

Molecular weight and molecular weight distribution of alginate determination by gel permeation chromatography

Ruixin ZHANG^{1,2}, Zhihui WANG^{1*}, Wei CONG¹, Fengji HUI³, Bin WANG³

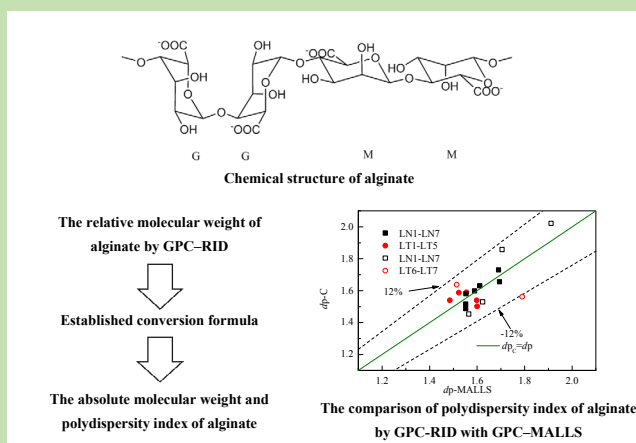
1. State Key Laboratory Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

2. School of Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. Shandong Jiejing Group Co., Ltd., Rizhao, Shandong 276800, China

Abstract: A method for the determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginate by gel chromatography and conventional detector was proposed. Alginates in a wide range of viscosities extracted from two dominated raw materials—*Lessonia nigrescence* and *Lessonia trabeculata* were taken as the samples. The relative molecular weight of alginate was determined by high-performance gel permeation chromatography (GPC) combined with refractive index detector (RID) with pullulan served as a standard. The corresponding relations of relative weight average molecular weight ($\overline{M}_{w,R}$), relative number average molecular weight ($\overline{M}_{n,R}$) measured by GPC–RID and absolute weight average molecular weight (\overline{M}_w), absolute number average molecular weight (\overline{M}_n) measured by multi-angle laser scattering (GPC–MALLS) were obtained by least square method. The results showed that there was a good linear correlation between the relative molecular weight of alginate determined by GPC–RID and the absolute molecular weight of alginate determined by GPC–MALLS. The correlation index was more than 0.9. The relative error between the absolute weight average molecular weight determined by the established GPC–RID method and the absolute weight average molecular weight determined by GPC–MALLS was less than $\pm 12\%$. The relative error between the absolute number average molecular weight determined by the established GPC–RID method and the absolute number average molecular weight determined by GPC–MALLS was less than $\pm 12\%$. The polydispersity index calculated by the established GPC–RID method was less than $\pm 12\%$, compared with that obtained by GPC–MALLS method. The GPC–RID method for the determination of the relative molecular weight of alginate can be used to determinate the absolute molecular weight and the polydispersity index of alginate. It manifested that it was feasible and economical to use the GPC–RID method provided in this work for the determination absolute of the absolute weight molecular weight, absolute number molecular weight and polydispersity index of alginate. The method can save the investment on the instrument and reduce the cost of determination the molecular weight of alginate.

Keywords: alginate; weight average molecular weight; number average molecular weight; polydispersity index; high-performance gel permeation chromatography; multi-angle laser scattering



收稿: 2019-04-10, 修回: 2019-05-12, 网络发表: 2019-06-03, Received: 2019-04-10, Revised: 2019-05-12, Published online: 2019-06-03

基金项目: 中国科学院科技服务网络计划(STS 计划)重点项目(编号: KFJ-STZ-QYQYXZ-017); 海藻生物炼制联合实验室项目

作者简介: 张蕊鑫(1993-), 女, 黑龙江省铁力市人, 硕士研究生, 生物化工专业, E-mail: Ruixin_zh@163.com; 王智慧, 通讯联系人, E-mail: zhhwang@ipe.ac.cn.

引用格式: 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分子量及分子量分布的方法. 过程工程学报, 2020, 20(1): 99–107.
Zhang R X, Wang Z H, Cong W, et al. Molecular weight and molecular weight distribution of alginate determination by gel permeation chromatography (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2020, 20(1): 99–107, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.219177.

一种用高效凝胶渗透色谱测试褐藻胶分子量及分子量分布的方法

张蕊鑫^{1,2}, 王智慧^{1*}, 丛威¹, 惠锋基³, 王斌³

1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190

2. 中国科学院大学化工学院, 北京 100049

3. 山东洁晶集团股份有限公司, 山东 日照 276800

摘要:提出了一种用凝胶色谱与常规检测器检测褐藻胶分子量及其分布的方法。用高效凝胶渗透色谱(GPC)与示差检测器(RID)结合,建立了以普鲁兰标准品为对照的相对重均分子量、相对数均分子量与 GPC-MALLS(多角度激光散射)测试的褐藻胶绝对重均分子量、绝对数均分子量间的转换关系,得到了用 GPC-RID 检测相对分子量计算褐藻胶绝对分子量和多分散系数的方法。结果表明, GPC-RID 法经转换公式得到的重均分子量、数均分子量和多分散系数与 GPC-MALLS 法的相对误差在±12%以内。基于 GPC-RID 法可较准确地获得褐藻胶的绝对分子量及多分散系数,使用通用检测器可节约仪器投资,降低检测成本。

关键词:褐藻胶; 重均分子量; 数均分子量; 多分散系数; 高效凝胶渗透色谱; 多角度激光散射

中图分类号: O657.7; TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2020)01-0099-09

1 前言

褐藻胶一般指褐藻酸钠,又称海藻胶或海藻酸钠,是存在于海洋褐藻中的天然高分子糖醛酸聚合物,是一种丰富的海洋植物产物^[1,2],常作为增稠剂、稳定剂、成胶剂、成膜剂和水合剂等^[3],广泛用于食品、化工、环境和生物医药等领域^[4-10]。分子量及其分布宽度直接影响褐藻胶的粘度、流变特性、成膜性能等性质,是影响褐藻胶加工和应用的重要因素^[11,12]。

