

ヒアルロン酸ナトリウム含有製剤のサイズ排除クロマトグラフィーによる分子量評価

四方田千佳子[#]・宮崎玉樹・岡田敏史

Evaluation of Molecular Weight of Hyaluronate Preparations by Size-exclusion Chromatography

Chikako Yomota, Tamaki Miyazaki and Satoshi Okada

Hyaluronate (HA), a glycosaminoglycan polysaccharide, has been used as a biomedical polymer to treat osteoarthritis by intra-articular injections and in ophthalmic surgery, such as anterior segment surgery.

In this study, the molecular weight (M_w) of HA preparations was estimated by size-exclusion chromatography (SEC), using HA and pullulan fractions as molecular weight standards, and the M_w values obtained were compared to those obtained with a low angle laser light scattering detector (LALLS). The results showed that the universal calibration with pullulan as the standard is useful for HA preparations.

The conditions of SEC for HA were also investigated, and the results suggested that a high ionic strength and low flow rate of the eluent were preferable for high molecular weight HA preparations.

Keywords: hyaluronate, size-exclusion chromatography, laser light scattering

はじめに

ヒアルロン酸ナトリウム(HA)は、鶏冠からの抽出あるいは微生物発酵法により製造される生体内多糖であり、現在、変形性膝関節症、肩関節周囲炎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。現在これらの分子量規格として、極限粘度値が採用されているが、粘度測定では、あくまで粘度平均分子量を見積もることができるだけであり、分子量分布に関する情報が得られないなど分子量規格として必ずしも十分とはいえない。そこで、最近外国薬局方でデキストラン製剤の分子量試験法として採用されつつあるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)をHA含有製剤に適用し、分子量評価法の最適化を試みた。

実験方法

1. 試料 市販HA含有製剤として、変形性膝関節症用剤の18種、眼手術補助剤の4種、目薬3種の計25製剤を使用した。このうち大部分は極限粘度11.8-19.5(dl/g)のもので、眼手術補助剤のうちの3種は極限粘度が24(dl/g)以上の高

分子量のものであった。SECにおける分子量標準品としてHAの酵素分解による分子量の異なる一連の試料及びプルランを用いた。ヒアルロン酸は文献にしたがって調製されたもので¹⁾、それらの光散乱法(LS)による絶対分子量と極限粘度値をまとめてTable 1に示した。プルランは昭和電工(株)製p-82及び特注品の160万、246万のものを用いた。
2. 測定条件 SEC装置はTosoh製ポンプCCPD、示差屈折計RI-8012、カラムTSKgelG6000PWxl+TSKgelG3000PWxl(7.8mmIDx30cm)を用い、溶離液0.2MNaCl、流速0.8ml/min、カラム温度40℃で測定した。試料は、製剤を0.02%となるように希釈し、100 μ l注入した。分子量はTosoh製スーパーシステムコントローラーSC-8020により計算した。分子量標準品として、プルラン及びHA分画試料を用いた。また、SECに低角度光散乱検出器(LALLS)であるTosohLS-8000光散乱光度計を検出器として接続したSEC-LALLSにより、同一試料の分子量を測定し比較した。SEC-LALLSでは、流速を0.5ml/minとし、試料は0.02%となるように希釈後1ml注入した。また、各製剤の粘度はオストワルド型希釈粘度計により極限粘度が11.8-19.5(dl/g)の製剤では0.25%-0.01%の濃度範囲で、極限粘度が24(dl/g)以上のものでは0.01%-0.0025%の濃度範囲でそれぞれ4濃度で測定し、極限粘度を計算した。

[#]To whom correspondence should be addressed: Chikako Yomota; Hoenzaka 1-1-43, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533; E-mail: yomota@nihs.go.jp

Table 1. Molecular weights of a series of hyaluronate(HA)

| No. | Mw by LS* | $[\eta]$ (dl/g) | Mv** |
|-----|-----------|-----------------|-----------|
| 1 | 18,900 | 0.59 | 13,200 |
| 2 | 104,000 | 3.01 | 107,000 |
| 3 | 460,000 | 8.26 | 390,000 |
| 4 | 637,000 | 12.7 | 676,000 |
| 5 | 847,000 | 15.7 | 888,000 |
| 6 | 993,000 | 17.7 | 1,035,000 |
| 7 | 1,410,000 | 22.9 | 1,440,000 |
| 8 | 2,130,000 | 28.9 | 1,940,000 |

*Weight average molecular weight measured by light scattering.

