测定生物大分子的相对分子质量及分布的同时表征大分子的构象及聚集状态。

目前，MALS 技术已广泛应用于生物偶联物和单抗药物的测定、多糖的表征、药用辅料的筛选、脂质体制剂的开发、蛋白质的属性及相互作用的表征等。各国药典也有相应的收载（见表 1）。其中，美国药典（USP 43）通则 <1238> 中提出可采用液相色谱或分子排阻色谱 - 多角度光散射（HPLC/SEC-MALS）联用技术进行多糖、蛋白质纯化和多糖 - 蛋白质共聚物解聚过程的检测、中间体和原料药的结构定性及分子尺寸的测定，通则 <1430> 中则阐明了 MALS 的原理。欧洲药典（EP 10.8）采用 4 根色谱柱串联的 SEC-MALS 法测定羟乙基淀粉的相对分子质量及其分布，规定样品的平均相对分子质量不得超过羟乙基淀粉对照品标示量的 5%。《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）征稿中采用凝胶渗透色谱法 - 多角度光散射 - 示差折光（GPC-MALS-RI）检测器测定羟乙基淀粉 130/0.4 的相对分子质量，规定 *M*w 应为 110 000 ～ 150 000，但最终未载入药典。

MALS 技术在药品质量控制中具有良好的应用前景，本研究将对 MALS 技术的原理、特点和其在药品关键质量属性（相对分子质量及其分布、粒径、构象、聚集状态和支化度等）测定中的应用进展进行总结分析，以期为大分子药物、药用辅料及制剂的质量控制研究提供技术参考。

1　MALS 的原理

光散射技术包括静态光散射（static light scattering，SLS）和动态光散射（dynamic light scattering，DLS）技术。在 SLS 中，通过测定平均散射光光强对角度和浓度的依赖性，可得到化合物的相对分子质量及其分布、均方根旋转半径（R_g）和 A_2；在 DLS 中，通过记录散射光光强随时间的涨落，即时间相关函数，可得到散射光的特性弛豫时间（τ），进而求得平动扩散系数（*D*）和与之对应的粒径（水动力学半径 / 流体力学半径）。

在使用过程中，有机结合 SLS 和 DLS 可研究高分子及胶体粒子在溶液中的许多涉及质量和流体力学体积变化的过程，如聚集和分散、结晶和溶解、吸附和解吸、高分子链的伸展和蜷缩以及蛋白质长链的折叠，并可得到许多独特的相对分子质量参数。

1.1　SLS

当一束单色、相干的激光沿入射方向照射到无吸收的高分子稀溶液时，光束中分子的电子云在光的电磁波作用下极化，形成诱导偶极子，并随着电磁波的振动向各个方向辐射出电子波（见图 1），该电子波成为二次光波源，也就是散射光。如果分子是静止的，则散射光和入射光的频率相同，称弹性散射[3—4]。

高分子溶液的散射光光强远高于纯溶剂，并且强烈依赖于高聚物的相对分子质量、链形态（构象）、溶液浓度、散射光角度（θ）和折光指数增量［d*n*/d*c* 值，其中 *n* 为溶剂的折光指数，*c* 为溶质分子的摩尔质量 /g·mol^{-1}］。因此，由光散射法测得不

表 1　MALS 的技术标准及药典收载情况

Tab.1　Standards and Pharmacopoeia Acceptances of MALS Techniques

来源	研究对象	研究目的	研究方法
美国材料与试验协会（ASTM）标准 F2602-08[1]	壳聚糖和壳聚糖盐	重均分子量（*M*w）、数均分子量（*M*n）及第二位力系数（second virial coefficient，A_2）的测定	SEC-MALS
ASTM 标准 F2605-08[2]	海藻酸钠	*M*w、*M*n 及 A_2 的测定	SEC-MALS
EP 10.8	羟乙基淀粉	*M*w、粒度分布	SEC-MALS
EP 10.8	液相色谱通则	可联用	LC-MALS
EP 10.8	分子排阻色谱通则	可联用	SEC-MALS
EP 8.0	肺炎球菌多糖疫苗	修饰肺炎球菌多糖的分子大小	SEC/GPC-MALS
EP 8.0	单价本体偶联物	分子大小	LC-MALS
英国药典（BP 2021）	生产人用共轭多糖疫苗的载体蛋白	表征	SEC-MALS

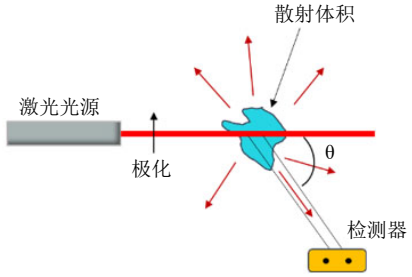


图 1 SLS 的基本原理示意图

Fig.1 Schematic Diagram of Basic Principe of SLS

同浓度的高聚物溶液在不同散射角下的散射光强数据后，可按下式求得高聚物的 Mw、R_g、A_2[5—7]。

$$K=4\pi^2(\mathrm{d}n/\mathrm{d}c)^2n_0^2/(N_A\lambda_0^4) \quad ①$$

$$R_\theta=I_\theta\times r^2/I_0 \quad ②$$

$$\frac{Kc}{R(\theta)}=\frac{1}{M\mathrm{w}P(\theta)}+2A_2X \quad ③$$

$$\frac{Kc}{R(\theta)}=\frac{1}{M\mathrm{w}}[1+\frac{16\pi^2n^2}{3\lambda_0^2}<R_g^2>\sin^2(\frac{\theta}{2})+\cdots]+2A_2c \quad ④$$

