

ヒアルロン酸ナトリウム製剤のSEC・MALLSによる分子量評価

四方田千佳子[#]

Evaluation of Molecular Weights of Hyaluronate Preparations by Multi-Angle Laser Light Scattering

Chikako Yomota[#]

Hyaluronate (HA), a glycosaminoglycan polysaccharide, has been used for osteoarthritis, periarthritis of the shoulder and rheumatoid arthritis by intraarticular administration, and in ophthalmic surgery such as anterior segment surgery, and eye lotion.

In this study, the molecular weight (Mw) of HA preparations were estimated by size-exclusion chromatography (SEC) system consisted of a refractometer (RI) and a multi-angle laser light scattering (MALLS). From the results, it has been clarified that a successful characterization of HA samples with Mw up to $2-3 \times 10^6$ g/mol was possible by multidetector system.

Keywords: hyaluronate; size-exclusion chromatography; multi-angle laser light scattering

はじめに

ヒアルロン酸ナトリウム(HA)は、雄鶏の鶏冠からの抽出、あるいは連鎖球菌による生合成で製造される生体内多糖であり、変形性膝関節症、肩関節周囲炎及び関節リュウマチに対する関節内注射剤、眼内レンズ挿入術、全層角膜移植時における手術補助剤及び目薬として使用されている。現在、HAの公定法としてはヨーロッパ薬局方¹⁾のみにモノグラフが収載されており、分子量規格には極限粘度値が採用され、ラベル表示値の90~120%という範囲で規定されている。しかし、粘度測定は分子量の指標とはなるものの、分子量分布試験が含まれていない。EPのモノグラフの提案時に、改訂時には製造業者の同意を得て分子量分布試験が提案される可能性があることが但し書きされている²⁾。すでに、筆者は前報³⁾において、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)における標準品や、粘度補正を検討し、HA含有製剤の分子量測定の最適化を試みた。しかし、通常の示差屈折検出器を使用するSECのみでは、HAの100万以上の高分子量領域では、SECカラムの排除限界が充分に大きくないために、分子量は小さめに見積もられ、粘度補正を行うとかなり改善されるものの充分ではないことを示した。さらに、低角度光散乱光度計(LALLS)を適用した

SEC・LALLSでの測定も試み、粘度平均分子量とほぼパラレルな値が得られることを示した。しかし、LALLSは現在我が国では入手困難であること、高分子量のポリマーでは、分子サイズが大きくなり、散乱光の角度依存性や、濃度依存性が無視できなくなり、5度の低角度の一点で測定しているLALLSでは分子量を実際より小さく見積もる可能性があること等から、本報では、SECの検出器として汎用されるようになってきた多角度光散乱検出器(MALLS)の適用を試みた。前報で分子量測定を行ったHA製剤の一部について、MALLSにより重量平均分子量を、毛細管粘度計により極限粘度を測定し、LALLSによる結果と比較検討した。

実験方法

1. 試料 市販HA含有製剤として、変形性膝関節症等の関節内注入剤の4種、眼手術補助剤の4種の計8製剤を使用した。このうち眼手術補助剤のうちの3種及び変形性膝関節用剤の1種は極限粘度が24(dl/g)以上の高分子量のもので、残りの半数は極限粘度11.8・19.5(dl/g)のものであった。

2. SEC測定装置 SEC装置は日本分光製のポンプ880・PO、オートサンプラーAS・2057i、カラムオープン865・CO、示差屈折計(RI)はSodexRI-71、光散乱検出器(MALLS)はWyatt technology社製DAWN・EOSを使用した。カラムはShodexSB・806HQ(8.0mmIDx30cm)とし、溶離液0.2M NaNO₃、流速0.3ml/min、カラム温度40℃で測定した。DAWNの装置定数はトルエンで、

[#]To whom correspondence should be addressed:

Chikako Yomota; Kamiyoga 1-22-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel:03-3700-1141 ext. 333;
E-mail:yomota@nihs.go.jp

