

# SEC-RI-MALLS 测定玻璃酸钠滴眼液分子量的 准确性与影响因素研究

钟雅妮<sup>1,2</sup>, 彭 纓<sup>1\*</sup>, 缪丽静<sup>2</sup>

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 珠海联邦制药股份有限公司, 广东 珠海 519040)

**摘要:** **目的** 通过分子排阻色谱-示差折光-多角度激光光散射联用技术 (SEC-RI-MALLS) 测定玻璃酸钠滴眼液的分子量及分布。**方法** 采用 TSK gel GMPWXL 色谱柱 (300 mm × 7.8 mm, 13 μm), 以 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 氯化钠溶液 (含 0.2 g·L<sup>-1</sup> 叠氮化钠) 作为流动相, 并联用示差折光检测器和十八角度激光散射检测器。**结果** 玻璃酸钠浓度在 0.037,8 ~ 0.075,6 mg·mL<sup>-1</sup> 范围内与示差信号呈高度线性关系 (相关系数 *r* 为 0.999,7); 分子量测定的重复性相对标准偏差 (RSD, *n* = 6) 为 0.7%, 显示出良好的耐用性。**结论** 该方法具有高度的准确度和耐用性, 适用于玻璃酸钠滴眼液的质量控制和研究。

**关键词:** 玻璃酸钠滴眼液; 质量控制; 分子排阻色谱-示差折光-多角度激光光散射联用; 分子量测定; 分子量分布

**中图分类号:** R94 **文献标志码:** A

玻璃酸钠是一种由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰基-D-氨基葡萄糖构成的糖胺聚糖钠盐, 广泛应用于眼科、关节腔注射及药用辅料等领域。其在眼科治疗中对干眼症和角膜损伤有显著疗效<sup>[1-4]</sup>, 且被收录于《中华人民共和国药典》2020 年版<sup>[5]</sup>。高分子量玻璃酸钠具有抗炎、免疫调节、抗氧化等生物活性, 能增强泪膜稳定性, 延长泪液破裂时间, 从而提升临床疗效。因此, 分子量及其分布的准确测定是评估玻璃酸钠滴眼液质量的关键<sup>[6-7]</sup>。

目前, 测定玻璃酸钠分子量的方法包括黏度法、分子排阻色谱法和分子排阻色谱-示差折光-多角度激光光散射联用技术 (SEC-RI-MALLS)。其中, SEC-RI-MALLS 因不依赖标准物质且具有高准确度和精密密度而受到关注<sup>[8-10]</sup>。《欧洲药典》<sup>[11]</sup>和日本药局方<sup>[12]</sup>均采用黏度法控制分子量, 但该方法存在局限性, 无法直接测定分子量及其分布。

本研究旨在建立并验证 SEC-RI-MALLS 测定玻璃酸钠滴眼液分子量及其分布的方法, 分析影响测定结果的因素, 并与黏度法进行对比。期望本研究能为玻璃酸钠滴眼液的质量控制提供更精确的科学依据, 推动其质量标准的提升。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

LC-10A 型高效液相色谱仪、RID-10A 型示差折光检测器 (日本株式会社岛津制作所), OPTILAB T-rex 型示差折光检测器、DAWN 型十八角度激光光散射检测器 (美国怀雅特技术公司), XS105DU 型、ML204 型电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司), Milli-Q IQ7000 型超纯水系统 (德

收稿日期: 2025-02-10

**作者简介:** 钟雅妮 (1980-), 女 (汉族), 广西北海人, 制药高级工程师, 主要从事药品研发工作, E-mail zhongyani@163.com; \***通信作者:** 彭纓 (1972-), 女 (满族), 吉林长春人, 教授, 博士生导师, 主要从事药物代谢、中药物质基础及质量控制研究, 小分子化合物的质谱裂解规律研究, Tel. 024-23986361, E-mail yingpeng1999@163.com。

