

NAc)の*N*-アセチル基とOSCSのGalNAcの*N*-アセチル基の化学シフトの違いを利用した方法であり、キャピラリー電気泳動法は、ヘパリンとOSCSが硫酸基結合数の違いで分離されることを利用した方法である。各国は、FDAが公開した分析法を用いてヘパリンナトリウムの分析を行うとともに、OSCSの存在が確認されたヘパリンナトリウムの回収を行う等の対応をとった。一方で、世界的にヘパリン関連医薬品の供給不足への懸念が広がり、ヘパリンナトリウム製剤の安定供給のために、OSCSやDS分析法の整備が緊急課題となった。日本薬局方、米国薬局方及び欧州薬局方も、迅速対応として、ヘパリンナトリウム各条にOSCS及びDSの試験を追加することを検討するに至った<sup>6,7)</sup>。

本研究は、我が国におけるヘパリンナトリウムの品質・安全性確保を目的として、FDAの方法を参考に、<sup>1</sup>H-NMRによるOSCS及びDS分析法を確立するとともに、日本薬局方各条ヘパリンナトリウム純度試験としての適用可能性を評価したものである。

## 実験方法

### 1. 試料

OSCSは日本バルク薬品(株)から供与されたヘパリンナトリウムより弱陰イオン交換HPLCで精製したものをを用いた<sup>8)</sup>。DSは生化学工業(株)から購入した。日局ヘパリンナトリウム標準品は財団法人日本公定書協会より供与された。国立衛研は、ニプロファーマ(株)より供与されたヘパリンナトリウムを用いた。共同検定に参加した製薬企業5社は、各社のヘパリンナトリウムを使用した。3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-*d*<sub>4</sub> (TSP, 重水素化率98%)は、アルドリッチ社から購入した。重水は重水素化率99.9~99.96%のものを使用した。

### 2. 分析条件

ヘパリンナトリウム20mgを最終濃度0.01% (w/v) TSPを含む重水溶液 (TSP重水溶液) 0.60 mLに溶かして試料溶液とした。この液につきTSPを内部基準物質として日本薬局方一般試験法NMR <2.21> に従い<sup>1</sup>H-NMRを測定した。温度は25℃に設定し、スピニングはオフとした。データポイント数は32,768とし、スペクトル範囲はDHOのシグナルを中心に±6.0 ppmとした。パル

ス角は90°、繰り返しパルス待ち時間は20秒、デミースキャンは4回とした。ヘパリンの*N*-アセチル基のプロトンのシグナルのS/N比200以上が得られるまで積算した。ウィンドウ関数は指数関数 (Line broadening factor=0.2 Hz) を用いた。

### 3. 分析能パラメータの評価及びデカップリングによる<sup>13</sup>Cサテライトピーク消失の確認

分析能パラメータの評価は、国立衛研においてJEOL JNM-ECA 500 (500 MHz) を用いて実施した。ピーク面積は、ピーク形状を補正処理した後、TSPのピークのシグナル面積強度を1.000としたときの相対面積強度として算出した。デカップリングによる<sup>13</sup>Cサテライトピーク消失の確認は、JEOL JNM-ECA 600 (600 MHz) を用いて行った。

#### 3.1 OSCS

ヘパリンナトリウムをTSP重水溶液に溶解してヘパリンナトリウムTSP重水溶液とした (20 mg/0.6 mL)。この液に最終濃度0.17~10.0% (w/w) になるようにOSCSを添加した後、500 MHzの装置を用いて<sup>1</sup>H-NMRを測定した。TSPのシグナル面積強度に対するOSCSの*N*-アセチル基に由来するシグナルの相対面積強度を求めた。

#### 3.2 DS

ヘパリンナトリウムTSP重水溶液 (20 mg/0.6 mL) に最終濃度0.35~18.7% (w/w) となるようDSを添加した後、500 MHzの装置を用いて<sup>1</sup>H-NMRを測定した。TSPのシグナル面積強度に対するDSの*N*-アセチル基に由来するシグナルの相対面積強度を求めた。

