

サイズ排除クロマトグラフィーにおける分子量標準品に関する考察 —水溶性高分子における分子量標準品の統一化の可能性—

四方田千佳子[#]・岡田 敏史

Studies on the molecular weight standards for size-exclusion chromatography —Standardization of a molecular weight standard for water-soluble polymers—

Chikako Yomota[#] and Satoshi Okada

Summary The possibility of the standardization of molecular weight standards for size-exclusion chromatography (SEC) was investigated in the case of water-soluble polysaccharides such as dextran, hyaluronate and chitosan. In the case of dextran, comparing the method adopted for dextran in EP and BP, it was shown that pullulan, one of commercially available molecular weight standards, can be used in usual SEC method. For hyaluronate and chitosan, applying the Mark-Houwink correction to the calibration curve obtained by pullulan, the acceptable molecular weights could be estimated.

Keywords: size-exclusion chromatography, dextran, hyaluronate, chitosan, pullulan
(Received May 30, 1997)

医薬品や医薬品添加物において、たんぱく質、多糖類、合成高分子など、分子量が大きな物質でその生理作用や特性が分子量に大きく依存する場合には、分子量に関する規格を設定することが不可欠である。従来、日本薬局方 (JP) や英国薬局方 (BP) の一般試験法には、粘度試験法が採用されており、粘度規格を分子量規格として用いてきた。しかし、粘度規格ではあくまで粘度平均分子量の値を評価しているに過ぎず、広い分子量分布をもつ高分子の分子量分布や、2種の分布の異なるものが混合されている場合などでは、単に粘度による評価は不可能となるという問題をかかえている。分子量測定法には、末端基定量や浸透圧など数平均分子量 (Mn) を求めるものと、光散乱や沈降平衡などの重量平均分子量 (Mw) を求めるものがある。これらは、絶対分子量測定法であるが、そのほかに相対的な方法として粘度測定法やサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) がある。粘度測定法では、分子量分布が同程度で、分子量の異なる一連の試料について、光散乱などの絶対的測定法による Mw と、極限粘度の関係を求めておく必要がある。また、SEC ではやはり Mw が既知の一連の試料について Mw と溶出容量の関係から、校正曲線を求めておくなくてはならない。これらの分子量測定法は特殊な装置と高度の熟練を要するものが多いが、SEC は HPLC の一種

であるための装置、操作の一般性と、クロマトグラムから容易に分子量分布に関する情報を得ることができるという利点から、最も公定法として採用されやすい方法といえる。しかし、一方では、相対的測定法であるために分子量標準品を設定する必要があるという大きな問題点も抱えている。

最近、ヨーロッパ薬局方 (EP) や BP では、注射用デキストランにおける分子量分布の評価に SEC が採用され、米国薬局方フォーラム (USP Forum) でも類似案で提案されている。^{1,2,3)}そこで、ここではデキストランにおける薬局方の動きを紹介するとともに、SEC を採用するにあたって考慮しなくてはならない分子量標準品の問題を取り上げてみた。

1. デキストランにおける公定法の動き

デキストラン注射液は血漿増量剤として使用され、分子量1.5万以下ではすみやかに腎排泄されるが、5.5万以上では全く排泄されないというようにその効果は分子量に大きく依存することが知られている。従来、デキストランのモノグラフが収載されていた BP, JP では極限粘度で分子量規格を設定しており、全体の極限粘度のほかに、エタノールによる分別沈殿により得られる10%高分子分画部分、10%低分子分画部分の極限粘度範囲も定められており、分子量分布にも配慮した規格設定となっている。デキストランの分子量規格に関して1991年に USP フォーラムで、1992年に Pharmaeuropa で SEC の導入が相次いで提案された。その後、BP では1996年の Addendum で Appendix C. SEC の中にデキストランの分子量分布という項目が入れられ、EP

[#] To whom correspondence should be addressed: Chikako Yomota; Hoenzaka 1-1-43, chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: yomota@nihs.go.jp

本ステートメントは、日本薬学会第117年会レギュラトリーサイエンス討論会 (1997.4, 東京) において発表した内容をまとめたものである。

では1997年に2.2.39. デキストランの分子量分布, という独立した項が設けられた。USP では1995年のフォーラムで再提案の状態となっている。³⁾ここで, デキストランに採用された, あるいは提案中の分子量測定法は, 通常のSECとは若干異なり, 用いられるデキストラン分子量標準品がやや広い分子量分布を有しているために, 較正曲線を求める際には, 5種類のデキストラン標準品でSECにより計算される分子量が, 光散乱による分子量の $\pm 5\%$ 以内の差で計算できるように最適化を行っている。⁴⁾そのために, この方法では標準品の他に, 通常のGPCソフトには含まれない特殊な計算ソフト (あるいは高度の計算技術) が必要となるという問題点がある。以後この方法をDex法と記す。そこで, デキストランを通常の方法で評価することができないか検討することにした。