国达姆施塔特默克集团)。

## 1.2 试剂与药品

叠氮化钠(国药集团化学试剂有限公司), 氯化钠(广东光华科技股份有限公司), 实验用水为超纯水, 玻璃酸钠工作对照品(批号为 WSB12-002, 含量质量分数为 98.7%, 珠海联邦制药股份有限公司中山分公司), 玻璃酸钠原料(批号为 1904100、1908070, 含量质量分数为 98.8%、99.1%, 华熙生物科技股份有限公司), 玻璃酸钠滴眼液(批号 9B214101、9B214102、9B214103 规格为 0.1%, 批号 04215101、04215102、04215103 规格为 0.3%, 珠海联邦制药股份有限公司中山分公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品的制备

供试品溶液: 取玻璃酸钠滴眼液适量, 加流动相稀释制成每 1 mL 中约含玻璃酸钠 0.06 mg 的溶液, 摇匀, 滤过, 取续滤液。

线性试验溶液: 取玻璃酸钠对照品约 50 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶, 加适量流动相分散, 振摇过夜, 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液; 精密量取对照品贮备液适量, 用流动相稀释分别制成每 1 mL 中约含玻璃酸钠 0.04、0.05、0.06 和 0.08 mg 的溶液, 摇匀, 滤过, 取续滤液。

回收率对照溶液: 取玻璃酸钠原料适量, 精密称定, 加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中约含玻璃酸钠 0.05 mg 的溶液, 滤过, 取续滤液。

回收率试验溶液: 按处方比例, 平行配制 6 份含玻璃酸钠 ( $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的溶液, 分别量取适量, 加流动相稀释制成每 1 mL 中约含玻璃酸钠 0.06 mg 的溶液, 摇匀, 滤过, 取续滤液。

### 2.2 SEC-RI-MALLS 法色谱条件

TSK gel GMPW<sub>XL</sub> 色谱柱 (300 mm × 7.8 mm, 13 μm), 以  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氯化钠溶液 (含  $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  叠氮化钠) 为流动相, 流速  $0.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 柱温  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 进样体积 400 μL, 十八角度激光散射检测器和示差折光检测器联用。用 ASTRA 软件计算分子量 ( $M_w$ ), 折光率增量 ( $\text{dn}/\text{dc}$ ) 为  $0.156 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

### 2.3 方法学验证

取“2.1”项下试验溶液, 考察方法的进样精密度、线性与范围及重复性, 并对多批次的玻璃酸钠滴眼液进行测定, 以验证方法的耐用性和准确性。

#### 2.3.1 进样精密度

取供试品溶液, 连续进样 5 次, 玻璃酸钠分子量测定结果的相对标准偏差 (RSD,  $n=5$ ) 仅为 0.3%, 进样精密度良好。数据详见表 1。

Table 1 Results of the precision investigation

表 1 进样精密度考察结果

序号	$M_w/(\times 10^4)$
1	98.4
2	98.1
3	97.6
4	98.1
5	98.0
平均值	98.0
RSD/%	0.3

### 2.3.2 线性与范围

在 SEC-RI-MALLS 技术中, 玻璃酸钠的分子量计算本质是将视差信号 ( $\Delta n$ ) 转化为浓度 ( $\rho$ ), 再联合多角度激光光散射信号求解光散射方程的过程。示差折光检测器通过测量流动相中溶质引起的折射率变化 ( $\Delta n$ ) 来反映浓度 ( $\rho$ ), 见公式 (1)。

$$\rho = \Delta n / (dn/d\rho) \quad (1)$$

其中  $\rho$  为玻璃酸钠在检测池中的瞬时质量浓度 (单位:  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $\Delta n$  为视差检测器输出的折射率差值信号,  $dn/d\rho$  为玻璃酸钠在流动相中的折射率增量 (单位:  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ )。

