Fig. 2 MS/MS Spectrum of  $m/z$  591.8 (+2) of Gonadorelin

b及びyイオンの集計結果をTable 3に示す。検出されたフラグメントイオンは、装置、測定条件により違いがあったが、生じることが予想されるフラグメントイオン $b_{1-9}$ 及び $y_{1-9}$ のうち、 $b_2$ 、 $b_3$ 、 $b_4$ 、 $b_6$ 、 $b_8$ 、 $y_2$ 、 $y_3$ 、 $y_5$ 、 $y_6$ 、 $y_7$ 及び $y_8$ が検出されやすい傾向があった。2回の測定とも検出できたイオンの数は、平均13.1個(7~16個)であった。また、各機関において規格として設定可能と判断されたイオンは、平均10.3個(5~16個)であった。各試験室で観測したフラグメントイオンの $m/z$ 値の実測値の理論値からの誤差は、一試験室(E1及びE2)を除くと-0.45~0.22であり、各測定での誤差の平均は-0.21~0.11、また標準偏差は0.001~0.15であった(Table 3)。機関Eにおいて実測値と理論値との差が大きくなった原因として、装置の分解能が低いこと、及びピークがノイズや他のフラグメントイオンと重なった場合にピークがブロードになったことが考えられた。機関Eを除く各試験室(機関Hでは2種類の条件で測定が行われているので、フラグメントイオンが多く観測されたH1の測定値を採用した。)で観測した $b_{2-8}$ 及び $y_{2-8}$ の各フラグメントイオンの $m/z$ 値の室内再現標準偏差及び室間再現標準偏差を求めたところ、それぞれ0.01~0.11及び0.05~0.14であった(データ非

表示)。

還元アルキル化インスリンA鎖 インスリンA鎖のMS/MSによって検出されたb及びyイオンの数をTable 4に示す。CAM化インスリンA鎖を測定した試験室A4及びE1、及びCM化インスリンA鎖を測定した試験室A4、C1、C2及びE1では、前駆イオンのシグナル強度が低く、フラグメントイオンを検出できなかった。MS/MSスペクトルを測定できた試験室においては、13~35個のフラグメントイオンを検出することができた。また、6~26個のフラグメントイオンを規格として設定可能であると判断した。

還元アルキル化インスリンB鎖 いずれの還元アルキル化方法でも、5個以上のフラグメントイオンを検出することができた(Table 4)。また、4~35個のフラグメントイオンを規格として設定可能であると判断した。

#### 4. 考 察

本研究では、ペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験法として適していると思われるイオン化方法、分析計及び測定方法を設定し、MSを用いた標準的確認試験法を作成した。更に、8機関共同で試験法の適用可能性を検証した。

はじめに、分子質量測定によるペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験の適用可能性を評価した。分子量約 300~6,000 の共通試料を測定したところ、分子量 4,000 以下のペプチドの場合、多くの試験室で単同位体質量を測定することができた。分子量が約 6,000 のペプチドの場合は、多くの機関で平均質量を測定したが、分解能の高いリフレクトロン型の TOF、OT 及び FT-ICR 型分析計を使用した機関では、単同位体質量を測定することができた。分子量 5,807.6 のインスリンにおいて、同位体存在比から推定した単同位体分子の存在量は、天然存在比が最大の同位体分子の約 14% しかないことから、より分子量の大きなペプチドでは単同位体ピークの検出は難しいと考えられ、単同位体質量が測定可能なペプチドは分子量が 6,000 程度のものまでと考えられた。

分子量 1,000 以下のペプチドの単同位体質量測定を測定した場合、実測値の許容範囲はグルタチオン及びゴナドレリンにおける室間再現標準偏差から  $2.8 \times$  室間再現標準偏差<sup>9)</sup> により計算したところ、それぞれ  $\pm 0.11$ ,  $\pm 0.16$  であり、 $\pm 0.3$  Da 以内の誤差で分子質量を測定することが可能であり、アミノ酸組成の違いによって生じる 1 Da の質量差を識別できることが示唆された。

分子量 1,000~6,000 のペプチドでは、観測された単同位体質量値の室間再現標準偏差は概ね 100 ppm 以内であり、 $\pm 300$  ppm がペプチドの単同位体質量の実測値の許容範囲と考えられた。この場合、質量差 1 Da のペプチドを識別できない場合があり、1 Da 差が問題になる場合は、MS/MS や HPLC 等による確認を併用することが望ましいと思われる。

