

Fig. 7 ヘパリンナトリウムに添加された OSCS の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル ( $\delta$ 1.8~2.4 ppm). OSCS-NIHS (A) 及び OSCS-T (B) の *N*-アセチル基に由来するピークの化学シフト.

構造特性と比較したところ、DEAE-HPLCにおける溶出位置、並びに DEAE で処理した後の  $^1\text{H}$ -NMR, HMQC 及び COSY スペクトルが類似していたことから、両者の硫酸エステルの結合数及び結合位置、並びに 2 糖構成単位はほぼ一致していることが明らかになった。

純度については、DEAE-HPLC, COSY 及び定量結果から、OSCS-T にはわずかに他の成分が混入していることが明らかとなった。混入成分として、 $^1\text{H}$ -NMR 及び COSY スペクトルで得られた化学シフトから、原料に混入していたヒアルロン酸が硫酸エステル化されたものなどが推察された。しかし、OSCS の *N*-アセチル基のシグナルの面積強度から OSCS-T 量を OSCS-NIHS 量に換算することが可能であること、また、OSCS-T の OSCS-NIHS への換算量は 80% 以上であることから、OSCS-T は、システムの感度を評価するための標準品として利用可能であると判断された。

ヘパリンナトリウムやヘパリンカルシウムに OSCS-NIHS 及び OSCS-T を添加して  $^1\text{H}$ -NMR

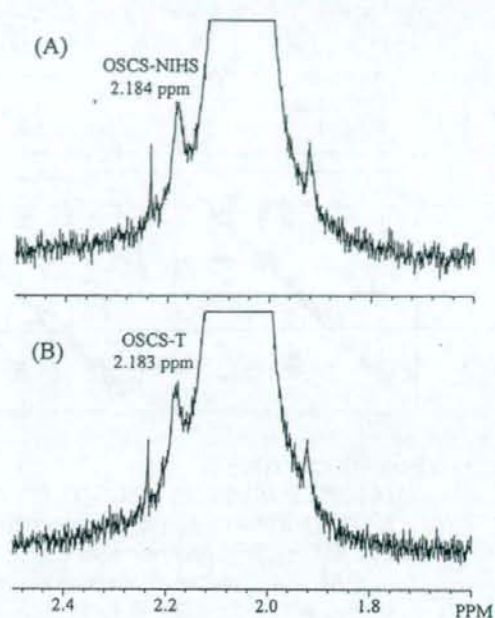


Fig. 8 ヘパリンカルシウムに添加された OSCS の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル ( $\delta$ 1.6~2.5 ppm). OSCS-NIHS (A) 及び OSCS-T (B) の *N*-アセチル基に由来するピークの化学シフト.

を測定したとき、*N*-アセチル基に由来するシグナルの化学シフトはほぼ一致することが確認された。OSCS-NIHS 及び OSCS-T の限度試験結果は類似していたことから、システムの特異性の評価に OSCS-T を用いることには問題はないと判断された。

以上のように、OSCS-T にはマイナー成分として他のグリコサミノグリカン硫酸エステルが混入していること、並びに OSCS-NIHS とナトリウム含量が異なることが示唆されたが、これらの差異は、システムの感度及び特異性の確認に影響するものではないことが確認された。OSCS-T はシステム適合性確認のための日局 OSCS 標準品として用いることが可能であると思われる。

## 謝 辞

ヘパリンナトリウムをご供与いただいた日本バルク薬品㈱及びニプロファーマ㈱、ヘパリンカルシウムをご供与いただいた味の素㈱及び沢井製薬㈱、並びに OSCS 標準物質をご供与いただいた FDA に厚