将浓度 ( $\rho$ ) 和多角度激光光散射检测器提供在多个角度下的散射光强度信息代入静态光散射的基本方程, 见公式 (2)。

$$K\cdot\rho/R(\theta) = 1/[M\cdot P(\theta)] \quad (2)$$

通过 ASTRA 软件对多角度光散射数据进行 Debye 图拟合, 外推至零角度, 即可从拟合直线的截距求得分子量, 该过程由软件自动计算完成。

SEC-RI-MALLS 法测定分子量无需依赖对照品, 然而, 为了评估样品浓度对实验结果的影响, 本研究引入了玻璃酸钠工作对照品进行试验验证。通过这种方法, 能够更准确地评估浓度变化对分子量测定准确性的影响。由于示差检测器的灵敏度相对低, 需要较高浓度的玻璃酸钠以确保测定结果的重现性。而十八角度激光散射检测器灵敏度高, 但检测器容量小, 玻璃酸钠浓度过高可能会导致响应信号过载或检测器污染堵塞, 因此, 选择合适的样品浓度尤为重要。采用“2.1”项下线性试验溶液进样测试。通过将示差信号 ( $y$ ) 与溶液浓度 ( $x$ ) 进行线性回归, 结果在玻璃酸钠浓度为  $0.037,8 \sim 0.075,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内, 分子量测定结果重现性良好, 相对标准偏差 (RSD,  $n = 4$ ) 为 1.6%。线性回归方程为  $y = 102.73 x - 0.068,7$ , 且相关系数 ( $r$ ) 为 0.999,7, 浓度与示差信号之间存在良好的线性关系。数据详见表 2。

Table 2 Results of linearity and range assessment

表 2 线性与范围考察结果

序号	浓度/( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	示差信号/( $\times 10^{-6}$ )	玻璃酸钠分子量		
			$M_w$ /( $\times 10^4$ )	均值/( $\times 10^4$ )	RSD/%
1	0.0378	3.857	99.13	98.04	1.6
2	0.0472	4.740	99.06		
3	0.0567	5.731	98.22		
4	0.0756	7.720	95.75		

### 2.3.3 重复性试验

取供试品溶液, 平行测定 6 份, 以玻璃酸钠分子量为考察指标, 结果相对标准偏差 (RSD,  $n = 6$ ) 为 0.7%, 方法的重现性良好。数据详见表 3。

Table 3 Results of reproducibility assessment

表 3 重复性考察结果

序号	$M_w/(\times 10^4)$
1	99.3
2	99.6
3	98.8
4	98.3
5	98.0
6	98.0
平均值	98.7
RSD/%	0.7

#### 2.3.4 回收率试验

取回收率对照溶液和试验溶液进样测试，依据试验溶液相对于对照溶液的分子量来计算回收率，平均回收率为 103.4%，相对标准偏差（RSD， $n = 6$ ）为 2.6%，方法的准确度良好。数据详见表 4。

Table 4 Results of recovery rate

表 4 回收率考察结果

序号	试验溶液 $M_w/(\times 10^4)$	对照溶液 $M_w/(\times 10^4)$	回收率/%	平均回收率/%	收率 RSD/%
1	100	94	106.4	103.4	2.6
2	99	94	105.3		
3	98	94	104.3		
4	98	94	104.3		
5	97	97	100.0		
6	97	97	100.0		

经进样精密度、线性与范围、重复性及回收率等方法学验证，结果表明，该方法具有良好的精密度，能够快速而准确地测定玻璃酸钠的分子量及其分布。

#### 2.4 样品测定结果

对多批次的玻璃酸钠滴眼液进行测定，并对数据进行分析，可知各个批次样品的分子量非常接近。分子量分布（PDI）以公式  $PDI = M_w/M_n$  计算，其中  $M_w$  为重均分子量， $M_n$  为数均分子量。分子量分布的值均未超过 2.0，显示出良好的一致性和质量控制。数据详见表 5，色谱图见图 1。

Table 5 Results of molecular weight and molecular weight distribution determination

表 5 分子量及分子量分布测定结果

批号	$M_w/(\times 10^4)$	$M_w/M_n$
9B214101	92	1.3
9B214102	93	1.3
9B214103	92	1.3
04215101	99	1.3
04215102	97	1.4
04215103	97	1.4