式中，K 为光学常数；n_0 为标准液体的折光指数；N_A 为阿伏伽德罗常数；λ_0 为入射光波长；R_θ 为瑞利因子；I_θ 为散射光光强；r 为散射中心到检测器的距离；I_0 为入射光光强；$P(\theta)$ 为形状因子，取决于分子结构。其中，$R(\theta)$ 是测得值，Kc、λ_0、θ 为输入值，其他均为已知值；而 Mw、A_2、R_g 为未知值。将 Kc/R_θ 对 $\sin^2(\theta/2)+Kc$ 作图，即得到齐姆图（Zimm plot），见图 2，其中 K 为调整横坐标的设定值。通过以下 3 种计算形式，可推导出 Mw、A_2 和 R_g^2：当 $\theta\to0$ 时，斜率为 A_2；当 $c\to0$ 时，斜率为 R_g^2；当 $c\to0$ 且 $\theta\to0$ 时，纵坐标轴上交点的倒数为 Mw。通常样品浓度很低，经进一步稀释后浓度更低，故当 $2A_2c\to0$ 时，将 Kc/R_θ 对 $\sin^2(\theta/2)+Kc$ 作图，纵坐标为 $1/M$w，直线斜率为 R_g^2。除了用齐姆图处理光散射数据外，还可采用 Debye 和 Berry 作图法。

利用 Mw、R_g 值可判断高分子在溶液中的构象和支化度（g^M），其中支化度的计算公式见式⑤：当斜率为 1 时，表示高分子在溶液中呈棒状排列；当斜率为 0.4 ～ 0.6 时，表示高分子在溶液中呈线性无规则线团；当斜率约为 0.33 时，表示为球状形态[8]。

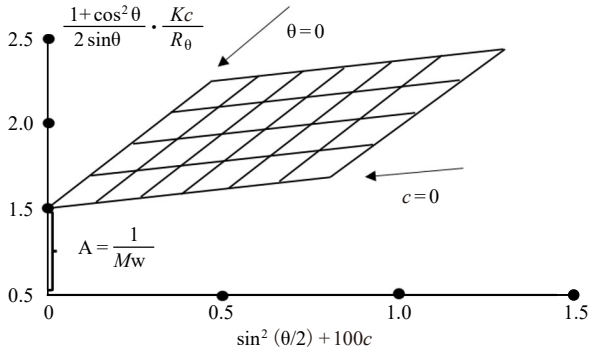


图 2 高分子溶液光散射数据的典型齐姆外推图

Fig.2 Typical Zimm Extrapolation Diagram of Light Scattering Data of Polymer Solution

$$g^M=\left|\frac{<R_g^2>_{\mathrm{branched}}}{<R_g^2>_{\mathrm{linear}}}\right| \quad ⑤$$

1.2 DLS

DLS 的原理是基于粒子的布朗运动，即粒子受到周围溶剂的碰撞从而产生无规则运动；颗粒越大、温度越高，粒子运动速率越快；粒子运动的快慢用扩散系数（D/m^2·s^{-1}）来表征[9]。根据 Stokes-Einstein 公式（式⑥），可得到粒径与扩散系数的关系。

$$R_h=kT/6\pi\eta D \quad ⑥$$

式中，R_h 为粒子半径，k 为玻尔兹曼常数（k=1.38×10^{-23} J/K）；T 为绝对温度 /K；η 为介质黏度（水介质，η=1.005 Pa·s，20 ℃）。

在 DLS 中，散射光的光强衰减速度与粒径相关，小颗粒的衰减速度快于大颗粒[10]。散射光光强（$G2$）与时间（t）的自相关函数见式⑦，自相关函数只取决于时间差 τ；对于单分散样品，相关函数见式⑧。

$$G2(\tau)=I(t)\times I(t+\tau) \quad ⑦$$

$$\mathrm{e}G2(\tau)=A\times[1+B\times\mathrm{e}^{(-2\Gamma\tau)}] \quad ⑧$$

$$\Gamma=D\times q^2 \quad ⑨$$

$$q=(4n\pi/\lambda_0)\sin(\theta/2) \quad ⑩$$

式中，Γ 为衰变常数（对于大量做布朗运动的粒子，时间自相关函数本质上是时间差 τ 的一个指数衰减函数）；DLS 模式中散射角 θ 为 90 °；A 为相关函数基线，B 为相关函数截距。

通过计算波动强度的自相关函数，可获得指数衰变曲线。从衰变时间常数 τ，可获得粒子扩散系数 *D*，使用 Stokes-Einstein 方程，最后可计算出粒子半径及粒度分布。但此技术有一定局限性，被测样品应为球形或粒子间无相互作用的单分散样品。

2　MALS 在药物质量控制中的应用

相对分子质量及其分布是表征大分子药物的基本参数，也是生物大分子药物质量控制的关键属性。基于构效及体内药物代谢情况，大分子药物的粒径、构象和支化情况也是药物在工艺开发设计和产品测定中的质控参数。MALS 联用技术可准确测定蛋白质、多肽、核酸、多糖、脂质体等的相对分子质量及其分布、粒径、聚集状态或构象等参数信息。

2.1　相对分子质量及其分布的测定

2.1.1　大分子药物

测定大分子药物相对分子质量的传统方法主要为凝胶渗透色谱（GPC）法、分子排阻色谱（SEC）法或质谱（MS）法。GPC 法不能分辨与目标分子大小相近的化合物，相对分子质量差需在 10％以上才能得到分离，且色谱柱易老化，需要标准品；采用凝胶电泳 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）法测定蛋白质相对分子质量时，样品需求量大，染色费时费力，操作过程烦琐且重现性差。MS 法可精确测定化合物的相对分子质量，目前基质辅助激光解吸 - 飞行时间质谱（MALDI-TOF/MS）、基质辅助激光解吸电离 - 傅里叶变换离子回旋共振质谱（MALDI-FT/ICR/MS）、电喷雾离子阱质谱（ESI-IT/MS）可测得相对分子质量分布较窄的高分子化合物的 *M*w[11—12]。但 MS 法存在一定的电离源适用性，对多分散的复杂体系的分析存在一定局限性。代荣荣等利用纳升电喷雾离子源 - 轨道阱质谱仪，以非变性形式探索了测定单克隆抗体药物整体的相对分子质量和糖型鉴定的方法条件，通过考察质谱源内碎裂程度、仪器分辨率、碰撞诱导裂解（collision induced dissociation，CID）、溶剂条件等参数，发现使用中等强度的源内碎裂参数时，高分辨率质谱仪实际信号的谱图分辨率可达到 4 000 以上，建议不开启 CID 或仅在需要增强去溶剂化效果时启用 CID，以避免完整药物碎裂[13]。