分子量 6,000 までのペプチドの平均質量を測定した場合、インスリンにおける室間再現標準偏差 155 ppm から、 $\pm 500$  ppm 以内の質量誤差で分子質量が得られることが示唆された。なお、得られた実測値の平均値 5,806.5 Da は、分子量 (5,807.6) よりむしろ最大強度質量の理論値 (5,806.6) に近く、単同位体質量を設定しない場合、規格設定において分子量と最大強度質量のいずれと比較するのかを明確にしておく必要がある。

ESI-MS を用いて分子量 22,125 の成長ホルモンの平均質量を測定した場合、室間再現標準偏差は 42 ppm であり分子量約 6,000 のインスリンと同程

度であった。したがって、分子量 6,000~22,000 の範囲において、質量誤差  $\pm 500$  ppm (約 11 Da) 以内で測定できることが確認された。一方、MALDI-MS を用いた場合は、室間再現標準偏差は 552 ppm であり、質量誤差  $\pm 1,600$  ppm (約 35 Da) 以内で測定できることが確認された。ESI-MS で測定した場合のばらつきが小さかった理由として、分子量の大きなたん白質でも多価イオンとして観測されるため、測定範囲をカバーした質量校正標準品を用いた質量校正が行えたことや、観測された複数の多価イオンを用いてデコンボリューション処理をすることによって、個々のピークのずれが補正されたことが考えられた。これに対して、MALDI-MS を用いた場合、分子量の大きな試料の測定に適した質量校正標準品がなかったことや、リフレクトロンモードではなくリニアモードでの測定になったことが、試験室間の実測値の差につながったものと考えられた。

ESI-MS を用いてヒト血清アルブミン (分子量: 約 66,400) を測定した場合、室間再現標準偏差は 306 ppm であり、ヒト成長ホルモンを分析した場合に比べて、実測値のばらつきが大きかった。しかし、IT 型分析計を用いた試験室を除く 5 試験室 (TOF 型若しくは OT 型分析計を使用) が得た実測値の平均の理論値からの誤差は、2.0 Da であり、室間再現標準偏差は 3.0 Da、相対標準偏差は 46 ppm であった (データ非表示)。この結果は、十分な分解能を有する装置を用いた場合は、分子量 6,000~66,400 の範囲で、質量誤差  $\pm 500$  ppm で測定できることを示唆している<sup>10,11)</sup>。

ヒト血清アルブミンを MALDI-MS で測定した場合、室間再現標準偏差は 517 ppm であり、質量誤差  $\pm 1,600$  ppm (約 105 Da) で測定できることが示唆された。しかし、実測値の平均値が理論値と大きく異なっていることから ( $-55$  Da)、質量校正が正確でなかった可能性がある。MALDI-MS では、分子量の大きいたん白質を測定する場合、質量校正標準品として BSA を用いることが多いが、BSA は翻訳後修飾等により分子量が不均一であることが知られており<sup>12,13)</sup>、各試験室で質量校正に用いた BSA の違いが、MALDI-MS による実測値の偏り、ばらつきにつながった可能性が推察される。MALDI-MS によりたん白質医薬品の質量測定を行う場合は、質量校正標準品の設定が重要であると思