通常利用多分散系数,即重均分子量与数均分子量的比值($d_p = \overline{M_w}/\overline{M_n}$)表征高聚物的分散程度,多分散系数越接近 1,分子量分布越窄^[13]。高效凝胶渗透色谱法(GPC)根据分子体积排阻原理,溶质的淋出体积与其分子量有关,分子量越大,淋出体积越小,用统计学方法计算平均相对分子量,是目前应用最广泛的检测聚合物分子量的方法,但需化学结构与待测物质相同或相似的一系列不同分子量的标准品作为对照,测试结果为与标准品相对照的相对分子量,受柱效、标准品种类等多种因素影响^[14,15]。褐藻胶是由 α -L-甘露糖醛酸(M 单元)与 β -D-古罗糖醛酸(G 单元)以 3 种方式(M-M, M-G 或 G-M, G-G)连接而成的线性高分子糖醛酸聚合物^[16],目前尚没有与褐藻胶结构相同的标准品。近年发展起来的凝胶渗透色谱与多角度激光散射联用(GPC-MALLS)方法无需标准品,可用于测试高分子绝对分子量和多分散系数^[17,18],但多角度激光散射检测器价格昂贵,使用成本较高,限制了其应用。

本工作旨在提供一种基于 GPC 与示差检测器(RID)检测褐藻胶的相对分子量,进而计算绝对分子量和多分散系数的方法。RID 作为一种通用检测器,可节约仪器投资,降低检测成本。以普鲁兰为标准品,通过 GPC-RID 检测不同粘度的褐藻胶样品,得普鲁兰当量的相对重均分子量和相对数均分子量,通过最小二乘法拟合建立由 GPC-RID 方法得到的相对分子量与 GPC-MALLS 检测得到的绝对分子量间的对应关系,由相对分子量参数与绝对分子量参数的对应关系计算得褐藻胶的绝对分子量参数和表征分子量分布宽度的多分散系数。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 实验材料与试剂

褐藻胶样品(山东洁晶集团股份有限公司)。变黑雷松藻(*Lessonia nigrescence*)和螺纹雷松藻(*Lessonia trabeculata*)是我国褐藻胶生产的主要原料,测试了以这 2 种褐藻为原料生产的不同粘度的褐藻胶产品。从变黑雷松藻中提取的褐藻胶粘度为 106~1327 mPa·s,标记为 LN1~LN11,从螺纹雷松藻中提取的褐藻胶粘度为 200~936 mPa·s,标记为 LT1~LT7。不同粘度的褐藻胶样品(表 1)用于建立相对分子量与绝对分子量的对应关系,选用与表 1 样品生产批次、原料产地及粘度不同的褐藻胶样品(表 2)验证建立的褐藻胶绝对分子量检测方法。

氯化钠(色谱级)和海藻酸钠(分析纯)购自阿拉丁试剂公司,普鲁兰系列标准品, P800($M=642\,000$ Da), P400

($M=337\,000$ Da), P200($M=194\,000$ Da), P100 ($M=107\,000$ Da), P50($M=47\,100$ Da), 购自日本 Shodex 公司。一次性无菌注射器(1 mL, 江苏治宇医疗器材有限公司), 水系微孔滤膜(孔径 $0.45\ \mu\text{m}$, 北京升河诚信膜科技发展有限公司), 水系针头滤器(孔径 $0.22\ \mu\text{m}$, 美瑞泰克公司)。

表 1 褐藻胶样品及粘度

Table 1 Samples and their viscosities of alginate

Material	Sample	Viscosity/(mPa·s)
<i>Lessonia nigrescence</i>	LN1	106
	LN2	326
	LN3	727
	LN4	820
	LN5	1000
	LN6	1206
	LN7	1327
<i>Lessonia trabeculata</i>	LT1	200
	LT2	324
	LT3	615
	LT4	858
	LT5	936

表 2 褐藻胶样品及粘度

Table 2 Samples and their viscosities of alginate

Material	Sample	Viscosity/(mPa·s)
<i>Lessonia nigrescence</i>	LN8	361
	LN9	737
	LN10	1031
	LN11	1244
	LT6	676
<i>Lessonia trabeculata</i>	LT7	826

2.1.2 实验仪器

ME204 电子分析天平(称量最大值 $\text{Max}=220\ \text{g}$, 分辨率 $d=0.1\ \text{mg}$, 瑞士 Mettler Toledo 公司), MX-S 涡旋振荡混匀仪(美国 SCILOGEX 公司), SHZ-D 循环水式多用真空泵(河南省予华仪器有限公司), SB-3200D 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司), Agilent 1200 高效液相色谱仪(GPC, 美国安捷伦科技有限公司), Optilab T-rEX 示差折射率测定仪(RID, 美国怀雅特公司), 高效凝胶色谱-多角度激光散射系统(GPC-MALLS)包括: DAWN HELEOS II 18 角度激光光散射仪(MALLS, 美国怀雅特公司)、TSK gel G6000 PW_{XL} 凝胶色谱柱(日本东曹公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品溶液的制备

根据文献[19]方法, 将褐藻胶样品分别与流动相溶液混合, 配制成浓度为 $1\ \text{g/L}$ 的待测溶液, 用涡旋振荡混匀仪振摇, 静置溶解 24 h, 用一次性无菌注射器经 $0.22\ \mu\text{m}$ 的水系针头滤器过滤待用。

μm 的水系针头滤器过滤待用。

2.2.2 褐藻胶绝对分子量和多分散系数的确定

将 GPC 与 MALLS 或 RID 联用, 色谱条件如下: 检测器温度为 $35\ ^\circ\text{C}$, 色谱柱为 TSK-gel G6000 PW_{XL} 凝胶色谱柱, 流速 $0.5\ \text{mL/min}$, 进样体积 $20\ \mu\text{L}$ 。将制备的褐藻胶样品溶液重复测试 3 次, 采集样品信号, 记录色谱图, 用 Astra 软件数据处理得褐藻胶样品的绝对重均分子量(\overline{M}_w)、绝对数均分子量(\overline{M}_n)和多分散系数(d_p)^[20]。为区分各检测方法及方便描述, 将 GPC-MALLS 测试的绝对重均分子量、绝对数均分子量和多分散系数分别记为 \overline{M}_w -MALLS, \overline{M}_n -MALLS 和 d_p -MALLS; 将 GPC-RID 检测得的相对重均分子量、相对数均分子量和基于相对分子量的多分散系数分别标记为 $\overline{M}_{w,R}$, $\overline{M}_{n,R}$ 和 $d_{p,R}$; 将本工作建立的采用 GPC-RID 检测相对分子量进而通过转换公式计算得到的绝对重均分子量、绝对数均分子量和多分散系数分别标记为 \overline{M}_w -Cal, \overline{M}_n -Cal 和 d_p -Cal。

