

应用纪要

利用Advanced Polymer Chromatography™研究水溶性生物聚合物中溶剂诱导的离子相互作用

Claudia Lohmann, Ekaterina Sobich, Samuel Kyeremateng, Esther Bochmann

Waters Corporation, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG

摘要

羧甲基纤维素钠(NaCMC)是一种水溶性且无毒的生物聚合物，广泛应用于各行各业的不同产品中，如食品和生物制药。它的增稠性、机械性能和粘弹性受分子量和取代度的影响，这些特性又会影响溶解度。将NaCMC加入产品之前进行适当地表征对于确保理想性能至关重要。鉴于离子性质，寻找适用于表征的流动相并非易事。本研究摒弃了传统耗时的体积排阻色谱方法，重点关注Advanced Polymer Chromatography™系统的方法开发，以快速筛选流动相，并测定两种不同粘度的五个NaCMC样品的分子量。由于被测流动相与聚合物之间的离子相互作用，我们观察到显著不同的色谱响应。中性pH和较高的盐度尽可能地减小了离子相互作用，并得到理想的色谱性能。

优势

- APC被证明是一种高效、快速开发方法的有用工具
- BEH AQ色谱柱可以在较宽的pH范围内产生低RSD的可重现结果

简介

多年来，工业中生物基聚合物（如纤维素及其衍生物）的产品和工艺不断增多¹。由于天然纤维素难以使用，往往通过修饰来改变它的溶解性和粘度等物理化学性质。NaCMC就是一个经过修饰的纤维素示例。对于单羧甲基钠取代，每个葡萄糖单位最多可以进行三个修饰（图1）。

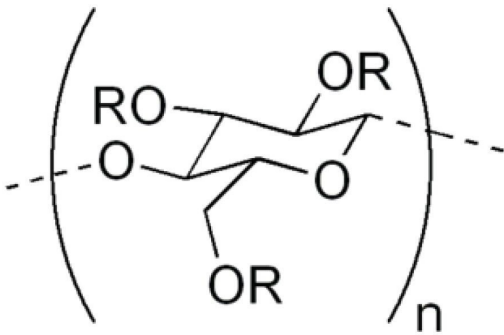


图1.可能的取代位置²。

不同的修饰过程得到的取代度（DS，即每个无水葡萄糖单位取代的羧甲基钠的平均数目）不同。NaCMC越来越多地应用于食品、制药、涂料、陶瓷和石油工业等各种行业。水性NaCMC溶液可以形成高粘性的溶液，因具有增稠、悬浮和稳定性能而得到应用，特别是用于食品和化妆品中。NaCMC有多种化学组成，分子量(MW)范围广。为了确定NaCMC的分子结构对应用性能的影响，需要了解其平均分子量信息²。随着NaCMC在工业中的重要性日益增加，人们开始关注表征这种物质的不同技术和方法。与其他多糖衍生物一样，这种纤维素基聚合物电解质由于分子量(MW)和化学成分的异质性，非常难以表征³。为了改善现有应用的功能或开发新的应用，必须要确定其物理化学特性，如DS、MW和流变性。相较于其他特性，DS对该化合物的溶解度有显著影响，否则，NaCMC会很容易溶于水。测定NaCMC的MW异质性及其分布最常用的是传统的体积排阻色谱(SEC)法^{4,5}。然而，传统的SEC测定通常需要较长的运行时间，而且由于吸附剂粒径较大以及仪器相关的谱带展宽的影响，分离度较低，导致对细微MW异质性的灵敏度通常不高⁶。UPLC SEC分离克服了这些不足，过去已成功用于表征生物基和半合成聚合物⁷。

要建立一个稳定的体积排阻色谱分析方法，有几个重要的因素必须考虑。主要因素包括固定相、流动相的选择以

及样品前处理。本研究的样品前处理采用内部方法，未做进一步研究，而是将重点放在使用给定的固定相BEH AQ色谱柱时流动相的选择上。

本研究的重点是在短时间内筛选多个流动相，以克服离子相互作用，采用Advanced Polymer Chromatography™ (APC™)可重现地测定NaCMC的MW。

