薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
102 (2) 215-220 (1982)

高速液体クロマトグラフィーによるアルキル化処理人免疫グロブリン製剤中の還元剤, アルキル化剤の定量¹⁾

森田秀行,^a 小西徹也^b

カッター・ジャパン株式会社研究開発部,^a 新潟薬科大学^b

Determination of Reductant and Alkylating Agent in the Alkylated Human Immunoglobulin by High Performance Liquid Chromatography¹⁾

HIDEYUKI MORITA^a and TETSUYA KONISHI^b

Research and Development Department, Cutter Japan Co., Ltd.,^a
1320-46, Tai Aza Nabetani, Kande-cho, Tarumi-ku, Kobe-shi,
Japan and Niigata College of Pharmacy,^b 5829,
Kamishinei-cho, Niigata-shi, Japan

(Received August 31, 1981)

High performance liquid chromatography (HPLC) by use of a reverse phase column (TSK LS410K) was applied to determine the residual dithiothreitol, iodoacetamide and oxidized dithiothreitol in the alkylated human immunoglobulin (AHIG). After extraction by ethyl acetate, the above compounds were separated by HPLC with MeOH-H₂O (60:40 v/v) as solvent. Determination was completed within 5 min with high reproducibility. Less than 0.5 ppm for each residual substance could be quantitated. The method was quite suitable for the routine analysis of the residual contaminants in AHIG.

Keywords—HPLC; reverse phase column; dithiothreitol; iodoacetamide; oxidized dithiothreitol; human immunoglobulin

緒 言

アルキル化処理人免疫グロブリンは、 γ -グロブリン分子の鎖間 S-S 結合を S-S 結合還元剤である dithiothreitol (DTT) で還元し、²⁾ 次いで SH 基保護試薬である iodoacetamide (IAA)³⁾ でアルキル化処理した後、安定剤として 10% maltose および 0.1 M glycine を加えた製剤である。通常、過剰の DTT, IAA, および DTT が酸化されて生ずる oxidized dithiothreitol (ODTT) を限外濾過により除去しているが、これらの薬物はこの製剤の残留限度試験の対象とされている。

Brigger ら⁴⁾ は gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 法により尿中の DTT を ODTT にして検出している。著者らは DTT, ODTT および IAA のアルキル化処理人免疫グロブリン製剤中残留量を吸光度法、ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等により定量することを検討したが、製剤中には maltose および蛋白が大量に存在すること、あるいはこれら薬物の本質が不安定のために分離が悪く、検出感度も低いことから応用困難であった。そこで著者らは HPLC による分離定量法を検討し、通常の限度試験法として適することを確認した。

実 験 方 法

1. 被検製剤 アルキル化処理人免疫グロブリン製剤 (カッター・ジャパン)。
2. 試薬および試液 高速液体クロマトグラフィー用メタノール (MeOH), 酢酸エチル (AcOEt) は共に和光純薬より、内部標準の acetanilide (AA) は半井化学より、標準試薬 dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA) はそれぞれ Aldrich chemical, 半井化学より購入した。Oxidized dithiothreitol (ODTT) は W.W. Cleland の方法²⁾ に従って合成した。製剤模擬溶液として 0.1 M glycine に 10% maltose を添加し、0.5 N NaOH で pH 7 に調整したものを使用した。
3. 機器 日立 557 型 2 波長自記分光光度計, 東洋曹達 HPLC-803 A 型高速液体クロマトグラフ, 東洋曹

Chart 1. Determination of IAA, ODTT and DTT by Extraction Method

HPLC condition

Column: LS410K (reversed phase column) Toyo Soda Co., Ltd.,
Solvent: MeOH-H₂O (60/40 v/v),
Flow rate: 1 ml/min,
Detection: UV at 205 nm.