2.2.3 相对分子量的检测

GPC 测试相对分子量的色谱条件与文献[19]相同: 高效液相色谱仪与 RID 联用, 色谱条件与 2.2.2 相同。

标准品溶液的制备: 将不同分子量的普鲁兰标准品分别与流动相溶液混合, 配成浓度为 $1\ \text{g/L}$ 的标准品溶液, 用涡旋振荡混匀仪振摇, 充分溶解后, 用一次性无菌注射器经 $0.22\ \mu\text{m}$ 的水系针头滤器过滤后待用。

标准曲线的建立: 用 GPC 检测不同分子量的普鲁兰标准品, 以峰位的洗脱体积(V)为横坐标, 分子量的对数($\lg M$)为纵坐标, 绘制标准曲线。

褐藻胶相对分子量和多分散系数的测定: 褐藻胶溶液用 GPC 分析, 重复 3 次, 用 Agilent ChemStation 软件对采集的样品色谱图积分处理, 并用其插件 GPC-Addon 依据建立的标准曲线处理样品的积分数据, 得褐藻胶样品的相对重均分子量($\overline{M}_{w,R}$)、相对数均分子量($\overline{M}_{n,R}$)和多分散系数($d_{p,R}=\overline{M}_{w,R}/\overline{M}_{n,R}$)。

色谱图横坐标是时间, 流速与时间的乘积为淋出体积, 纵坐标为检测器的响应值。褐藻胶是分子量分布较宽的高聚物, 处理数据时将谱图平均分成 n 条, 即整个样品分成 n 级, 每级的溶液体积相等, 但浓度和分子量不同, 根据下式分别计算样品的相对重均分子量[式(1)]、相对数均分子量[式(2)]和多分散系数[式(3)]^[13]:

$$\overline{M}_{w,R} = \sum_i W_i M_i = \sum_i H_i M_i / \sum_i H_i \quad (1)$$

$$\overline{M}_{n,R} = \left(\sum_i \frac{W_i}{M_i} \right)^{-1} = \sum_i H_i / \sum_i \frac{H_i}{M_i} \quad (2)$$

$$d_{p,R} = \overline{M_{w,R}} / \overline{M_{n,R}} \quad (3)$$

式中, W_i , H_i 和 M_i 分别为第 i 级的质量分数、响应值高度和分子量, M_i 通过标准曲线求得。

2.2.4 GPC-RID 绝对分子量检测方法的建立

根据 2.2.3 中方法, 以普鲁兰标准品为对照, 通过 GPC-RID 测得相对重均分子量和相对数均分子量。用最小二乘法分别将其与 GPC-MALLS 测试的绝对重均分子量和绝对数均分子量拟合, 获得由相对分子量参数转换为绝对分子量参数的计算公式, 计算得绝对重均分子量($\overline{M_w}$ -Cal)、绝对数均分子量($\overline{M_n}$ -Cal)及多分散系数(d_p -Cal)。

用 GPC-RID 法测得褐藻胶样品的普鲁兰当量的相对重均分子量和绝对重均分子量, 根据转换公式计算得绝对分子量和多分散系数, 与 GPC-MALLS 方法的测试值对比, 计算相对误差。

将褐藻胶样品各取 3 份, 分别溶解于流动相, 用涡旋振荡混匀仪振摇, 静置溶解 24 h, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 水系针头滤器过滤^[7], 以普鲁兰系列标准品为对照, 测得相对分子量, 根据转换公式计算绝对分子量和多分散系数, 并计算每个样品的绝对分子量和多分散系数的平均值和相对标准偏差。

3 结果与讨论

3.1 GPC-RID 色谱条件的确定

3.1.1 流动相溶液的确定与制备

文献[19–24]中 GPC 方法测试褐藻胶分子量采用的流动相有 0.1 mol/L NaNO_3 溶液、0.1 或 0.2 mol/L NaCl 溶液和蒸馏水, 褐藻胶粘度主要在 $600 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 以下^[21–23], 本工作将褐藻胶粘度扩展至 $1300 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 。考察了流动相对褐藻胶尤其是高粘度褐藻胶的影响。图 1 为不同流动相下褐藻胶样品的 GPC 色谱图。以蒸馏水为流动相检测的海藻酸钠粘度约为 $300 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, 以 0.1 mol/L NaCl 溶液、0.1 mol/L NaNO_3 溶液和 0.2 mol/L NaCl 溶液为流动相检测褐藻胶样品 LT4 (粘度为 $858 \text{ mPa}\cdot\text{s}$)。由图可见, 蒸馏水为流动相时, 褐藻胶在水中产生阴离子排斥作用, 分子处于伸展状态, 流体力学体积较大, 分离效果不稳定, 峰形较宽, 出峰时间早, 因此, 不需要进一步以蒸馏水为流动相考察更高粘度褐藻胶样品的色谱行为。以强电解质溶液为流动相时, 褐藻胶分子伸展减弱, 色谱行为较稳定^[24], 3 种盐溶液为流动相时, 色谱行为相差不大, 由于 NaNO_3 较难购买, 后续实验均采用 0.1 mol/L NaCl 溶液为流动相。 NaCl 溶液经 $0.45 \mu\text{m}$ 水系微孔滤膜用循环水式真空泵过滤后超声脱气。