实验

用去离子水溶解相应量的盐，制备APC的流动相，即pH = 5的乙酸盐缓冲液、pH = 8.8的NaOH稀释液和pH = 7的0.01 M NaNO₃ + 0.2 M NaH₂PO₄。用乙酸、盐酸和/或氢氧化钠调节pH值。

样品描述

样品组包含两种不同粘度的五个NaCMC样品。NaCMC 1和2为高粘度样品，NaCMC 3到5为中等粘度样品。取100 mg NaCMC溶于10 mL去离子水中，在80°C (70 rpm)的线性振摇水浴中溶解1小时。将溶液冷却至室温，然后用洗脱液稀释，制备1 mg/mL的样品溶液。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY APC™
检测条件:	示差折光检测器(RI)
色谱柱:	AQ900 Å + AQ 450 Å + AQ 125 Å/AQ 45 Å
柱温:	40 °C
样品温度:	25 °C
进样体积:	10 µL
流速:	1 mL/min和0.5 mL/min

数据管理

色谱软件：

带有GPC选项的Empower™ 3

结果与讨论

使用去离子水作为评估聚合物与聚合物以及聚合物与表面之间相互作用的流动相起点。在相同的保留时间范围内，5个NaCMC样品以近似的死体积(V_0)洗脱，形成带毛刺和肩峰的窄峰，如图2所示。在螺旋膨胀（因排斥而导致）和离子排斥的共同作用下，可以明显看到，先洗脱的成分几乎没有分离。NaCMC在水中的这种洗脱行为是聚合电解质在低离子强度极性溶剂中的典型表现⁹。这些电荷效应与固定相类型无关，因为以水为洗脱液时，NaCMC的洗脱行为与在凝胶色谱柱上观察到的相同⁹。

