

# 使用配备 RI 和 UV 检测的 GPC/SEC 研究多糖铁复合物

## 作者

Wolfgang Radke  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

凝胶渗透色谱 (GPC) (也称为体积排阻色谱 (SEC)) 在使用双重检测的情况下可为多糖铁复合物的摩尔质量分布和游离多糖含量测定提供一种简单有效的方法。

## 前言

人体的红细胞（血红蛋白）或肌肉细胞（肌红蛋白的一部分）中含有铁。这两种蛋白质对于氧气运输至关重要，因此铁是一种基本营养元素。在缺铁的情况下，多糖和铁的复合物可作为药物用于改善低铁水平。出于监管、质量控制和研究需要，必须对这些复合物及其配方进行适当的表征<sup>[1]</sup>。

GPC/SEC 为测定多糖铁复合物的摩尔质量分布提供了一种简便有效的方法。在本应用简报中，使用配备同步 UV/RI 检测的 GPC/SEC 系统对不同来源的多糖铁复合物进行了分析。

## 实验部分

表 1. 仪器和样品条件

	条件
泵	等度泵 流速: 1 mL/min 流动相: H <sub>2</sub> O, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7), 0.1 N NaNO <sub>3</sub>
进样系统	自动进样器 灵活的进样量
色谱柱	Agilent SUPREMA 中等分子量组合: Agilent SUPREMA 5 μm 预柱, 8 × 50 mm (货号 SUA080505) Agilent SUPREMA 5 μm 30 Å, 8 × 300 mm (货号 SUA0830053e1) 2 根 Agilent SUPREMA 5 μm 1000 Å, 8 × 300 mm (货号 SUA0830051e3)
温度	23 °C
样品浓度	- 干性材料 2 g/L - 配方产品 50 g/L
校准	Agilent ReadyCal-高分子量普鲁兰多糖试剂盒 (货号 PSS-PULKITR1H)
检测器	可变波长 UV-Vis 检测器 (VWD), λ = 254 nm 示差折光 (RI) 检测器
软件	Agilent WinGPC

## 结果与讨论

此应用的一个优势在于，通过紫外检测器在 254 nm 处实现了多糖铁复合物的选择性检测。通用性更强的 RI 检测器检测到复合物、未结合的多糖和典型的、不可避免的系统峰。

有趣的是，这种通过紫外选择性检测铁复合物的可能性常常被忽视。在大多数研究中，反而会对更复杂的 RI 曲线进行评估。

然而，在本应用中，使用 UV 曲线测量多糖铁复合物的摩尔质量分布、摩尔质量平均值和分散度。使用 RI 检测器信号深入表征未结合的多糖。

图 1 显示了四个不同样品 A、B、C 和 D 的紫外谱图叠加图。样品 A 和 B 的洗脱曲线几乎相同，仅使用紫外检测无法区分。由于缺少发色团，紫外检测器也不会显示任何未结合的多糖。这使得数据评估变得很容易。所有复合物的峰形良好，接近高斯峰形，表明分析的所有样品均没有达到 SUPREMA 色谱柱组合的高摩尔质量排阻极限和低摩尔质量分离限。这意味着 SUPREMA 色谱柱中等分子量组合是该摩尔质量分离范围的理想选择。

四个样品中有三个可根据色谱图和获得的摩尔质量实现明确区分。然而，样品 A 和 B 具有相同的洗脱曲线。

所有的紫外信号均可轻松评估，因为在所选波长下紫外检测器检测不到潜在的共洗脱残留成分。

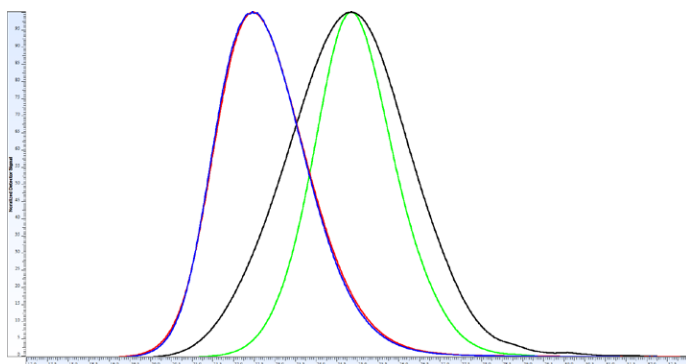


图 1. 4 个不同多糖铁复合物样品的归一化 UV 曲线（254 nm 处的 UV 曲线）：样品 A（蓝色）、样品 B（红色）、样品 C（黑色）、样品 D（绿色）

通过使用浓度高达约 1200000 g/mol 的 ReadyCal-高分子量普鲁兰多糖试剂盒建立的 12 点校准曲线，推导出相对摩尔质量分布以及摩尔质量平均值和分散度。表 1 对结果进行了总结。

表 2. 通过 UV 检测获得的纯多糖铁复合物的摩尔质量平均值和分散度 (D)

样品	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	D
A	155000	106000	1.46
B	154000	108000	1.42
C	66400	27600	2.40
D	67000	32400	2.07

对于在 UV 检测中具有相同洗脱曲线的两个样品 A 和 B，通过同步测得的 RI 信号可以观察到差异 (图 2)。对比 RI 曲线可以看出，样品 A 中未结合多糖的含量明显较高。RI 检测器信号表明，样品 A 中未结合多糖的含量比样品 B 更高。

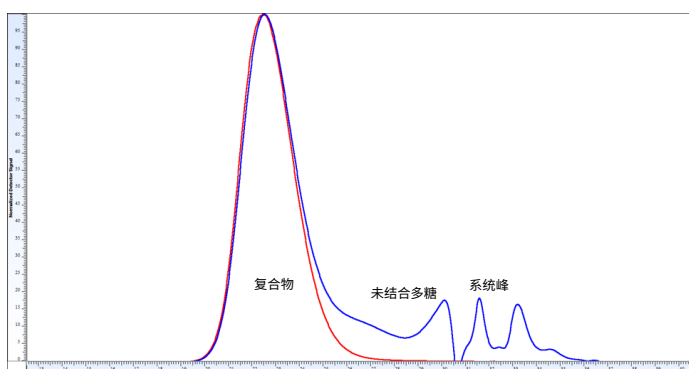


图 2. 样品 A (蓝色) 和样品 B (红色) 的 RI 曲线，显示出几乎相同的 UV 信号

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44964.6089351852

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2023  
2023 年 3 月 3 日, 中国出版  
5994-5765ZHCN

因此，配备 UV 和 RI 检测的 GPC/SEC 不仅可以测定多糖铁复合物的摩尔质量分布，还可以同时提供游离多糖的含量信息，确保对样品进行更全面的表征。这些信息对于质量控制至关重要，并且有利于优化生产过程。

## 结论

以一组 Agilent SUPREMA 色谱柱为固定相并使用由磷酸盐缓冲液和氯化钠组成的水性流动相，可实现多糖铁复合物的稳定、可靠 GPC/SEC 分离。

由 UV-Vis 和 RI 检测器组成的 GPC/SEC 双重检测系统可对多糖铁复合物进行全面分析。通过 RI 可检测整个样品，无论是游离多糖还是经过结合形成铁复合物。与只能检测多糖铁复合物的 UV 检测相结合，RI 除了常规的摩尔质量分析外还可以测定结合和未结合的多糖。

## 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