Table 3 Summary of Detected Fragment Ions in MS/MS

Laboratory	A1	A2	A3	B1	B3	C1	C2	D	
Mass type	ESI QTOF CID	ESI IT CID	ESI FT CID	ESI IT CID	ESI IT CID	ESI IT CID	ESI QTOF CID	ESI QTOF CID	
Precursor ion	591.8 (+2)	591.8 (+2)	591.8 (+2)	592.1 (+2)	591.8 (+2)	591.8 (+2)	1182.6 (+1)	591.8 (+2)	
Energy	30 eV	35%	35%	30-200%	35%	25%	30 eV	15-45 eV <sup>a</sup>	
Fragment ions									
b-ions	<i>m/z</i>								
1	112.04	-	-	-	-	-	-	○	
2	249.10	⊙	⊙	⊙	⊙	-	⊙	⊙	
3	435.18	⊙	⊙	⊙	⊙	-	⊙	○	
4	522.21	⊙	⊙	⊙	⊙	-	⊙	○	
5	685.27	○	⊙	⊙	○	○	○	-	
6	742.29	○	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	-	
7	855.38	○	⊙	⊙	⊙	⊙	○	○	
8	1011.48	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	○	
9	1108.53	-	-	-	-	-	-	-	
y-ions	<i>m/z</i>								
9	1071.55	-	-	-	-	-	-	-	
8	934.49	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	○	⊙	
7	748.41	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	○	⊙	
6	661.38	⊙	⊙	⊙	⊙	○	○	⊙	
5	498.31	⊙	⊙	⊙	⊙	-	○	⊙	
4	441.29	○	⊙	⊙	○	-	○	-	
3	328.21	○	⊙	⊙	⊙	-	○	○	
2	172.11	⊙	⊙	⊙	○	-	○	○	
1	75.06	-	-	-	-	-	-	-	
Mass error ( <i>m/z</i> )									
Spectrum 1	Average	-0.014	-0.01	0.001	0.01	-0.07	-0.10	0.030	0.000
	SD	0.006	0.04	0.001	0.01	0.09	0.15	0.013	0.009
	Max	-0.007	0.09	0.004	0.03	0.02	0.22	0.049	0.017
	Min	-0.027	-0.08	0.000	-0.02	-0.28	-0.28	0.010	-0.021
Spectrum 2	Average	-0.007	0.02	0.001	0.01	-0.08	-0.09	0.029	0.004
	SD	0.002	0.06	0.001	0.01	0.10	0.13	0.012	0.007
	Max	-0.004	0.11	0.004	0.03	0.09	0.10	0.049	0.014
	Min	-0.012	-0.08	0.000	-0.02	-0.28	-0.23	0.010	-0.010
Number of fragment ions detected in both of two independent MS/MS spectra									
b-ions	7	7	7	7	7	4	7	6	
y-ions	7	7	7	7	7	3	7	6	
Total	14	14	14	14	14	7	14	12	
Number of fragment ions which individual laboratories considered as possible acceptance criterion for identification test									
b-ions	4	7	7	6	6	3	5	1	
y-ions	5	7	7	5	5	2	0	4	
Total	9	14	14	11	11	5	5	5	

○, Ions which were detected in both of two independent MS/MS spectra.

⊙, Ions which individual laboratories considered as possible acceptance criterion for identification test.

<sup>a</sup>, A collision energy ramp was used.<sup>b</sup>, W-ion was detected.

われる。

次に、MS/MSによって得られたペプチドフラグメントイオンを、アミノ酸配列の確認に利用できるかどうか、及びどのような基準で試験を行うのが適当かを、分子量約300から4,000のペプチドを用いて検証した。グルタチオン(3アミノ酸残基)では、IT型分析計を使用した場合を除いて、すべてのb及びyイオンを検出することができた。ゴナドレリン(アミノ酸10残基)のMS/MSでは、ほとん

どの機関で、予想されるb及びyイオンのうち10個のフラグメントイオンを確認することができた。より分子量の大きいインスリンA鎖(21アミノ酸残基)及びインスリンB鎖(30アミノ酸残基)においても、ほとんどの機関で10個以上のフラグメントイオンを確認し、5個以上のフラグメントイオンを規格に設定できると判断した。したがって、ペプチドの確認試験において、確認すべきフラグメントイオンとして、分子量1,000から4,000のペプチ

Spectra of Gonadorelin at Each Laboratory

F	A4	B4	E1	E2	H1	H2	
ESI	MALDI	MALDI	CHCA	DHB	MALDI	MALDI	
OT	TOFTOF	TOF	MALDI	MALDI	TOFTOF	TOFTOF	
CID	CID	PSD	TOF	TOF	PSD	TOFTOF	
			PSD	PSD		CID	
591.8 (+2)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	
35%	1 keV	-	-	-	-	20 keV	
○	⊙	⊙	○	○	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
-	⊙	⊙	○	○	⊙	-	
⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
-	⊙	⊙	-	-	⊙	-	
⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
-	⊙	-	-	-	-	-	
-	-	○	-	-	-	-	
⊙	⊙	⊙	-	-	⊙	-	
⊙	⊙	⊙	-	-	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	○	○	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	○	○	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	-	-	⊙	-	
⊙	⊙	⊙	○	○	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	○	○	⊙	⊙	
-	-	-	-	-	-	-	
-0.001	-0.03	0.11	0.58	0.73	-0.21	-0.16	
0.001	0.04	0.01	0.65	0.87	0.11	0.11	
0.000	0.01	0.13	1.63	2.43	-0.07	-0.05	
-0.003	-0.12	0.09	-0.18	-0.21	-0.41	-0.45	
-0.002	-0.04	0.09	0.53	0.97	-0.17	-0.09	
0.001	0.04	0.03	0.57	0.75	0.12	0.10	
0.000	0.01	0.13	1.43	2.23	0.03	0.03	
-0.003	-0.13	0.02	-0.21	0.02	-0.41	-0.30	
							average
6	9	8	7	7	8	7	
7	7	8	4	4	7	6	
13	16	16	11	11	15	13	13.1
5	9	8	5	5	8	6	
7	7	7	0	0	7	5	
12	16	15	5	5	15	11	10.3