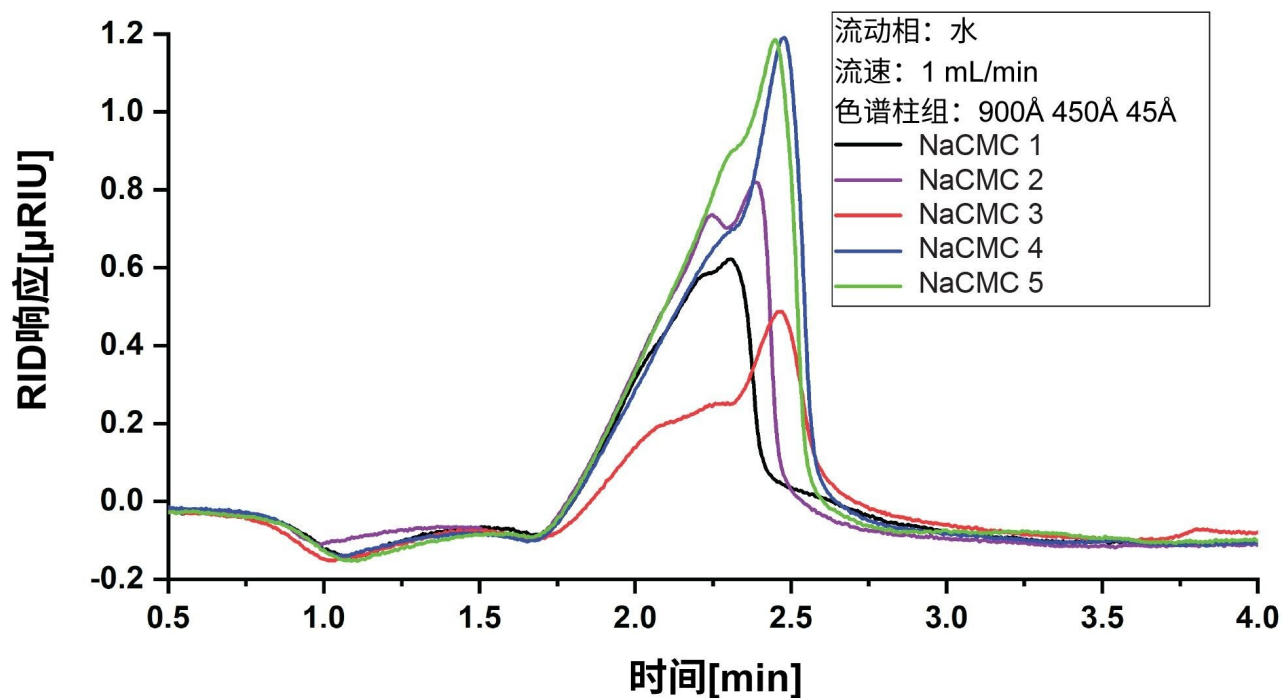


图2.以水作为流动相分析得到的NaCMC 1-5的RI叠加色谱图。

为了减轻NaCMC的聚电解质效应，方法开发工作流程的后续步骤包括改变pH值，同时添加盐，研究哪种组合能更有效地减少离子引起的排斥和其他影响。在pH 5的乙酸盐缓冲液中，样品峰的保留时间略有增加，色谱图显示出两个不同的峰，如图3所示。第一个峰对应于NaCMC，而5-6 min之间的第二个峰通过叠加样品色谱图上的空白运行鉴别为洗脱液的峰。这一结果排除了盐排斥的作用，即由于唐南平衡，盐从孔隙中排出³。主峰突然急剧上升表明有很大一部分样品从最大的色谱柱孔中排出，从而被洗脱而未分离。基于之前的研究，NaCMC会在缓冲溶液中形成缔合物^{10,11}。这些缔合物倾向于在色谱柱的死体积中洗脱，这可能是色谱图中峰急剧上升的原因。制备水溶性多糖，特别是带电多糖的无缔合物溶液是一个普遍的问题¹¹。很难辨别样品峰的拖尾是由于次级相互作用，还是由于样品中存在一部分低MW成分。因为硅胶是极性表面，可以得出结论，聚合物与表面的相互作用极小。然而，仔细观察色谱图发现，样品NaCMC 2、4和5在保留时间3.5-5分钟之间可能存在第二个峰群。可以排除色谱柱干扰这一因素，因为NaCMC 1和3没有表现出这种特征肩峰。我们可以将造成这种肩峰的馏分视为样品中固有的成分。总的来说，这种流动相条件不够充分，且辨别能力不足。