## 4. 共同検定

国立衛研生物薬品部、同有機化学部、味の素(株)、(株)大塚製薬工場、テルモ(株)、日本臓器製薬(株)、及び扶桑薬品工業(株)が参加した。ここでは便宜上試験室A~Gと記す (順不同)。試験室AはBruker AVANCE 600 (600 MHz)、試験室BはBruker ARX-500 (500 MHz)、試験室CはVarian INOVA 500 (500 MHz)、試験室DはJEOL JNM-ECA 500 (500 MHz)、試験室EはJEOL JNM-AL 400 (400 MHz)、試験室FはVarian MERCURY VX 400 (400 MHz)、試験室GはVarian Unity-Plus 400 (400 MHz) を使用した。

#### 4.1 OSCS

OSCSをTSP重水試液に溶解し、OSCS溶液(4.0 mg/mL)を調製した。この液とヘパリンナトリウムTSP重水溶液を用いて、最終濃度0.5、1.0及び1.5% (w/w)のOSCSを含むヘパリンナトリウムTSP重水溶液(20 mg/0.6 mL)を調製し、<sup>1</sup>H-NMRを測定した。3.1と同様にしてTSPのシグナル面積強度に対するOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルの面積強度比を求めた。

#### 4.2 DS

DSをTSP重水試液に溶解し、DS溶液(4.0 mg/mL)を調製した。この液とヘパリンナトリウムTSP重水溶液を用いて、最終濃度1.0、1.5及び2.0% (w/w)のDSを含むヘパリンナトリウム溶液(20 mg/0.6 mL)を調製した。3.2と同様にしてTSPのシグナル面積強度に対するDSのN-アセチル基に由来するシグナルの相対面積強度を求めた。

### 結 果

#### 1. OSCSの分析

##### 1.1 特異性

ヘパリンナトリウムをTSP重水溶液に溶かして20 mg/0.6 mLの試料溶液(ヘパリンナトリウムTSP重水溶液)を調製し、プロトン共鳴周波数500 MHzのNMR装置を用いて<sup>1</sup>H-NMRを測定したところ、ヘパリンナトリウムのN-アセチル基のプロトンは2.05 ppmに観測された。次に、ヘパリンナトリウムTSP重水溶液に最終濃度10.0% (w/w)になるようにOSCSを添加して<sup>1</sup>H-NMRを測定したところ、OSCSに由来するN-アセチル基のシグナルは、2.15 ppmに観測された(Fig. 2)。ヘパリンとOSCSのN-アセチル基のシグナルはよく分離していることから、<sup>1</sup>H-NMRは、OSCSに対する特異性が高いことが確認された。また、ヘパリンナトリウムのN-アセチル基の<sup>13</sup>Cサテライトピークのうち低磁場側のピークが2.175 ppmに観測されたが、OSCSのN-アセチル基のプロトンシグナルの化学シフトは2.152 ppmであり、識別できることが確認された。

プロトン共鳴周波数600 MHz装置を用いたとき、ヘパリンナトリウムのN-アセチル基の<sup>13</sup>Cサテライトピークが1.937及び2.151 ppmに観測された(Fig. 3A)。ヘパリンナトリウムにOSCSを添加し

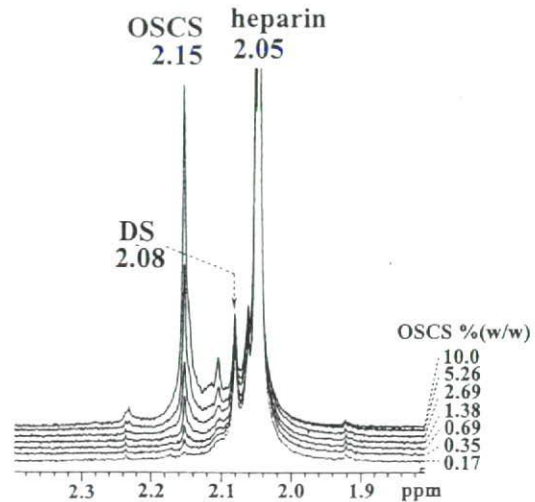


Fig. 2 ヘパリンナトリウム及びOSCSのN-アセチル基のプロトンの化学シフト  
最終濃度0.17~10.0% (w/w)のOSCSをヘパリンナトリウムに添加した。プロトン共鳴周波数: 500 MHz.