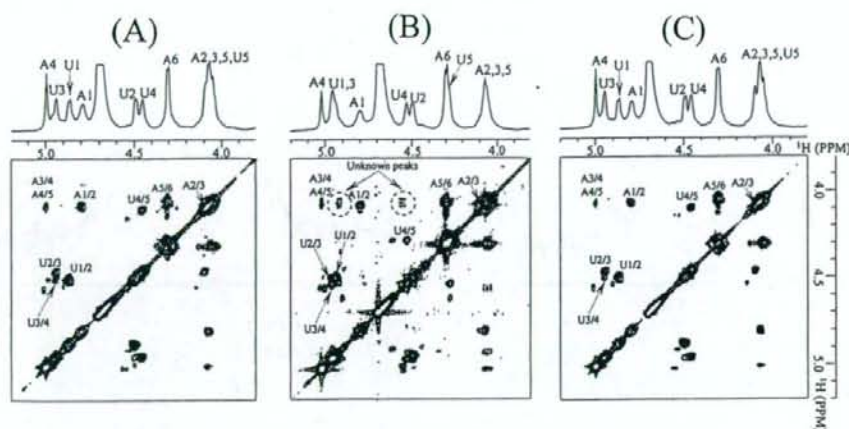
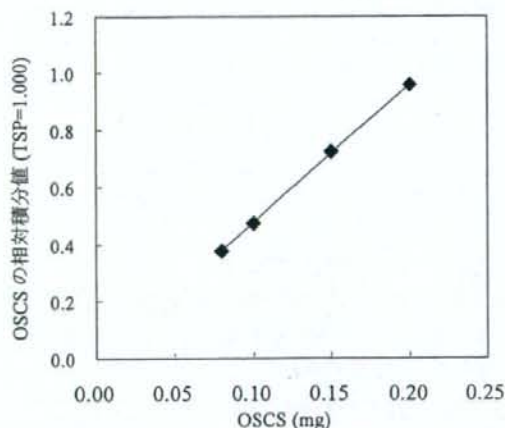


Fig. 5 OSCSのCOSY

(A) OSCS-NIHS, (B) OSCS-T, (C) DEAE-OSCS-T

A, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine;U, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid.A1~A6, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamineの1~6位; U1~U5, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acidの1~5位を示す。(例) A1/2: 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamineの1位と2位の<sup>1</sup>Hの相関ピークの観測位置を示す。Fig. 6 <sup>1</sup>H-NMRを用いたOSCS定量試験におけるOSCS-NIHSの直線性

トル等にわずかな差異が認められたことから、これらの差異がヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウム純度試験のシステム適合性評価に与える影響を調べた。システム適合性で用いる量に相当する0.10 mgのOSCS-NIHSとDEAE未処理OSCS-

Tを20 mgのヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムに添加して<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定し、OSCSの*N*-アセチル基のプロトンに由来するシグナルを比較した。その結果、ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムのいずれにおいても、OSCS-NIHS及びOSCS-Tの*N*-アセチル基に由来するシグナルの化学シフトはほぼ一致し、シグナルの強度にも目立った差はないことが確認された (Fig. 7, 8)。

#### 考 察

日局各条ヘパリンナトリウム及び日本薬局方外医薬品規格2002各条ヘパリンカルシウムの純度試験であるOSCSの限度試験は、OSCSが混入しているヘパリンから精製したOSCS-NIHSを用いて確立されたものであり、特異性及び検出限界は、OSCS-NIHSを用いて評価されたものである。本研究では、OSCS-NIHSと合成OSCS-Tの構造特性、純度、及び限度試験結果等の品質特性を比較することによって、OSCS-Tを日局OSCS標準品として使用することの妥当性を評価したものである。