**Viscosity average molecular weight calculated using Laurent's equation.²⁾

Table 2. Molecular weights(Mw) of a series of hyaluronate(HA) measured by SEC

| No. | HA | Standards used for calibration | | |
|-----|-----------|--------------------------------|------------------|-------------------|
| | | pullulan | | |
| | | No correction | MH correction 1* | MH correction 2** |
| 1 | 19,600 | 64,000 | 22,900 | 24,100 |
| 2 | 124,000 | 421,000 | 137,000 | 139,000 |
| 3 | 497,000 | 1,740,000 | 532,000 | 524,000 |
| 4 | 743,000 | 2,630,000 | 786,000 | 769,000 |
| 5 | 981,000 | 3,480,000 | 1,030,000 | 1,000,000 |
| 6 | 1,100,000 | 3,910,000 | 1,150,000 | 1,120,000 |
| 7 | 1,620,000 | 5,790,000 | 1,670,000 | 1,620,000 |
| 8 | 1,820,000 | 6,530,000 | 1,880,000 | 1,810,000 |

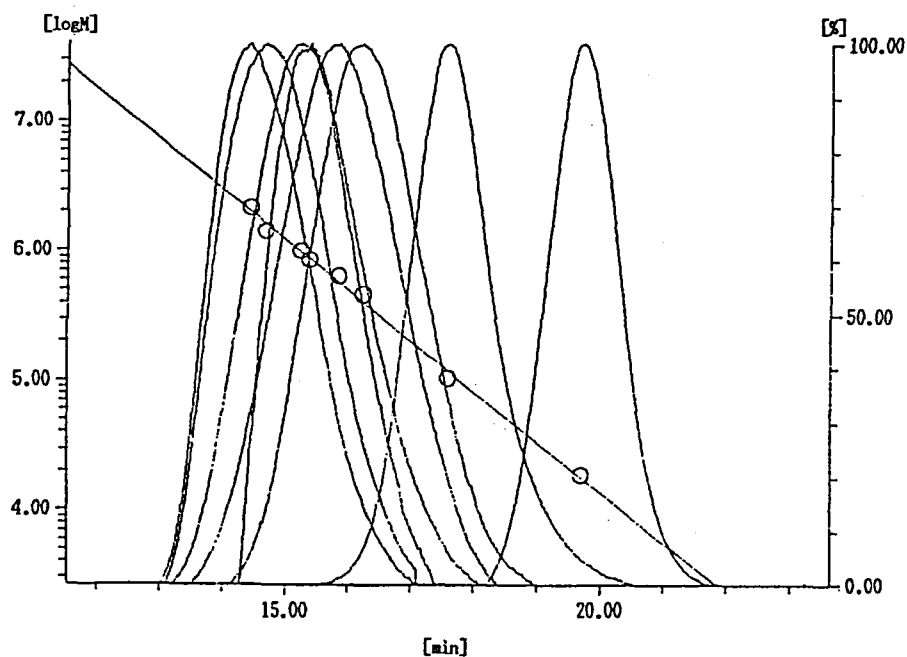
*Mark-Houwink correction using Laurent's equation.²⁾**Mark-Houwink correction using Cleland's equation.³⁾

Fig.1. Elution pattern of 8 kinds of hyaluronate fraction for SEC standards and calibration curve.

