

未分画ヘパリン中のムコ多糖類の確認方法およびその工業的除去方法

誌名	日本食品科学工学会誌
ISSN	1341027X
著者名	村田,浩志 松久,明生 山本,啓一 戸田,隆雄 六車,三治男 河原,聡
発行元	日本食品科学工学会
巻/号	59巻12号
掲載ページ	p. 628-636
発行年月	2012年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



未分画ヘパリン中のムコ多糖類の確認方法およびその工業的除去方法

村田浩志^{1,2}, 松久明生², 山本啓一², 戸田隆雄², 六車三治男³, 河原 聡^{3*}¹ 宮崎大学大学院農学工学総合研究科² 扶桑薬品工業株式会社³ 宮崎大学農学部

A Method for Analyzing the Purity of Un-fractionated Heparin Preparations and the Industrial-scale Removal of their Impurities

Hiroshi Murata^{1,2}, Akio Matsuhisa², Keiichi Yamamoto², Takao Toda²,
Michio Muguruma³ and Satoshi Kawahara^{3*}¹ Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki,
1-1 Gakuenkibanadai Nishi, Miyazaki, Miyazaki 889-2192² Fuso pharmaceutical industries, Ltd, 2-3-30, Morinomiya, Joto, Osaka, Osaka 536-8523³ Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1 Gakuenkibanadai Nishi, Miyazaki, Miyazaki 889-2192

We have developed an analytical method for mucopolysaccharides (MSs) and a simple method for removing their impurities from un-fractionated heparin (UFH) preparations. An over-sulfated chondroitin sulfate standard (OSCS-STD) was de-polymerized with nitrous acid, as were UFH sodium salt containing OSCS and other MSs (OSHP-SH), OSCS reference standards containing heparin (CSMS-CE1 and CSMS-CE2), and various UFH products. Following de-polymerization, the molecular weight distributions of these samples were analyzed by gel permeation HPLC. The molecular weight distribution of OSCS-STD remained unchanged before and after nitrous acid de-polymerization, and the molecular weight distribution of OSCS-STD was similar to that of OSHP-SH de-polymerized with nitrous acid. On the other hand, the molecular weight distributions of CSMS-CE1 and CSMS-CE2 were similar to that of standard chondroitin sulfate B. UFH sodium salt and several drug substances containing heparin and other MSs were then purified by ethanol precipitation. After nitrous acid de-polymerization, gel permeation HPLC and ¹H-NMR spectroscopy revealed that MSs resistant to de-polymerization with nitrous acid were concentrated in the supernatant and heparin was concentrated in the colloidal precipitate.

(Received Apr. 23, 2012; Accepted Sep. 3, 2012)

Keywords : nitrous acid de-polymerization, HPLC, ethanol precipitation, heparin, over-sulfated chondroitin sulfate
キーワード : 亜硝酸分解, HPLC, エタノール沈殿, ヘパリン, 過硫酸化コンドロイチン硫酸

ヘパリン (heparin, HP) は工業的には食用獣である牛、豚および羊等の屠畜後の副生物から製造される生理活性物質であり、主に肺、肝および腸組織から抽出される酸性ムコ多糖 (mucopolysaccharide, MS) である。医療分野で世界的に広く普及し、血液透析時の血液凝固防止および血栓塞栓症予防等の目的で使用される¹⁾。また HP を、化学的あるいは酵素的に分解して得られる低分子 HP も同効薬として広く普及している。

BSE (bovine spongiform encephalopathy) 問題以降、医薬品用 HP は、ほぼ豚小腸粘膜の MS 混合物を粗原料とし、

それをバッチ混合 / 分画して製造された未分画 HP (un-fractionated heparin, UFH) である^{2)~4)}。MS 混合物中には、HP 以外に、コンドロイチン硫酸ファミリー (chondroitin sulfate family, CSF) およびヘパラン硫酸 (heparan sulfate, HS) が含有されている。CSF や HS もまた、分画されて食品、試験研究用試薬、あるいは医薬品などとして有効利用されている⁵⁾。日本国内においても、HP のみならず、多くの MS 製品が健康食品や医薬品として流通している。

2008 年初頭、米国およびドイツにおいて UFH 製剤を急速静注投与した患者に従来とは異なる副作用が発生したことが、米国 FDA から発表された⁶⁾。この事故では最終的に 100 名以上の患者が死亡した。FDA および世界各国の研究機関において、この事故で使用された UFH 製剤の原薬を分析した結果、自然界には存在しないとされる、過硫酸

¹ 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1² 〒536-8523 大阪府大阪市城東区森之宮 2-3-30³ 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

* 連絡先 (Corresponding author), a04206u@cc.miyazaki-u.ac.jp

化コンドロイチン硫酸 (over-sulfated chondroitin sulfate, OSCS) が多量に存在したことが確認された⁷⁻⁹⁾。このことを受け、世界中の多くの研究者により、動物実験等で OSCS と副作用との関連性が調査された。その結果、アナフィラキシー様症状などの病態が確認され、今回の有害事象の原因は OSCS によるものと特定された。