達高速液体クロマトグラフィー用紫外波長可変流動光度計 (UV-8) を使用した。

4. HPLC 条件 カラム 東洋曹達社 LS 410 K (逆相カラム), 溶離液 MeOH-H₂O (60 : 40 v/v), 流速 1.0 ml/min, 波長 205 nm, 測定温度 室温。

5. 被検製剤模擬溶液中の IAA, ODTT, DTT の検量線作成 標準液は被検製剤模擬溶液に IAA および ODTT を添加し, 各薬物について 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 ppm の各最終濃度に調製した。DTT については前 2 者混合物とは別に, DTT のみを加えて同濃度の標準液に調製した。

IAA, ODTT の定量は検体 1 ml に内部標準として AA (15 μ g/ml H₂O) を 0.1 ml 加えた後, AcOEt 10 ml で 10 分間良く振盪しながら抽出した。そして 2 時間放置した後, AcOEt 層を 8 ml 取り約 25 度で減圧留去し, 残渣に 0.5 ml MeOH を加えて溶解した。その溶液 5 μ l を HPLC に注入し, 別記 HPLC 条件により分離を行った。溶出ピークは 205 nm における吸光度で測定し, 各溶出成分のピーク高と AA のピーク高の比から定量した。

DTT については標準液調製後, 直ちに $K_3Fe(CN)_6$ (100 mg/ml H₂O) 0.1 ml を加え, 約 5 分間良くかく拌し DTT を ODTT に酸化した後, 内部標準を加えて以下 IAA, ODTT 定量と同じ操作に従った。

結 果

1. 溶離液の検討

IAA (40 ng/ μ l), ODTT (80 ng/ μ l) 混合物の MeOH 溶液 1 μ l を HPLC に注入し, MeOH-H₂O の溶離液組成による分離状態の変化を検討した結果, MeOH 含有率の増加に伴って ODTT は溶出時間が著しく短縮し, より鋭敏な高いピークとなった。IAA の溶出時間はあまり変化を受けなかったが, ピークは鋭く, 同様に高さが増大した。しかしピーク面積に関しては IAA, ODTT 共に MeOH 含有率に関係なく一定の値を示した。したがって溶離液組成によるカラムへの吸着の変化は起こっていないものと考えられる。

DTT については DTT (500 ng/ μ l) MeOH 溶液単独で溶離液組成の影響を検討した結果, ODTT と同様に MeOH 含量の増加に伴ってピークが鋭くなり, 溶出時間の短縮が起こった。

以上のことからピーク高比較による定量のためには、溶出時間および感度等を考慮して、最適溶離液組成を MeOH-H₂O (60:40 v/v) とした。

2. 検出限界および定量性の検討

IAA, ODTT の標準品を MeOH に溶かし、2.5 から 100 ng/μl の溶液とし、内部標準として AA を 12 ng/μl 濃度に加え、その溶液 1 μl を HPLC に注入して検量線を作成した。その結果 IAA, ODTT ともに測定した 2.5 から 100 ng/μl 濃度の間で、原点を通る良い直線性を示し、相関係数が IAA で 0.9998, ODTT では 0.9997 と極めて良い定量性を示した。

しかし DTT については DTT 単独で検量線を作成した場合でも試料作成中の自然酸化等が原因と思われるピークの平坦化とテーリングが起こり、100 ng/μl 濃度以下では全く検出不可能であった。さらに大量の DTT を使用した場合には、IAA が

IAA, ODTT or DTT concentration in the original sample (ppm)

Fig. 1. Calibration Curves for IAA, ODTT or DTT in 10% Maltose - 0.1 Glycine Solution

—●—, IAA $Y=0.1435X - 0.0104$ ($r=0.9976$),
 —◇—, DTT $Y=0.0785X - 0.0050$ ($r=0.9935$),
 —◆—, ODTT $Y=0.0798X + 0.0051$ ($r=0.9975$).