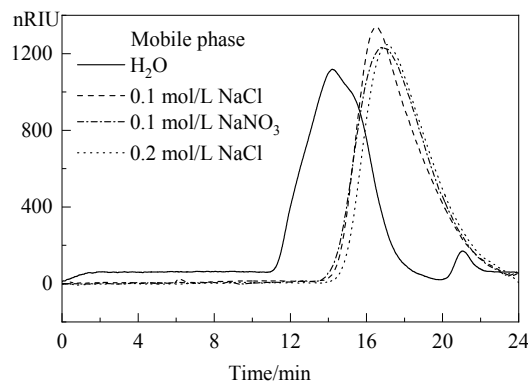


图 1 不同流动相下褐藻胶样品的 GPC 色谱
Fig.1 GPC chromatogram of alginate samples in different mobile phases

3.1.2 普鲁兰标准曲线

将不同分子量的普鲁兰标准品溶于流动相溶液中, 进行色谱检测, 记录洗脱体积(V), 每个样品重复 3 次, 相对标准偏差小于 1.4%。将 $\lg M$ 与洗脱体积 V 进行回归处理, 得到 t 时刻淋出级分的分子量(M_t)与洗脱体积(V_t)的对应关系, 即式(4)所示的线性回归方程, 其相关系数 $R^2=0.9915$, 具有较好的线性回归关系(图 2)。2.2.3 中色谱条件和 3.1.1 的流动相适用于测试褐藻胶和普鲁兰系列标准品。根据建立标准曲线, 用高效液相色谱软件 Agilent ChemStation 处理褐藻胶的色谱峰, 得褐藻胶洗脱体积 V_t 对应的普鲁兰当量的分子质量 M_t , 通过式(1)和(2)分别计算普鲁兰当量的相对重均分子量和相对数均分子量, 根据式(3)计算相对分子量的多分散系数。

$$\lg M_t = -0.552V_t + 10.835, \quad R^2 = 0.9915 \quad (4)$$

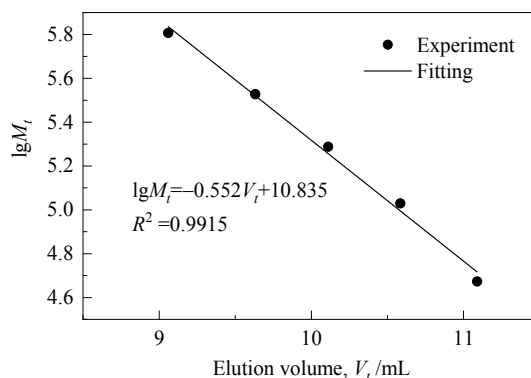


图 2 普鲁兰标准曲线
Fig.2 Standard curve of pullulan

3.2 褐藻胶的重均分子量

表 3 为褐藻胶的绝对重均分子量($\overline{M_w}$ -MALLS)与相对于普鲁兰的相对重均分子量($\overline{M_{w,R}}$)。由表可知, $\overline{M_{w,R}}$

远大于 $\overline{M_w}$ -MALLS，原因是 NaCl 强电解质离子流动相中，普鲁兰或褐藻胶与聚甲基丙烯酸类凝胶色谱柱间的离子相互作用被消除，色谱行为只与分子尺寸相关，由于相同分子量时褐藻胶的分子尺寸比普鲁兰大，出峰时间早，导致式(4)计算的相对分子量远大于褐藻胶的绝对分子量，而二者均为线性结构，普鲁兰当量的相对分子量与褐藻胶绝对分子量的变化趋势一致，与 Ci 等^[25]的推测一致。通过最小二乘法对表 3 中褐藻胶的相对重均分子量和绝对重均分子量进行拟合，结果如图 3 所示，两种原料生产的褐藻胶的相对重均分子量和绝对重均分子量符合相同的线性关系，相关系数 $R^2=0.9494$ ，表明两种原料生产的褐藻胶的糖醛酸组成差异并未对褐藻胶的色谱行为产生影响，可用相同的重均分子量转换公式。

$$\overline{M_w}\text{-Cal}=0.32\overline{M_{w,R}}-142.1, \quad R^2=0.9494 \quad (5)$$

表 3 褐藻胶的绝对重均分子量($\overline{M_w}$ -MALLS)与相对于普鲁兰的相对重均分子量($\overline{M_{w,R}}$)

Table 3 Absolute weight average molecular weight of alginate ($\overline{M_w}$ -MALLS) and relative weight average molecular weight ($\overline{M_{w,R}}$)

Sample	$\overline{M_{w,R}}$ /kDa	$\overline{M_w}$ -MALLS/kDa
LN1	1015.7	176.7
LN2	1329.6	300.1
LN3	1671.7	359.8
LN4	1769.5	378.4
LN5	1721.8	392.6
LN6	1806.5	454.9
LN7	1941.7	487.7
LT1	1344.5	276.1
LT2	1376.3	286.3
LT3	1578.9	372.6
LT4	1558.7	347.1
LT5	1779.3	421.3

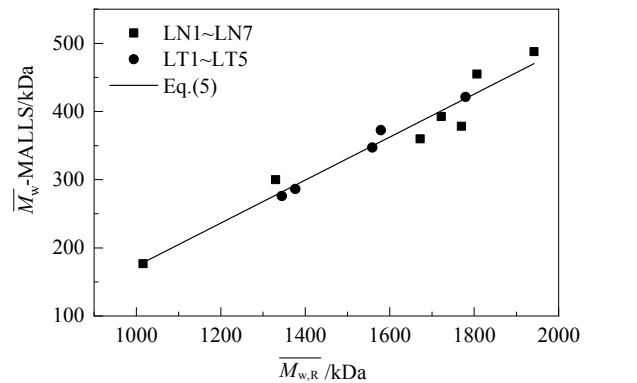


图 3 褐藻胶绝对重均分子量($\overline{M_w}$ -MALLS)与相对于普鲁兰的相对重均分子量($\overline{M_{w,R}}$)的对应关系

Fig.3 The relationship between the absolute weight average molecular weight of alginate ($\overline{M_w}$ -MALLS) and the relative weight average molecular weight of alginate ($\overline{M_{w,R}}$)