<sup>1</sup>H-NMRを測定すると、低磁場側の<sup>13</sup>CサテライトピークがOSCSのN-アセチル基のプロトンシグナルと重なることが明らかとなった(Fig. 3B)。しかし、デカップリングにより<sup>13</sup>Cサテライトピークを消失させることによって、OSCSのみを検出できることが確認された(Fig. 3C)。

##### 1.2 検出限界

OSCSを最終濃度0.17~10.0% (w/w)になるようにヘパリンナトリウムTSP重水溶液に添加した溶液につき<sup>1</sup>H-NMRを測定し、本分析法の検出限界を確認した。Fig. 2に示すように、OSCS濃度が0.35%のときにはピークを確認することができたが、OSCS濃度が0.17%のときはピークとして判断することが困難であった。

##### 1.3 直線性、範囲、再現性

OSCSを最終濃度0.17~10.0% (w/w)になるように添加したヘパリンナトリウムTSP重水溶液につき、<sup>1</sup>H-NMRを測定した。得られたOSCSのN-アセチル基に由来するシグナル面積強度をTSPに対する面積強度比で表したとき、0.4~10.0%の範囲で直線性が確認され、その相関係数(R<sup>2</sup>)は0.9991であった(Fig. 4)。0.4%のOSCSを添加したときの併行精度は1.6%であった。また、0.4%の

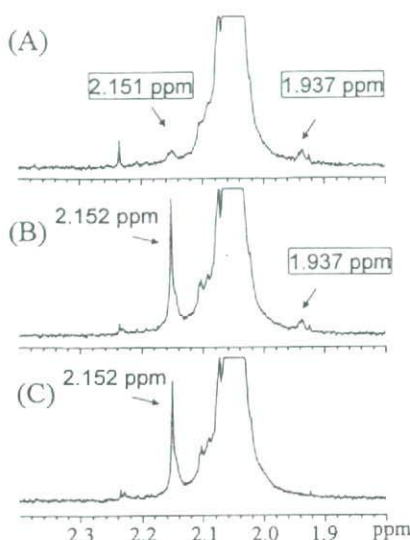


Fig. 3 ヘパリンナトリウム *N*-アセチル基のプロトン由来 <sup>13</sup>C-サテライトピーク (1.937 及び 2.151 ppm), 及び OSCS の *N*-アセチル基のプロトンのシグナル (2.152 ppm)

装置：JEOL JNM-ECA600 (600 MHz). (A) ヘパリンナトリウムのみ (デカップリングなし), (B) 最終濃度 1.0% (w/w) OSCS 添加ヘパリンナトリウム (デカップリングなし), 及び (C) 最終濃度 1.0% (w/w) OSCS 添加ヘパリンナトリウム (デカップリングあり).

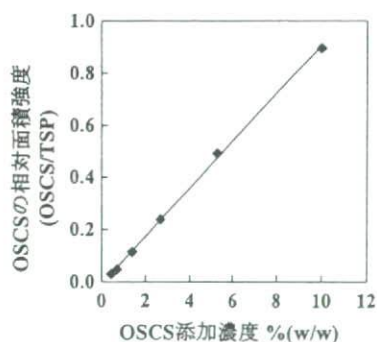


Fig. 4 <sup>1</sup>H-NMRによるOSCSの直線性  
ヘパリンナトリウムに最終濃度 0.17~10.0% (w/w) のOSCSを添加したときのTSPのシグナル面積強度に対するOSCSの *N*-アセチル基のプロトンの相対面積強度をプロットした。

Table 1 <sup>1</sup>H-NMRによるOSCS分析の分析能パラメータ

分析能パラメータ	結果
真度 <sup>a</sup>	98.3 % (RSD : 4.63%)
併行精度 <sup>a</sup>	1.6%
特異性	Fig.2 参照
検出限界	0.35 %
定量限界	0.4 %
直線性	$Y=0.0909X-0.064$ ( $R^2=0.9991$ )
範囲	Fig. 4 参照 0.4-10.0 %

<sup>a</sup>0.4%OSCSを用いた(n=3).