Table 3. Molecular weights of 25 kinds of hyaluronate(HA) preparations

| No. | Mw | | | | Mv* |
|-----|-----------|-------|----------|-----------|-------|
| | SEC-LALLS | SEC | | | |
| | | HA | pullulan | pull-MH** | |
| 1 | 246.1 | 162.1 | 580.9 | 162.1 | 253.6 |
| 2 | 219.9 | 177.8 | 638.2 | 177.2 | 172.5 |
| 3 | 179.6 | 153.6 | 550.0 | 153.9 | 171.1 |
| 4 | 125.2 | 98.5 | 350.0 | 100.7 | 80.1 |
| 5 | 120.7 | 97.1 | 344.9 | 99.3 | 92.8 |
| 6 | 120.5 | 114.9 | 409.6 | 116.6 | 116.6 |
| 7 | 119.6 | 103.4 | 367.5 | 105.5 | 99.8 |
| 8 | 119.1 | 100.4 | 356.7 | 102.6 | 93.6 |
| 9 | 118.8 | 98.6 | 350.2 | 100.9 | 96.8 |
| 10 | 118.5 | 102.2 | 363.4 | 104.3 | 90.4 |
| 11 | 117.9 | 102.6 | 364.6 | 104.7 | 97.5 |
| 12 | 117.1 | 98.8 | 350.9 | 101.0 | 96.4 |
| 13 | 115.7 | 92.5 | 327.9 | 94.9 | 93.1 |
| 14 | 115.2 | 105.6 | 375.7 | 107.6 | 81.1 |
| 15 | 110.9 | 97.6 | 346.7 | 99.9 | 90.9 |
| 16 | 109.6 | 92.8 | 329.3 | 95.2 | 88.8 |
| 17 | 109.1 | 90.5 | 320.9 | 92.8 | 80.9 |
| 18 | 109.0 | 101.7 | 360.0 | 104.0 | 71.6 |
| 19 | 106.8 | 99.8 | 355.2 | 101.9 | 94.7 |
| 20 | 103.0 | 104.3 | 370.8 | 106.4 | 87.8 |
| 21 | 102.5 | 100.0 | 355.4 | 102.2 | 90.6 |
| 22 | 102.1 | 91.0 | 322.6 | 93.3 | 85.5 |
| 23 | 99.2 | 93.3 | 329.9 | 95.6 | 66.1 |
| 24 | 95.4 | 92.5 | 327.3 | 94.9 | 82.6 |
| 25 | 87.8 | 72.1 | 254.8 | 74.8 | 65.1 |

*Viscosity average molecular weight calculated using Laurent's equation.²⁾

**Mark-Houwink correction using Cleland's equation.³⁾

結果及び考察

1. ヒアルロン酸分画試料の分子量測定

ヒアルロン酸の SEC 測定において分子量校正曲線をどのように設定できるかを検討するため、Table 1 に示した一連の分子量既知の HA 分画試料について、分画 HA そのものを分子量標準とした場合、市販の分子量標準品プルランを用いた場合、プルランを標準として粘度補正を行った場合の校正曲線を用いて SEC により分子量を再計算した。得られた分子量値を Table 2 にまとめて示した。HA そのものを標準とするには、光散乱により求められた HA の重量平均分子量(Mw)値をピークトップの分子量として校正曲線を求め(Fig.1), それぞれの分子量を再計算すると、Mw 値は No.8 を除くと全体的に光散乱の場合よりやや大きな値となった。これは、用いた分画試料が分子量分布を有するため、重量平均分子量は実際にはピークトップよりやや溶出の速い位置となるためである。No.8 で、SEC による分子量値が光散乱による値より小さくなったのは、No.8 の分子量が使用した SEC 用カラムの排除限界を越えたためと推測される。次に、市販の分子量標準品であるプルランを標準として校正曲線を求め、分子量計算を行うと、HA の

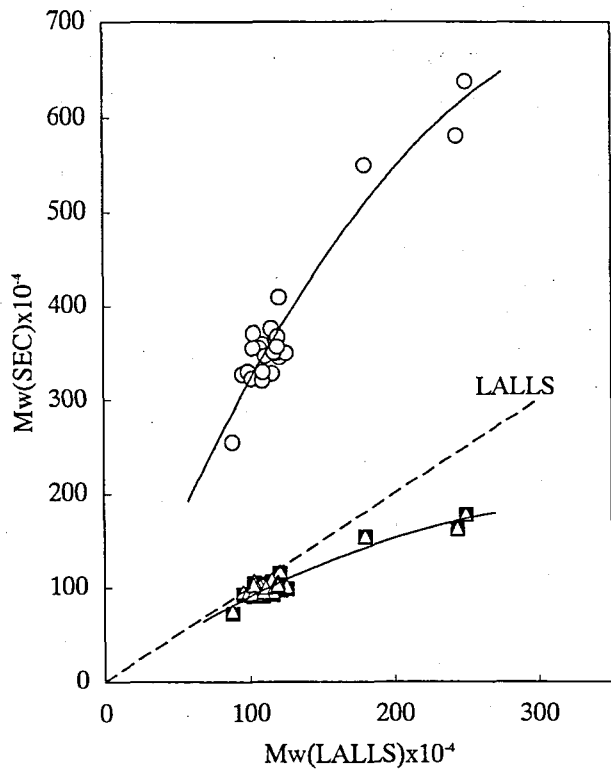


Fig.2. Relationship between molecular weights(Mw) of HA preparations obtained by SEC-LALLS and those estimated by SEC using three kinds of calibration.

Used Standard for SEC calibration: ○, pullulan; ■, hyaluronate; △, pullulan with Mark-Houwink correction.