OSCS-Tの主成分の構造特性をOSCS-NIHSの

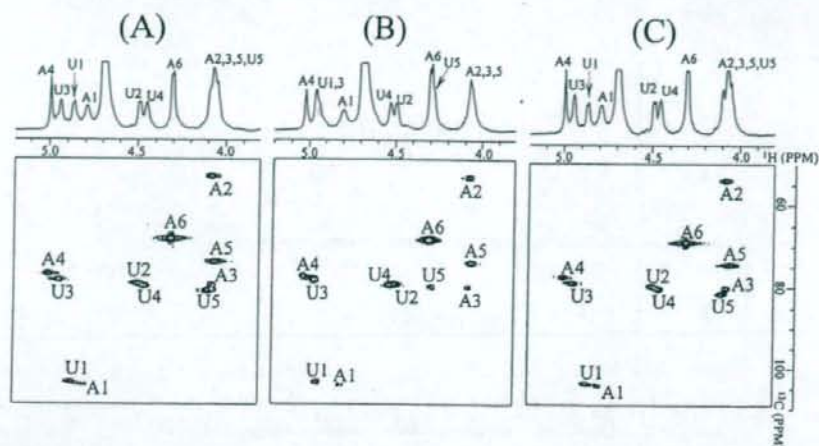


Fig. 4 OMSCS の HMQC

(A) OMSCS-NIHS, (B) OMSCS-T, (C) DEAE-OMSCS-T

A, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine;U, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid.A1~A6, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1~6 位; U1~U5, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid の 1~5 位を示す。(例) A1: 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1 位の  $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  の相関ピークの観測位置を示す。

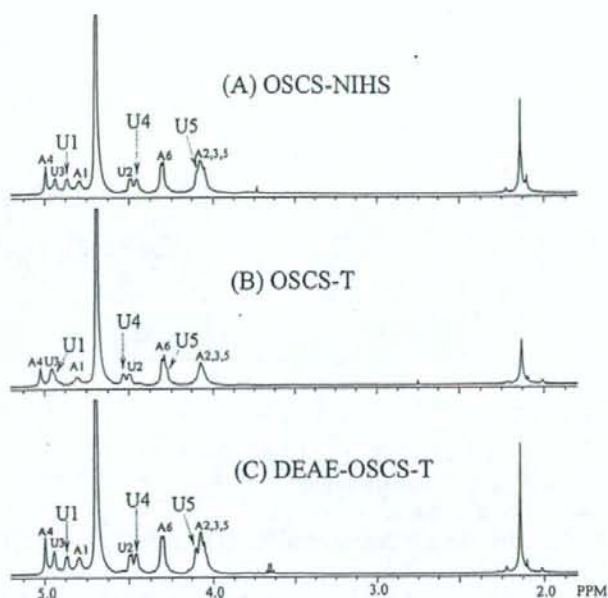
トルの  $\delta$  4.92 と 4.06 ppm 及び  $\delta$  4.56 と 4.06 ppm の間に、OSCS-NIHS のスペクトルには認められない相関ピークが観察された (Fig. 5A, 5B)。そこで、DEAE-OSCS-T の COSY 測定を行ったところ、これらの相関ピークは消失し、OSCS-NIHS のスペクトルとほぼ一致することが確認された (Fig. 5A, 5C)。このことから、4.92 と 4.06 ppm 及び 4.56 と 4.06 ppm 間に観測された相関ピークは、OSCS-T に含まれていたマイナー成分に由来するシグナルであることが示唆された。この相関ピークは、硫酸エステル化されたヒアルロン酸の 3 及び 6 位が硫酸エステル化された *N*-アセチルグルコサミンの 1 位 ( $\delta$  4.92 ppm) と 2 位 ( $\delta$  4.06 ppm)、及び 2 位 ( $\delta$  4.06 ppm) 及び 3 位 ( $\delta$  4.56 ppm) の相関ピークの観測位置にはほぼ一致することから<sup>8)</sup>、原料であるウシ気管軟骨由来コンドロイチン硫酸エステルナトリウムに混入していたヒアルロン酸が、硫酸エステル化されたものと推定された。以上のように  $^1\text{H}$ -NMR, HMQC 及び COSY スペクトルから得られた化学シフトの比較から、OSCS-NIHS 及び OMSCS-T の主成分の構成糖と硫酸エステル基の結合位置はほぼ同じであると考えられた。