SEC 或 GPC-MALS 是目前测定相对分子质量所得结果最接近真值的方法，能快速测定大分子的相对分子质量。孙桂斌等采用 MALS-RI 联用技术测定羟乙基淀粉 130/04 氯化钠注射液的 *M*w、*M*n、*Z* 均相对分子质量、相对分子质量分布、聚集态及分子排布规律等信息，通过聚类分析发现不同厂家样品的相对分子质量及其分布存在较大差异，为 ChP 收录此技术用于大分子药物相对分子质量的测定奠定了基础[14]。

李永红等采用 SEC-MALS 联用技术测定了重组人白细胞介素、重组血管内皮抑制素、重组单抗的相对分子质量，测定结果与 ChP 2020 三部 SDS-PAGE 法所得的相对分子质量测定结果基本一致，说明 MALS 法的测定结果可靠[15]。NICOLE 等利用病毒衣壳及其包裹的 DNA 的固有吸光度、光散射和折射特性，建立了表征腺相关病毒（AAV）衣壳大小、聚集状态、完整性、含量及载体基因摩尔质量的 SEC-MALS 通用法，并提供了确定轻 / 重衣壳比的替代方法，为腺相关病毒载体基因治疗药物的开发和流程分析提供了强有力支持[16]。SEC-MALS 技术分离测试蛋白质相对分子质量的缺点在于对分子形状的要求较高，需要标准蛋白与待测蛋白的分子形状一致，测定结果才较准确。AMARTELY 等突破性地使用离子交换色谱（IEX）与 MALS 联用以区分具有相似相对分子质量的蛋白质，分离蛋白质中的低聚物，测得单体、二聚体和三聚体的相对分子质量分别为 $(62.4\pm0.4)\times10^3$、$(130\pm10)\times10^3$ 和 $(170\pm10)\times10^3$，该法弥补了蛋白质样品中存在的低聚物易从分析型 SEC 柱中洗脱出来而导致分离特性差、SEC-MALS 分析能力有限的缺点[17]。玻璃酸钠是一种长链生物大分子，相对分子质量从几十万到几百万，何素婷等分别采用黏度法、SEC 法及 SEC-MALS 联用法测定 3 批玻璃酸钠注射液样品的相对分子质量，结果表明，SEC 法采用不同的色谱柱组合测得的 *M*w 及 *M*w/*M*n 存在较大差异；不同的色谱柱组合对 SEC-MALS 法的测定结果却影响不大；SEC-MALS 法与黏度法的

测定结果较为接近，但黏度法无法获得相对分子质量分布信息，而 SEC-MALS 法可测定玻璃酸钠样品的相对分子质量及其分布 [18]。

相对分子质量不仅可表征药物的属性，也能间接表明化合物的修饰程度。刘涛等通过高效凝胶过滤色谱（HPSEC）-MALS 联用结合 2,4,6- 三硝基苯磺酸（TNBS）衍生化法，建立了一种分析蛋白中自由氨基含量和修饰度的新方法；以人血清白蛋白（HSA）为模型对该法进行了可行性验证，结果显示试验值与根据其氨基酸组成获得的计算值一致；利用 TNBS 将琥珀酰明胶衍生化，再通过 HPSEC-MALS 法测定衍生物的相对分子质量及其分布，利用相对分子质量 - 保留时间拟合曲线，计算得琥珀酰明胶的自由氨基修饰度为 38% [19]。

目前主要采用 GPC 法测定核酸的相对分子质量，该法不仅操作较复杂、进程缓慢，而且需要用到昂贵的标准核酸及有毒试剂甲醛、染色剂等。此外，该法的影响因素较多，准确性差。依据 MALS 的应用特点，张再平等采用 SEC-MALS 联用法测得注射用核糖核酸的相对分子质量为 4.6×10^3 ～ 234.2×10^3，分布系数 *M*w/*M*n 为 1.3 ～ 2.9，该法的建立为核糖核酸的质量控制提供了新思路 [20]。光散射法以其独特的优越性，成为核酸及 DNA 复合物表征的理想工具之一。

2.1.2 中药

光散射技术主要应用于中药多糖成分的研究中（见表 2 [21—24]），一般认为相对分子质量及其分布是多糖的识别特征之一，*M*w 和 *M*n 作为多糖的质控指标，反映了多糖组分的纯度 [25]。目前研究中常用 SEC 或 GPC 法测定多糖的相对分子质量及其分布，如太子参多糖、甘草多糖和贻贝多糖等相对分子质量及含量测定已有此类方法的验证报道 [26—28]。ChP 2020 四部收载了用高效凝胶渗透色谱法测定多糖相对分子质量及其分布的方法。在中药质量控制研究中，建立以多糖成分为质控指标的质量标准仍存在诸多问题，如没有特异性鉴别反应、含量测定方法缺乏专属性、多糖标准品难以获得等。MALS 技术在多糖组分研究中具有独特的优势。KAN 等采用 SEC-MALS 联用技术测得芦荟多糖中 3 种多糖的相对分子质量分别为 5.5×10^4、1.29×10^5、9.62×10^5，并将 SEC-MALS 法与亚铁氰化铁（又称普鲁士蓝）法和经葡聚糖标准校准的 SEC/RI 法检测结果进行比较，期间通过不断调整标准曲线，发现 3 种方法的测定结果存在较大差异，这是由于所用标准品的结构组成与待测物存在差异，而非 SEC 效应及多糖间相互作用造成的 [29]。由于多糖的复杂性，很难用单一的多糖作为标准来测定芦荟中未知多糖的相对分子质量，MALS 法依然是可靠的手段。胡卫珍等采用 GPC-MALS 联用技术测得 3 种种源的铁皮石斛多糖 *M*w 为（2.975 ～ 3.741）$\times10^5$、*M*w/*M*n 为 1.29 ～ 1.50、R_g 为 60.3 ～ 61.1 nm，表明不同种源的铁皮石斛多糖相对分子质量及其分布存在差异 [30]。