ドでは5~10程度のイオンを設定することが可能と思われた。しかしながら、装置間で検出されたフラグメントイオンは異なっていたことから、装置に依存しない規格を設定するためには、今後、断片化条件の最適化及び標準化の検討が必要である。

MS/MSにおいてフラグメントイオンの $m/z$ 値の理論値からの誤差の程度は、質量校正の正確さ、分析計の分解能、ソフトウェアの違い、プリカーサーイオンの分子量及びフラグメントイオンの分子量、

ピーク強度等によって変動することが推測される。ゴナドレリンのMS/MSスペクトルで観測された各フラグメントイオンの $m/z$ 値の室間再現標準偏差は、最大で0.14であったことから、分子量1,000程度のペプチドのMS/MSでは、フラグメントイオンの同位体ピークを±0.4程度の $m/z$ の誤差で検出することが可能と推定された。より大きなペプチドのMS/MSについては、本研究では例数が少なく、また、装置ごとの差が大きかったことから、

Table 4 Number of Detected Fragment Ions in MS/MS Spectra of Insulin

Laboratory		A1	A2	A3	B1	B3	C1	C2	D
Mass type		ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI
Sample		QTOF	IT	FT	IT	IT	IT	QTOF	QTOF
		CID	CID	CID	CID	CID	CID	CID	CID
Human insulin A chain									
Pyridylethyl	Precursor ion	1402 (+2)							702 (+4)
	Energy	66 eV							25 eV
	b-ions	9							9
	y-ions	4							7
	Total	13							16
	b-ions	4							3
	y-ions	6							5
	Total	10							8
Carboxyamidemethyl	Precursor ion	1306 (+2)			1307 (+2)	871 (+3)			
	Energy	40 eV			30-200%	35%			
	b-ions	11			14	21			
	y-ions	8			14	14			
	Total	19			28	35			
	b-ions	5			8	4			
	y-ions	9			9	2			
	Total	14			17	6			
Carboxymethyl	Precursor ion	1308 (+2)	1308 (+2)	1308 (+2)					872 (+3)
	Energy	40 eV	35%	35%					25 eV
	b-ions	10	14	12					14
	y-ions	8	13	10					8
	Total	18	27	22					22
	b-ions	8	13	9					5
	y-ions	8	13	8					7
	Total	16	26	17					12
Human insulin B chain									
Pyridylethyl	Precursor ion	910 (+4)							729 (+5)
	Energy	43 eV							25 eV
	b-ions	11							10
	y-ions	8							8
	Total	19							18
	b-ions	9							3
	y-ions	6							1
	Total	15							4
Carboxyamidemethyl	Precursor ion	1182 (+3)			1773 (+2)	887 (+4)			
	Energy	60 eV			30-200%	35%			
	b-ions	18			19	24			
	y-ions	11			17	17			
	Total	29			36	41			
	b-ions	12			8	9			
	y-ions	6			7	5			
	Total	18			15	14			
Carboxymethyl	Precursor ion	1182 (+3)	1182 (+3)	1182 (+3)			1182 (+3)	887 (+4)	887 (+4)
	Energy	60 eV	35%	35%			35%	30 eV	25 eV
	b-ions	12	18	19			11	23	19
	y-ions	6	18	17			11	25	19
	Total	18	36	36			22	48	38
	b-ions	6	17	15			1	10	7
	y-ions	3	18	17			4	9	3
	Total	9	35	32			5	19	10

Upper: Number of the b- and y-ions detected both in two independent MS/MS spectra.

Lower (Bold): Number of the b- and y-ions which individual laboratory considered as possible acceptable criterion for identification test.