日本国内では、HP の純度試験法および確認試験法等の検討が行われ¹⁰⁾¹¹⁾、これまで行われていた HP の規格試験に加え、不純物の確認 / 純度試験として¹H-NMR、イオン交換および逆相クロマトグラフィー等の実施が薬事法で義務付けられた¹²⁾¹³⁾。工業的には、HP や他の MS 製品は同一製造所で調製される場合が多く、調製ラインが共用されていることも多い。今回の有害事象は、各製品の粗原料の管理不足、あるいは調製ラインの洗浄不良によるものと考えられ、HP を原料とする医薬品や食品への不純物混入を避けるために、調製工程での不純物検査を行うことは、HP の安全性を確保する上で必須である。しかし、薬事法で義務付けられた試験法は比較的高価な機器を必要とし、また煩雑な試験であることから、粗原料や中間体等の各調製工程で上記の検査を実施するのは困難である。

MS の中でも、HP や HS は基本骨格が N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) あるいは N-スルフェートグルコサミン (GlcNS) とウロン酸 (D-グルクロン酸 (GluA) あるいは L-イズロン酸 (IdoA)) の繰り返し 2 糖で構成される。そして、HP や HS は亜硝酸分解されるという特性を持つ。一方、基本骨格が N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) あるいは N-スルフェートガラクトサミン (GalNS) とウロン酸 (GluA あるいは IdoA) の繰り返し 2 糖で構成される OSCS や CSF は、亜硝酸分解に対して抵抗性を示すことが知られている。各構成糖のアセチル基と硫酸基の結合部位と結合数は一定ではないが、一般的には、水 / 有機溶媒混液に対する溶解度は、分子量と結合硫酸基の数の増加に伴い、低くなる傾向にある¹⁴⁾。

本研究では、これら MS の基本的な特性に基づき、HP 調製工程で実施できる簡便な HP の純度試験法を開発することを目的とし、さらに HP 中に含有される MS 不純物の工業的除去方法についても検討を行った。

実験方法

1. 試薬

OSCS 標準品 (OSCS-STD) は (財)医薬品医療機器レギュラトリーサイエンスより購入した。OSCS と CSF の混合物である粗 OSCS (CSMS-CE1 および CSMS-CE2) は、日本バルク(株) から供与された、試験用 OSCS 含有 UFH ナトリウム塩を酸加水分解後にエタノール (EtOH) で固化し、HP および HS を除去したものをを用いた。また、HP、HS、コンドロイチン硫酸 B 型および約 12.5% の OSCS を含有する試験用 UFH ナトリウム塩 (OSHP-SH) は、CBC(株)

より供与された。

MS 参照物質として用いたコンドロイチン硫酸 A, B, C, D および E 型 (CS-A, CS-B, CS-C, CS-D, CS-E) の 5 種類、HS およびケラタン硫酸 (keratan sulfate, KS) は、生化学工業(株) から購入した (生物由来、試薬特級品)。また、高分子 CS-B 標準品 (CS-B-STD) は、自家調製した豚小腸粘膜由来の MS 混合物を精製したものをを用いた。MS 参照物質 I (MS-I) は、豚小腸粘膜由来の低分子 MS を HS : CS-B : CS-C = 約 8 : 1.5 : 0.5 (重量比) となるように調製し、MS 参照物質 II (MS-II) は牛気管軟骨由来の MS 混合物 (CS-A : CS-C = 約 7 : 3) を酸加水分解して調製した。

分画試験で用いた各 UFH については、500 g スケールでの処理に供した試験用 UFH ナトリウム塩 (UFN-SP ; 主成分として HP を、また他の MS として HS, CS-B および CS-C を含有) は CBC(株) からの供与品を用いた。また、1 g スケールでの処理に供したナトリウム塩 5 検体 (UFN1, UFN2, UFN3, UFN4, UFN5) およびカルシウム塩 1 検体 (UFC) は市販 HP 製剤に使用されている商業用 HP 原薬 (¹H-HMR 法による純度確認試験において OSCS が未検出) をを用いた。注射用水および生理食塩水は日本薬局方適合品を、また、有機溶媒 (EtOH) を含むその他の試薬は試薬特級品、あるいはそれ以上のもの (和光純薬(株) 製) をを用いた。

2. EtOH 分画処理

UFN-SP の EtOH 分画処理は、八藤後らの方法¹⁵⁾ の変法により行った。略述すると、UFN-SP 500 g を 10 L ホーロータンクに量り取り、生理食塩水を加えて 5 L とした。そこに EtOH 2.5 L を加えて攪拌した後、室温で 24 時間静置し、上層および下層のコロイド状沈殿物の二層に分配した (Fig. 1A, B)。上層液を別の 30 L ホーロータンクに移し、さらに EtOH 20 L を加え、激しく攪拌した。一方、下層のコロイド状沈殿物は別の 30 L ホーロータンクに移し、生理食塩水 3 L を加えて攪拌した後、再度、EtOH 20 L を加えて激しく攪拌した。いずれの画分についても 24 時間静置した後、タンク底に沈殿した白色析出物をそれぞれブフナーオート上で回収し、EtOH で洗浄した後、五酸化ニリン存在下で、室温にて減圧乾燥した。500 g の UFN-SP から最終的に 418.2 g の白色粉末を回収した (回収率 83.6%)。

UFN1~5 および UFC についても、同様にして EtOH 分画処理を行い、白色粉末を回収した (Fig. 1C)。なお UFN 1~5 および UFC については 1 g の出発物質から分画を行い、全工程を 1/500 にスケールダウンして実施した。

3. MS の亜硝酸分解処理

あらかじめ注射用水に溶かした各検体溶液に、検体 1 g に対し 60 mg の NaNO₂ を加えて攪拌した後、4 mol/L HCl で pH を約 1.5 に調整した。30 分間静置後、2 mol/L NaOH で pH を 5.0 に調整し、HPLC の試料とした。上の処理は全て水冷下で行った。

