

分子量と電荷測定による 高純度ヘパリンとコンドロイチン 硫酸混入ヘパリンの判別

Sophia Kenrick, Ph.D.[†]

日本語訳: 昭光サイエンティフィック (株)

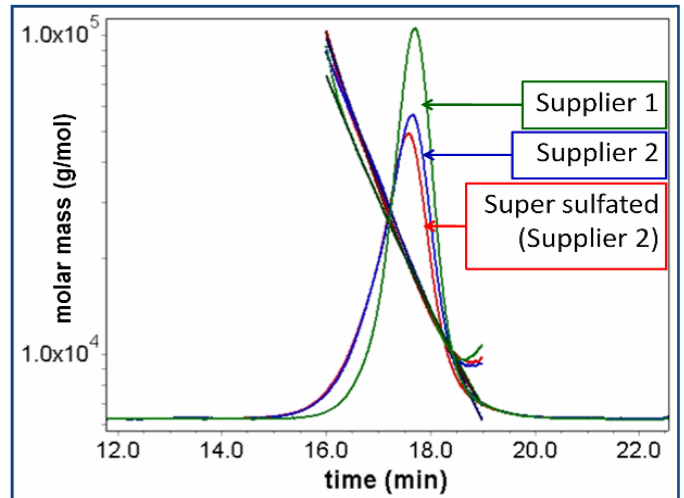
概要

ロット毎に異なるヘパリンを評価するには、複数の分析手法を組み合わせることが必要となります。多角度光散乱測定法 (MALS) による重量平均分子量と動的光散乱測定法 (DLS) による流体力学的半径はヘパリンのサイズと分散度の評価に使われ、その数値は、製造元の異なるヘパリンの品質やロット間差の評価にも用いられています。超並列位相分析光散乱法 (MP-PALS) と DLS を用いると試料の正味電荷及び純度を求めることができます。このアプリケーションノートでは、過硫酸化物質が混入したヘパリンを含む製造元の異なるヘパリンを比較しました。

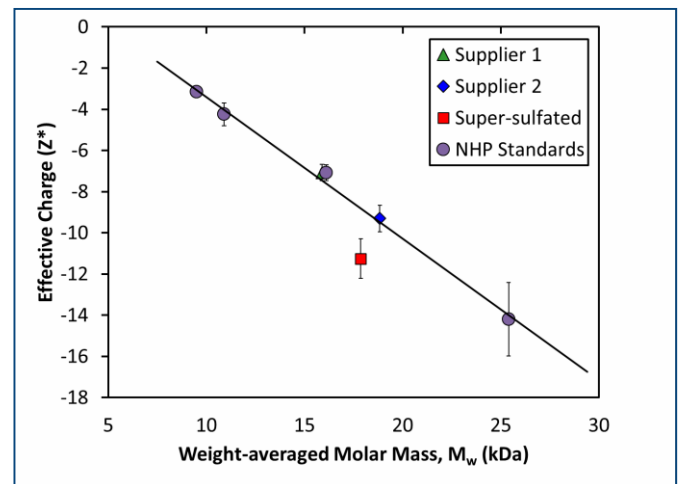
ヘパリンの標準試料及び異なる市販試料の重量平均分子量 (M_w) を SEC-MALS 測定により決定しました。2つの製造メーカー間の違いによるヘパリンの重量平均分子量及び流体力学的半径 (r_h) の差は10%以下でした。また、高純度ヘパリンと過硫酸化物質が混入したヘパリンの M_w と r_h の差は5%以下と非常に小さな値を示しました。このことから、サイズ情報のみでは、ヘパリンの品質評価はできないことが明らかになりました。

そこで、 z 平均の電気泳動移動度と r_h を同時に求められ、正味電荷を求めることが可能な Wyatt **Möbius** を用いて評価を行いました。その結果、一連のヘパリン標準品の正味電荷と重量平均分子量の関係は直線性を示し、電荷と分子量の比が一定であることが示されました。また、高純度ヘパリンは両製造元とも同様な直線性を示しましたが、過硫酸化物質が混入したヘパリンにおいては、電荷が30%マイナス側に増加することが示され、一分子あたりのマイナス電荷の増加は、硫酸基の増加と一致しました。

このように、SEC-MALS 測定により得られた M_w と MP-PALS により得られた正味電荷を組み合わせることで、高純度ヘパリンと硫酸化物質が混入したヘパリンを明確に区別できることが判りました。Wyatt社製 **DAWN** と **Möbius** の双方を使用することで、電荷と分子量の比を迅速に求めることを可能とし、非破壊でヘパリンのロット差を見極めることができます。



2社から市販されているヘパリンの SEC-MALS 測定の結果を重ね書きしたものです。試料の1つは過硫酸化物質が混入したヘパリンが混入しているものが含まれています。



純度の高いヘパリンは、電荷と重量平均分子量の比が一定であるのに対して、過硫酸化物質が混入したヘパリンの混入した試料では、分子量に比べ、負の電荷が増大していることが確認できます。