MALS 技术也可用于多糖的定性鉴别和菌种筛选，LIU 等通过 SEC-MALS 法测得地衣芽孢杆菌产生的胞外多糖（EPS）的相对分子质量为 2.826×10^4，并发现该 EPS 为均相体系，从而筛选出 EPS 产量较高（47.45 g/L）的地衣芽孢杆菌 [8]。ZHU 等采用

表 2 MALS 在中药多糖相对分子质量测定中的应用

Tab.2 Application of MALS in Determination of Relative Molecular Weights of Traditional Chinese Medicine Polysaccharides

研究对象	检测对象	方法	结果分析	文献
茯苓多糖	*M*w	HPSEC-MALS-RI	测得茯苓多糖组分 A 的 *M*w 为 4.671×10^6（±1.003%），相对分子质量分布为 12.3%；组分 B 的 *M*w 为 6.144×10^4（±2.466%），相对分子质量分布为 87.7%	[21]
蛹虫草多糖	*M*w、R_g	GPC-MALS	*M*w 和 R_g 分别为 2.432×10^7 和 31 nm；在溶液状态下为高支化结构	[22]
注射用黄芪多糖	*M*w、R_g、*M*w/*M*n	GPC-MALS	MALS 法测得 3 个信号较强的色谱峰组分的 *M*w 分别为 1.148×10^6、1.8×10^5、4.3×10^4；R_g 分别为 23.8、10.9 nm（由于色谱峰 3 组分的粒径小于 10 nm，用 MALS 无法测得 R_g）；*M*w/*M*n 分别为 1.4、1.0、1.3	[23]
灵芝菌丝体多糖	*M*w、R_g	SEC-MALS	测得 3 种多糖的 *M*w 分别为 4.526×10^5、4.603×10^4 和 3.760×10^3；*M*w/*M*n 分别为 1.559、1.360 和 1.125；均为高度分支结构的大分子聚合物	[24]

HPSEC-MALS-RI 技术，结合主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA），获得基于糖类凝胶电泳的糖类图谱，对我国不同地区来源的丹参多糖进行比较，结果表明相对含量存在显著差异，而相对分子质量几乎没有差异[31]。

2.1.3 药用辅料

药用辅料是保证药物制剂生产和使用的物质基础，不仅赋予药物一定剂型，而且与提高药物疗效、降低不良反应有较大关系，其质量可靠性是保证药物安全性的基础。在药物制剂中使用的药用辅料通常具有特定功能，归属不同功能类别（ChP 2020 通则 0251）。药用辅料的功能性相关指标，如稀释剂的粒径、增稠剂的相对分子质量等，会影响固体制剂的成型性和液体制剂的黏度，对功能性相关指标的测定和保证对于制剂质量安全有重要意义。ChP 2020 四部通则 9601 已将相对分子质量及其分布的测定（通则 0514）作为聚合物黏合剂、包衣剂、表面活性剂、助悬剂 / 增稠剂、保湿剂、成膜剂、冻干保护剂、释放调节剂、压敏胶黏剂及硬化剂等的功能性相关指标。采用 GPC 法测定药用辅料的相对分子质量是一种相对的方法，此法的可靠性依赖于标准品的相对分子质量、标准曲线和数据处理。MALS 利用散射光光强与物质相对分子质量和物质的量浓度分别成正比，且光强可精确获得的性质，可准确得到相对分子质量及 R_g、构象和支化度等信息[32]。KPODO 等采用 SEC-MALS 法测定加纳格雷维亚树胶（Ghanaian grewia gum）提取物中多糖的相对分子质量时发现，偏亚硫酸氢钠在相对较低的温度（25 ℃）下提取得到的样品的摩尔质量［(1.7 ～ 2.8)×10^6 g/mol］高于磷酸盐缓冲液提取产物［(0.75 ～ 0.92)×10^6 g/mol］，这种差异可能是由于缓冲液种类及 pH 值的不同导致了多糖 - 蛋白质、多糖 - 纤维素聚合物的化学链水解断裂；所研究的多糖的摩尔质量高于黄秋葵多糖［(5.0 ～ 6.0)×10^4 g/mol］、黄蜀葵多糖（8.8×10^3 g/mol）、木槿多糖［(8.7×10^3 ～ 1.4×10^5) g/mol］，但低于药葵多糖（33.3×10^6 g/mol），表明从锦葵科植物中可获得宽范围相对分子质量的多糖[33]。目前 MALS 法在药用辅料中的应用见表 3[34—40]。

此外，MALS 作为实时测量相对分子质量的过程分析技术，可用于工艺下游过程控制。例如，疏水作用色谱（HIC）-MALS 系统可实时监测和控制生物制品纯化过程中的聚合物，实现生物治疗药物的实时释放[41]。

2.2 粒径和构象的分析

MALS 技术因测定简便和快捷，在脂质体纳米粒的处方筛选和产品检测中也得到了广泛应用（见表 4[42—46]）。CAROLINE 等应用小角 X 射线散射（SAXS）和 AF4-MALS-DLS 法协同表征了二硬脂酰磷酰乙醇胺 - 聚乙二醇聚合物胶束（PM）在包裹紫杉醇前后的粒径大小和血浆清除速率[47]。结果表明，PM 可在介质中以高度组织化形式存在，包

