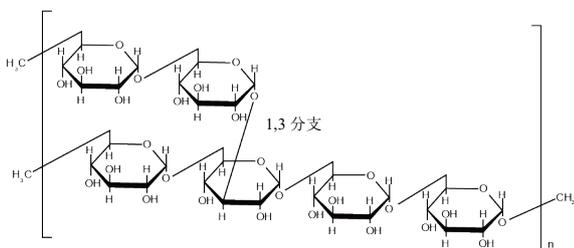




## 使用 SEC-MALS 监测多糖的结构变化

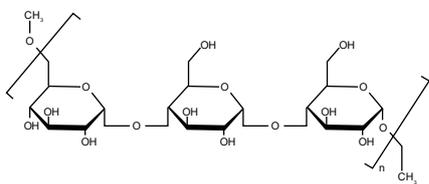
葡聚糖是最常见的多糖之一，是一种由葡萄糖单元间的  $\alpha$ -1,6 连接构成的大分子。另外， $\alpha$ -1,3（及稀有的  $\alpha$ -1,2）连接也可能存在，进而在主糖链上形成分支（见图 1）。这些材料的链长和支化度各有不同，因此其理化性质也有显著的多样性。葡聚糖主要商用于食品和制药行业，如疫苗、眼药、器官保存和血细胞分离等。同时，还可用作血浆的代用品。

图 1. 葡聚糖的结构



普鲁兰是另一种被广泛研究的多糖。它由麦芽三糖单元构成，含三个具有  $\alpha$ -1,4 连接的葡萄糖单体。这些单体通过  $\alpha$ -1,6 糖苷键进行连接（见图 2）。由于同时存在两种类型的糖苷键，因此产生了一种介于葡聚糖和直链淀粉之间的结构。该线性结构十分独特，使普鲁兰形成了特殊的结构灵活性和可溶性，进而产生了其他多糖所没有的独特的成膜和成纤特性。普鲁兰多糖广泛应用于食品、制造、电子和制药行业，如用于伤口愈合组合物、医药涂层、口腔护理产品和疫苗的无毒结合物等。

图 2. 普鲁兰的结构



多糖作为最丰富的天然生物聚合物，其独特的理化特性、出色的生物相容性使其成为众多行业的首选材料。同时，由于其应用范围广、结构复杂，因此需对其进行彻底检查，并充分了解其分子特性。例如，若要研究其扩散特性，需将分子大小纳入一个重要参数。另外，葡聚糖的大小是目前影响红细胞聚集的首要因素，其中小分子会抑制聚集，大分子会促进聚集。而且，构象和分支行为过多使某些多糖在某些应用中要么十分适合，要么问题严重。

本文以普鲁兰和葡聚糖为例就如何使用尺寸排阻色谱法（SEC）结合多角度光散射法（MALS）来测定多糖的结构变化进行说明。

### 实验条件

系统:	EcoSEC Elite® (HLC-8420) GPC 系统
色谱柱:	2 × TSKgel® GMPW <sub>XL</sub>
流动相:	水 + 0.01 mol/L NaNO <sub>3</sub> 和 0.02 % NaN <sub>3</sub>
流速:	0.7 mL/min
检测器:	示差折光 (RI) 和 LenS <sub>3</sub> ® MALS 检测器

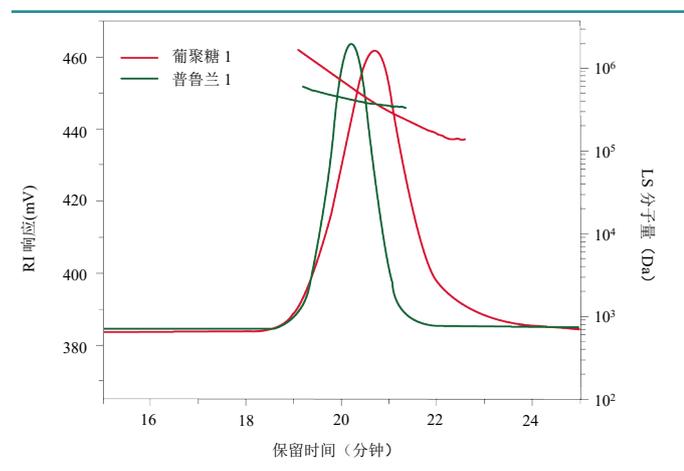
该系统使用分子量 (MW) 为 44 kDa 的聚氧化乙烯 (SE-5) 进行校准。洗脱液中 SE-5 溶液的浓度为 1.6 mg/mL，色谱柱中的注入量为 100  $\mu$ L。SE-5 比折光指数增量 (dn/dc) 为 0.132 mL/g。

### 结果和讨论

图 3 显示了普鲁兰 1 和葡聚糖 1 的 RI 色谱图。从洗脱曲线来看，普鲁兰 1 比葡聚糖 1 更早洗脱出来，表明葡聚糖 1 的流体力学体积 ( $V_h$ ) 小于普鲁兰 1。但是，样品的分子量分布（基于光散射）显示，相较于更早洗脱的普鲁兰 1，葡聚糖 1 的分子量更高。