[†]skerrick@wyatt.com

I. 序論

ヘパリンは医療分野で既に70年以上、抗血液凝固剤として用いられてきましたが、最近、ロットによりコンドロイチン硫酸が混入していることが明らかになり、ヘパリンの精密分析法に新たな関心が向けられています。分子量及び分子量分布の測定のみでは、ヘパリンの化学構成を決定するには不十分であり、完全な特性解析のためには、より高度な分析手法が求められています。電気泳動移動度の測定により、分子の平均電荷が計算できますが、分子量の情報と組み合わせることで、正味電荷は、過硫酸化分子が混入したロットのヘパリンを見極めることができます。

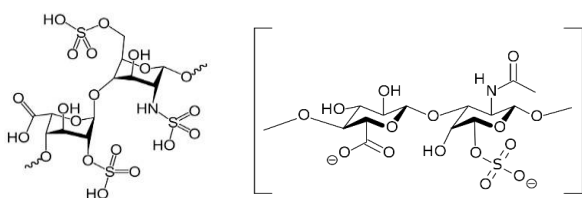


図 1: ヘパリン(左)及びコンドロイチン硫酸(右)の分子構造。硫酸基がコンドロイチン硫酸が混入したヘパリンのマイナス電荷を増加させている要因と考えられます。

II. 材料と方法

分画されていないヘパリン及び分画されたヘパリン標準(多糖のヘパリン誘導体, Neoparin 社)はBaxter社より供給されました。試料は0.1M酢酸アンモニウムに約5mg/mLとなるように溶解し、分析を行う前に室温で一終夜放置し平衡化しました。

MP-PALS 分析はWyatt Möbius を用いて行いました。試料は0.02µmのシリンジフィルター

(Anotop, Whatman)でろ過をし、Möbius のフローセルに直接注入しました。Möbius は超並列位相分析光散乱法(MP-PALS)による電気泳動移動度と動的散乱法(DLS)による流体力学的半径の同時測定を可能とします。

各試料の重量平均分子量(Mw)は多角度光散乱検出器(MALS)で測定し、分画されたヘパリンの分子量と多分散度は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)にMALSを接続して測定しました。SEC-MALS測定において、試料をろ過せずに、そのままカラムに注入し、検出器には、多角度光散乱検出器 DAWN HELEOS II 及び示差屈折率検出器 Optilab TrEX を使用しました。なお分画されていないヘパリンは、Baxter 社より試料を提供されていません。

III. 結果と考察

測定した各ヘパリンの分子量には、若干の違いがあったものの、その差は、ヘパリン中に過硫酸化物質が混入しているかを決定づける測定法として使用するには不十分なものでした。表1に見られるように、製造メーカー2の高純度ヘパリンと過硫酸化物質が混入したヘパリンの分子量差は約5%で、製造メーカー間の差(約18%)よりも小さい結果となりました。また、流体力学的半径の測定においても、過硫酸化物質の混入を識別できませんでした。

	M _w (kDa)	r _h (nm)
Unfractionated Heparin, Supplier 1	15.9 ± 0.1	2.30 ± 0.02
Unfractionated Heparin, Supplier 2	18.8 ± 0.3	2.48 ± 0.01
Super-sulfated Heparin, Supplier 2	17.9 ± 0.0	2.49 ± 0.02

表 1: 分画されていないヘパリンの重量平均分子量及びz平均流体力学的半径

ここで、過硫酸化物質が試料のマイナス電荷を増加させるものと考え、電気泳動移動度の測定を行い、純度の高いヘパリンと汚染されたヘパリンの識別が可能かどうかを確認しました。図2は、電気泳動移動度を測定する際に得られる代表的な“V グラフ”です。このデータは、300の電場振幅を30個の検出器で多重検出した平均値を示しています。マイナスの電気泳動移動度(μ)は、ヘパリン試料がマイナスの正味電荷を持つことを意味します。有効電荷とゼータ電位は電気泳動移動度と流体力学的半径から計算できます。表2は、分画されていないヘパリン試料と分画されたヘパリン試料(NHP)の各測定値をまとめたものです。

予想した通り、過硫酸化物質の混在した試料が3者の未分画ヘパリン間で、最も大きな正味電荷を示しました。しかしながら、過硫酸化試料と純試料間の電荷の差と2社間試料の電荷の差は、同程度の大きさになりました。このことは、この差が単に分子量もしくは多分散度の違いから生じている可能性を示すとともに、正味電荷の評価のみでは、ヘパリンのロット間差の異物混入評価には不十分であることを物語っています。