表 3　MALS 在药用辅料相对分子质量测定中的应用

Tab.3　Application of MALS in Determination of Relative Molecular Weights of Pharmaceutical Excipients

研究对象	检测对象	方法	结果分析	文献
甲基纤维素	*M*w、*M*w/*M*n	SEC-MALS	10 批样品的 *M*w 为 5.146×10^4 ～ 5.623×10^5；*M*n 为 2.652×10^4 ～ 3.198×10^5；*M*w/*M*n 为 1.494 ～ 3.174	[34]
羧甲纤维素钠	*M*w、*M*w/*M*n、R_g	GPC-MALS	羧甲纤维素钠样品的 *M*w 在 10^5 ～ 10^6；*M*w/*M*n 在 1.5 ～ 4.4，为紧密且具有高支化度结构的大分子聚合物	[35]
羧甲纤维素钠	*M*w	SEC-MALS	对比 3 种方法评估大分子群体的链构象和链尺寸特征的可靠性	[36]
胡芦巴胶	*M*w、*M*w/*M*n、R_g	SEC-MALS	*M*w、*M*w/*M*n 和 R_g 分别为 2.235×10^6、1.089、146.4 nm	[37]
壳聚糖	*M*w、*M*w/*M*n	非对称流场流分离（asymmetric flow field-flow fractionation，AF4）-MALS、SEC-MALS	与 SEC-MALS 法相比，采用 AF4-MALS 法获得的壳聚糖回收率较低，但不会对相对分子质量的计算结果产生很大影响	[38]
透明质酸	*M*w、*M*w/*M*n	SEC-MALS	SEC-MALS 法的准确度和精密度较好	[39]
褐藻胶	*M*w、*M*n、*M*w/*M*n	GPC-RI、GPC-MALS	建立了检测褐藻胶相对分子质量和多分散性指数的方法	[40]

裹药物后形成 PM 簇；SAXS 拟合参数结果显示，包裹药物前后平均粒径大小基本不变；聚乙二醇的构象由刷状变为蘑菇状；与含有紫杉醇的 PM 相比，空白 PM 的体内循环时间更长，该研究为新型药物递送系统制备中的胶束内部结构的表征提供了参考[47]。ADAMS 等首次采用 SEC-MALS 法对包括天然胰岛素［人重组胰岛素（insulin recombinant human，IHr）、牛胰岛素（insulin bovine，IBov）、猪胰岛素（insulin porcine，IPor）］、快速作用类似物［门冬胰岛素（insulin aspart，IAsp）、赖谷胰岛素（insulin glulisine，IGlu）、赖脯胰岛素（insulin lispro，ILis）］和缓慢作用类似物［甘精胰岛素（insulin glargine，IGla）、地特胰岛素（insulin detemir，IDet）、德谷胰岛素 insulin degludec，IDeg）］在内的 9 种胰岛素及其类似物进行表征，评估了四元结构（以化学计量的形式）及其在锌离子、苯酚等辅料存在与否状态下的相关功能[48]。将 9 种胰岛素中的 8 种注入色谱柱，并根据洗脱时间和测得的物质的量进行评估，发现当流动相中无锌离子存在时，IHr、IBov 和 IPor 以六聚体的状态存在，猜测这 3 种胰岛素与锌离子的结合强度太强而不能使锌扩散到流动相中，使其保持六聚体状态。快速作用类似物的组成与天然胰岛素差异显著，IAsp 和 ILis 主要以二聚体和单体形式被洗脱；IGlu 以单体 - 二聚体 - 六聚体的形式被洗脱。IGla 应为二聚体，并发现间甲酚防腐剂的存在可能降低了共价二聚体的形成率。该试验为复杂功能的生理蛋白研究增加了新的数据。

场流分离（field flow fractionation，FFF）-MALS 法能够克服凝胶固定相的渗透极限和排阻极限、对待测样品的剪切降解和吸附限制等缺点，被证明是分离和定量分析大分子药物的有效方法。BOUSSE 等采用 FFF-MALS 法定性和定量分析甲型流感病毒，结果表明，FFF-MALS 法可成功地检出和定量分析感染鸡蛋尿囊液和培养细胞上清液中的流感病毒颗粒；此法也说明 FFF-MALS 能与不同的技术手段联用，包括 SEC-MALS、快速定量聚合酶链反应、透射电镜和原子力显微镜，通过提供疫苗候选病毒在不同条件生长时的数量、大小分布和聚集状态等关键信息，筛选目标病毒疫苗[49]。

2.3 聚集体及片段的测定

MALS 技术可用于确定纯化蛋白质是单体还是寡聚态，以及确定寡聚化的程度、蛋白翻译后的修饰程度和多分散性（包括蛋白质 - 蛋白质、蛋白质 - 核酸和蛋白质 - 多糖复合物的形成），测定单体 - 二聚体的平衡解离常数和评估蛋白质构象[50]。为了确定糖化过程是否会对制剂中可溶性和亚可见颗粒的形成产生任何影响，AWOTWE 等使用 DLS 和 SEC-MALS 法分析受控和非受控冻干步骤对 2 种浓度的免疫球蛋白 G1（immunoglobulin G1，IgG1）制剂的非酶糖化和聚集程度的影响，证明储存温度能影响糖化程度，但糖化水平不影响单克隆抗体的二级结构[51]。SAHIN 等用 SLS 法测量 A_2 以表征蛋白质间的相互作用，通过 SEC-MALS 法评估聚集途径，研究了不同酸碱度和溶液离子强度对 4 种人 IgG1 抗体的蛋白质间相互作用、蛋白质