RI装置定数は食塩水で定め、18個の検出器の感度補正には昭和電工社製分子量標準品プルランP・50 (Mw: 47000) を使用した。試料溶液の調製では、試料0.1 gを量り、HAの極限粘度が11.8・19.5 (dl/g) の製剤では0.01%、極限粘度がそれ以上の場合には0.005%となるように溶離液を加えて希釈し、これらの液100 μ lにつき、SEC測定を行った。分子量解析には、Wyatt社のMALLS用の解析ソフトAstra Ver4.73.04を使用した。分子量解析では、HA水溶液の屈折率増分 dn/dc は別途測定して0.153とし、第2ピリアル定数もあらかじめHA濃度を変化させて見積もり0.002 $\text{cm}^3 \text{mol/g}^2$ の一定値を用いた。これらの値は文献値と良く一致した^{4,5)}。なお、分子量計算に使用する検出器は、高分子量側の4製剤では14.5度から60度の6個、低分子量4製剤では25.9度から69.3度の6個とし、散乱強度の角度依存性を考慮して重量平均分子量 (Mw) を求めた。

3. 極限粘度測定 ウペローデ希釈型粘度計を使用し、各HA製剤を0.2M NaClにより希釈して、極限粘度が11.8・19.5 (dl/g) の製剤では0.01%・0.025%の濃度範囲、極限粘度が24 (dl/g) 以上のもでは0.0025%・0.01%の濃度範囲のそれぞれ4濃度で流下時間を測定して、極限粘度を計算した。ここで、粘度計算における濃度は、SECにおけるRI測定により決定した。

結果及び考察

1. ヒアルロン酸製剤の重量平均分子量

Fig.1に、3種の製剤についてSEC・MALLSの測定結果を示した。クロマトグラムの縦軸はRIの応答によるもので、MALLSによる各溶出位置のMwを右軸としていっしょに図示した。各溶出位置の分子量は直線的に減少し、サイズ排除が適切に機能していることを示している

が、試料3のように高分子量のものでは、クロマトグラムが左右対称とならず、一部が排除限界に入っているものと思われ、溶出量-分子量曲線も低分子量の場合より若干高分子量側にずれることが示された。これらの傾向は他の5種についても同様であり、溶出量-分子量曲線は分子量の大きな4種では試料3とほぼ一致し、低分子量側の他の2種では試料7,8とほぼ一致した。ただし、MALLSによる分子量測定は、絶対測定法であるため、得られる分子量値への排除限界の影響はない。8種HA製剤のMALLSの90度におけるクロマトパターンをFig.2に示した。試料1～試料3ではややパターンが左右不均衡で、先端部分が排除限界に達している可能性が考えられたが、他の製剤では良好なパターンとなった。

光散乱法による分子量測定は、次式により求められる。

$$K^*c/R(\theta) = 1/M_w R(\theta) + 2A_2c \quad (\text{式1})$$

ここで、Kは光学定数、 $R(\theta)$ は還元散乱強度、 A_2 は第2ピリアル係数、 $R(\theta)$ は内部干渉因子である。Kは高分子の屈折率増分の二乗の関数である。 $R(\theta)$ は $\text{Sin}^2(\theta/2)$ 項を含む散乱強度の角度依存性を示す関数で分子構造因子とも呼ばれるが、分子の広がり光の波長の1/20程度を越えると分子は散乱点と見なせなくなり、分子から散乱される光が互いに干渉しあって散乱光強度が下がるようになる。 $1/R(\theta)$ は、分子の慣性半径 R_g の関数であり、散乱光強度の角度依存性から $R(\theta)$ を、すなわち R_g を見積もることができる。ここで、 R_g は分子サイズを表すパラメーターである。測定例として、試料3のピークトップ位置の1スライスにおける $K^*c/R(\theta)$ を $\text{Sin}^2(\theta/2)$ に対してプロットし、Fig.3に示した。式1のようにして、角度ゼロへの外挿値よりMwが、直線の傾きから R_g が求められる。