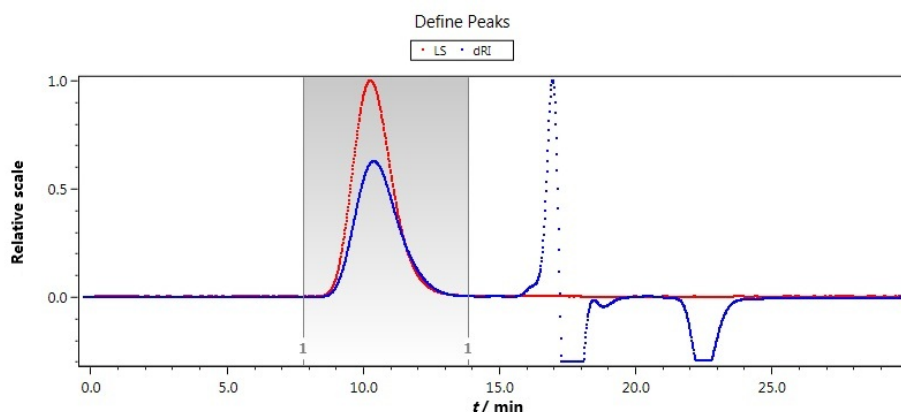


Fig.1 Chromatogram of the test sample

图 1 供试品测定色谱图

### 3 讨论

#### 3.1 结果分析

分子量的差异会影响玻璃酸钠的物理特性,例如黏度和黏附力,这些特性直接关系到其在眼表的润滑和保护效果。玻璃酸钠滴眼液的特性受其分子量和浓度的影响,不同分子量的玻璃酸钠滴眼液的临床研究结果难以直接比较。因此,在开发和评估玻璃酸钠眼科制剂时,必须重视分子量及其分布的测定和标准化<sup>[13]</sup>。例如,爱丽®药品说明书<sup>[14]</sup>明确指出其分子量范围为 500 ~ 1200 kDa。

分子量分布对玻璃酸钠滴眼液的质量控制至关重要。较窄的分子量分布范围意味着产品具有更好的一致性和更高的稳定性。相反,较宽的分子量分布范围可能会影响滴眼液的疗效和安全性。通过分析分子量分布,可以为玻璃酸钠滴眼液的质量评估提供关键参考。

在 SEC-RI-MALLS 联用系统中,分子量分布(PDI)的计算是由软件自动完成的。当样品通过色谱柱分离后进入 MALLS 和 RI 检测器。数据采集软件会对整个色谱峰的所有数据点进行积分和计算,从而得到整个样品的总  $M_w$  和总  $M_n$ 。最后,软件将自动计算出 PDI。

眼科制剂中玻璃酸钠的分子量及其分布是确保疗效和安全性的关键质量参数。Aragona 等<sup>[7]</sup>的研究表明,对于干眼症治疗而言,理想的玻璃酸钠滴眼液应具有较高的分子量和较低的分子量分布(小于 2.0)。PDI 越接近 1,表明样品的分子量分布范围越窄,分子链长度越均一。

本研究中测定的玻璃酸钠滴眼液显示出较窄的分子量分布范围,其分布系数介于 1.2 ~ 1.5,表明本研究中的玻璃酸钠样品纯度高,过大或过小的分子链含量少,产品质量稳定可控,从而保证临床使用的安全性和有效性。

#### 3.2 试验条件影响因素研究

取供试品溶液进行一系列试验,以评估柱温、流速、流动相以及色谱柱的变化对玻璃酸钠分子量测定结果的影响。试验结果显示,在上述条件发生微小变化时,玻璃酸钠分子量测定结果相对标准偏差(RSD,  $n = 10$ )为 3.1%,表明该方法具有很好的耐用性。数据详见表 6。

Table 6 Durability assessment results

表6 耐用性考察结果

参数	$M_w/(\times 10^4)$	RSD/%
SEC-RI-MALLS 法	99.4	3.1
柱温 33 °C	98.0	
柱温 37 °C	97.4	
流速 0.55 mL·min <sup>-1</sup>	98.3	
流速 0.65 mL·min <sup>-1</sup>	97.7	
0.18 mol·L <sup>-1</sup> 氯化钠溶液 (含 0.2 g·L <sup>-1</sup> 叠氮化钠)	96.6	
0.22 mol·L <sup>-1</sup> 氯化钠溶液 (含 0.2 g·L <sup>-1</sup> 叠氮化钠)	99.7	
Shodex™ SB-806 HQ 色谱柱	104.4	
TOSOH TSK gel GMPW <sub>XL</sub> 色谱柱	104.5	
不含抑菌剂	95.1	