表 4 MALS 在粒径和构象分析中的应用

Tab.4 Application of MALS in Analysis of Particle Size and Conformation

研究对象	检测对象	方法	结果分析	文献
香菇多糖	*M*w、*M*w/*M*n、R_g	SEC-MALS	R_g 和 *M*w/*M*n 分别为 39.9 nm 和 1.59，为高分支结构	［42］
胰岛素类似物	聚合度、粒径	SEC-MALS	自制和原研制剂的聚合度分别为 12.2±0.21、12.6±0.05；平均粒径分别为（1.73±0.24）、（1.72±0.17）nm	［43］
脂质体	*M*w、R_g	AF4-MALS	空白脂质体的 R_g 为 50、250、350 nm；脂质双层内含有 Fe_3O_4@AuNPs-C12SH 的磁性脂质体的 R_g 为 50、150、250 nm；水腔内包裹了甲酚紫的脂质体的 R_g 为 100、250、600 nm	［44］
丙戊酸多糖	*M*w、R_g	SEC-MALS	纤维素丙戊酸酯（CV）、普鲁兰多糖丙戊酸酯（PV）为半柔性；葡聚糖丙戊酸酯（DV）预测为分支结构	［45］
脂质纳米颗粒	*M*w、R_g	SEC-MALS-UV-RI	R_g在26.8～46.4 nm；*M*w在2.03×10^7～1.44×10^8	［46］

去折叠和非特异性聚集变化的影响和变化规律[52]。

液相色谱是分析蛋白质最有前途的技术之一，但在以往的研究中，由于蛋白质复杂的疏水性和亲水性，导致液相色谱的方法回收率和分辨率低。GENTILUOMO 等突破性地采用反相超高效液相色谱（RP-UPLC）-MALS 法表征 9 种完整单克隆抗体及其 Fab 和 Fc 片段，并通过 SEC-MALS 法进行佐证；从 RP 柱上洗脱的杂质通常与聚集的物质有关，而且在大多数情况下，这些低聚物也存在于 SEC-MALS 中；将 RP-UPLC 与 MALS 法相结合，能计算完整单克隆抗体的每个洗脱峰以及 Fc 和 Fab 片段的相对分子质量；与 SEC-MALS 和 IEX-MALS 法相比，RP-UPLC-MALS 法使用的不同分离原理能有效地分离表征蛋白质中的低聚物[53]。

2.4 支化度的测定

在药物的质量控制中，支化度是多糖类和聚合物药用辅料的关键属性之一，因其结构多样化，支化度的表征对于确保药物缓释可控和构效关系的研究至关重要。张伊洁等采用 GPC-MALS 法测定部分已上市的、多种规格的多肽微球注射剂中丙交酯乙交酯共聚物（PLGA）的相对分子质量、丙交酯和乙交酯的物质的量比（L ∶ G）、含量、支化度和玻璃化转变温度，并探讨了 PLGA 的这 5 个属性间的关系与作用机制，及其对微球中药物释放的影响，为多肽微球注射剂生产工艺评估、载药浓度调整及产品快速质量控制提供参考[54]。YOSHIBA 等通过 SEC-MALS 和差示扫描量热分析研究了通过 Smith 降解得到的具有不同支化度的 β-1,3-D- 葡聚糖的三螺旋构象，发现经 Smith 降解的裂叶多糖支化度降低，而物质的量分布几乎没有变化，在水中具有低程度的修饰，分子构象不变[55]。同样，NIE 等采用超声波辅助提取黄秋葵多糖，得到一种果胶多糖（命名为 OPP-D）的化学特性和糖链构象，该研究首次采用 SEC-MALS-DLS 技术，并确定 OPP-D 在 0.9% 氯化钠溶液中是具有支链的空心球；该研究结果有助于更好地理解 OPP-D 结构与生物活性的关系，助力 OPP-D 在功能食品和制药工业中的应用[56]。

3　总结与展望

近年发展起来的 MALS 技术能快速、有效地测定大分子的相对分子质量、粒径及扩散系数、支化度和 A_2 等参数。现今，采用 SEC-MALS 联用技术，可获得样品洗脱图中每一级分点的物质的量和相对分子质量，无需标准品作参照即可得到准确的样品相对分子质量及其分布；克服了标准曲线测定、误差大及色谱柱易老化的缺点，同时可获得从低浓度高相对分子质量到高浓度低相对分子质量混合物中各个组分的相对分子质量、dn/dc、R_g、A_2、Mw、Mn、分支程度和聚集态等构象信息。但是，MALS 法不适合测定难以在色谱柱上分离洗脱和成分复杂的样品，并且在识别具有相同或非常接近质量的蛋白质或单克隆抗体的突变体时准确度差。与色谱联用测定高分子药物 Mw 时易受多种因素（如色谱柱类型、流动相组成、样品制备、进样体积等）影响。目前该技术测定结果的准确性还有待进一步评估。

MALS 技术的出现对于大分子药物的研究是非常宝贵的，目前被生物制药界广泛用于表征蛋白质单体和聚集体、表面活性剂、蛋白质组件（如病毒样颗粒、蛋白质 - 蛋白质、蛋白质 - 核酸复合物和蛋白质 - 多糖缀合物）、多糖、多肽及其他生物大分子药物。我国对于大分子药物和药用辅料的研究尚不成熟，MALS 技术是一种重要的表征手段，在药品质量控制研究中具有良好的应用前景。

参考文献：

[1] ASTM. Standard guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue-engineered medical product applications [EB/OL]. [2021-10-01]. https://www.astm.org/f2103-18.html.

[2] ASTM. Standard test method for determining the molar mass of sodium alginate by size exclusion chromatography with multi-angle light scattering detection [EB/OL]. [2021-10-01]. https://www.astm.org/f2605-16.html.