8種HA製剤のそれぞれ3回の試料調製によるMw、

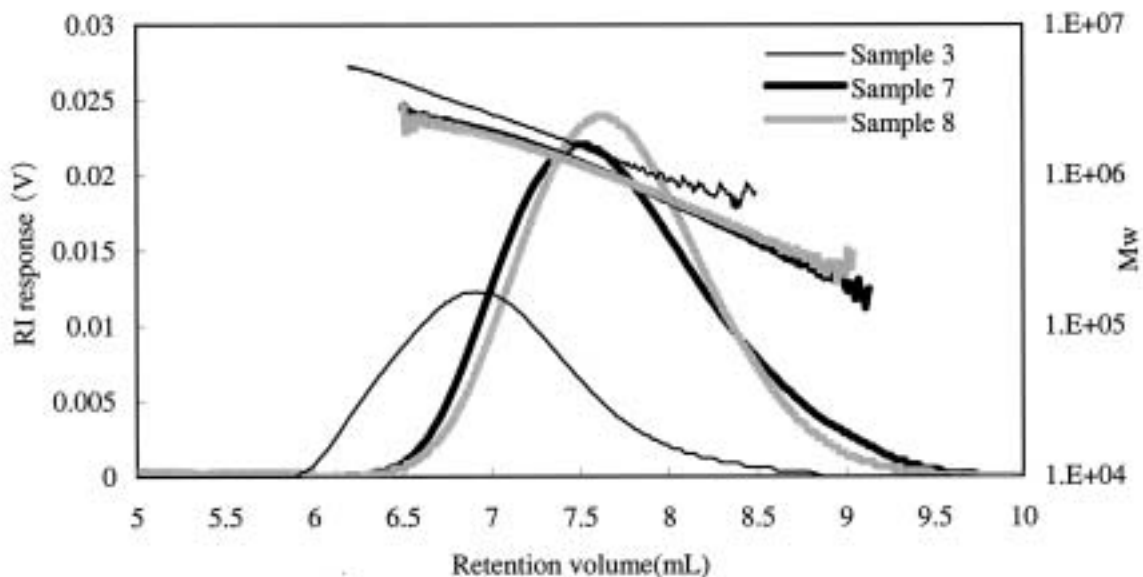


Fig.1 Typical chromatograms showing raw voltage traces for refractometer and calculated Mw at each retention volume.

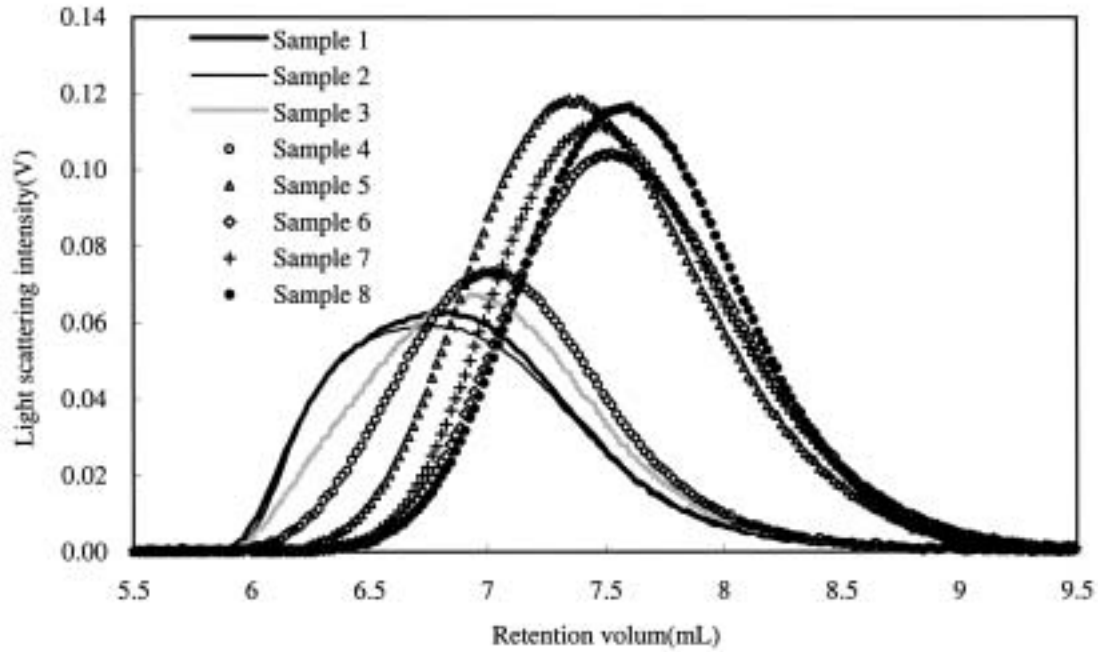


Fig.2 Chromatograms of 8 kinds of HA preparations showing raw voltage traces for light scattering.