根据表 3 中采用 GPC-RID 检测的 $\overline{M_{w,R}}$ ，用公式(5)计算的褐藻胶绝对重均分子量($\overline{M_w}$ -Cal)，结果见表 4。由表可见， $\overline{M_w}$ -Cal 与 GPC-MALLS 测试的褐藻胶绝对重均分子量($\overline{M_w}$ -MALLS)间的相对误差基本在 $\pm 5\%$ 内 (不大于 $\pm 10\%$)，两种原料生产的褐藻胶的相对误差相近，褐藻胶分子链中糖醛酸组成的差异(变黑雷松藻的 M 单元与 G 单元的 M/G ≈ 1.01 ，螺纹雷松藻的 M/G ≈ 0.22)对重均分子量的检测无显著影响。

表 4 GPC-RID 方法测定的褐藻胶绝对重均分子量($\overline{M_w}$ -Cal)和 GPC-MALLS 测试值($\overline{M_w}$ -MALLS)的比较

Table 4 Comparison of absolute weight average molecular weight of alginate by GPC-RID ($\overline{M_w}$ -Cal) with that measured by GPC-MALLS ($\overline{M_w}$ -MALLS)

Sample	$\overline{M_w}$ -MALLS/kDa	$\overline{M_w}$ -Cal/kDa	Relative error/%
LN1	176.7	178.25	0.88
LN2	300.1	277.26	-7.61
LN3	359.8	385.15	7.05
LN4	378.4	416.00	9.94
LN5	392.6	400.96	2.13
LN6	454.9	427.67	-5.99
LN7	487.7	470.31	-3.57
LT1	276.1	281.94	2.12
LT2	286.3	291.99	1.99
LT3	372.6	355.89	-4.49
LT4	347.1	349.51	0.70
LT5	421.3	419.09	-0.52

表 5 褐藻胶样品的绝对重均分子量与相对误差
Table 5 Absolute weight average molecular weight of alginate and relative error

Sample	$\overline{M_w}$ -MALLS/kDa	$\overline{M_w}$ -Cal/kDa	Relative error/%
LN8	285.4	286.91	0.53
LN9	348.4	376.61	8.10
LN10	474.0	450.79	-4.90
LN11	468.7	413.98	-11.67
LT6	367.4	359.73	-2.09
LT7	377.2	381.05	1.02

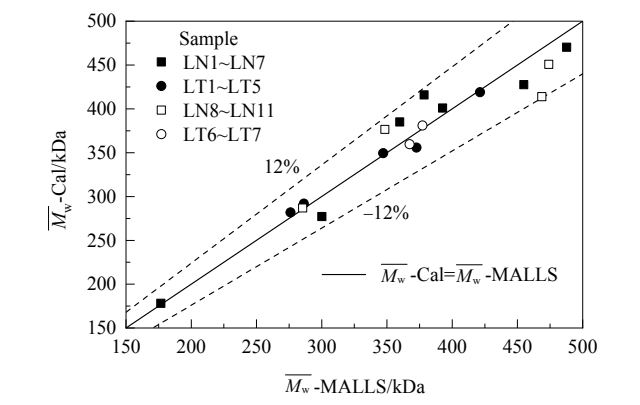


图 4 GPC-RID 方法测定的褐藻胶绝对重均分子量($\overline{M_w}$ -Cal)与 GPC-MALLS 测试值($\overline{M_w}$ -MALLS)的对比

Fig.4 Comparison of absolute weight average molecular weight of alginate by GPC-RID ($\overline{M_w}$ -Cal) with that measured by GPC-MALLS ($\overline{M_w}$ -MALLS)

用褐藻胶样品(LN8~LN11 及 LT6~LT7)对 GPC-RID 绝对重均分子量检测方法进行检验。如表 5 所示, \overline{M}_w -Cal 与 \overline{M}_w -MALLS 的相对误差在±12%以内。图 4 为粘度 106~1 327 mPa·s 的褐藻胶用 GPC-RID 方法检测的绝对重均分子量与 GPC-MALLS 测试值的对比, 两种检测方法的测试结果基本一致, 表明 GPC-RID 检测方法可较准确地获得褐藻胶的绝对重均分子量, 检测结果不受糖醛酸组成影响。

3.3 褐藻胶的数均分子量

用 GPC-RID 方法检测的褐藻胶相对于普鲁兰的相对数均分子量($\overline{M}_{n,R}$)与 GPC-MALLS 方法检测的绝对数均分子量(\overline{M}_n -MALLS)如表 6 所示。由表可知, $\overline{M}_{n,R}$ 明显大于 \overline{M}_n -MALLS。如图 5 所示, 对表 1 两种原料生产的褐藻胶的相对数均分子量和绝对数均分子量进行拟合, 通过最小二乘法得到拟合方程[式(6)], 相关系数 $R^2=0.9322$, 可知具有较好的线性相关性。

$$\overline{M}_n\text{-Cal}=0.66 \overline{M}_{n,R}-94.75, \quad R^2=0.9322 \quad (6)$$

由表 6 和式(6)可知, \overline{M}_n -MALLS 与 $\overline{M}_{n,R}$ 之间的差异小于两者重均分子量间的差异, 原因可能是根据分子尺寸对应的分子量 M_i 与分子的质量中心相关, 在计算平均分子量时, 以分子质量为权重的重均分子量统计计算的影响大于以分子数量为统计权重的数均分子量。由于褐藻胶重均分子量与数均分子量和相对普鲁兰的相对分子量的对应关系不一致, 因此, 不能用基于普鲁兰当量的相对分子量计算的分散系数表征褐藻胶的分布宽度。

表 6 褐藻胶的绝对数均分子量(\overline{M}_n -MALLS)与相对于普鲁兰的相对数均分子量($\overline{M}_{n,R}$)

Table 6 Absolute number average molecular weight of alginate (\overline{M}_n -MALLS) and relative number average molecular weight ($\overline{M}_{n,R}$)