4. HPLCによるMSの分子量分布の確認

HPLC法による各試験物質の分子量分布の確認は、第15改正日本薬局方¹⁶⁾に記載されている変法を用いて、次の条件で行った。なお、試料は、各検体25mgを量り取り、それぞれを移動相2.5mLに溶解して調製した。管理システム、LC solution;ポンプ、LC-10AV vp;検出器、紫外吸光度計 (SPD-10AV vp;測定波長、234nm)、示差屈折計 (RID-10A);カラムおよびガードカラム、TSKgel G-2000SWXL, TSKguardcolumn SWXL (TOSO(株));カラム温度、40℃;移動相、0.2 mol/L Na₂SO₄ (pH5.0);流速、0.5 mL/min.;試料導入量、25 μL。

5. ¹H-NMR法によるMSの純度確認

NMR法による各試験物質の純度確認は、日本薬局方に記載されている方法に準じて行った¹²⁾。試料調製は、各検体(25mg)を、3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウ

ム-d₄の重水素溶液(1→10000)0.5mLに溶解した。また、NMR装置はVNMRS 500 PS、分析ソフトにはVnmrJ2.2C (アジレントテクノロジー(株))を用い、0~8ppmのシグナルを測定した。なお、1.92ppmおよび2.18ppm前後に検出されるシグナルは、HPに由来するサテライトあるいはHPに由来する未同定のシグナルであるため、評価対象としなかった。

実験結果および考察

1. 亜硝酸分解/HPLC法によるUFHの純度試験法の確立

OSCSを含有する各種標準品および参照物質の亜硝酸分解抵抗性を検討した。HPLCクロマトグラムにおいて、亜硝酸分解反応の前後でOSCS-STDは低分子化せず、亜硝酸分解に対して抵抗性であることが示された (Fig. 2A-c, d)。それに対し、約12.5%のOSCSを含有するOSHP-SHについては、2糖単位のピークシフトを伴う低分子化が確認された (Fig. 2A-a, b)。OSHP-SHの未分解物ピーク形状はOSCS-STDのそれと似ており、未分解物ピークのRI面積値は分解前の約12.1%であった。それ故、OSCSは、他のMS混在下でも亜硝酸分解抵抗性を示し、ある程度定量的に検出可能であると考えられた。この結果は、分解方法の相異なる低分子ヘパリン中OSCSの残存度について検討したZhangらの報告¹⁷⁾と一致した。

また、CSMS-CE1およびCSMS-CE2についても亜硝酸分解抵抗性であることが確認されたが、HPLCにおける未分解物のピークはCS-B-STDに近い分子量をもち、分子量分布もそれと似ていた (Fig. 2B)。これらのことから、未分解物ピークの主成分は、しばしばUFHに多く残存する、豚腸粘膜由来の高分子CS-Bであると推測された。また、

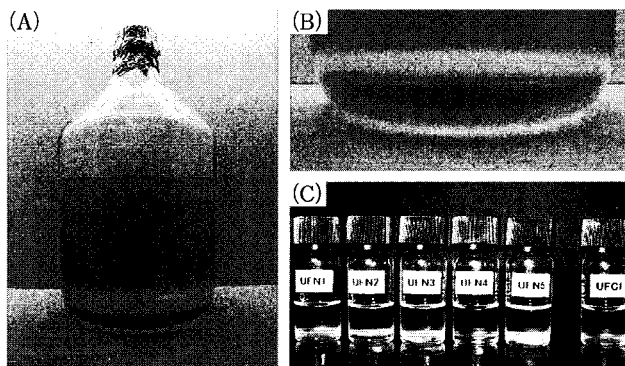


Fig. 1 Fractionation of UFH by EtOH precipitation

(A), appearance of UFN-SP after EtOH precipitation; (B), magnified view of the interface between the supernatant and the precipitate; (C), appearance of UFN1-5 and UFC1 after EtOH precipitation.

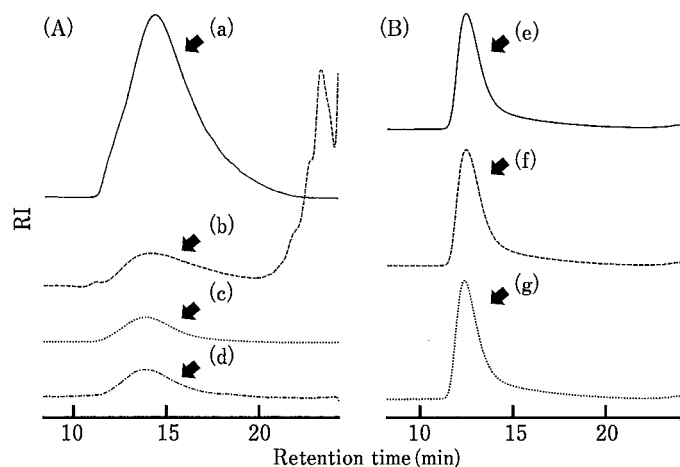


Fig. 2 Molecular weight shift of the OSCS standard, OSCS containing UFH, and crude OSCS resulting from nitrous acid de-polymerization

(A), OSCS standard and UFH; (B), crude OSCS. (a), OSHP-SH (—); (b), de-polymerized OSHP-SH (---); (c), OSCS-STD (.....); (d), de-polymerized OSCS (- · - ·); (e), de-polymerized CSMS-CE1 (—); (f), de-polymerized CSMS-CE2 (---); (g), CS-B-STD (.....).