TABLE I. Reproducibility of the Method of Several Sample Concentration

Sample	Sample concentration (ppm)	Determined (ppm) (n=5)		C.V. (%)
		$\bar{X}$ (ppm)	S. D	
IAA	0.5	0.464	0.121	26.1
	1	0.870	0.083	9.5
	2	1.676	0.193	11.5
	4	3.413	0.127	3.7
	6	5.321	0.201	3.8
	8	7.347	0.315	4.3
	10	9.338	0.241	2.6
ODTT	0.5	0.518	0.086	16.7
	1	0.963	0.067	7.0
	2	1.868	0.209	11.2
	4	3.892	0.349	9.0
	6	6.250	0.194	3.1
	8	8.279	0.255	3.1
	10	10.400	0.443	4.3
DTT	0.5	0.379	0.046	12.1
	1	0.952	0.195	20.5
	2	1.936	0.239	12.3
	4	4.120	0.287	7.0
	6	6.255	0.381	6.1
	8	8.298	0.507	6.1
	10	10.191	0.783	7.7

共存すると操作中に両者の反応が起こり、結果のバラツキを増大させた。それ故、DTT については、 $K_3Fe(CN)_6$ により定量的に ODTT に酸化できる²⁾ ことを利用して ODTT として測定することにした。

3. 被検製剤模擬溶液中の IAA, ODTT, DTT の検量線作製

製剤中各薬物の残留濃度を直接 HPLC の結果より読み取るための検量線を作成した。製剤にはかなり大量の蛋白, maltose および glycine が含まれており、多容量の試料を直接 HPLC で分析することは困難であるため AcOEt 抽出操作を加えて、Chart 1 に示す分析手順を確立し、HPLC で測定した。DTT の定量は前述した理由のため製剤溶液から AcOEt で抽出する前に $K_3Fe(CN)_6$ で処理し、存在する DTT を ODTT に酸化してから測定した。そして酸化処理していない試料の ODTT 値からの増分として DTT 量を求めた。

結果は Fig. 1 に示したようにいずれの薬物に関しても 10 ppm の製剤中濃度まで原点を通る良い直線性が得られた。各濃度段階の薬物を含む製剤模擬溶液の分析結果を Table I にまとめた。

測定値の変動係数は 10 ppm の IAA で約 2.6%, ODTT で約 4.3%, DTT で約 7.7% であった。4 ppm の IAA では約 3.7%, ODTT で約 9.0%, DTT で約 7.0% であった。0.5 から 10 ppm までの各試料の平均回収率はそれぞれ IAA で $89.0 \pm 4.0\%$, ODTT で $100 \pm 4.5\%$, DTT で $99.4 \pm 4.9\%$ であった。このことより抽出操作を通じてほぼ定量的に回収されていることがわかる。本法によれば各薬物について 0.5 ppm の残存量でも充分定量できることが明らかとなった。

典型的な分離例を Fig. 2 に示した。A は IAA, ODTT の両者を含む製剤模擬溶液抽出物の溶出例を示し、IAA は t_R 2.9 min, ODTT は 3.8 min に溶出された。B は DTT のみを含む製剤模擬溶液を $K_3Fe(CN)_6$ で酸化処理した場合の溶出例で、ODTT に一致するピークのみが認められた。

B の 3 分付近の溶媒ピークのつぎに出る小さなピークは、薬物を含まない製剤模擬溶液を酸化処理した場合に

Fig. 2. (A) Chromatogram of AcOEt Extract of IAA and ODTT in a Model AHIG Solution
(B) Chromatogram of $K_3Fe(CN)_6$ Oxidized DTT in a Model AHIG Solution

HPLC condition: column-LS410K (reversed phase column),
Solvent-MeOH-H₂O (60/40 v/v),
flow rate-1.0 ml/min,
detection-UV at 205 nm.

Peak 1: solvent peak, Peak 2: IAA, Peak 3: ODTT,
Peak 4: internal standard (AA), Peak 5: DTT after $K_3Fe(CN)_6$ oxidation.

TABLE II. Residual Contents of ODTT in AHIG

Sample No.	Lot No.				
	PR 2677	PR 2680	PR 2703	PR 2705	PR 2709
1	0.20 (ppm)	0.66	—	0.18	—
2	0.33	0.69	—	0.18	—
3	0.21	0.66	—	0.29	—
4	0.30	0.54	—	—	—
5	0.43	0.44	—	0.33	—
x	0.29	0.60	—	0.20	—
S.D.	0.09	0.01	—	0.13	—

—: not detected.

も現われることから, $K_3Fe(CN)_6$ 由来のものと思われる. 5 分付近に溶出するピークは, MeOH 単独でも現われることから溶媒に基づくピークと思われる.