Sample	$\overline{M}_{n,R}$ /kDa	\overline{M}_n -MALLS/kDa
LN1	322.56	113.9
LN2	383.22	177.5
LN3	524.16	231.9
LN4	525.75	234.9
LN5	519.29	247.1
LN6	548.87	292.8
LN7	569.26	287.9
LT1	424.50	175.8
LT2	418.80	188.0
LT3	489.78	233.3
LT4	483.42	233.7
LT5	538.45	271.0

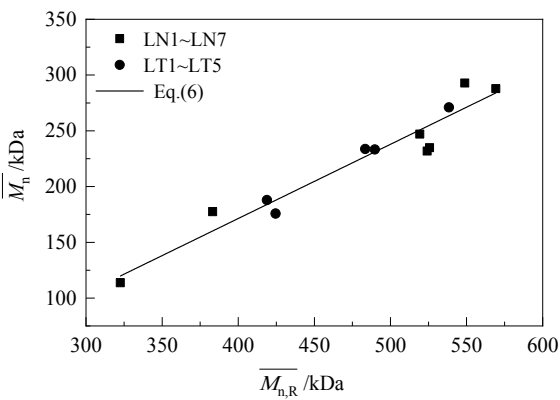


图 5 褐藻胶绝对数均分子量(\overline{M}_n -MALLS)与相对于普鲁兰的相对数均分子量($\overline{M}_{n,R}$)的对应关系

Fig.5 The relationship between the absolute number average molecular weight of alginate (\overline{M}_n -MALLS) and the relative number average molecular weight of alginate ($\overline{M}_{n,R}$)

将表 6 的相对数均分子量代入式(6)计算得绝对数均分子量, 见表 7。GPC-RID 方法检测的褐藻胶绝对数均分子量与 GPC-MALLS 法测试值的相对误差小于±10%, 褐藻胶的糖醛酸组成的差异对数均分子量的检测无显著影响。

表 7 GPC-RID 方法测定的褐藻胶绝对数均分子量(\overline{M}_n -Cal)和 GPC-MALLS 测试值(\overline{M}_n -MALLS)的比较

Table 7 Comparison of absolute number average molecular weight of alginate by GPC-RID (\overline{M}_n -Cal) and measured by GPC-MALLS (\overline{M}_n -MALLS)

Sample	\overline{M}_n -MALLS/kDa	\overline{M}_n -Cal/kDa	Relative error/%
LN1	113.9	119.88	5.25
LN2	177.5	160.24	-9.72
LN3	231.9	254.02	9.54
LN4	234.9	255.08	8.59
LN5	247.1	250.78	1.49
LN6	292.8	270.47	-7.63
LN7	287.9	284.03	-1.34
LT1	175.8	187.70	6.77
LT2	188.0	183.92	-2.17
LT3	233.3	231.15	-0.92
LT4	233.7	226.91	-2.90
LT5	271.0	263.53	-2.76

用褐藻胶样品 LN8~LN11 及 LT6~LT7 对 GPC-RID 方法检测绝对数均分子量进行检验, 如表 8 所示。由 GPC-RID 方法测试的相对数均分子量进而根据式(6)计算得到的绝对数均分子量(\overline{M}_n -Cal)与 GPC-MALLS 法测得的绝对数均分子量(\overline{M}_n -MALLS)间的相对误差大部分在±12%以内。由图 6 可见, 对粘度 106~1 327 mPa·s

的褐藻胶用 GPC-RID 检测方法获得的绝对数均分子量与 GPC-MALLS 测试值基本一致，可较准确地获得褐藻胶的绝对数均分子量。

表 8 褐藻胶样品的绝对数均分子量与相对误差
Table 8 Absolute number average molecular weight of alginate and relative error

Sample	\overline{M}_n -MALLS/kDa	\overline{M}_n -Cal/kDa	Relative error/%
LN8	182.4	197.27	8.15
LN9	204.3	202.73	-0.77
LN10	248.1	222.99	-10.12
LN11	288.8	270.53	-6.33
LT6	205.3	230.30	12.18
LT7	249.2	232.63	-6.65

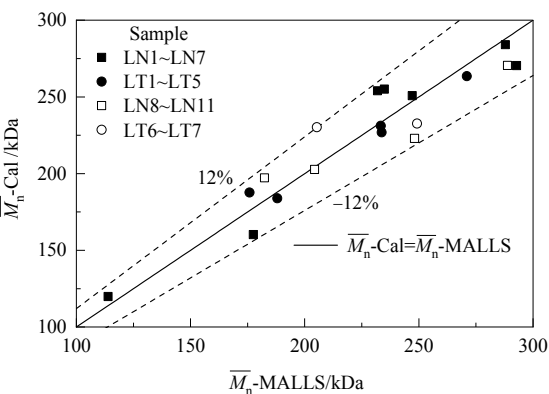


图 6 GPC-RID 方法测定褐藻胶绝对数均分子量(\overline{M}_n -Cal)与 GPC-MALLS 测试值(\overline{M}_n -MALLS)的对比
Fig.6 Comparison of absolute number average molecular weight of alginate by GPC-RID (\overline{M}_n -Cal) with that measured by GPC-MALLS (\overline{M}_n -MALLS)

3.4 褐藻胶的多分散系数

多分散系数常用于表征分子量的分散程度，多分散系数越大，褐藻胶分子量分布越宽。褐藻胶多分散系数(d_p -MALLS)与相对于普鲁兰的相对分子量的多分散系数($d_{p,R}$)如表 9 所示。由表可知， $d_{p,R}$ 远大于 d_p -MALLS， $d_{p,R}$ 并不能准确的反映褐藻胶分子量的分布宽度，原因可能是褐藻胶与普鲁兰分子链的组成单体差异导致的两种高分子的重均分子量与数均分子量的对应关系不一致。

将普鲁兰当量的相对重均分子量和相对数均分子量分别通过式(5)和(6)转换为褐藻胶绝对重均分子量和绝对数均分子量，通过式(7)计算得到多分散系数。由表 10 可见，基于 GPC-RID 绝对分子量计算的多分散系数和 GPC-MALLS 测试值间的相对误差主要集中在±12% 范围内。由图 7 可见，采用本工作建立的 GPC-RID 检测方法获得的绝对分子量计算的多分散系数与 GPC-