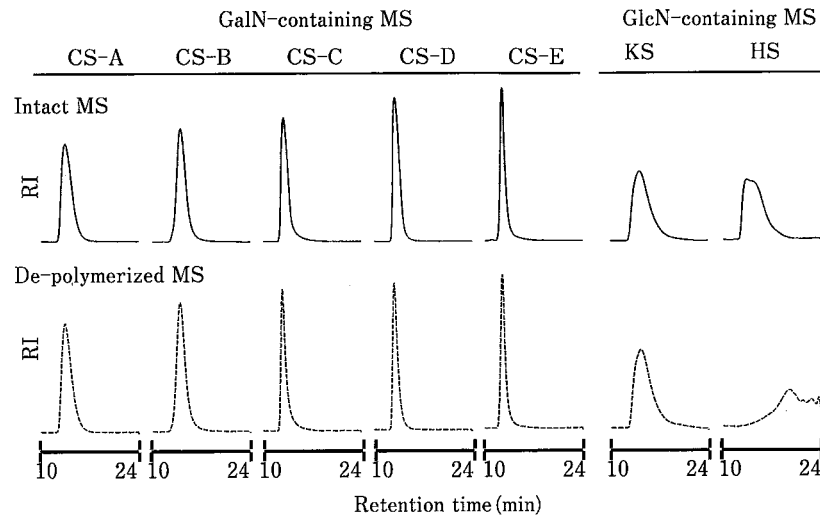


Fig. 3 Molecular weight shift of CSF, KS and HS after nitrous acid de-polymerization

Upper charts show the molecular weight distribution of intact MS and lower charts show the molecular weight distribution of de-polymerized MS.

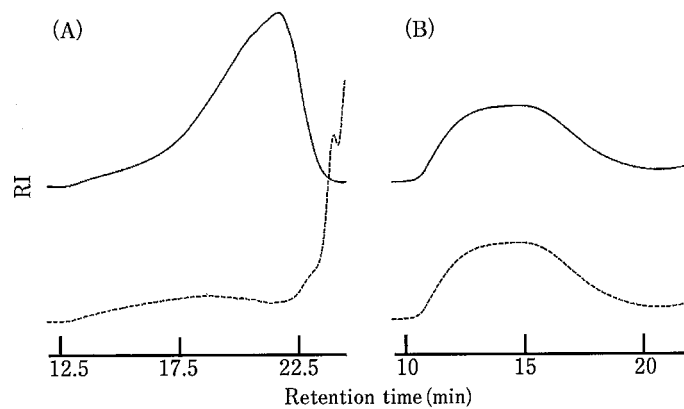


Fig. 4 Molecular weight shift of MS in the reference substances after nitrous acid de-polymerization

(A), MS-I; (B), MS-II. intact MS, (—); de-polymerized MS, (---).

これらの粗 OSCS 中に残存する OSCS は CS-B と比較して極微量であったため、ピークとして確認できなかったと推測された。

CSF の全ての型および KS は亜硝酸分解処理により分解しなかったのに対し、HS のみで 2 糖単位のピークシフトを伴う分解と低分子化が確認された (Fig. 3)。また、豚小腸粘膜に由来する MS-I 中に含有される HS は、亜硝酸分解処理により分解および低分子化した (Fig. 4A)。この結果より、HS は他の MS 混在下においても亜硝酸分解により分解され、その反応性は HS 単体の場合と変わらないことが示された。さらに、牛気管軟骨由来の CS-A および CS-C 混合物の酸加水分解物である MS-II については、亜硝酸分解抵抗性が確認された (Fig. 4B)。これらのことから、ムコ多糖の起源である動物種は亜硝酸分解の感受性に影響しないことが示唆された。

HPLC 法は MS、特に低分子 HP、の分子量測定法として

古くから用いられており¹⁸⁾、各国の薬局方に収載され、多くの原料 MS メーカーにも普及している分析手法の 1 つである。したがって、UFH 調製時の工程管理において、本報中の MS 確認方法を実施することは比較的容易であると考えられる。

本研究で検討した、亜硝酸分解と HPLC を組み合わせた MS 確認方法では、OSCS や CSF などの GalN とウロン酸を主骨格とする MS、および KS 等の亜硝酸分解抵抗性を有する MS の分析が可能であるが、OSCS と CSF を分離同定することは困難であった。特に、半合成品である OSCS の場合、出発原料と硫酸化方法の違いにより糖鎖構造と物性が変動することが確認されており (データ示さず)、これらの OSCS を分離同定することは、さらに困難になると推測される。この点については、今後、詳細な検討が必要であると考えられた。

しかし、HP 中の不純物を確認するという目的において

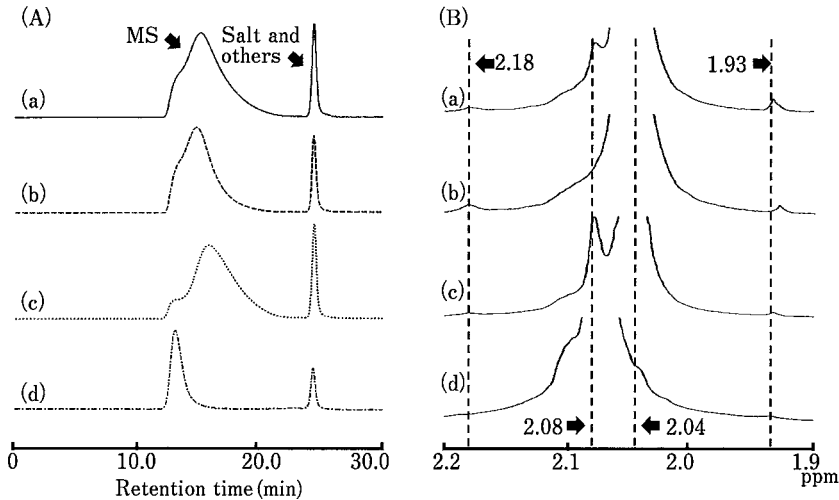


Fig. 5 HPLC and NMR analysis of UFN-SP fractionated by EtOH precipitation
 (a), UFN-SP; (b), colloidal precipitate; (c), supernatant; (d), purified supernatant after re-fractionation using EtOH of the supernatant fraction shown in (c).