从样品的洗脱和分子量分布曲线，我们可以得出结论，葡聚糖 1 的质量尺寸比（密度）高于普鲁兰 1，表明葡聚糖 1 的分子密度因分支而增加。

图 3. 葡聚糖 1 和普鲁兰 1 样品的色谱图



为进一步研究该假设，我们在相同的实验条件下，分析了一组分子量从 21 kDa 到 915 kDa 的线性普鲁兰标准品。使用 SECview 软件测定了普鲁兰标准品的回转半径 ( $R_g$ ) 和分子量，见表 1。值得注意的是，所有的标准品均测得了  $R_g$  值，包括较小的标准品。从技术上讲，传统的 MALS 检测器无法通过检测散射光的角度依赖性来测量 12 纳米以下尺寸的  $R_g$  值。LenS3 MALS 检测器设计新颖，测量范围更广，可以测量  $R_g$  值更小的聚合物。这里，最低可测量普鲁兰标准品（分子量为 21 kDa）的  $R_g$  值为 5.1 nm。

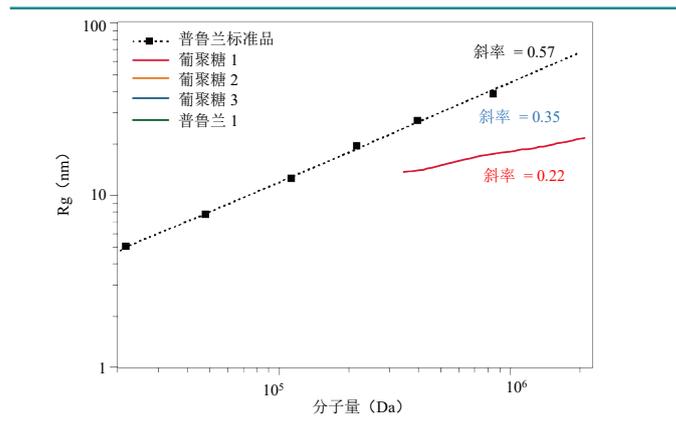
表 1. 葡聚糖和普鲁兰样品的分子量和  $R_g$  值

样品	$M_w$	CV (%)	$R_g$	CV (%)
普鲁兰标准品	21,749	0.48	5.1	4.3
	47,778	0.36	7.8	0.62
	113,042	0.20	12.6	1.2
	217,515	0.21	19.4	1.2
	399,466	0.20	27.3	0.6
普鲁兰 1	399,466	0.20	27.3	0.6
葡聚糖 1	487,449	1.15	17.3	1.33
葡聚糖 2	56,873	0.64	6.3	2.08
葡聚糖 3	284,999	0.67	13.8	0.51

$M_w$ =重均分子量，CV=变异系数（一式三份进样）

图 4 中的构象图显示，普鲁兰标准品的  $R_g$  和分子量之间的相关性呈线性，斜率为 0.57，符合良好溶剂中无规线团聚合物的预期。普鲁兰 1 的分布更加广泛，其分布结果正好落在外推的构象图上。

图 4. 普鲁兰和葡聚糖的构象图



除线性普鲁兰标准品外，我们还分析了不同分子量分布的葡聚糖，其结果见表 1 和图 4。低分子量葡聚糖（葡聚糖 2） $R_g$  值的整体分布与普鲁兰的构象图完全重合。该关系是分子密度的指标，表明低分子量的葡聚糖与普鲁兰具有相同的线性结构。相反，葡聚糖 1 和葡聚糖 3 的  $R_g$  与分子量关系的斜率分别为 0.22 和 0.35。其斜率值比线性普鲁兰小得多，表明其结构相对较密。

线性普鲁兰在洗脱液中形成的是无规线团结构。而葡聚糖，如前所述，特别是高分子量的葡聚糖中可能存在长链分支。因此，溶于洗脱液时，会形成一个更紧密的无规线团结构。该紧密结构会导致分子尺寸更小，因此从色谱柱中洗脱的时间更长。

## 结论

该研究表明，使用 SEC-MALS 分析，可以深入研究聚合物的结构差异。如前文示例所述，高分子量葡聚糖其主干上通常存在更多的分支，导致其在溶液中会形成更紧密的结构。因此，与相似 MW 的线性普鲁兰相比，其保留体积更高且  $R_g$  值更低。实践操作时，若要阐明低分子量和低  $R_g$  区域的结构变化，需配备一台高灵敏度的光散射仪器，并能够检测极细微的各向异性散射，如 LenS3 MALS 检测器。

## 产品信息

货号#	产品名称
ECOSYS Elite-RI	EcoSEC Elite GPC 系统
40000	LenS <sub>3</sub> 多角度光散射检测仪
08025	TSKgel GMPW <sub>XL</sub> , 13 μm, 7.8 mm ID × 30 cm
06212	SE-5, 3.9 × 10 <sup>4</sup> Da