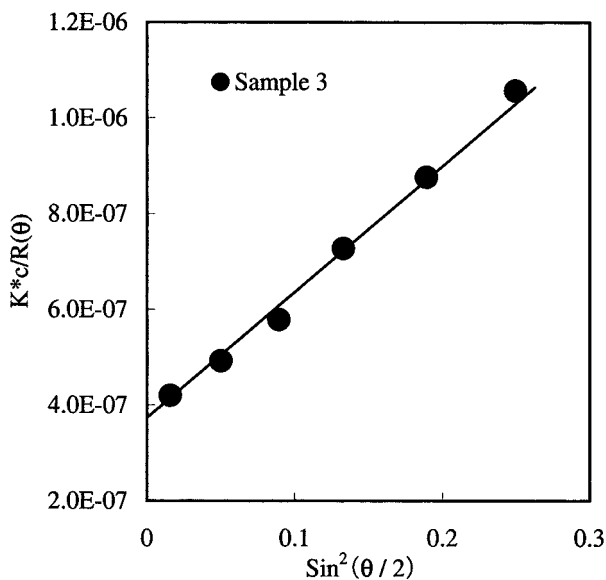


Fig.3 Relationship between $K^*c/R(\theta)$ and $\text{Sin}^2(\theta/2)$ at the peak top of Sample No.3

Rgの測定結果をTable 1にまとめた。ここで試料1, 2, 4, 5は眼手術補助剤であって分子量が大きく、試料3は関節内注入用の高分子量のHA製剤、試料6, 7, 8は低分子量の関節内注入用製剤である。得られたMw値のRSDは0.6・1.9%といずれも2%以下と小さく、再現性も良好で、MwとRgには良い相関が見られた。ここで得られた、RgとMwの関係を、高橋ら³⁾の自作の静的光散乱装置によるHAの分子量に関する詳細な報告と比較すると、ほぼ類似する結果であった。

3. SEC, SEC・LALLSの測定結果との比較

今回測定したHA製剤8種のうち7種は前報で使用した製剤であったが、ロット間の差を相殺するために、今回も極限粘度の測定を行い比較することとした。また、極限粘度からLaurentの式⁶⁾ $[\eta] = 0.00036 \cdot M^{0.78}$ を用いて粘度平均分子量(Mv)を算出した。前報(1999)の粘度報告値とMv, SEC・LALLSによるMw, 本法(2003)の粘度測定値, Mv, SEC・MALLSによるMwをTable 2にまとめて示した。また、比較のためMvに対してMwをプロットして、Fig.4に示した。ここで、試料1の1999年における粘度測定値は、規格値の下限ぎりぎり小さく、図中×で示したように、LALLSのプロットから大きく外れている。また、水の流下時間が比較的速い粘度計を使用した記録があるため、試料1の1999粘度値を異常値と見なし、かわりに2003年の粘度測定値を用いてプロットした()。LALLSとMALLSにより得られたMw値を比較すると、分子量120万程度まではほぼ

Table 1. Weight average molecular weights and radius of gyration (Rg) for hyaluronate samples using SEC-MALLS

Sample	Mw $\times 10^{-4}$ (SEC-MALLS)					Rg(nm)
	No.1	No.2	No.3	Average	RSD(%)	
1	345	337	338	340	1.3	256 \pm 0
2	359	349	346	351	1.9	260 \pm 0
3	272	281	277	277	1.6	225 \pm 1
4	232	232	226	230	1.5	192 \pm 4
5	135	135	133	134	0.9	159 \pm 2
6	102	101	102	102	0.6	132 \pm 1
7	111	109	109	110	1.1	136 \pm 1
8	102	101	101	101	0.6	126 \pm 2

Sample No.1,2,4,5 : Ophthalmic use

Sample No.3,6,7,8 : Intraarticular use

Table 2. Molecular weights of hyaluronate(HA) preparations

Sample No.	Intrinsic viscosity(dl/g)		Mvx10 ⁻⁴ ***		Mwx10 ⁻⁴	
	1999*	2003**	1999*	2003**	LALLS	MALLS
1	26.4	33.0	173	230	250	340
2	35.6	31.8	254	219	244	351
3	-	29.1	-	196	-	277
4	26.2	26.7	171	175	180	230
5	19.4	18.4	117	109	121	134
6	14.9	16.1	83	92	95	102
7	14.6	16.1	81	92	109	110
8	13.3	15.7	72	89	109	101

* The values obtained in 1999.