OSCSを添加したときの回収率は98.3% (RSD: 4.63%)であった (Table 1).

#### 1.4 共同検定

6機関7試験室において、OSCSを最終濃度0.5, 1.0及び1.5% (w/w) になるようにヘパリンナトリウムTSP重水溶液に添加し、プロトン共鳴周波数400, 500及び600MHzの装置を用いて<sup>1</sup>H-NMRを測定した。OSCSの *N*-アセチル基に由来するシグナルは、2.149~2.153 ppmの範囲に観察された。各試験室で得られたTSPに対するOSCS

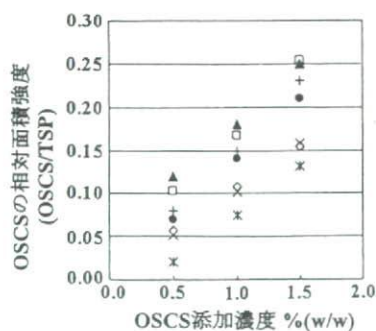


Fig. 5 <sup>1</sup>H-NMRを用いたOSCS限度試験共同検定結果

ヘパリンナトリウムに0.5, 1.0, 1.5% (w/w) を添加したときのTSPのシグナル面積強度に対するOSCSの *N*-アセチル基のプロトンの相対面積強度. ◇, 試験室A; □, 試験室B; ▲, 試験室C; ×, 試験室D; \*, 試験室E; ●, 試験室F; +, 試験室G

の *N*-アセチル基の相対シグナル面積強度を Fig. 5 に示す。全試験室で 0.5% 以上の OSCS のシグナルを確認することができたが、一部の試験室では、これ以下の OSCS のシグナルを検出することは難しいと判断された。共同検定結果から、本分析法の検出限界は 0.5% 程度と判断された。共同検定においても、600 MHz の装置を用いた試験室では、<sup>13</sup>C サテライトピークの一部と OSCS の *N*-アセチル基のシグナルが重なることを確認した。

## 2. DS の分析

### 2.1 特異性

DS を最終濃度 18.7% (w/w) になるようにヘパリンナトリウム TSP 重水溶液に添加し、500 MHz の装置を用いて <sup>1</sup>H-NMR を測定した。DS の *N*-アセチル基の化学シフトは 2.08 ppm であり、ヘパリンナトリウムの *N*-アセチル基 (化学シフト: 2.05 ppm) と一部重なることが確認された (Fig. 6)。

### 2.2 検出限界

DS を最終濃度 0.35~18.7% (w/w) になるようにヘパリンナトリウム TSP 重水溶液に添加した溶液を調製し、500 MHz の装置を用いて <sup>1</sup>H-NMR

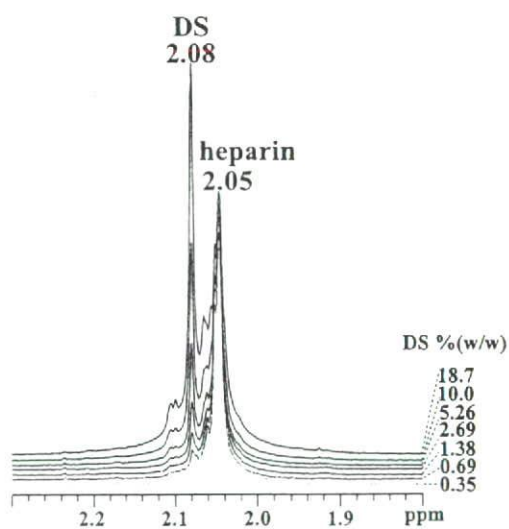


Fig. 6 ヘパリンナトリウム及び DS の *N*-アセチル基のプロトンの化学シフト

0.35~18.7% (w/w) の OSCS をヘパリンナトリウムに添加した。プロトン共鳴周波数: 500 MHz。

を測定したとき、0.35% の DS のシグナルを確認することができた。しかし、それより低い濃度の DS の検出は難しいと思われた (Fig. 6)。

### 2.3 直線性、範囲、再現性

500 MHz の装置及びピーク形状補正が可能なソフトウェアを用いて、最終濃度 0.35~18.7% (w/w) の DS を添加したヘパリンナトリウム溶液の <sup>1</sup>H-NMR を測定し、DS のシグナル面積強度を TSP に対する相対面積強度で表したとき、0.6~18.7% の範囲で直線性が確認され、その相関係数は 0.9998 であった (Fig. 7)。0.6% の DS を添加したときの併行精度は 1.5% であった。添加回収率は 102.6% (RSD: 3.99%) であった (Table 2)。