[3] STRIEGEL A M, SINHA P. Absolute molar mass determination in mixed solvents. 1. Solving for the

SEC/MALS/DRI "trivial" case [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, **1053**: 186-195.

[4] FAN Y, KHAGO D, MARTIN R W, *et al*. Bayesian analysis of static light scattering data for globular proteins [J]. *PLoS One*, 2021, **16**(10): e0258429.

[5] SOME D, VLADIMIR R. High-throughput analytical light scattering for protein quality control and characterization [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, **2025**: 335-359.

[6] KUSHNIR D, BEYER N, BARTSCH E, *et al*. Wide-angle static and dynamic light scattering under shear [J]. *Rev Sci Instrum*, 2021, **92**(2): 25113.

[7] 占正奉, 陶正毅, 兰 晶, 等. SEC-MALS测定聚丙烯酰胺衍生物相对分子质量[J]. 技术进步, 2017, **38**(16): 6-10.

[8] LIU C H, LU J, LU L L, *et al*. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by Bacillus licheniformis 8-37-0-1 [J]. *Bioresour Technol*, 2010, **101**(14): 5528-5533.

[9] HOLLOWAY L, ROCHE A, MARZOUK S, *et al*. Determination of protein-protein interactions at high co-solvent concentrations using static and dynamic light scattering [J]. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(9): 2699-2709.

[10] HANSEN S. DLSanalysis. org: a web interface for analysis of dynamic light scattering data [J]. *Eur Biophys J*, 2018, **47**(2): 179-184.

[11] 陈 君, 殷 俊, 高 帅, 等. 基质与样品的相互作用对于傅立叶变换离子回旋共振质谱测定低相对分子质量多肽的影响[J]. 分析化学, 2012, **40**(3): 421-426.

[12] 胡 炜, 付 强, 周 洁, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测蛋白质分子量的优化研究(英文)[J]. 南方农业学报, 2012, **43**(1): 14-17.

[13] 代荣荣, 马 鑫, 邵心阳, 等. 基于纳升电喷雾-轨道阱超高分辨率质谱对完整单克隆抗体药物进行相对分子质量测定及糖型鉴定的条件探究[J]. 分子测试学报, 2020, **39**(1): 122-127.

[14] 孙桂斌, 杭太俊. 羟乙基淀粉130/04氯化钠注射液相对分子质量及分布的测定[J]. 药物分析杂志, 2009, **29**(10): 1643-1645.

[15] 李永红, 王 兰, 饶春明. 多角度激光光散射检测器与体积排阻色谱法联用测定重组蛋白药物的相对分子质量[C]//第十一次全国生物制品研讨会会议资料. 2011年中国生物制品年会. 北京: 中华预防医学会, 2011.

[16] NICOLE L M, GEOFFREY Y B, OMAIR A K, *et al*. Comprehensive characterization and quantification of adeno associated vectors by size exclusion chromatography and multi angle light scattering [J]. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 3012.

[17] AMARTELY H, AVRAHAM O, FRIEDLE A. Coupling multi angle light scattering to ion exchange chromatography (IEX-MALS) for protein characterization [J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 6907.

[18] 何素婷, 张卫东, 吕 晶, 等. 3种方法测定玻璃酸钠的相对分子质量比较[J]. 中国药师, 2015, **18**(6): 929-931.

[19] 刘 涛, 张贵锋, 周卫斌, 等. 凝胶过滤色谱-多角度激光散射法测定琥珀酰明胶自由氨基修饰度[J]. 分析化学, 2017, **35**(1): 43-48.

[20] 张再平, 吴小曼, 张 锐, 等. 分子排阻色谱-多角度激光散射法测定注射用核糖核酸相对分子质量及其分布[J]. 中南药学, 2016, **14**(11): 1241-1244.

[21] 刘 颖, 王文晞, 姜 红. 茯苓多糖的提取及其相对分子质量测定[J]. 中国现代应用药学, 2016, **33**(11): 1402-1405.

[22] 江 琦, 娄在祥, 王正齐, 等. 蛹虫草虫草多糖的分离纯化、分子构象分析及抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, **45**(1): 22-28.

[23] 王 莹, 许玮仪, 李丽潇, 等. 注射用黄芪多糖相对分子质量测定方法的比较及研究[J]. 药学学报, 2019, **54**(2): 348-353.

[24] 王海燕, 戴 军, 陈尚卫. 灵芝菌丝体多糖的分离纯化及其单糖组成分析与相对分子质量测定[J]. 食品与机械, 2015, **31**(5): 201-205.

[25] 张永文. 中药多糖成分的质控及评价要点[J]. 中国新药杂志, 2015, **24**(3): 260-264.

[26] 史文涛, 庞文生, 胡 娟. 高效凝胶色谱法测定太子参均一多糖相对分子质量[J]. 中国民族民间医药, 2015, (2): 20.

[27] 赵 颖, 宋新波, 张丽娟. 高效凝胶色谱法测定甘草多糖相对分子质量及其相对分子质量分布[J]. 天津中医药, 2015, **32**(1): 46-48.

[28] 侯重文, 朱梓昂, 张金华, 等. 高效凝胶色谱法测定贻贝多糖含量及相对分子质量[J]. 中国生化药物杂志, 2016, **36**(11): 9-12.

[29] KAN H, BILL M, MIKE Y, *et al*. Molecular weight determination of aloe polysaccharides using size exclusion

chromatography coupled with multi-angle laser light scattering and refractive index detectors [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, **143**: 806-813.

[30] 胡卫珍, 齐振宇, 陈晓芳, 等. 凝胶渗透色谱联用多角度激光光散射测定铁皮石斛多糖相对分子质量及其分布[J]. 浙江农业科学, 2020, **61**(6): 1166-1167.

[31] ZHU B J, YAN Z Y, HONG L, *et al*. Quality evaluation of *Salvia miltiorrhiza* from different geographical origins in China based on qualitative and quantitative saccharide mapping and chemometrics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, **191**: 113583.