は、 $^1\text{H-NMR}$ 法¹⁰⁾と比較して、本法は簡便かつ低コストで実施できる検査方法である。さらにこの方法は、UFH製品中の不純物含量確認のみならず、他のMS製品中の不純物含量確認による安全性の向上にも寄与できると考えられる。

2. EtOH分画によるUFNからのHPの粗精製

HP中に含まれる不純物を簡便かつ効率良く除去する手法を開発するため、HPの純度にEtOH分画処理が及ぼす影響を検討した。UFN-SPのEtOH分画処理後に得られたコロイド状沈殿物および上清を再結晶して得た白色粉末を、HPLCおよびNMR分析、比較した。また、上清画分を再度EtOH分画して得た沈殿物（以下、再分画沈殿と略記）についても、同様に分析を行った。

HPLC分析では、全ての試料で、保持時間10~20分にMS骨格に由来する主要ピークが検出され、約24.5分には塩類に由来するピークが検出された。未分画のUFN-SP (Fig. 5A-a)と比較して、沈殿物ではピーク頂点より高分子側でのピークの立ち上がりとテーリングの減少が確認された (Fig. 5A-b)。一方、上清では、保持時間13.5分および16.0分付近に2つのピークが確認された (Fig. 5A-c)。また、再分画沈殿では、保持時間13.5分付近のピークのみが確認された (Fig. 5A-d)。

UFN-SPのNMRスペクトルでは、2.04 ppm、と2.08 ppmの2シグナルを確認した (Fig. 5B-a)。沈殿物では2.04 ppmの1シグナルのみが確認された (Fig. 5B-b)。また、上清では2.04 ppm、と2.08 ppmの2シグナルを確認したが、UFN-SPと比較して、2.04 ppmのシグナルに対する2.08 ppmのシグナルの割合が増加した (Fig. 5B-c)。さらに、再分画沈殿では、2.04 ppmのシグナルが大きく減少し、2.08 ppmが主要なシグナルとなった (Fig. 5B-d)。

MSの $^1\text{H-NMR}$ 分析では、2.04 ppm付近にHPに由来するシグナルが得られ、2.08 ppm付近にはCS-Bに由来するシグナルが得られる。このことから、USN-SPのEtOH処理により、HP以外の物質の多くは上清に移行し、沈殿物への残留は僅かであると考えられた。

さらに、UFN-SP、UFN-SPのEtOH分画物、および再分画沈殿を亜硝酸分解し、HPLC分析した。全ての試料で、保持時間約13.5分に分解抵抗性MSのピークが確認された (Fig. 6A)。しかし、UFN-SPと比較して、沈殿物の中ピークは僅少であったのに対し、上清ではピーク面積が増加した。再分画沈殿では、分解抵抗性MSのピークが、より明確に確認された。これら試料のNMRシグナルは2.04 ppmおよび2.08 ppmが主であり (Fig. 6B)、亜硝酸未分解の各画分のデータ (Fig. 5B)と類似していた。これらの結果から、亜硝酸分解前後でMSの分子量と構造に大きな変動はないと推測された。また、上清画分に含まれる亜硝酸分解抵抗性MSの、0~6 ppmにおけるNMRシグナルは、CS-B-STDと同様のシグナル形状を示した (データ示さず)。このことから、UFN-SP中の亜硝酸分解抵抗性物質は高分子CS-Bであると推測された。

全MSに占める亜硝酸分解抵抗性MSのピークのRI面積値は、UFN-SPでは分解前の面積値の1.16%であったのに対し、EtOH分画処理後に得られたコロイド状沈殿物中の分解抵抗性MSピークのRI面積値は、分解前の面積値の約0.09%であった。このことから、EtOH分画処理によりHPの純度が大幅に高まったことが確認された (Table 1)。

UFN1~5およびUFCのEtOH処理前と分画後のコロイド状沈殿物の純度をNMRにより比較した結果をFig. 7に。また、これらの亜硝酸分解物を比較したHPLCクロマトグラムをFig. 8に示す。NMRによる分析の結果、EtOH