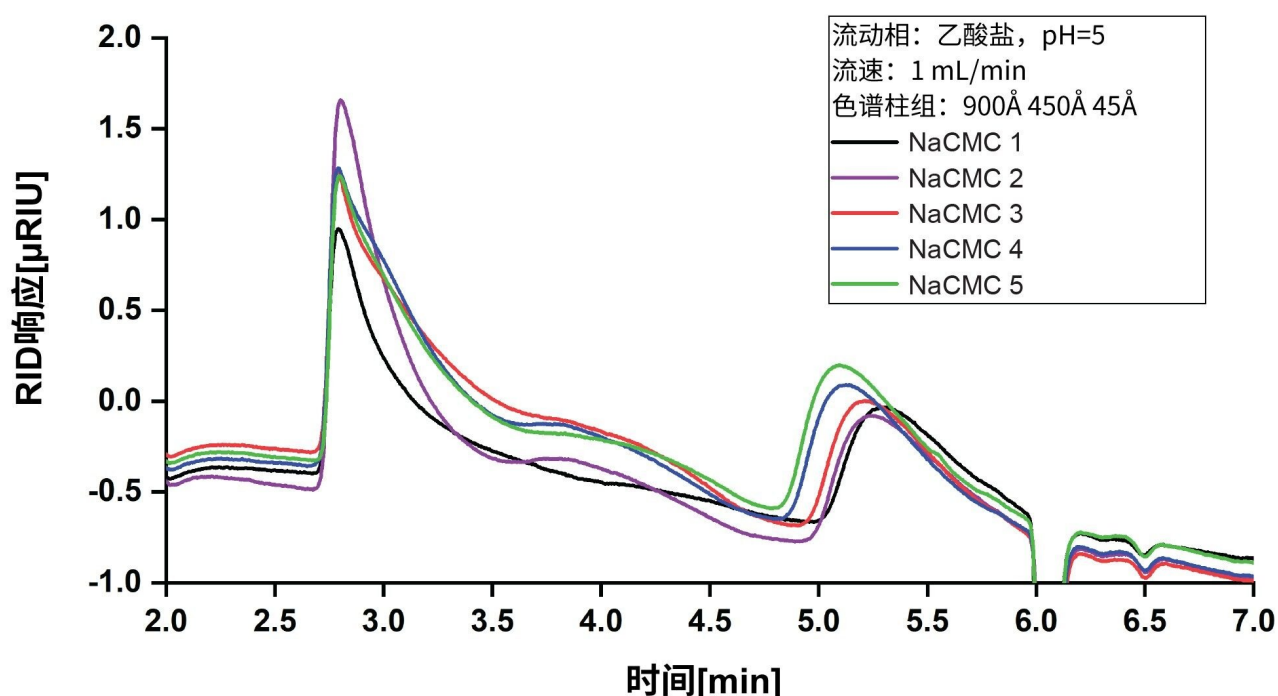


图3.利用pH 5的乙酸盐缓冲液分析所得的所有NaCMC样品的RI叠加图。

由于降低pH值只能轻微改善分离，因此考察了pH 8.8的NaOH稀释溶液，结果如图3所示。增加pH值的目的是研究图3中观察到的聚电解质效应是否能随着流速的降低而进一步减小。峰形较之前测试的流动相有所改善。仍有可

能发生相互作用，但由于高pH值对螺旋聚合物链形状的影响不同，相互作用的类型也不同。尽管峰形表面上看起来更一致，但高pH值的流动相并没有区分出不同粘度的5个样品。此外，在低pH值的乙酸盐缓冲液中观察到的第二个峰群在高pH值的流动相中也没有得到分离。因此，高pH值的流动相并没有显著提高分离效果。唯一的改善可能是由于将流速从1 mL/min减少到0.5 mL/min。