### 2.4 共同検定

6 機関 7 試験室において、最終濃度 1.0, 1.5 及び 2.0% (w/w) の DS を添加したヘパリンナトリウム試料溶液の <sup>1</sup>H-NMR を測定し、TSP に対する DS の *N*-アセチル基の相対シグナル面積強度を求めた (Fig. 8)。500 MHz 以上の装置とピーク形状補正が可能なソフトウェアを用いた試験室では、直線性を確認することができた (試験室 A, C 及び D)。しかし、500 MHz の装置を用いても、ピーク形状補正可能なソフトウェアを使用しない場合、DS のシグナルがヘパリンのシグナルと重なっているため、DS の濃度が見かけ上多く算出されることが明かとなった。また、400 MHz の装置を用いた試験室では、ヘパリンナトリウムの *N*-アセチル基

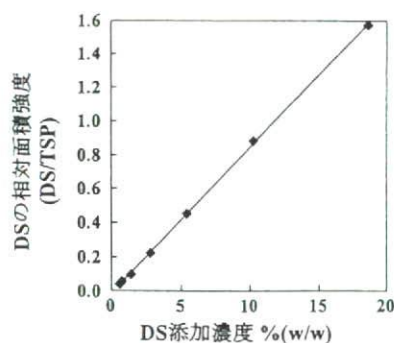
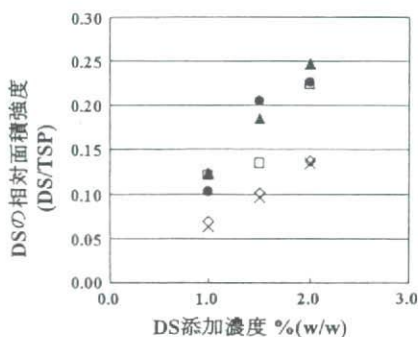


Fig. 7 <sup>1</sup>H-NMR による DS の直線性

ヘパリンナトリウムに 0.35~18.7% (w/w) の DS を添加したときの TSP のシグナル面積強度に対する DS の *N*-アセチル基のプロトンの相対面積強度をプロットした。

Table 2 <sup>1</sup>H-NMRによるDS分析の分析能パラメータ

分析能パラメータ	結果
真度 <sup>a</sup>	102.6% (RSD : 3.99%)
併行精度 <sup>a</sup>	1.5%
特異性	Fig. 6 参照
検出限界	0.35 %
定量限界	0.6 %
直線性	Y=0.08534X-0.0113 (R <sup>2</sup> =0.9998)
範囲	Fig. 7 参照 0.6-18.7 %

<sup>a</sup>0.6 %DS を用いた(n=3).Fig. 8 <sup>1</sup>H-NMRを用いたDS限度試験共同検定結果

ヘパリンナトリウムに1.0, 1.5, 2.0% (w/w) 添加したときのTSPのシグナル面積強度に対するDSのN-アセチル基のプロトンの相対面積強度。◇, 試験室A; □, 試験室B; ▲, 試験室C; ×, 試験室D; \*, 試験室E; ●, 試験室F; +, 試験室G

とDSのN-アセチル基を分離することができなかった。

## 考 察

### 1. OSCS

<sup>1</sup>H-NMRを用いた分析法は、OSCSに対する特異性が高いこと、また共同検定に参加したすべての機関において、検出限界に近い0.5% (w/w) のOSCSを検出できたことから、ヘパリンナトリウムに混入しているOSCSを対象とした純度試験とし