分子量は HA を標準とした場合の 3 倍程度大きな値となった。HA は電荷を有し、プルランに較べ大きく広がった構造をとっているため、同じ分子量でも HA の方が排除体積が大きく、溶出が速くなるためと考えられる。分子量標準品は、測定しようとする高分子そのものを用いるのが理想であるが、個々の高分子に対して通常の SEC の校正曲線に使用できるほど十分に分子量分布の狭いものを調製するのは困難である。測定法が簡便で、特殊な装置を必要としない SEC 法にあって残された問題点でもある。そのため、特に合成高分子などでは分子サイズの差を相殺しようとする試みが見られる。一般に高分子の分子量は固有粘度 $[\eta]$ により $Mw = K[\eta]^a$ という関係式で表される。SEC の分離モードは流体力学的体積で、これは $[\eta]Mw$ に比例することから、A, B 二種類の高分子ではそれぞれの溶出位置において $[\eta]_A Mw_A = [\eta]_B Mw_B$ が成り立つ。したがって、高分子の粘度式が既知の場合には、高分子 A を標準として高分子 B の分子量を $\log M_B = \{1/(1+a_B)\} \log K_A/K_B + \{(1+a_A)/(1+a_B)\} \log M_A$ により求めることができる。この方法は、粘度式の別名をとってマークホーインク補正と呼ばれ、通常の GPC 用ソフトに組み込まれていることが多い。HA では 0.2MNaCl を溶媒とする粘度式として、Laurent の式²⁾ $[\eta] = 0.036 Mw^{0.78}$ や

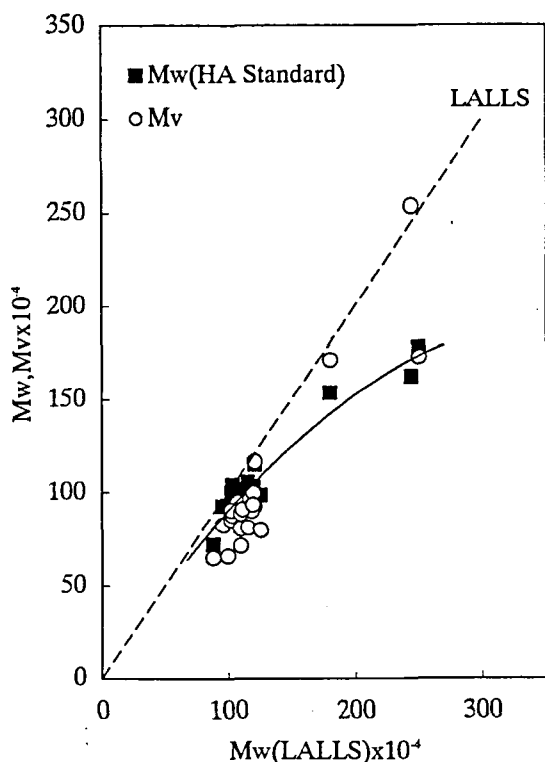


Fig. 3. Mw obtained by SEC and Mv of HA preparations are plotted against Mw by SEC-LALLS
Weight average molecular weight(Mw) obtained by SEC using HA standards and viscosity average molecular weight(Mv) calculated using Laurent's equation.

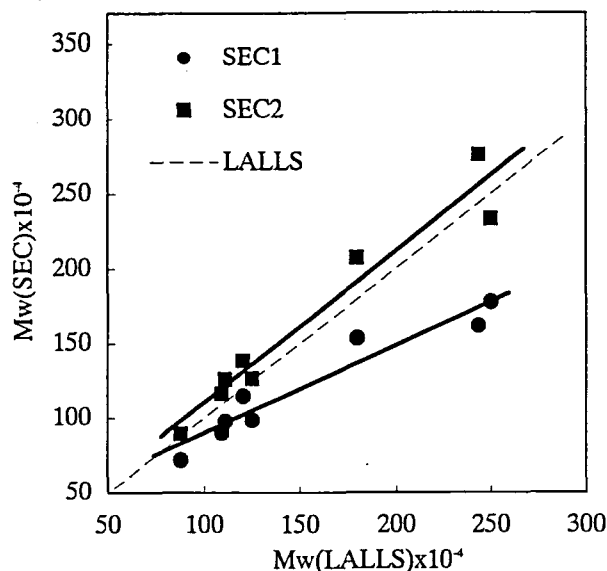


Fig. 4. Effect of SEC conditions to Mw of HA preparations
SEC1, eluent: 0.2MNaCl; flow rate: 0.8ml/min
SEC2, eluent: 0.5MNaCl; flow rate: 0.4ml/min