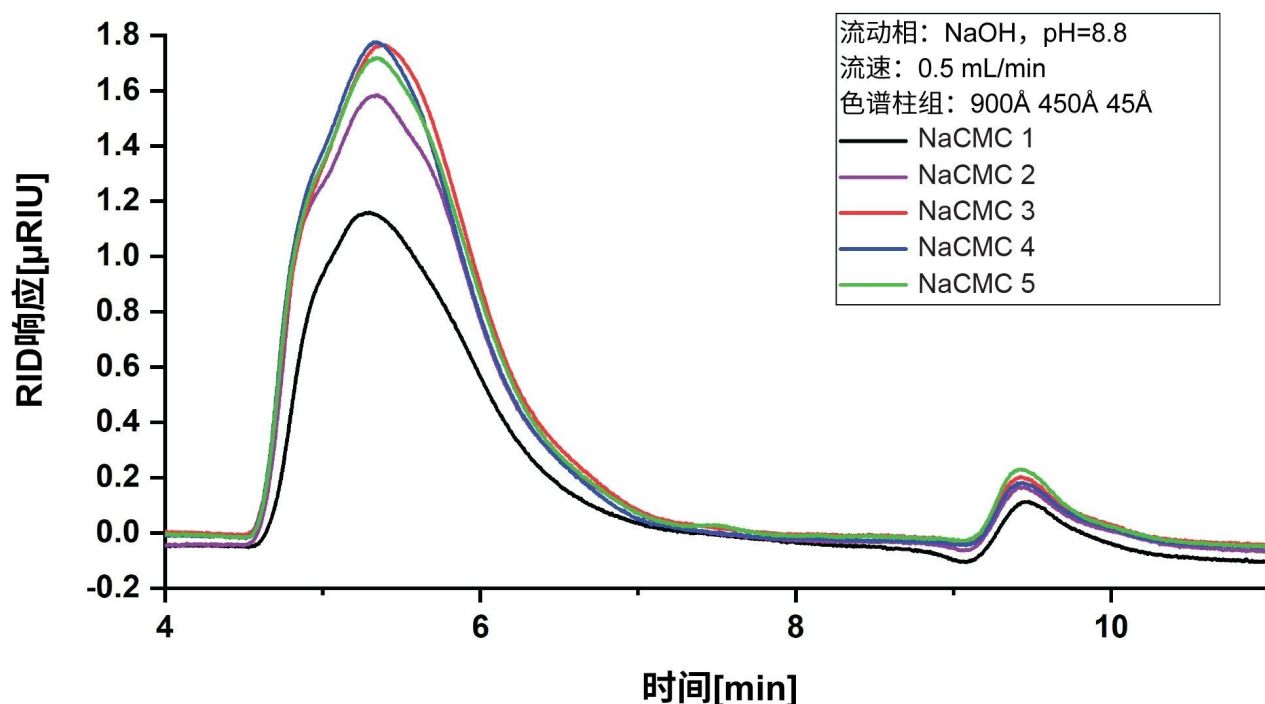


图4.利用pH 8.8的NaOH稀释液分析所得的所有NaCMC样品的RI叠加图。

在明确高、低pH值的流动相均不能充分抑制聚电解质典型行为的情况下，研究了使用中性pH的磷酸盐-硝酸盐流动相且提高盐量的影响¹²。此外，将之前的实验中使用的AQ 45 Å替换为AQ 125 Å色谱柱。分离在11分钟内完成。从图5中可以看出，因为NaCMC 1已经在低pH值实验中进行了观察，所以除NaCMC 1外，将其他样品分为两组。这表示NaCMC 1中低分子量组分的丰度不如其他样品明显。结果表明，使用含盐的中性pH流动相可以减少NaCMC与色谱柱填料之间不需要的相互作用。