4. 前処理後の安定性検討

低濃度の IAA 溶液では, 測定偏差が ODTT に比べて比較的大きいことから, 操作途中の IAA の分解が考えられたので, これについて検討を加えた.

操作は 5 ppm の IAA, ODTT 標準液を前処理して 0, 0.5, 1, 2, 3 時間各々室温 (20.5 度) および -20 度に放置した後, HPLC で定量し, その結果を Fig. 2 に示した. またこれらのデータを Arrhenius の法則を利用した加速変性法⁵⁻⁷⁾による解析を試みた結果, ODTT は室温および -20 度いずれの条件においてもほとんど変化は見られなかった. しかし IAA は -20 度保存でも 7 時間, 室温では 1.6 時間で, 10% の含量低下が観察された. したがって IAA は室温で分解を起こしやすいことが明らかとなった. 特に微量の場合には分解の影響が多くなると考えられるので, 前処理をしてから HPLC で測定するまでの時間を一定にする注意が必要である.

5. 実際試料への応用

実際のアルキル化処理人免疫グロブリン製剤 5 lot について IAA, ODTT および DTT の定量を行った結果, IAA, DTT はいずれの lot にも検出されなかった. ODTT については 0.6 ppm 検出されたもの 1 lot, 0.29, 0.20 ppm 検出されたものがそれぞれ 1 lot あった. 検出されなかったものは 2 lot であった (Table II).

考 察

アルキル化処理人免疫グロブリン製剤中の限度試験の対象としている IAA, DTT 等は蛋白の化学修飾試薬として, 一般に使用されているが IAA は光分解, DTT は自然酸化, 熱分解等を受け易く不安定な化合物である.

ODTT を含むこれらの試薬をガスクロマトグラフィーにおいて同時定量を試みたが, 化合物の相互間で反応しやすく, さらに熱分解を起こしやすいために再現性が極めて低く同時定量は困難であった. IAA は 265 nm, ODTT は 285 nm に極大吸収を示すが, 波長が近接していること, 分子吸光係数が小さいこと等で混合物の吸光

Fig. 3. Stability of IAA and ODTT after Extraction

—○—, IAA (room temp),
 —●—, IAA (-20°C),
 —◇—, ODTT (room temp),
 —◆—, ODTT (-20°C).

度定量も困難であった。薄層クロマトグラフィーにおいては分離可能だが抽出の時、混入する製剤中の maltose がしばしば良好な分離を妨げテーリングを増大させる等、望ましくなくさらに定量感度も低いことから限度試験には不適であった。

以上のことより不安定な極性物質の分離に適している HPLC, 特に逆相カラムによる分離を応用した定量法を検討した。IAA, ODTT はそれぞれ 265, 285 nm 付近に極大吸収波長を示すが両者の同時分析および感度の向上を計って 205 nm をモニター波長とした。

この結果は溶媒の影響を受けることなく IAA, ODTT, および DTT いずれの場合にも原点を通り、製剤中濃度で 10 ppm まで良い直線性を示し、0.3 ppm までは充分定量可能であることを示した。

実際の製剤中の残存限度は 10 ppm 前後を一応の目安としていることから、本法は充分の感度を有しており、ケイ光標識等の特別な増感操作を必要としない簡略化した限度試験として routine に採用できると考えられる。

引用文献および注

- 1) 本論文は日本薬学会第 101 年会 (熊本, 1981 年 4 月) で発表.
- 2) W.W. Cleland, *Biochemistry*, **3**, 480 (1964).
- 3) L. Hellerman, F.P. Chinard, V.R. Deitz, *J. Biol. Chem.*, **147**, 443 (1943).
- 4) D.D. Brigger, H. Goldman, C.R. Scriver, *Pediat. Res.*, **11**, 124 (1977).
- 5) N.K. Jerne, W.L.M. Perry, *Bull. WHO*, **14**, 167 (1956).
- 6) D. Greiff, W.A. Rightsel, *J. Immunol.*, **94**, 395 (1965).
- 7) 黒川正身, 高橋宏一, 石田説而, バイオアッセイ, **1978**, 240.