

RI および UV 検出器を用いた GPC/SEC による鉄多糖類錯体の調査

著者

Wolfgang Radke
Agilent Technologies, Inc.

概要

ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と呼ばれ、デュアル検出を使用すれば、鉄多糖類錯体のモル質量分布や遊離した未結合多糖類の量を簡単かつ効果的に測定することができます。

はじめに

人体の赤血球にはヘモグロビンとして、また筋肉細胞にはミオグロビンの一部として鉄が含まれています。どちらのタンパク質も酸素の輸送に不可欠で、鉄は必須栄養素です。鉄分が不足した場合、これを補うために、多糖類と鉄の錯体が薬として用いられます。規制の遵守や品質管理、調査にとって、このような錯体とその製剤の適切な特性解析が欠かせません¹。

GPC/SEC は鉄多糖類錯体のモル質量分布を簡単かつ効果的に測定する方法を提供します。このアプリケーションノートでは、さまざまなサンプルに由来する鉄多糖類錯体を UV/RI 検出器を同時に使った GPC/SEC システムで分析しました。

実験方法

表 1. 機器およびサンプル条件

	条件
ポンプ	イソクラティックポンプ 流量：1 mL/min 移動相：H ₂ O、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7)、0.1 N NaNO ₃
注入システム	オートサンブラ 注入量：50 µL
カラム	Agilent SUPREMA 中分子量コンビネーション： Agilent SUPREMA 5 µm プレカラム、8 × 50 mm (p/n SUA080505) Agilent SUPREMA 5 µm 30 Å、8 × 300 mm (p/n SUA0830053e1) 2 × Agilent SUPREMA 5 µm 1,000 Å、8 × 300 mm (p/n SUA0830051e3)
温度	23 °C
サンプル濃度	- 充填剤の場合 2 g/L - 製剤の場合 50 g/L
キャリブレーション	Agilent ReadyCal キット プルラン高分子 (p/n PSS-PULKITR1H)
検出器	可変波長 UV-Vis 検出器 (VWD) @ λ = 254 nm 示差屈折率 (RI) 検出器
ソフトウェア	Agilent WinGPC

結果と考察

このアプリケーションには、254 nm で動作する UV 検出器により、鉄多糖類錯体が選択的に検出されるという長所があります。より汎用的な RI 検出器により、複合的な未結合多糖類や、典型的で避けられないシステムピークが明らかになります。

興味深いことに、UV による鉄錯体の選択的検出の可能性が無視されることはよくあります。その代わりに、大半の研究で、より複雑な RI トレースの評価が行われます。

しかし、このアプリケーションでは、モル質量分布、モル質量平均、鉄多糖類錯体の分散度の測定に UV トレースを使用しました。未結合多糖類の詳しい特性解析には、RI 検出器信号を使用しました。

図 1 は、4 種類のサンプル A、B、C、D の UV サンプルクロマトグラムを重ね表示したものです。サンプル A と B はほとんど同一の溶出プロファイルを示し、UV 検出器だけでは区別できません。また、発色団がないため、UV 検出器は未結合多糖類も表示しません。これにより、データ評価が簡単になります。すべての錯体は、形の整った、ほぼ正規分布形状のピークを示します。これは、分析対象となったサンプルのいずれも、SUPREMA カラムコンビネーションの高モル質量排除限界と低モル質量分離限界に達していないことを示します。つまり、このモル質量分離範囲には、SUPREMA カラムメディア分子量コンビネーションが適しています。

4 サンプルのうち 3 つは、サンプルクロマトグラムと結果として求められたモル質量に基づいて、明確に区別できます。しかし、サンプル A と B の溶出プロファイルは同一です。