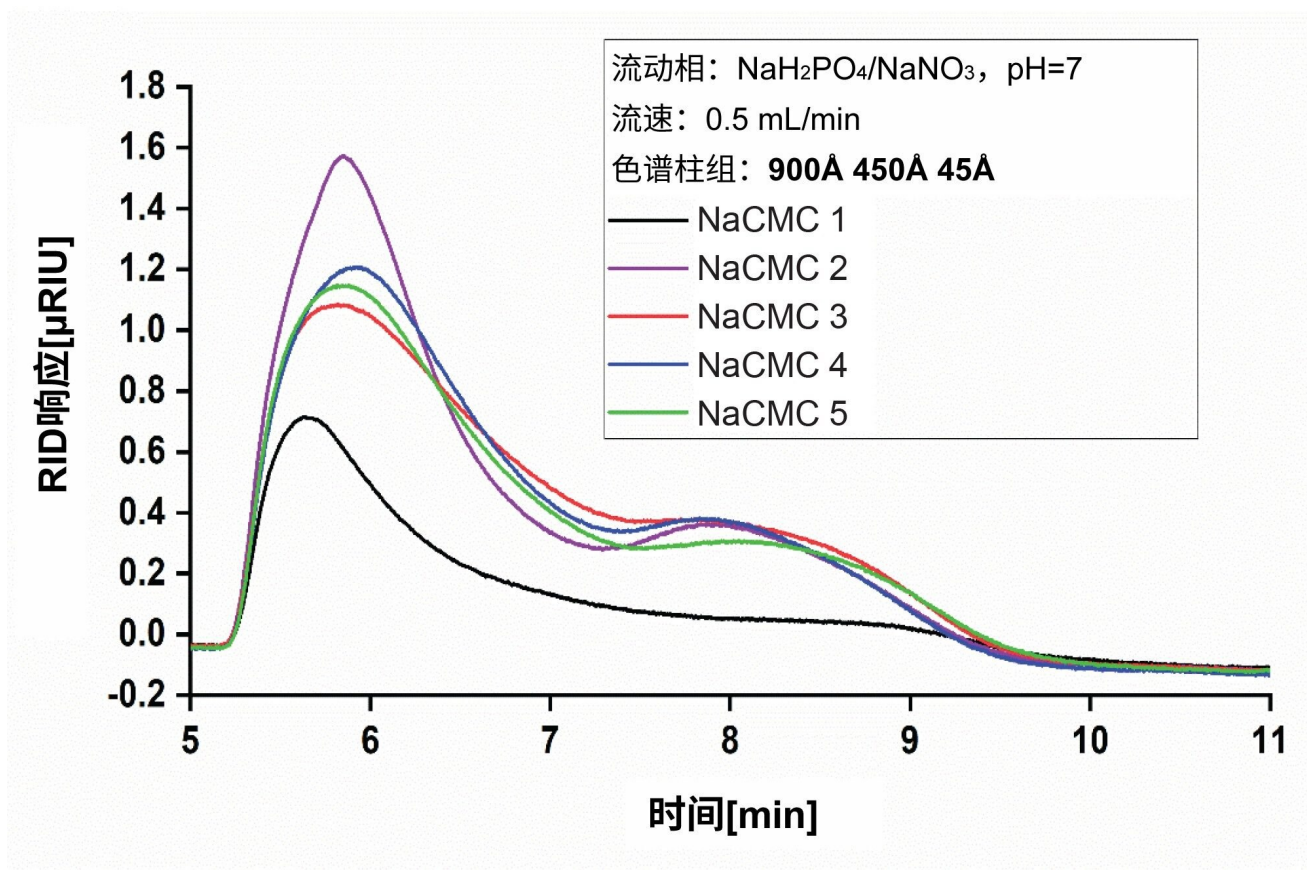


图5.利用pH 7的0.2 M NaH_2PO_4 /0.01 M NaNO_3 分析所得的所有NaCMC样品的RI叠加图。

所有NaCMC的测定分子量见表1。样品的相对标准偏差(RSD)计算值 <4.5 ，表明测量结果具有良好的重复性。此外，较低的RSD值也表明聚合物链在剪切作用下不存在潜在降解，因为降解会使信号（色谱图）的重复性降低，从而导致RSD值较高。

样品	Mn, kDa	%RDS	Mw, kDa	%RDS	Đ
NaCMC 1 (高粘度)	201.5	3.2	1051.9	1.8	5.23
NaCMC 2 (高粘度)	190.2	1.2	905.6	3.3	4.76
NaCMC 3 (中等粘度)	151.6	2.8	698.2	3.1	4.61
NaCMC 4 (中等粘度)	175.7	4.4	718.1	4.5	4.09
NaCMC 5 (中等粘度)	154.0	0.6	750.0	2.6	4.87

表1.利用pH=7的0.2 M NaH₂PO₄/0.01 M NaNO₃时，所有NaCMC样品的分子量和标准偏差。

如预期一样，高粘度样品NaCMC 1和2的最高重均分子量(MW)在900-1000 kDa范围内，中等粘度样品的MW在700-750 kDa范围内。此外，NaCMC 1的多分散性更强，Đ为5.23，而NaCMC 2的Đ为4.76。色谱图（图4）中可以清楚地看到显著差异，图4显示NaCMC 1主要由高MW组分和少量低MW组分组成，这些低MW组分显示为宽拖尾。相比之下，NaCMC 2有一个高MW组分以及第二个分离良好的低MW组分，该组分洗脱较晚，保留时间较长。另外，所有中等粘度样品的色谱图均有高和低MW组分。然而，与高粘度样品的高MW组分相比，中等粘度样品的高MW组分洗脱的保留时间相对较长。从这些图中可以明显看出，在每种粘度组中，没有相同的两个批次，特别是高粘度组中（NaCMC 1和NaCMC 2）。实际上，在样品进样前的过滤步骤中定性观察到，NaCMC 1的溶液粘度远远高于NaCMC 2和其他样品。比较测试的四种流动相，中性pH流动相与AQ 900 Å + 450 Å + 125 Å色谱柱相结合对NaCMC样品的分离效果最好。