	Mobility (($\mu\text{m}^*\text{cm}$)/(s*V))	Effective charge (Z*)	Zeta Potential (mV)	r_H (nm)
Unfractionated Heparin, Supplier 1	-1.00 ± 0.05	-7.1 ± 0.40	-16.9 ± 0.9	2.30 ± 0.02
Unfractionated Heparin, Supplier 2	-1.18 ± 0.09	-9.3 ± 0.64	-19.5 ± 1.5	2.48 ± 0.01
Super-sulfated Heparin, Supplier 2	-1.46 ± 0.12	-11.2 ± 0.96	-23.8 ± 1.9	2.49 ± 0.02
NHP III	-0.42 ± 0.03	-3.2 ± 0.26	-7.9 ± 0.57	2.19 ± 0.02
NHP IV	-0.65 ± 0.10	-4.2 ± 0.56	-11.8 ± 1.7	2.09 ± 0.02
NHP VI	-0.86 ± 0.05	-7.1 ± 0.39	-15.8 ± 0.9	2.43 ± 0.02
NHP VII	-0.85 ± 0.10	-14.2 ± 1.8	-14.2 ± 1.7	3.74 ± 0.03

電荷と分子量の双方を同時に考えることにより、高硫酸化と純ヘパリン間の差は、直ぐに明らかになります。(図3) 分画されたヘパリン標準試料(NHP III, IV, VI, VII)の分子量を用いて、純ヘパリンの較正曲線を作成しました。これらの4試料の正味電荷と分子量の関係は直線性を示し、電荷と分子量の比は一定であることが明らかになりました。

測定された重量平均分子量 M_w に着目すると、分画していないヘパリンの正味電荷は製造メーカー1、2双方共、期待値 n の2%以内の数値を示しました。一方で、製造メーカー2の過硫酸化物質を含むヘパリンの正味電荷は、同じ大きさのヘパリンの期待値よりも約30%マイナス側に大きな値を示しました。

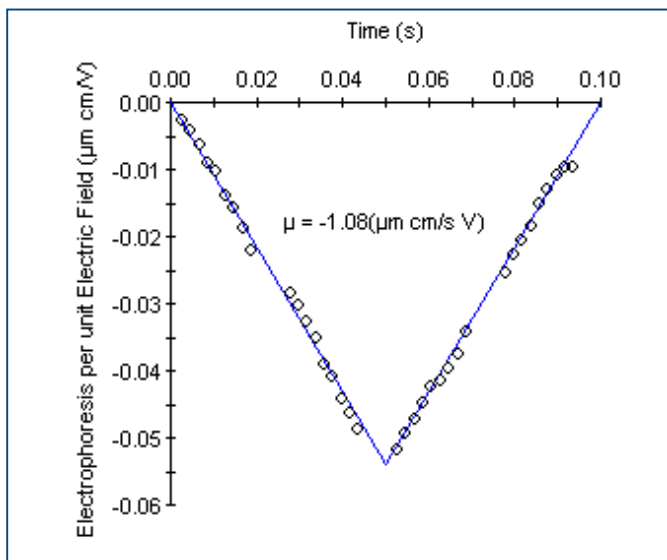


図2: 製造メーカー1の分画されていないヘパリンの電気泳動移動度データ

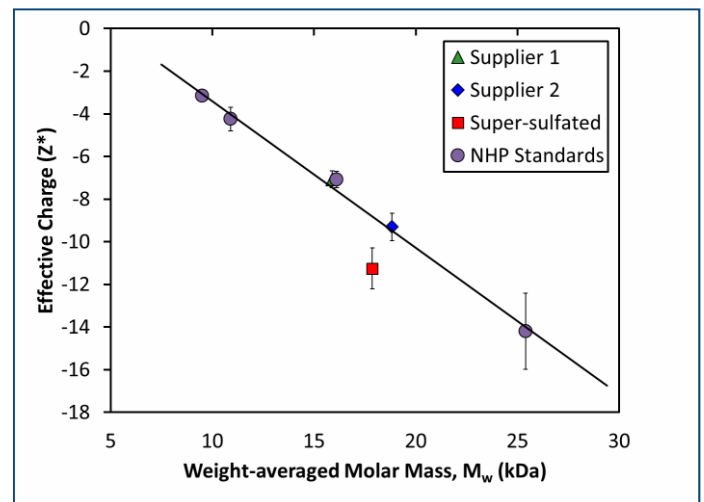


図3: 各試料の電荷と分子量の関係プロットしたグラフです。ヘパリン標準試料の正味電荷と分子量の関係は直線性を示し、電荷と分子量の比は一定であることを示しています。また高純度ヘパリンも両メーカーの試料とも、同じ直線上にプロットされます。しかしながら、過硫酸化物質に汚染されたヘパリンは、直線から外れてきます。

IV. 結論

電気泳動移動度と流体力学的半径の同時測定により、分子の実行電荷を迅速かつ非破壊で求めることができます。電気泳動移動度の変化により得られるマイナス電荷の増加は、ヘパリン中の硫酸基の増加と関係していることが明らかになりました。つまり、試料の電荷の増加と分子量測定を組み合わせることは、純度の高いヘパリンと過硫酸化物質が混入したヘパリンを比較する上での唯一の指標になり得ます。この実験では、実行電荷と分子量の比を見ることで、高純度ヘパリンと過硫酸化物質が混入しているヘパリンを識別できることが明らかとなり、試料間差を見極める測定法として使用できることを示すことができました。