て、日本薬局方各条に採用することが可能であると判断された。本分析法を用いたときの規格等は以下のように考察された。

#### 1.1 化学シフト

国内6機関7試験室において、OSCSのN-アセチル基は2.149~2.153 ppmに観察されたことから、化学シフトの規格は、2.15 ppmを中心に±0.02 ppmと設定することが適当であると判断された。なお、米国薬局方は、OSCSのN-アセチル基の化学シフトの規格として2.16±0.03 ppmと設定しているが、2008年3月6日に公表された米国FDAのヘパリンナトリウム中の不純物検出法では、2.15±0.02 ppmが採用されている。

#### 1.2 限度値

OSCSは、有害事象の原因物質であること、また、製造工程由来物質や目的物質関連物質として混入する可能性がないことから、ヘパリンナトリウム中に検出されるべきではない。したがって、本試験法における規格は、「ヘパリンナトリウム中にOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルが検出されないこと」が適当であると考えられる。ただし、共同検定で得られた本試験法の検出限界は0.5%であることから、本試験法は、0.5%程度の限度試験であり、OSCSの含量が0.5%以下であることを保証するものと解釈される。OSCSをより高感度で測定できる試験機関において、2.15±0.02 ppmの範囲にシグナルが観察された場合、そのシグナルの面積強度が0.5%以下に相当すると推定されても、その検体は規格に適合しないと判断すべきと考えられる。

#### 1.3 システム適合性

本試験法は0.5%程度の限度試験であるので、システム適合性において、OSCSの化学シフトだけでなく、分析システムが0.5%のOSCSを検出できることを確認することが重要である。すなわち、0.1 mg/0.6 mLのOSCSが溶解したTSP含有重水溶液に、約20 mgのヘパリンナトリウム試薬を溶解して<sup>1</sup>H-NMRを測定したとき、2.02~2.06 ppm及び2.13~2.17 ppmにそれぞれヘパリンとOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルが検出されることを確認する必要がある。ここで使用するヘパリンナトリウム試薬は、OSCSが混入していないことを確認したものに限られる。なお、国立衛研によって、日局ヘパリンナトリウム標準品中のOSCSが

検出限界未満であることが確認されているので、日局ヘパリンナトリウム標準品を用いてOSCSが混入していないことを確認した後、そのヘパリンナトリウムをヘパリンナトリウム試薬として用いることは可能である。

#### 1.4 <sup>13</sup>C サテライトピーク

<sup>1</sup>H-NMR スペクトルでは、プロトンとカーボンが直接結合している場合、<sup>1</sup>H と <sup>13</sup>C (天然存在比、約 1.1%) のカップリングにより、プロトンのメインピークの両側に 2 本の <sup>13</sup>C サテライトピークが観測される。両サテライトピークの化学シフトの間隔 (ppm) は [<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C のカップリング定数 (Hz)/<sup>1</sup>H 共鳴周波数 (MHz)] で決まることから、ヘパリンの *N*-アセチル基のプロトンが 2.04 ppm に観測される場合、400、500 及び 600 MHz の装置を使用したときの低磁場側の <sup>13</sup>C サテライトピークは、それぞれ 2.20、2.17、及び 2.15 ppm に観測されることになる (*N*-アセチル基のプロトンの <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C カップリング定数：約 130 Hz)<sup>9)</sup>。今回の共同研究でも、600 MHz の装置を用いた場合、<sup>13</sup>C サテライトピークが OS CS の *N*-アセチル基のプロトンシグナルとはほぼ同じ位置に観測されることが確認された。しかし、<sup>13</sup>C サテライトピークは、ヘパリンナトリウムの *N*-アセチル基のメインピークを中心として対称に観察されること、ヘパリンナトリウムの *N*-アセチル基に対するシグナル面積強度の 0.55% であること、また、デカップリングによって消失することから<sup>9)</sup>、OSCS 由来のシグナルと識別可能であると思われる。<sup>13</sup>C サテライトピークの可能性があるシグナルが 2.13~2.17 ppm に検出された場合、デカップリングなどにより、OSCS か <sup>13</sup>C サテライトピークかを確認する必要がある。