### 3.3 测定参数解读

在 SEC-RI-MALLS 法中, 折射率增量 ( $dn/dc$ ) 为关键参数, 反映了溶液中溶质浓度变化与折射率变化之间的关系, 在测定过程中对于玻璃酸钠分子量的计算具有重要影响<sup>[15]</sup>。取玻璃酸钠, 以 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 氯化钠溶液 (含 0.2 g·L<sup>-1</sup> 叠氮化钠) 为溶剂, 配制一系列浓度的玻璃酸钠溶液, 作为试验溶液, 依次注入 OPTILAB T-rex 型示差折光检测器中, 记录各浓度对应的折光指数差值信号 ( $\Delta n$ )。以  $\Delta n$  对溶液质量浓度 ( $\rho$ ) 进行线性回归, 拟合直线的斜率即为该条件下的折射率增量 ( $dn/dc$ )。经测定, 本实验条件下玻璃酸钠的  $dn/dc$  值为 0.156 mL·g<sup>-1</sup>。

### 3.4 SEC-RI-MALLS 法与黏度法的对比研究

取不同处方的玻璃酸钠滴眼液, 分别按 SEC-RI-MALLS 法与黏度法进行分子量测定。数据详见表 7。对比两种方法分子量的测定结果可知, 两组数据之间没有显著差异, 且方法精密度均良好。尽管黏度法操作简单、成本相对较低, 但其测定结果易受多种因素的影响, 如要求玻璃酸钠溶液具有高纯度、必须知晓精确的浓度等, 同时其难以准确测定分子量分布。与之相比, SEC-RI-MALLS 法不需要如此严格的测定条件, 方法耐用性良好, 精准度高, 且无需使用标准品, 能够同时测定分子量及其分布。

Table 7 Results of comparative study

表7 对比研究结果

批号	SEM-RI-MALLS		黏度法平均分子量/( $\times 10^4$ )
	$M_w/(\times 10^4)$	$M_w/M_n$	
9B214101	92	1.3	94
9B214102	93	1.3	97
9B214103	92	1.3	94

### 3.5 联用技术优势

示差折光检测器与激光光散射仪联合使用, 在玻璃酸钠分子量的测定中展现出了显著的优势。

示差折光检测器根据溶液中不同物质折射率的差异来检测样品浓度的变化,而激光光散射仪则通过分析散射光的强度和角度来确定分子的尺寸和形状<sup>[16-17]</sup>。两者联用,能够从多个维度捕捉样品的特性,从而更精确地测量玻璃酸钠的分子量及其分布,显著提升了测定结果的准确性和可靠性。此外,这种联用技术无需使用标准品,能够快速准确地测定不同条件下玻璃酸钠的分子量及分布,降低测定的时间和成本。

## 4 结论

本研究详尽探讨了 SEC-RI-MALLS 技术在测定玻璃酸钠滴眼液分子量方面的应用。该技术的一个显著特点是无需依赖标准品,并且能够同时提供分子量分布信息,适用于各种不同处方的玻璃酸钠滴眼液分子量及其分布的测定。此外,本研究还深入分析了 SEC-RI-MALLS 法中的关键影响因素。通过方法学验证发现,即使在柱温、流速、流动相以及色谱柱等条件发生轻微变化时,方法的准确性未受影响,显示出良好的耐用性,可为玻璃酸钠及其制剂的生产提供快速而准确的数据支持。综合上述分析,SEC-RI-MALLS 法被证实是一种既可靠又准确的测定方法,能够有效测定玻璃酸钠滴眼液的分子量及分子量分布,可为确保产品质量提供强有力的技术支持。