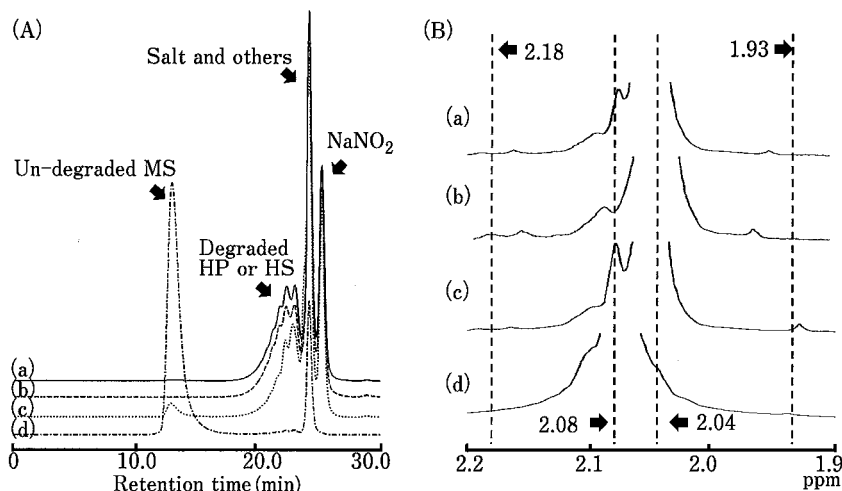


Fig. 6 HPLC and NMR analysis of nitrous acid de-polymerized fractions of UFN-SP
 (a), UFN-SP ; (b), colloidal precipitate ; (c), supernatant ; (d), purified supernatant
 after re-fractionation using EtOH of the supernatant fraction shown in (c).

Table 1 Changes of RI area of MS[†] contained in the UFN-SP fractionated with ethanol

Ethanol precipitation	Nitrous acid de-polymerization		Composition of un-degraded MS (B/A)	Ratio of un-degraded MS ^c
	Un-treated ^a (A)	Treated ^b (B)		
Un-treatment (intact)	2942810±1624	34064±711	1.16×10^{-2}	1.00
Supernatant	3145815±1954	152882±260	4.86×10^{-2}	4.20
Colloidal precipitate	3056740±1647	2831±137	9.26×10^{-4}	8.00×10^{-2}

Values are means ± SD ($n=6$).

[†]MS, mucopolysaccharides.

a, Total area of MS without nitrous acid de-polymerization.

b, RI area of un-degraded MS with NaNO₂ eluted from 10.0-20.0 min on HPLC.

c, Ratio of un-degraded MS in fractionated UFN-SP to that in the intact material.

分画処理後にすべての検体において、2.08 ppm 付近のシグナル強度が減少した。また、UFN4において、2.09 ppm 付近に大きくシグナルが確認されたが、これは製造工程において添加された過マンガン酸カリウムによる影響と推測された。一方、HPLCによる分析の結果、EtOH分画処理前の各UFHを亜硝酸分解すると、いずれの試料でも、亜硝酸分解抵抗性MSのピークが確認された (Fig. 8A)。コロイド状沈殿物および上清に含有されるMSの分子量分布は、共にUFN-SPの場合と良く似ていた (データ示さず)。また、コロイド状沈殿物を亜硝酸分解処理すると、主要なピーク成分は分解した。しかし、保持時間約13.5分の亜硝酸分解抵抗性MSのピークも、僅かながら確認された (Fig. 8B)。

HPLCクロマトグラムにおけるピーク面積の計算結果から、これら未分画UFHには亜硝酸分解抵抗性の不純物が、およそ0.01%~0.35%含有されていることが示された (Table 2)。それらピーク成分のRI面積値は、分画前の原料UFHのRI面積値の10%~30%程度まで減少していた (Table 3)。

以上の結果より、UFH製造工程において、HP以外のMS共雑物質を除去する方法として、EtOH分画が有効であると考えられた。本調製方法を製造工程の最終段階で実施することにより、HPの純度を高めることが可能になる。本調製方法は室温付近での操作でも十分な分離能を確保でき、また、高UFH濃度および高イオン強度を確保できることでHPの沈降が加速されるため、バッチ操作での回収操作が容易となることが大きな利点である。この方法で得られた精製UFHは、UFH製剤のみならず、不純物による副反応および最終製品へのコンタミネーションを低減した、付加価値の高い新規HP化合物や低分子HPの原料となり得る。

以上のことから、UFHの調製工程において亜硝酸分解/HPLC法による純度検査を行い、さらに、EtOH分画処理を実施することで、高品質なHP原料を安定的に調製できると考えられた。今後、この知見を応用し、様々なHP製品における純度試験を行い、混入MSの除去が可能であることを確認する必要があると考えられた。

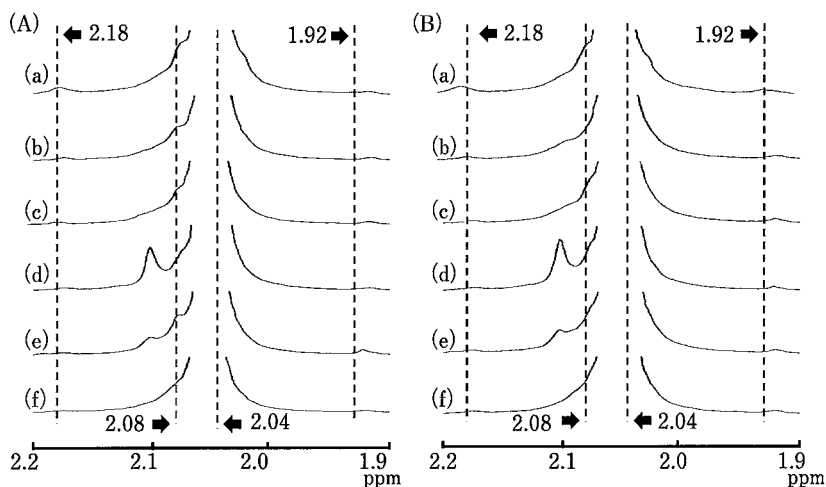


Fig. 7 NMR spectrum of the sodium and calcium salts of UFH products purified by EtOH precipitation (A), intact product ; (B), purified product. (a), UFN 1 ; (b), UFN 2 ; (c), UFN 3 ; (d), UFN 4 ; (e), UFN 5 ; (f), UFC.