#### 4. OMSCS-T の OMSCS-NIHS 量への換算

OSCS-T と OMSCS-NIHS は品質特性上類似性があると考えられたことから、OSCS-T の OMSCS-NIHS 含量に対する換算値を求めることとした。0.080, 0.10, 0.15 及び 0.20 mg の OMSCS-NIHS を 0.001% TSP 重水溶液 0.6 mL に溶解した液につき  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを測定し、TSP のシグナルの積分値に対する OMSCS の *N*-アセチル基に由来するシグナルの相対積分値を  $y$  軸として、また、OSCS-NIHS 量を  $x$  軸としてプロットしたところ、直線性が確認された ( $Y=4.8621X-0.01$ ,  $R^2=0.9998$ ) (Fig. 6)。また 0.10 mg の OMSCS-NIHS を 3 回測定したときの相対標準偏差は 1.0% であり、検量線から求めた真度は  $99.1 \pm 1.0\%$  であった。この検量線を用いて、0.15 mg の OMSCS-T を OMSCS-NIHS 量に換算したところ、 $0.12 \pm 0.001$  mg (OSCS-NIHS に対する相対純度 82%) であった。

#### 5. ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムへ添加したときの OMSCS の $^1\text{H}$ -NMR

OSCS-NIHS と OMSCS-T の DEAE-HPLC 溶出パターン、 $^1\text{H}$ -NMR, HMQC 及び COSY スペク

Fig. 3 OSCS の  $^1\text{H-NMR}$ 

(A) OSCS-NIHS, (B) OSCS-T, (C) DEAE-OSCS-T.

A, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine;U, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid.A1~A6, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1~6 位;U1~U5, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid の 1~5 位を示す。(例) A1: 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1 位のプロトンの観測位置を示す。

Table 1 OSCS-NIHS, OSCS-T及びDEAE-OSCS-Tの化学シフト

Monosaccharide	NIHS	OSCS-T	DEAE-OSCS-T
4,6- <i>O</i> -sulfo- <i>N</i> -acetyl-galactosamine			
H1	4.80	4.80	4.80
H2	4.08	4.07	4.08
H3	4.08	4.08	4.08
H4	5.00	5.02	5.00
H5	4.06	4.06	4.05
H6	4.31	4.30	4.31
<i>N</i> -Acetyl	2.14	2.13	2.14
2,3- <i>O</i> -sulfo-glucuronic acid			
H1	4.86	4.94 <sup>a</sup>	4.87
H2	4.49	4.50	4.49
H3	4.94	4.96	4.95
H4	4.46	4.53 <sup>a</sup>	4.46
H5	4.10	4.28 <sup>a</sup>	4.10

<sup>a</sup> OSCS-NIHS と比較して低磁場にシフトしていたOSCS-Tのプロトンの化学シフト

## 6. OSCS-T の OSCS-NIHS への換算

OSCS-NIHS 1.0 mg を最終濃度 0.001% (w/v) の TSP を含む重水溶液 (0.001% TSP 重水溶液) 1.0 mL に溶かし、OSCS-NIHS 原液 (1.0 mg/mL) とした。この液 0.08, 0.10, 0.15 及び 0.20 mL に、それぞれ 0.52, 0.50, 0.45 及び 0.40 の 0.001% TSP 重水溶液を加えて 0.08, 0.10, 0.15 及び 0.20 mg/0.6 mL OSCS-NIHS 溶液とした。これらの液につき、スピニングをオフとし、25°C で <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した。装置は JEOL の JNM-ECA 600 (600 MHz) を用いた。データポイント数は 32,768、スペクトル範囲は  $\delta$  5.0 ppm を中心に  $\pm 7.5$  ppm、パルス角は 90°、繰り返しパルス待ち時間は 20 秒と設定し、グミースキャンは 2 回行った。積算回数は TSP のシグナルの S/N 比 50 以上が得られる回数とし、ウィンドウ関数は指数関数 (Line broadening factor = 0.2 Hz) を用いた。測定後、ベースラインを基準として TSP 由来のシグナルの積分値 ( $\delta$  0.00  $\pm$  0.02 ppm) に対する OSCS-NIHS の *N*-アセチル基に由来するシグナルの積分値 (ピーク中心  $\pm$  0.01 ppm) を求めた。y 軸を TSP のシグナルの積分値に対する OSCS-NIHS の *N*-アセチル基に由来するシグナルの相対積分値として、また、x 軸を OSCS-NIHS 量 (0.08, 0.10, 0.15, 0.20 mg) として検量線を作成した。