结论

比较所有样品在增加盐度和低、高pH值下的色谱结果发现：

1. 聚电解质效应随流动相中盐含量的增加而减小
2. pH值在降低聚合物与聚合物的相互作用方面作用较小
3. 使用高盐度和中性pH值的组合，如pH 7的0.2 M NaH₂PO₄/0.01 M NaNO₃，所有样品都能得到可重现的MW值以及容易区分的色谱图。这种流动相能最有效地抑制离子效应
4. 即使是3根色谱柱组合使用，APC系统也能快速运行，有助于筛选流动相，无需耗时的溶剂交换步骤

参考资料

1. Shaghaleh H, Xu X, Wang S. Current Progress in Production of Biopolymeric Materials Based on Cellulose, Cellulose Nanofibers, and Cellulose Derivatives. *RSC Adv.* 2018;8:825–842.
2. https://en.wikipedia.org/wiki/Carboxymethyl_cellulose
3. Shakun, M, Maier, H, Heinze, T, Kilz, P, Radke, W. Molar Mass Characterization of Sodium Carboxymethyl Cellulose by SEC-MALLS. *Carbohydr Polym.* 2013;95:550–559.
4. Rinaudo M, Danhelka J, Milas M. A New Approach to Characterizing Carboxymethyl Celluloses by Size Exclusion Chromatography. *Carbohydr Polym.* 1993; 21:1–5.
5. Melander, M, Vuorinen T. Determination of Degree of Polymerization of Carboxymethyl Cellulose by Size Exclusion Chromatography, *Carbohydr Polym.* 2001;46:227-233.
6. Porsch, B, Wittgren, B. Analysis of Calcium Salt of Carboxymethyl Cellulose: Size Distributions of Parent Carboxymethyl Cellulose by Size-Exclusion Chromatography With Dual Light-Scattering and Refractometric Detection. *Carbohydr Polym.* 2005;59: 27-35.
7. Janco, M, Alexander IV, J N, Bouvier, E S P, Morrison, D. Ultra High-Performance Size-Exclusion Chromatography of Synthetic Polymers. *J Sep Sci.* 2013;36:2718–2727.
8. Perez-Moral, N, Plankeele, J-M, Domoney, C, Warren, F J. Ultra High-Performance Liquid Chromatography-Size Exclusion Chromatography (UPLC-SEC) As an Efficient Tool for the Rapid and Highly Informative Characterisation of Biopolymers. *Carbohydr Polym.* 2018;196: 422–426.
9. Eremeeva T E, Bykova T O. SEC of Mono-Carboxymethyl Cellulose (CMC) In a Wide Range of PH; Mark–Houwink Constants. *Carbohydr Polym.* 1998;36:319-326.
10. Gruber E. Microgel Particles in Solutions of Cellulose and Cellulose Derivatives. *Cellul Chem Technol*, 1979 Jan;3(3):258–278.
11. Kulicke W-M, Reinhardt U, Fuller GG, Arendt O. Characterization of the flow Properties of Sodium Carboxymethylcellulose via Mechanical and Optical Techniques. *Rheo Acta* 1999;38:26–33.
12. Cleaver G. Analysis of Carboxymethyl Cellulose via GPC Viscometry. 2015; www.agilent.com <

<http://www.agilent.com/>>

披露

Ekaterina Sobich、Esther Bochmann和Samuel Kyeremateng是AbbVie的员工，可能持有AbbVie的股份。

Claudia Lohmann是沃特世公司的员工，没有其他需要披露的利益冲突。AbbVie赞助并资助了这项研究；参与设计；参与数据的收集、分析和解析，还参与了最终出版物的撰写、审查和批准。

特色产品

ACQUITY超高效聚合物色谱系统 <<https://www.waters.com/134724426>>

2414示差折光(RI)检测器 <<https://www.waters.com/514425>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007774ZH, 2022年10月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号