[32] 胡川梅, 郑硌侠, 陈　钢. 多糖类药用辅料的应用及其质量分析进展[J]. 中国药品标准, 2015, **16**(1): 31-35.

[33] KPODO F M, AGBENORHEVI J K, ALBA K *et al*. Structure and physicochemical properties of Ghanaian grewia gum [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **122**: 866-872.

[34] 刘　菁, 吴　燕, 李华龙, 等. SEC-RI-MALLS联用技术测定甲基纤维素的相对分子质量及相对分子质量分布[J]. 药物分析杂志, 2019, **39**(6): 1058-1062.

[35] 田　甜, 张阳洋, 冉文华, 等. GPC-MALLS联用技术测定羧甲纤维素钠分子质量及其分布[J]. 中国药品标准, 2020, **21**(6): 494-498.

[36] GRUBE M, PEREVYAZKO I, HEINZE T, *et al*. Revisiting very disperse macromolecule populations in hydrodynamic and light scattering studies of sodium carboxymethyl celluloses [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, **229**: 115452.

[37] ZONG Y Z, HAO W, TIAN T C, *et al*. Synthesis and structure characterization of sulfated galactomannan from fenugreek gum [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **125**: 1184-1191.

[38] GONZÁLEZ E Y, SABAGH B, MOLDENHAUER E, *et al*. Characterisation of chitosan molecular weight distribution bymulti-detection asymmetric flow-field flow fractionation(AF4) and SEC [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **136**: 911-919.

[39] 刘树新, 梁永波, 覃良媛. 多角度激光光散射检测器和体积排阻色谱法联用测定透明质酸相对分子质量及其分布[J]. 轻工科技, 2013, (2): 32-33.

[40] 张蕊鑫, 王智慧, 丛　威, 等. 一种用高效凝胶渗透色谱测试褐藻胶相对分子质量及相对分子质量分布的方法[J]. 过程工程学报, 2020, **20**(1): 99-107.

[41] PATEL B A, GOSPODAREK A, LARKIN M. Multi-angle light scattering as a process analytical technology measuring real-time molecular weight for downstream process control [J]. *MAbs*, 2018, **10**(7): 945-950.

[42] LI J, CAI C, ZHENG M M, *et al*. Alkaline extraction, structural characterization, and bioactivities of (1→6)-β-D-glucan from *lentinus edodes* [J]. *Molecules*, 2019, **24**(8): 1610.

[43] 王志昆, 范仁裕, 程艳菊, 等. 一种新型长效胰岛素类似物的结构一致性研究[J]. 药物生物技术, 2017, **24**(6): 483-488.

[44] ÉCIJA-ARENAS Á, ROMÁN-PIZARRO V, FERNÁNDEZ-ROMERO J M. Separation and characterization of liposomes using asymmetric flow field-flow fractionation with online multi-angle light scattering detection [J]. *J Chromatogr A*, 2021, **1636**: 461798.

[45] GRUBE M, DINU V, LINDEMANN H, *et al*. Polysaccharide valproates: structure-property relationships in solution [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, **15**(246): 116652.

[46] JIA X J, LIU Y, WAGNER A M, *et al*. Enabling online determination of the size-dependent RNA content of lipid nanoparticle-based RNA formulations [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2021, **1186**: 123015.

[47] CAROLINE M R O, ANTÔNIO A M G, ANGELO M, *et al*. Physical and biological effects of paclitaxel encapsulation on disteraroylphosphatidylethanolamine-polyethyleneglycol polymeric micelles [J]. *Colloids Surf B*, 2020, **188**: 110760.

[48] ADAMS G G, MEAL A, MORGAN P S, *et al*. Characterisation of insulin analogues therapeutically available to patients [J]. *PLoS One*, 2018, **13**(3): e0195010.

[49] BOUSSE T, SHORE D A, GOLDSMITH C S. Quantitation of influenza virus using field flow fractionation and multi-angle light scattering for quantifying influenza A particles [J]. *J Virol Methods*, 2013, **193**(2): 589-596.

[50] SOME D, AMARTELY H, TSADOK A, *et al*. Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering(SEC-MALS) [J]. *J Vis Exp*, 2019, **148**: 1-9.

[51] AWOTWE O D, AGARABIA C, READ E K. Product and process understanding to relate the effect of freezing method on glycation and aggregation of lyophilized monoclonal antibody formulations [J]. *Int J Pharm*, 2015, **490**(1/2): 341-350.

[52] SAHIN E, GRILLO A O, PERKINS M D. Comparative effects of pH and ionic strength on protein-protein interactions, unfolding, and aggregation for IgG1 antibodies [J]. *J Pharm Sci*, 2010, **99**(12): 4830-4848.

[53] GENTILUOMO L, SCHNEIDER V, ROESSNER D, *et al*. Coupling multi-angle light scattering to reverse-phase ultra-high-pressure chromatography (RP-UPLC-MALS) for the characterization monoclonal antibodies [J]. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 14965.

[54] 张伊洁, 郭宁子, 许丽晓, 等. 多肽微球缓释注射剂中载体辅料丙交酯乙交酯共聚物的关键质量属性分析[J]. 药物分析杂志, 2020, **40**(6): 988-998.

[55] YOSHIBA K, SAHEKI T, CHRISTENSEN B E, *et al*. Conformation, and cooperative order-disorder transition in aqueous solutions of β-1,3-D-glucan with different degree of branching varied by the Smith degradation [J]. *Biopolymers*, 2019, **110**(9): 1-8.

[56] NIE X R, FU Y, WU D T, *et al*. Ultrasonic-assisted extraction, structural characterization, chain conformation, and biological activities of a pectic polysaccharide from okra (*Abelmoschus esculentus*) [J]. *Molecules*, 2020, **25**(5): 1155.