別に、0.15 mg の OSCS-T に、0.001% TSP 重水溶液 0.60 mL を加えて OSCS-T 溶液とし、上記と同一条件で <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した。ベースラインを基準として TSP 由来のシグナルの積分値 ( $\delta$  0.00  $\pm$  0.02 ppm) に対する OSCS-T の *N*-アセチル基に由来するシグナルの積分値 (ピーク中心  $\pm$  0.01 ppm) を求め、先に作成した検量線から OSCS-NIHS 換算量 (mg) を求めた。

## 結 果

### 1. 陰イオン交換 HPLC

DEAE カラムを用いた陰イオン交換 HPLC (DEAE-HPLC) におけるグリコサミノグリカン硫酸エステル保持時間は、結合している硫酸エステルの数に影響され、硫酸エステルが 2 糖単位あたり 4 個結合している OSCS は、2~2.5 個結合しているヘパリンよりも後に溶出される (Fig. 2A)。OSCS-NIHS 及び OSCS-T の硫酸エステル化の度

合いを比較する目的で、DEAE-HPLC における OSCS-NIHS 及び OSCS-T の溶出パターンを比較した。主成分はほぼ同じ時間 (約 21 分) に溶出されることから、どちらも硫酸エステル化の度合いはほぼ同じであることが推定された。しかし、OSCS-T からは主ピークの後 (約 23 分) にマイナー成分が溶出され、UV 吸収から算出した主ピークに対するマイナーピークの割合は約 30% であった (Fig. 2B)。

### 2. <sup>1</sup>H-NMR

OSCS-NIHS 及び OSCS-T の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを比較したところ、OSCS-NIHS 及び OSCS-T の *N*-アセチルガラクトサミンのプロトンに由来するシグナルの化学シフトはほぼ一致するが、OSCS-T のグルクロン酸の 1, 4 及び 5 位のプロトンに相当する  $\delta$  4.94, 4.53 及び 4.28 ppm のシグナルは、OSCS-NIHS より低磁場にシフトしていることが明らかになった (Fig. 3A, 3B, Table 1)。

OSCS-NIHS は、NaCl を含む溶離液を用いた DEAE-HPLC により単一ピークのリチウム塩として回収されたものであるが、OSCS-T は水に対して透析したものであり、ナトリウムの割合が異なることや、マイナー成分が含まれていることなど、OSCS-NIHS とわずかな違いがある。これらの差異が化学シフトの違いの原因であることが推察されたので、OSCS-T から NaCl 含有溶離液と DEAE-HPLC により、主成分のリチウム塩 (DEAE-OSCS-T) を回収し、再度 <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した。その結果、OSCS-NIHS と DEAE-OSCS-T の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルはよく一致することが確認された (Fig. 3A, 3C, Table 1)。

### 3. HMQC 及び COSY

OSCS-NIHS 及び OSCS-T の HMQC スペクトルを比較したところ、OSCS-T のグルクロン酸の 1, 4 及び 5 位の <sup>1</sup>H と <sup>13</sup>C 以外の相関ピークの観測位置はほぼ一致していた (Fig. 4A, 4B)。また、OSCS-NIHS と DEAE-OSCS-T の HMQC スペクトルを比較した結果、すべての相関ピークが一致した (Fig. 4A, 4C)。一方、OSCS-NIHS 及び OSCS-T の COSY スペクトルを比較したところ、主な相関ピークは一致したが、OSCS-T のスペク