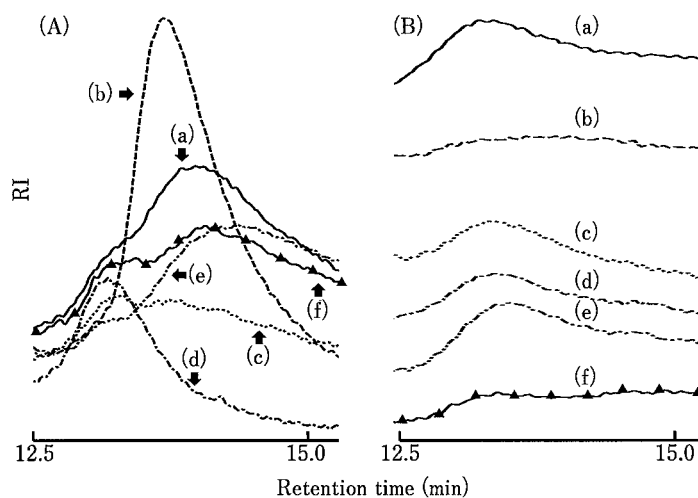


Fig. 8 HPLC chromatogram of nitrous acid de-polymerized colloidal precipitate from the sodium and calcium salts of UFH products

(A), intact product ; (B), purified product. (a), UFN 1 (—); (b), UFN 2 (---); (c), UFN 3 (·····); (d), UFN 4 (- · - ·); (e) UFN 5 (— · ·); (f) UFC (—▲—).

Table 2 RI area of nitrous acid de-polymerization-resistant MS[†] in drug substances

Products [§]	Nitrous acid de-polymerization		Composition of un-degraded MS (B/A)
	Un-treated ^a (A)	Treated ^b (B)	
UFN 1	3 139 209 ± 2 372	8 714 ± 228	2.78 × 10 ⁻³
UFN 2	3 225 737 ± 2 988	11 122 ± 145	3.45 × 10 ⁻³
UFN 3	3 167 162 ± 3 880	303 ± 48	9.57 × 10 ⁻⁵
UFN 4	3 191 825 ± 1 933	607 ± 66	1.90 × 10 ⁻⁴
UFN 5	3 223 922 ± 2 427	2 275 ± 41	7.06 × 10 ⁻⁴
UFC	3 218 608 ± 1 363	2 528 ± 128	7.85 × 10 ⁻⁴

Values are means ± SD (*n* = 3).

[†] MS, mucopolysaccharides ; [§] UFN, un-fractionated heparin sodium salt ; UFC, un-fractionated heparin calcium salt.

a, Total area of MS without nitrous acid de-polymerization.

b, RI area of un-degraded MS with NaNO₂ eluted from 10.0–20.0 min on HPLC.

Table 3 RI area of nitrous acid de-polymerization-resistant MS[†] in colloidal precipitate resulting from ethanol precipitation of drug substances.

Products [§]	Nitrous acid de-polymerization		Composition of un-degraded MS (B/A)	Ratio of un-degraded MS ^c
	Un-treated ^a (A)	Treated ^b (B)		
UFN 1	3 331 957±3 447	2 723±236	8.17×10^{-4}	2.94×10^{-1}
UFN 2	3 265 393±4 494	1 039±87	3.18×10^{-4}	9.23×10^{-2}
UFN 3	3 248 345±2 006	98±37	3.02×10^{-5}	3.15×10^{-1}
UFN 4	3 341 219±2 229	152±25	4.55×10^{-5}	2.39×10^{-1}
UFN 5	3 437 141±2 585	479±31	1.39×10^{-4}	1.97×10^{-1}
UFC	3 386 020±3 052	486±59	1.44×10^{-4}	1.83×10^{-1}

Values are means±SD ($n=3$).

[†] MS, mucopolysaccharides.

[§] Abbreviations are the same as shown in Table 2.

a, Total area of MS without nitrous acid de-polymerization.

b, RI area of un-degraded MS with NaNO₂ eluted from 10.0–20.0 min on HPLC.

c, Ratio of un-degraded MS in precipitate to that in each intact material shown in Table 2.

要 約

未分画ヘパリン (UFH) の純度試験法, および UFH 中のヘパリン (HP) 以外のムコ多糖類 (MS) 夾雑物の工業的除去方法について検討した。過硫酸化コンドロイチン硫酸 (OSCS), HP 以外の MS, およびそれらの混合物不純物を含有する UFH ナトリウム塩 (OSHP-SH), HP 含量を低減した粗 OSCS (CSMS-CE1 および CSMS-CE2) について亜硝酸分解処理を行い, HPLC 法により分解物の分子量分布を測定した。OSCS-STD は分解処理前後で分子量分布の変動はなく, 分解抵抗性であった。OSHP-SH 中の亜硝酸分解抵抗性物質の分子量分布は OSCS-STD と近かったが, 粗 OSCS 中の分解抵抗性物質は CSMS-CE1 および CSMS-CE2 の分子量分布はコンドロイチン硫酸 B 標準品に近かった。一方, UFH Na 塩 (UFN-SP), 商業用の UFH ナトリウム塩およびカルシウム塩について, EtOH 分画処理を行った。各分画物を HPLC 法と¹H-NMR 法により分析した結果, 全ての検体で亜硝酸分解抵抗性物質は上清に移行し, HP はコロイド状沈殿物として濃縮された。以上の結果から, UFH の調製工程において亜硝酸分解/HPLC 法による純度検査を行い, さらに, EtOH 分画処理を実施することで, 高品質な HP 原料を安定的に調製できると考えられた。