すべての UV 信号を簡単に評価できるのは、選択された波長では、UV 検出器は溶出の可能性のある残余成分を検出できないからです。

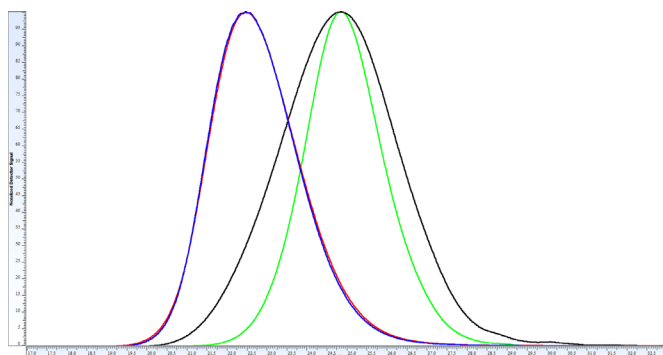


図 1. 4 種類の鉄多糖類サンプルの正規化後の UV トレース (UV @ 254 nm) : サンプル A(青)、サンプル B(赤)、サンプル C(黒)、サンプル D(緑)

最高約 1,200,000 g/mol の ReadyCal キット プルラン高分子を使用し、確立された 12 点検量線を適用することにより、相対モル質量分布、モル質量平均、および分散度が導出されます。結果を表 1 にまとめます。

表 2. UV 検知器により求められた純粋な鉄多糖類錯体のモル質量の平均値と分散度 (D)

サンプル	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	D
A	155,000	106,000	1.46
B	154,000	108,000	1.42
C	66,400	27,600	2.40
D	67,000	32,400	2.07

サンプル A と B の 2 つは UV トレースの溶出プロファイルが一致しますが、同時に測定された RI 信号を見ると違いがわかります (図 2)。RI トレースを比べると、サンプル A には、かなり大量の未結合多糖類が含まれていることがはっきりします。RI 検出器の信号は、サンプル A にはサンプル B よりも多くの未結合多糖類が含まれていることを明らかにしています。

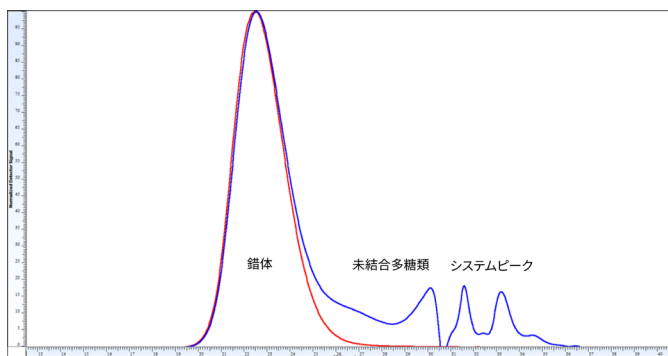


図 2. サンプル A (青) と B (赤) の RI トレース。ほぼ同一の UV 信号を示しています。

したがって、UV および RI 検出器を使った GPC/SEC では、鉄多糖類錯体のモル質量分布を測定できるだけでなく、同時に遊離した、未結合の多糖類の量に関する情報も得られるため、サンプルの特性解析をより包括的に行うことができます。この情報は品質管理には不可欠で、生産プロセスの最適化を可能にします。

結論

堅牢性と信頼性に優れた GPC/SEC で、固定相として Agilent SUPREMA カラムセット、水性移動相としてリン酸緩衝液と塩化ナトリウムを使用し、鉄多糖類錯体を分離できます。

UV-Vis 検出器と RI 検出器のデュアル検出機能を備えた GPC/SEC は鉄多糖類錯体を包括的に分析できます。遊離した多糖類か、鉄錯体として結合されているかにかかわらず、サンプル全体が RI 経路で検出されません。鉄多糖類錯体のみを検出する UV 検出器と組み合わせることで、RI 検出器は従来のモル質量解析のほか、多糖類が結合しているかどうかを判断できるようになります。

参考文献

1. Lu, R. et al. Efficacy and Safety of Polysaccharide Iron Complex Capsules Compared with Iron Sucrose in Hemodialysis Patients: Study Protocol For a Randomized, Open-Label, Positive Control, Multicenter Trial (IHOPE). *Trials* **2021**, 22(1), 691.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA44964.6089351852

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, March 3, 2023

5994-5765JAJP