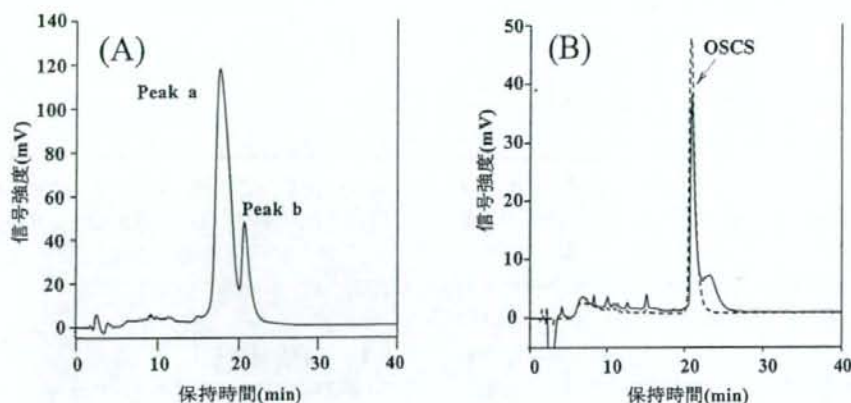


Fig.2 陰イオン交換 HPLC による OSCS の精製

(A) ヘパリンナトリウムからの OSCS の精製. Peak a, ヘパリンナトリウム; peak b, OSCS.

(B) OSCS-T の精製. 実線, OSCS-T; 破線, OSCS-NIHS.

#### 4. DEAE-OSCS-T の調製

OSCS-T 約 10 mg を 1.0 mL の 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解し、実験方法 2. に準じて HPLC を行い、主なピークを回収した (Fig. 2B)。最終濃度 70% (v/v) になるよう冷エタノールを加え、実験方法 2. と同様に処理した後、凍結乾燥し、DEAE-OSCS-T とした。

### 5. NMR

#### 5.1 $^1\text{H-NMR}$

OSCS-NIHS, OSCS-T, 及び DEAE-OSCS-T 4.0 mg をそれぞれ最終濃度 0.01% (w/v) の 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。これらの液につき TSP を内部基準物質として日本薬局方一般試験法 NMR <2.2I> に従い  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定した。装置は日本電子 (JEOL) の JNM-ECA 500 (500 MHz) を用いた。温度は 33°C 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  $\pm 6.0$  ppm とした。積算回数は 32 回、パルス角は 90°, 繰り返しパルス待ち時間は 20 秒、ダミーキャンは 4 回とした。ウィンドウ関数は指数関数 (Line broadening factor = 0.2 Hz) を用いた。

別に、ヘパリンナトリウム又はヘパリンカルシウム 20 mg を、0.10 mg の OSCS-NIHS 又は OSCS-T

を含む TSP 重水溶液 0.60 mL に溶解した。これらの液につき、上記と同様の条件で  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定した。

#### 5.2 二次元 NMR

##### 1) $^1\text{H}$ Detected Multiple Quantum Coherence (HMQC)

OSCS-NIHS, OSCS-T 及び DEAE-OSCS-T 4.0 mg をそれぞれ TSP 重水溶液 0.60 mL に溶かし OSCS-NIHS, OSCS-T 及び DEAE-OSCS-T 試験溶液とした。この液につき、JEOL JNM-ECA 500 を用いて HMQC スペクトルを測定した。データポイント数は 1,024  $\times$  256、スペクトル範囲は  $^1\text{H}$  側を  $\delta$ -1.0~6.0 ppm,  $^{13}\text{C}$  側を  $\delta$ -10.0~200 ppm とした。温度を 33°C、繰り返しパルス待ち時間を 1.5 秒と設定し、ダミーキャンを 4 回行った。積算回数は 128 回とした。

##### 2) $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ Correlation Spectroscopy (COSY)

実験方法 5.2.1) で調製した OSCS-NIHS, OSCS-T 及び DEAE-OSCS-T 試験溶液について JEOL JNM-ECA 500 を用いて COSY スペクトルを測定した。データポイント数は 1,024  $\times$  512、スペクトル範囲は  $\delta$ -1.0~6.0 ppm とした。温度を 33°C、繰り返しパルス待ち時間を 1.5 秒と設定し、ダミーキャンを 4 回行った。積算回数は 16 回とした。