2. デキストランにおけるプルラン標準品の適用

一般に高分子の極限粘度と分子量の間には, Mark-Houwinkの粘度式 $[\eta] = K M^a$ が成立することが示されており, 種々の高分子に対してK値やa値が求められている。SECにおける分離モードは分子量ではなく分子サイズであるため, 標準とする高分子と, 目的の高分子の分子量と粘度の関係, すなわち粘度式が大きく異なる場合には, 妥当な分子量を見積もることはできない。河原らは, プルランの粘度式は分子量20万以下の範囲ではデキストランの粘度式とよく一致することを報告している。⁵⁾そこで注射用デキストランは分子量が数万と小さいため, SECにおいてプルランを分子量標準とすることができるのではないかと考え, Dex法を試みると同時に, プルランを分子量標準とした通常のSECの結果と比較検討した。Dex法とプルランによるそれぞれの較正曲線は, 分子量20万以下の範囲ではよく一致し, 計算されたデキストラン40, デキストラン70製剤の分子量値も, ややプルランを標準とした場合の方が大きな値となったが, その差は5%以内であり, 分子量評価値として十分使用可能な範囲であった。従って, プルランを分子量標準として使用した通常のSECでも, Dex法とほぼ同様の分子量値が得られることから, 特殊な解析ソフトを必要とするDex法に依らなくても, デキストランのSECによる分子量評価が可能であることが示された。

3. その他の荷電性多糖におけるSEC

その他の水溶性高分子の例として, カチオン性多糖としてキトサンをアニオン性多糖としてヒアルロン酸を取り上げ, 同様にSECによる分子量測定を試みた。荷電性高分子では, 分子上の荷電基間の反発により, 分子が大きく広がっており, 荷電のない高分子と比較すると, SECにおける溶出位置は同じ分子量で比較するとかなり早くなることが知られている。また, カラムとのイオン性相互作用を抑える目的で高濃度の電解質溶液を溶離液として用いること

が多い。

ヒアルロン酸のSECでは, 0.2M NaClを溶離液とし, ヒアルロン酸の分子量の異なる一連の分画試料あるいはプルランを標準物質として分子量を求めた。ヒアルロン酸の分画試料はあらかじめ, 光散乱法によりMw値が測定されている。ヒアルロン酸そのものを標準とした場合の分子量に比べ, プルランを標準としてヒアルロン酸の分子量を求めた場合は3-4倍の大きな分子量値が得られた。これは, プルランとヒアルロン酸では, 同じ分子量でもその流体力学的半径が大きく異なることに起因する。SECの分離が, 分子量ではなくその流体力学的半径に依存することから, 水溶性合成高分子においては較正曲線の縦軸にMw $[\eta]$ をとること, すなわち粘度補正を行うことにより, この分子形態の差を補正できることが示されている。そこで, プルランを標準として, ヒアルロン酸およびプルランに関して報告されている粘度式 $[\eta] = K M^a$ を用いて粘度補正を行ったところ, ヒアルロン酸そのものを標準とした場合とほぼ一致する分子量値を得ることができた。ヒアルロン酸のSECにおいて, 粘度補正を加えることにより, プルランを標準としてほぼ妥当な分子量値を見積もることができると考えられる。さらに, キトサンについても同様にキトサンの一連の分画試料及びプルランを用いてSECによる分子量測定を試みた。キトサンのSECでは, カラムに対する吸着を阻止するために, 0.5M NaCl+0.5M 酢酸を溶離液としてSEC測定を行ったため, 既報の粘度式を用いることができず, 溶離液を溶解液とした場合の粘度式を求めて補正に適用した。⁶⁾キトサンにおいても同様に, 粘度補正を行うことにより, プルランを標準としてもキトサンの分画試料を標準とした場合と類似した分子量が得られることが示された。

以上のように, デキストラン, ヒアルロン酸, キトサンのような水溶性多糖類に関して, すでに我が国で市販されているプルランを標準物質として統一化できる可能性が示唆された。

公定法におけるSEC法の採用にあたっては, 個々の高分子について分子量分布の狭い標準品を調製するのが最良の方法であるが, 膨大な労力と時間を投入しても不可能な場合も少なくないと思われる。個々の高分子物質の特性をふまえて, すでに確立された分子量標準品から最適なものを選び, ここで示したように粘度補正などにより絶対分子量に近い値を得る努力をするのが最も近道であると思われる。

あるいはより現実的な方法としては, プルランなどの分子量標準品を測定系を数値化するための手段として用い, 粘度補正なども行わずにあくまで相対的評価であるとして, 実際の絶対分子量とは全く異なるSECファクターとも呼ぶべき値を規格値として設定することも考えられ

る。その場合にも、分子量分布に関わる Mw/Mn 値などは、粘度補正を行った場合と同じ数値で与えられるため、得られる情報量に差はない。

昨年来、極めて特殊な Dex 法ではあるが、BP, EP と相次いで公定法に SEC が採用され、USP も同様の歩みを続けている。日本薬局方においても、早急に、SEC のカラム、機器メーカー、製薬企業の品質管理担当者などの協力の基に、分子量規格について対策を始めなくてはならない時期が来ている。

文 献

- 1) *European Pharmacopoeia*, 3rd Ed., 41~43 (1997)
- 2) *British Pharmacopoeia 1993*, Addendum 1996, Appendices A499-A501.
- 3) *US Pharmacopoeial Forum*, **21**, 1267~1282 (1995)
- 4) Nilsson, G. and Nilsson, K.: *J. Chromatogr.*, **101**, 137~153 (1974)
- 5) Kawahara, K., Ohta, K.: *Carbohydrate Polymer*, **4**, 335~356 (1984)
- 6) Yomota, C., Miyazaki, T., Okada, S.: *Colloid & Polym. Sci.*, **271**, 76~82 (1993)