Cleland の式³⁾ $[\eta] = 0.0228 Mw^{0.816}$ が、プルランの粘度式として⁴⁾ $[\eta] = 0.014 Mw^{0.70}$ などが知られている。これらの粘度式を用いてマークホーインク補正を試みたところ、検討した実験条件下では、プルランを標準としても HA を標準とした場合に近い Mw 値が得られることが明らかとなった (Table 2)。HA の二つの粘度式による補正値を較べると、試料 3 以上ではやや Laurent 式の方が大きな分子量を与えたが、両者は類似した値となった。すなわち、HA のような、水溶性高分子電解質においても、マークホーインク補正の適用によりより妥当な分子量値が見積もられることが示唆された。

2. 市販ヒアルロン酸ナトリウム製剤の分子量測定

HA 分画試料における検討を基に、市販製剤 25 品目について粘度測定及び SEC, SEC-LALLS による分子量測定を試み、結果を Table 3 に示した。Fig. 2 に SEC による 3 種の分子量値を SEC-LALLS により求めたそれぞれの Mw 値に対して図示した。マークホーインク補正では Cleland の式を用いた。SEC では、HA 分画試料を標準とした場合と、プルランを標準としマークホーインク補正を行った場合でほぼ一致する Mw 値が得られた。これは、HA 含有製剤の分子量評価においても、プルランを分子量標準として使用

できる可能性を示している。また、Fig. 2 から分子量が大きな 3 製剤では、SEC による Mw 値は SEC-LALLS による値よりかなり小さく、本報の SEC の測定条件下では Mw が 150 万以上の分子は排除限界に達し、実際よりやや小さな Mw 値を得ていることが示唆された。

さらに、Fig. 3 では SEC による Mw と実測した極限粘度から Laurent の式により計算した粘度平均分子量(Mv)を SEC-LALLS による Mw に対して図示した。極限粘度を基に計算される Mv 値は、分布が大きな試料では通常 Mw よりやや小さな値となることが知られており、Fig. 3 でも分子量 100 万程度付近では、 $Mv < Mw$ であったが、高分子量の 3 製剤のうち、2 製剤では Mv 値は SEC-LALLS の Mw 値に近い値となり、1 製剤では Mv 値は他の二つと比較するとかなり小さくなった。HA は 100 万以上の高分子量域では、高分子同士のからみあいが大きくなり粘度測定値には慎重な取り扱いが必要となることが示されており⁵⁾、高分子製剤においては、粘度測定から得られる Mv 値は、必ずしも真の Mw 値を反映しない場合があると思われた。

3. SEC 測定条件の Mw 値に及ぼす影響

以上の結果から、100 万程度の分子量を有する HA 製剤の分子量は、SEC で充分評価可能と思われたが、高分子量

のヒアルロン酸製剤に関しては、SECの排除限界に達していることが示された。水系のSEC用カラムの排除限界は大きいものでデキストランあるいはプルラン換算で 10^7 程度とされているが、電荷を有するヒアルロン酸では、分子が大きく広がっているためにMw 200万程度でも排除限界に達していると考えられる。そこで、同じカラム系で排除限界が小さくなるようなSEC条件を検討した。測定条件を溶離液0.5MNaCl、流速0.4ml/minとして、高分子量製剤3種を含む8種のHA製剤を選択してSEC測定を試みたところ、Mw値は溶離液0.2MNaCl、流速0.8ml/minの場合と比較して全体にやや大きくなり、特に高分子量の製剤では差はかなり大きく、SEC-LALLSの値と近い値を示すようになった (Fig.4)。イオン強度を大きくし、流速を遅くすることで高分子鎖子の広がりが小さくなり、排除限界が大きくなるた

めに、300万近い高分子量の製剤でもSECによる分子量評価が可能となることが示された。

文 献

- 1) Ueno, Y., Tanaka, Y., Horie, K. and Tokuyasu, K.: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4971-4975 (1988)
- 2) Laurent, T.C., Ryan, M. and Pietruszkiewicz, A.: *B. B. A.*, **42**, 476-485 (1960)
- 3) Cleland, R.L. and Wang, J.L.: *Biopolymers*, **9**, 799-810 (1970)
- 4) 河原一男：分子量及び分子量分布研究会－水溶性ポリマーの分離とキャラクタリゼーション－，講演要旨集 pp.14-15 (1979)
- 5) Bothner, H., Waaler, T. and Wik, O.: *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 287-291 (1988)