MALLS 测试值基本一致，表明采用 RID 利用相对分子量和绝对分子量的转换关系获得绝对分子量、进而计算得到多分散系数的方法，可较准确地获得褐藻胶的多分散系数，较好地反映了褐藻胶分子量的分散程度。

$$d_p - \text{Cal} = \frac{\overline{M}_w - \text{Cal}}{\overline{M}_n - \text{Cal}} = \frac{0.32\overline{M}_{w,R} - 142.1}{0.66\overline{M}_{w,R} - 94.75}$$

(7)

表 9 褐藻胶多分散系数(d_p -MALLS)与相对于普鲁兰的相对分子量的多分散系数($d_{p,R}$)
Table 9 Polydispersity index of alginate (d_p -MALLS) and relative polydispersity index ($d_{p,R}$)

Sample	$d_{p,R}$	d_p -MALLS
LN1	3.1488	1.552
LN2	3.4696	1.690
LN3	3.1892	1.552
LN4	3.3657	1.611
LN5	3.3157	1.589
LN6	3.2914	1.553
LN7	3.4109	1.694
LT1	3.2000	1.600
LT2	3.2862	1.523
LT3	3.2236	1.598
LT4	3.2243	1.485
LT5	3.3044	1.555

表 10 基于 GPC-RID 法计算的褐藻胶多分散系数(d_p -Cal)与 GPC-MALLS 测试值(d_p -MALLS)的比较
Table 10 Comparison of polydispersity index calculated by GPC-RID (d_p -Cal) with that measured by GPC-MALLS (d_p -MALLS) of alginate

Sample	d_p -MALLS	d_p -Cal	Relative error/%
LN1	1.552	1.487	-4.19
LN2	1.690	1.730	2.38
LN3	1.552	1.516	-2.31
LN4	1.611	1.631	1.23
LN5	1.589	1.599	0.62
LN6	1.553	1.581	1.82
LN7	1.694	1.656	-2.25
LN8	1.565	1.454	-7.07
LN9	1.705	1.858	8.96
LN10	1.911	2.022	5.79
LN11	1.623	1.530	-5.71
LT1	1.600	1.502	-4.38
LT2	1.523	1.588	4.24
LT3	1.598	1.540	-3.65
LT4	1.485	1.540	3.72
LT5	1.555	1.590	2.27
LT6	1.790	1.562	-12.74
LT7	1.514	1.638	8.19

3.5 精密度与重复性

将褐藻胶样品各取 3 份，分别与流动相 0.1 mol/L

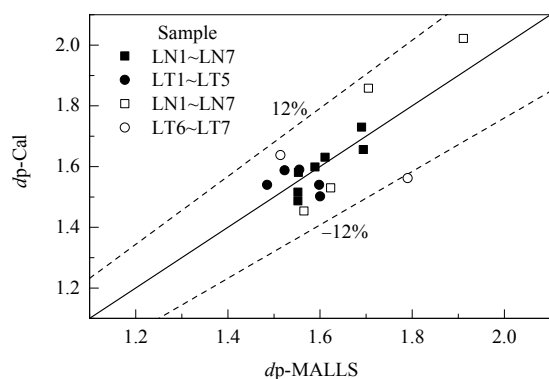


图 7 基于 GPC-RID 法计算的褐藻胶多分散系数(d_p -Cal)与 GPC-MALLS 测试值(d_p -MALLS)的比较

Fig.7 Comparison of polydispersity index calculated by GPC-RID (d_p -Cal) with that measured by GPC-MALLS (d_p -MALLS) of alginate

表 11 拟合方程计算的分子量的重现性

Table 11 Reproducibility of molecular weight calculated by fitting equation

Test number	LT1			LN2		
	M_w -Cal/kDa	M_n -Cal/kDa	d_p -Cal	M_w -Cal/kDa	M_n -Cal/kDa	d_p -Cal
1	279.91	189.10	1.48	301.42	178.29	1.69
2	283.22	190.34	1.49	302.42	174.44	1.73
3	282.71	183.66	1.54	303.62	175.62	1.73
Average value	281.90	187.70	1.50	302.49	176.12	1.72
Relative standard deviation, RSD/%	0.63	1.89	2.14	0.37	1.12	1.37

4 结论

以系列普鲁兰标准品为对照,用高效凝胶渗透色谱与示差检测器(GPC-RID)检测了由变黑雷松藻和螺旋藻生产的不同粘度的褐藻胶样品,获得了普鲁兰当量的相对重均分子量和相对数均分子量,通过最小二乘法拟合建立了相对分子量与 GPC-MALLS 检测的绝对分子量间的对应关系,进而计算得褐藻胶的绝对分子量参数及多分散系数,并验证了建立的 GPC-RID 检测褐藻胶绝对分子量的方法,得到如下结论:

(1) 以 0.1 mol/L NaCl 溶液为流动相,可消除普鲁兰或褐藻胶与聚甲基丙烯酸类凝胶色谱柱间的离子相互作用,色谱行为只与分子尺寸相关。

(2) 用 GPC-RID 方法获得的普鲁兰当量的相对分子量与 GPC-MALLS 测得的褐藻胶绝对分子量具有良好的线性关系,相关系数 R^2 均大于 0.9,两种藻生产的褐藻胶可采用相同的转换公式,糖醛酸组成对褐藻胶的色谱行为无显著影响。

(3) 用 GPC-RID 方法检测相对分子量,经转换公式计算的重均分子量、数均分子量和多分散系数与 GPC-MALLS 测试值的相对误差主要集中在 $\pm 12\%$ 以