** The values obtained in 2003.

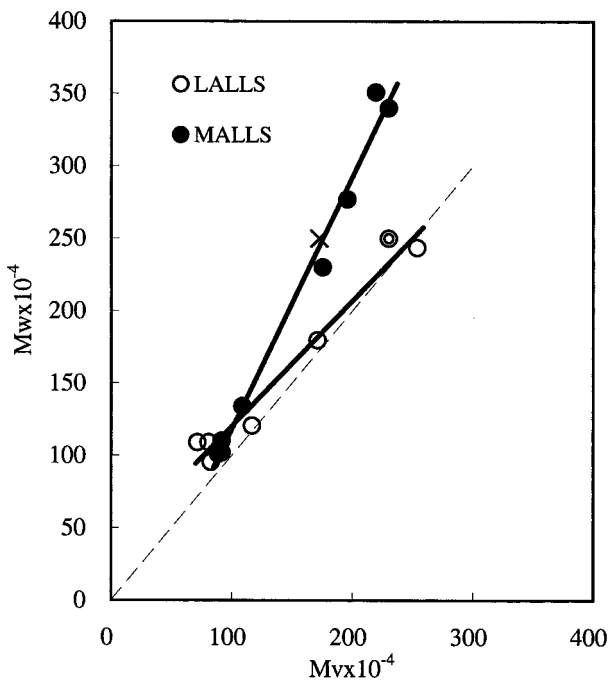
*** Viscosity average molecular weights calculated using Laurent's equation.⁶⁾

Fig.4 Relationship between molecular weight(Mw) of hyaluronate preparations obtained by SEC-LALLS and those by SEC-MALLS

類似した結果と言えるが、それ以上の分子量範囲ではMALLSではLALLSの30～40%大きな値を与えた。ここで、 $M_v = M_w$ の関係を波線で示したが、LALLSによるMwはMvに近い値を与えている。しかし、Laurentの式を求めるために使用されたHAの分画試料のMw値は、7.7万から170万の範囲であり、得られた粘度式は

必ずしも高分子領域にそのまま適用できない⁶⁾。すでに報告したように、通常のSECではカラムの排除限界の問題、標準物質の問題等で、粘度補正を実施しても分子量の大きなHAの分子量評価の誤差が大きい³⁾。また、SEC・LALLS測定では、分子サイズがある程度大きくなると、Fig.3のように縦軸の切片は5度の一点近似測定では角度依存性を無視できなくなり、実際より小さな分子量値が得られることになる。さらに、LALLSの解析では十分に希薄溶液で測定しているとしてA₂をゼロとして計算したが、実際にLALLSでバッチ法により散乱光の濃度依存性を測定したところ、0.002程度の値が得られており、これもLALLSで分子量値を小さめに見積もる要因となっていると思われる。一方で、Reed⁵⁾は、同じSECシステムにMALLSとLALLSを接続し、両者で比較的類似した分子量値が得られたと報告しているが、R_g, A₂の値を何らかの形でLALLS解析に組み込んでいるのではないかと推測される。

以上の結果より、HAのMw測定では、粘度規格として11.8・19.5dl/g程度の分子量の比較的小さいものについては、通常のRI検出器によるSECでプルランを標準として粘度補正を行った場合、HAの分画試料を標準とした場合、SEC・LALLSによるもの³⁾、Viscotec社製トリプル検出器を用いた場合⁷⁾、いずれの場合にも、同程度の分子量評価が可能と考えられるが、粘度規格として20 dl/gを越えるものに関しては、SEC・MALLSによる分子量の絶対評価が有効と考えられた。

文 献

- 1) European Pharmacopoeia, 4th Ed., 1915-1917 (2002)
- 2) Pharmeuropa, 9.2, 185-188 (1997)
- 3) 四方田千佳子, 宮崎玉樹, 岡田敏史: 衛研報告, 117, 135-139 (1999)
- 4) R. Takahashi, K. Kubota, M. Kawada, A. Okamoto: Biopolymers, 50, 87-98 (1999)
- 5) W.F. Reed: Macromol. Chem. Phys., 196, 1539-1575 (1995)
- 6) T.C. Laurent, M. Ryan, A. Pietruszkiewicz: B. B. A., 42, 476-485 (1960)
- 7) 四方田千佳子, 宮崎玉樹, バイオポリマーの分子量評価法3, 製剤と機械, 264, 10-12 (2001)