本研究の遂行にご協力戴きました元共立女子大学教授中村豊朗氏, ILS(株) (大塚化学(株)グループ:旧社名:伊藤ライフサイエンス(株)), 八藤後武美氏, 岡周作氏に深く御礼申し上げます。貴重な各試験用 UFH をご供与戴きました CBC(株) および日本バルク薬品(株) に深く御礼申し上げます。扶桑薬品工業(株), 川上隆生氏, 嶋村英雄氏に深く御礼申し上げます。また生物由来生理活性物質の抽出方法, 修飾方法および国内外の臨床利用例について多く

のご教示ご指導戴きました故奥山隆先生に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) ヘパリンナトリウム, ヘパリンナトリウム注射液, 「第15改正日本薬局方解説書」, (廣川書店, 東京), C3970-3979 (2006).
- 2) Roden, L. and Dorfman, A., The acid mucopolysaccharides of Furth's mastocytoma in the mouse. *Acta Chemica Scandinavica*, **13**, 2121 (1959).
- 3) Pearce, R.H., Mathieson, J.M. and Grimmer, B.J., Fractionation of anionic glycosaminoglycans by ion-exchange chromatography. *Anal. Biochem.*, **24**, 141-156 (1968).
- 4) Coyne, E., Heparin manufacturing processes. *Federation Proceedings*, **36**, 32 (1977).
- 5) 奥山 隆, 佐々木勲, 村田克己, ヘパリンノイドの化学と薬理, 「ヘパリン」, 吉澤善作監修, (講談社, 東京), pp.234-235 (1979).
- 6) U.S. Food and Drug Administration (FDA), FDA Public Health Update : Recall of heparin sodium injection and heparin lock flush solution (Baxter), (2008). <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>. (2008. 2. 28).
- 7) Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., Naggi, A., Viswanathan, K., Bisio, A., Capila, I., Lansing, J.C., Guglieri, S., Fraser, B., Al-Hakim, A., Gunay, N.S., Zhang, Z., Robinson, L., Buhse, L., Nasr, M., Woodcock, J., Langer, R., Venkataraman, G., Linhardt, R.J., Casu, B., Torril, G. and Sasisekharan, R., Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nature Biotechnology*, **26**, 669-675 (2008).
- 8) Beyer, T., Diehl, B., Randel, G., Humpfer, E., Schafer, H., Spraul, M., Schollmayer, C. and Holzgrabe, U., Quality assessment of unfractionated heparin using ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **48**, 13-19 (2008).
- 9) Kishimoto, T.K., Viswanathan, K., Ganguly, T., Elankumaran, S., Smith, S., Pelzer, K., Lansing, J.C., Sriranganathan, N., Zhao, G., Galcheva-Gargova, Z., Al-Hakim, A., Bailey, G.S., Fraser, B., Roy, S., Rogers-Cotrone, T., Buhse, L., Whary, M., Fox, J., Nasr, M., Dal Pan, G.J., Shriver, Z., Langer, R.S.,

- Venkataraman, G., Austen, K. F., Woodcock, J. and Sasisekharan, R., Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *The New England and Journal of Medicine*, **358**, 2457-2467 (2008).
- 10) 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 川原信夫, 正田卓司, 杉本直樹, 靄島由二, 品川麻衣, 榛葉信久, 宮田一義, 塚本秀樹, 千秋和久, 長谷川泰介, 河合健蔵, 余田 光, 木下充弘, 梶 直孝, 木下充弘, 掛樋一晃, 合田幸弘, 奥田晴宏, 棚元憲一, 山口照英, ヘパリン純度試験に関する研究 (第一報) ¹H-NMR によるヘパリンナトリウム純度試験に関する研究, *医薬品研究*, **39**, 651-659 (2008).
 - 11) 梶 直孝, 木下充弘, 川崎ナナ, 山口照英, 早川堯夫, 掛樋一晃, 日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験へのキャピラリー電気泳動法の適用について, *薬学雑誌*, **129**, 1255-1264 (2009).
 - 12) 厚生労働省, 厚生労働省告知第417号 (2008).
 - 13) 厚生労働省, 厚生労働省告示第322号 (2010).
 - 14) Volpi, N., Purification of heparin, dermatan sulfate, and chondroitin sulfate from mixture. *J. Chromatogr. B*, **685**, 27-34 (1996).
 - 15) 八藤後武美, 村田浩志, 低分子量ヘパリンの製造法, 特開2002-293804 (2002).
 - 16) 厚生労働省, パルナパリンナトリウム, 「第15改正日本薬局方」, pp. 855-856 (2006).
 - 17) Zhang, Z., Weiwer, M., Li, B., Kemp, M.M., Daman, T.H. and Linhardt, R.J., Oversulfated chondroitin sulfate: Impact of a heparin impurity, associated with adverse clinical events, on low-molecular-weight heparin preparation. *Journal of Medicinal Chemistry*, **51**, 5498-5501 (2008).
 - 18) Dedem, G. V and Nielsen, J. L., Determinations of the molecular mass of low molecular mass (LMM) heparin. *Pharmeuropa*, **3**, 202-218 (1991).
- (平成24年4月23日受付, 平成24年9月3日受理)