NaCl 溶液混合配成待测溶液,测得普鲁兰当量的相对分子量,根据式(5), (6), (7)分别计算褐藻胶的绝对重均分子量、绝对数均分子量和多分散系数,并分别对绝对分子量值和多分散系数统计平均,计算相对标准偏差,表 11 随机列出 2 个褐藻胶样品,通过 GPC-RID 绝对分子量检测方法检测不同粘度的 LN 藻和 LT 藻样品的重均分子量、数均分子量、多分散系数,其相对标准偏差均小于 2.5%。结果表明,通过 GPC-RID 绝对分子量检测方法得到的褐藻胶绝对分子量和多分散系数具有良好的精密度和重复性。GPC-MALLS 实验检测结果相对标准偏差均小于 4%, GPC-RID 相对分子量检测结果的相对标准偏差小于 1.43%,得到的结果精密度和重复性较好。

内,采用该方法可较准确地获得褐藻胶的绝对分子量、数均分子量与多分散系数。

(4) 建立的 GPC-RID 绝对分子量检测方法采用通用检测器,为获得褐藻胶绝对分子量及多分散系数提供了一种较准确的方法。

参考文献

- [1] Huang P L, Shen X J, Chen J H, et al. Research advances in extraction and functionalization of the sodium alginate [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2017, 37(4): 13-22.
- [2] Nalamothu N, Potluri A, Muppalla M B, et al. Review on marine alginates and its applications [J]. Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 2014, 4(10): 4006-4015.
- [3] 秦益民. 海藻酸 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008: 10-12. Qin Y M. Alginate [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2008: 10-12.
- [4] Kanokpanont S, Yamdech R, Aramwit P. Stability enhancement of mulberry-extracted anthocyanin using alginate/chitosan microencapsulation for food supplement application [J]. Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology, 2017, 46(4): 773-782.
- [5] Khan R A, Salem H J, Korehei R, et al. Application of fractionated bleached pulp fibres on sodium alginate films [J]. Canadian Journal of Chemical Engineering, 2017, 95(1): 33-38.
- [6] Sourbh T, Bhawna S, Ankit V, et al. Recent progress in sodium alginate based sustainable hydrogels for environmental applications

- [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 198: 143–159.
- [7] 叶思, 平其能, 孙敏捷. 海藻酸钠在生物医药领域的应用与研究进展 [J]. *药学与临床研究*, 2018, 26(2): 120–124, 129.
- Ye S, Ping Q N, Sun M J. Applications and research advances of alginate sodium in biomedical fields [J]. *Pharmaceutical and Clinical Research*, 2018, 26(2): 120–124, 129.
- [8] Tønnesen H H, Karlsen J. Alginate in drug delivery systems [J]. *Drug Development & Industrial Pharmacy*, 2002, 28(6): 621–630.
- [9] Xu X, Bi D C, Wan M. Characterization and immunological evaluation of low-molecular-weight alginate derivatives [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2016, 16(8): 874–887.
- [10] Sen F, Uzunsoy I, Basturk E, et al. Antimicrobial agent-free hybrid cationic starch/sodium alginate polyelectrolyte films for food packaging materials [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 170: 264–270.
- [11] Khotimchenko Y S, Kovalev V V, Savchenko O V, et al. Physical–chemical properties, physiological activity, and usage of alginates, the polysaccharides of brown algae [J]. *Russian Journal of Marine Biology*, 2001, 27(1): S53–S64.
- [12] Lee K Y, Mooney D J. Alginate: properties and biomedical applications [J]. *Progress in Polymer Science*, 2012, 37(1): 106–126.
- [13] 何曼君, 陈维孝, 董西侠. 高分子物理 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2000: 208–211.
- He M J, Chen W X, Dong X X. *Polymer physics* [M]. Shanghai: Fudan University Press, 2000: 208–211.
- [14] Desbrieres J, Mazet J, Rinaudo M. Gel permeation chromatography on polyelectrolytes in aqueous solution [J]. *European Polymer Journal*, 1982, 18(3): 269–272.
- [15] 丁生龙, 丛湧, 高春梅. 凝胶渗透色谱在高聚物分子量测定中的应用 [J]. *化学通报*, 2017, 80(2): 151–156.
- Ding S L, Cong Y, Gao C M. Application development in estimation of molecular weight by gel permeation chromatography [J]. *Chemistry*, 2017, 80(2): 151–156.
- [16] Feng L P, Cao Y P, Xu D X, et al. Molecular weight distribution, rheological property and structural changes of sodium alginate induced by ultrasound [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 34: 609–615.
- [17] Brady S A, Fox E K, Lally C, et al. Optimisation of a novel glass-alginate hydrogel for the treatment of intracranial aneurysms [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 176: 227–235.
- [18] Khajouei R A, Keramat J, Hamdami N, et al. Extraction and characterization of an alginate from the Iranian brown seaweed, *Nizimuddinina zanardini* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118: 1073–1081.
- [19] 赵珊, 许加超, 付晓婷. 褐藻寡糖分子量测定方法的研究 [J]. *食品工业科技*, 2011, 32(12): 486–488.
- Zhao S, Xu J C, Fu X T. Study on the determination method of molecular weight of alginate oligosaccharide [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32(12): 486–488.
- [20] Storz H, Muller K J, Ehrhart F, et al. Physicochemical features of ultra-high viscosity alginates [J]. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(8): 985–995.
- [21] Scullin C, Stavila V, Skarstad A, et al. Optimization of renewable pinene production from the conversion of macroalgae *Saccharinalatissima* [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 184: 415–420.
- [22] Holme H K, Davidsen L, Kristiansen A, et al. Kinetics and mechanisms of depolymerization of alginate and chitosan in aqueous solution [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 73(4): 656–664.
- [23] Holme H K, Lindmo K, Kristiansen A, et al. Thermal depolymerization of alginate in the solid state [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 54(4): 431–438.
- [24] 甘纯玟, 林权. 褐藻酸钠的高效凝胶色谱行为及其分子量参数测定 [J]. *色谱*, 1997, (2): 147–149.
- Gan C J, Lin Q. High performance gel chromatography behavior of alginate sodium and determination of its molecular weight parameters [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 1997, (2): 147–149.
- [25] Ci S X, Huynh T H, Louie L W, et al. Molecular mass distribution of sodium alginate by high-performance size-exclusion chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 864(2): 199–210.