### 参考文献:

- [1] 凌沛学,贺艳丽,郭学平.透明质酸[M].北京:中国轻工业出版社,2000:250-254.
- [2] 闫慧玲,陈冉,张洋,等.玻璃酸钠对膝关节炎患者疼痛和运动功能的影响[J].山西中医药大学学报,2024,25(4):455-461.
- [3] 黄岳山,潘艺茗,薛静.不同相对分子量透明质酸功能及应用的研究[J].透析与人工器官,2010,21(4):22-25.
- [4] 赖永勤,刘玉川,周正东,等.低分子量透明质酸功能与制备研究进展[J].食品与发酵科技,2015,6:77-80,99.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2020年版第一增补本:玻璃酸钠[M].北京:中国医药科技出版社,2023:692-693.
- [6] MEDIC N, BOLDIN I, BERISHA B, et al. Application frequency — key indicator for the efficiency of severe dry eye disease treatment — evidence for the importance of molecular weight of hyaluronan in lubricating agents[J]. Randomized Controlled Trial, 2024, 102(5): e663-e671.
- [7] ARAGONA P, SIMMONS P A, WANG H P, et al. Physicochemical properties of hyaluronic acid-based lubricant eye drops[J]. Transl Vis Sci Technol, 2019, 8(6): 2.
- [8] 魏无际,俞强,崔益华,等.高分子化学与物理基础[M].北京:化学工业出版社,2015:271-283.
- [9] 付阳,霍萃萌,姜垒,等.高聚物分子量两种测定方法对比初探[J].河南科学,2009,27(12):1520-1523.
- [10] 王凤,王凤舞,崔加友,等.小分子量透明质酸片段的4种分子量检测方法的对比研究[J].海峡药学,2019,31(12):89-93.
- [11] European Pharmacopoeia. Sodium Hyaluronate, EP 11.5[S]. Strasbourg: the Council of Europe, 2023: 1472.
- [12] Japanese Pharmacopoeia. Purified Sodium Hyaluronate Ophthalmic Solution[S]. Tokyo: Yakuji Nippo Ltd., 2022: 1711-1712.
- [13] Wolfgang G K. Why chain length of hyaluronan in eye drops matters[J]. Diagnostics, 2020, 10: 511.
- [14] 参天制药株式会社.玻璃酸钠滴眼液 0.1% / 玻璃酸钠滴眼液 0.3% / 玻璃酸钠迷你滴眼液 0.1% / 玻璃酸钠迷你滴眼液 0.3% 说明书[EB/OL]. (2022-07-15)[2026-04-14]. [https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/300237\\_1319720Q3078\\_1\\_18](https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/300237_1319720Q3078_1_18).
- [15] 王喜云,王远亮,吴扬兰,等.凝胶渗透色谱-十八角激光散射仪(GPC-MALLS)的应用:浓度、流量、温度对

- 高分子分子量及其分布的影响[J]. 光散射学报, 2007, 19(1): 49-54.
- [16] 黄志萍. 激光光散射仪及应用[J]. 现代仪器, 2009, 12(6): 44, 49-53.
- [17] 耿艳. 简析多角度激光散射仪的原理及应用[J]. 科技创新与应用, 2013, 13: 52.

## Accuracy and influencing factors of determination of molecular weight of sodium hyaluronate eye drops by SEC-RI-MALLS

ZHONG Yani<sup>1,2</sup>, PENG Ying<sup>1\*</sup>, MIAO Lijing<sup>2</sup>

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmacertical University, Shenyang 110016, China; 2. Zhuhai United Laboratories Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

**Abstract: Objective** To investigate the use of size-exclusion chromatography coupled with refractive index detector and multi-angle laser light scattering (SEC-RI-MALLS) for the determination of molecular weight and distribution of sodium hyaluronate eye drops. **Methods** The experiment utilized a TSK gel GMPW<sub>XL</sub> column (300 mm × 7.8 mm, 13 μm), with a mobile phase of 0.2 mol·L<sup>-1</sup> sodium chloride solution containing 0.02% sodium azide, and employed a differential refractive index detector in conjunction with an 18-angle laser light scattering detector. **Results** The results demonstrated a high linear relationship between the concentration of sodium hyaluronate (ranging from 0.037,8 to 0.075,6 mg·mL<sup>-1</sup>) and the differential signal (correlation coefficient *r* of 0.999,7). The repeatability of molecular weight measurement RSD (*n* = 6) was 0.7%, indicating the good robustness. **Conclusion** This method exhibits high accuracy, and robustness, making it suitable for quality control and research of sodium hyaluronate eye drops.

**Key words:** sodium hyaluronate eye drops; quality control; size exclusion chromatography-refractive index detector-multi-angle laser light scattering (SEC-RI-MALLS); molecular weight determination; molecular weight distribution