#### 1.5 装置の適用範囲

米国薬局方では 500 MHz 以上の装置が採用されているが、国内 6 機関 7 試験室による共同検定の結果、400 MHz の装置でも OS CS とヘパリンのシグナルを分離できること (同程度の特異性)、並びに 0.5% 以上の OS CS を検出できること (同程度の検出限界) が確認された。また、400 MHz の装置を所有している国内メーカーが多いことから、日本薬局方のヘパリンナトリウム純度試験では 400 MHz 以上の装置を採用することが適当であると考えられる。欧州薬局方も 400 MHz の NMR の使用を認めてい

る。本研究では、プロトン共鳴周波数 300 MHz 以下の装置の適用可能性を評価していないので、300 MHz 以下の装置を使用する場合は、今回と同様なバリデーションスタディを実施しなければならない。その結果、同程度の特異性と検出限界が確認できれば、OSCS 分析法として用いることは可能である。なお、最終的な判断が必要となった場合は、400 MHz 以上の装置を用いる必要がある。

## 2. DS

500 MHz の装置を用いた分析能パラメータ評価では、DS とヘパリンの識別が可能であること、また、0.6~18.7% (w/w) の範囲で直線性があることが確認された。しかし、ピーク形状補正を行わない場合や、400 MHz の装置を用いた場合は、定量性や特異性に問題があることが明らかになった。共同検定の結果から、NMR による DS 分析を日本薬局方の試験法として設定することは適当ではないと判断されるが、各機関において、プロトン共鳴周波数 500 MHz 以上の装置を用い、ピーク形状補正が可能なソフトウェアを用いた場合は、DS の定量試験として利用することは可能であると考えられる。

DS の規制の必要性については、DS はヘパリンとは異なる物質であるので、純度試験として適切に規制するべきであるとする意見と、これまで毒性等の報告がないので、必ずしも純度試験等により規制する必要はないとの意見があり、国際的にも見解が分かれている。今後、国内ヘパリンナトリウムの DS の混入状況について正確に把握した上で、規制が必要か否か検討していく必要がある。その結果、必要と判断された場合は、FDA が提案しているキャピラリー電気泳動法などの NMR 以外の方法を日本薬局方における純度試験法として設定する必要があるだろう。

## 謝 辞

有益なご助言をいただきました自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター生命環境研究領域、生命分子研究部門加藤晃一教授、国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部鹿庭なほ子室長、独立行政法人医薬品医療機器総合機構早川堯夫顧問及び小嶋茂雄顧問、ヘパリンナトリウムをご供与いただきました日本バルク薬品(株)及びニプロファーマ(株)並

びに日局ヘパリンナトリウム標準品をご供与いただきました財日本公定書協会に深く御礼申し上げます。本研究の遂行にご協力いただきました厚生労働省医薬食品局審査管理課鷺田淳専門官、鈴木克之主査、独立行政法人医薬品医療機器総合機構品質管理部基準課上野清美課長、森田収氏、仁後知子氏に感謝いたします。また、有益なご討論をいただいた日本薬局方部会、日本薬局方原案審議委員会生物薬品委員会、FDA、米国薬局方、欧州薬局方、及びヘパリンナトリウム製剤製造会社の関係各位にお礼申し上げます。

本研究の一部は厚生労働省の支援によって行われたものである。

#### 文 献

- 1) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>.
- 2) Sugahara, K., Yamada, S.: *Trends in Glycoscience and Glycorechnology*, **12**, 321-349 (2000).
- 3) Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., et al.: *Nat Biotechnol.*, **26**(6), 669-675 (2008).
- 4) Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T., et al.: *N. Engl. J. Med.*, **358**(23), 2457-2467 (2008).
- 5) Maruyama, T., Toida, T., Imanari, T., Yu, G., Linhardt, R. J.: *Carbohydr. Res.*, **306**(1-2), 35-43 (1998).
- 6) <http://www.usp.org/hottopics/heparin.html>.
- 7) [http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin\\_sodium\\_monograph\\_Revised.pdf](http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin_sodium_monograph_Revised.pdf).
- 8) Montgomery, R. I., Lidholt, K., Flay, N. W., Liang, J., Vertel, B., Lindahl, U., Esko, J. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **89**(23), 11327-11331 (1992).
- 9) Yamaguchi, H., Shinagawa, M., Shimba, N., Miyano, H., Suzuki, E.: *Yakugaku Zasshi*, **128**(10), 1513-1515 (2008).