今後の検討が必要であると思われる。

分子量 4,000 を超えるペプチドやたん白質については、生じるフラグメントイオンに限られるので、MS/MS を確認試験に用いることは難しいと思われる。しかし、たん白質分解酵素などでペプチド断片

とすることによって MS/MS を応用できる可能性があることから<sup>14)</sup>、今後、酵素処理と MS/MS による確認試験の検討を行っていきたい。

A Chain and Insulin B Chain at Each Laboratory

F	A4	B4	E1	E2	H	Average
ESI	MALDI	MALDI	CHCA	DHB	MALDI	
OT	TOFTOF	TOF	MALDI	MALDI	TOFTOF	
CID	CID	PSD	TOF	TOF	TOFTOF	
		PSD	PSD	PSD	PSD	
702 (+4)	2803 (+1)		2803 (+1)	2803 (+1)		
eV	1 keV		-	-		
9	10		17	19		
7	3		5	10		
16	13		22	29		18.6
3	10		9	8		
5	3		0	0		
8	13		9	8		9.6
1306.5 (+2)		2611 (+2)		2611 (+1)	2611 (+1)	
35%		-		-	-	
17		17		15	15	
17		17		10	13	
34		34		25	28	29.0
7		12		7	13	
7		4		3	9	
14		16		10	22	14.1
172 (+3)				2615 (+1)		
eV				-		
14				19		
8				10		
22				29		23.6
5				7		
7				2		
12				9		16.0
29 (+5)	3639 (+1)		3639 (+1)	3639 (+1)		
eV	1 keV		-	-		
10	1		11	16		
8	4		5	17		
18	5		16	33		18.2
3	1		4	4		
1	4		1	2		
4	5		5	6		7.0
1182 (+3)	3543 (+1)	3543 (+1)	3543 (+1)	3543 (+1)	3543 (+1)	
35%	1 keV		-	-	-	
25	19	18	12	18	20	
25	15	24	7	19	21	
50	34	42	19	37	41	36.6
12	19	5	4	4	15	
8	15	12	1	2	15	
20	34	17	5	6	30	17.7
387 (+4)	3545 (+1)		3545 (+1)	3545 (+1)		
eV	1 keV		-	-		
19	2		14	20		
19	8		8	19		
38	10		22	39		29.9
7	2		6	4		
3	8		1	3		
10	10		7	7		14.9

5. 結 論

ペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験として質量分析を用いる場合の標準的試験法(別紙1)を作成した。多機関共同研究の結果、MSにより分子の質量の確認を行ったとき、分子量1,000以下のペ

プチドでは±0.3Da(単同位体質量)、分子量1,000~6,000のペプチドの場合、±300ppm(単同位体質量)もしくは±500ppm(平均質量)、分子量6,000~22,000までのペプチド及びたん白質の場合、ESIでは±500ppm(平均質量)、また、MALDI

では±1,600 ppm (平均質量) 以内の誤差で分子の質量を測定可能であることが確認された。MS/MSにおいては、分子量1,000~4,000のペプチドでは、5~10のフラグメントイオンをペプチドの確認に利用可能であると考えられたが、装置間で検出されたフラグメントイオンは異なっていたことから、装置に依存しない規格を設定するためには、測定条件の検討が必要である。

#### 謝 辞

本研究を行うに当たり、ゴナドレリン酢酸塩標準品を供与して頂いた財団法人日本公定書協会に厚く御礼申し上げます。

有益なご助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部鹿庭なほ子先生に感謝いたします。

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究事業の支援を受けて行ったものである。

#### 文 献

- 1) Hirayama, K., S. Akashi, S., Furuya, M., Fukuhara, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 639-646 (1990).
- 2) Arnott, D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F.: *Clin. Chem.*, **39**, 2005-2010 (1993).
- 3) McLafferty, F. W., Fridriksson, E. K., Horn, D. M., Lewis, M. A., Zubarev, R. A.: *Science*, **284**, 1289-1290 (1999).
- 4) Medzihradszky, K. F.: *Methods in Enzymology*, **402**, 209-244 (2005).
- 5) Strupat, K.: *Methods in Enzymology*, **405**, 1-36 (2005).
- 6) Audi, G., Wapstra, A. H.: *Nuclear Physics A*, **595**, 409-480 (1995).
- 7) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方、付録 原子量表 (2004) について、2006, p. 1667-1670.
- 8) Roepstorff, P., Fohlman, J.: *Biomed. Mass. Spectrom.*, **11**, 601 (1984).
- 9) JIS z 8402-1991「分析・試験の許容差通則」、日本規格協会発行。
- 10) Tarelli, E., Mire-Sluis, A., Tivnann, H. A., Bolgiano, B., Crane, D. T., Gee, C., Lemerminier, X., Athayde, M. L., Sutcliffe, N., Corran, P. H., Rafferty, B.: *Biologicals*, **26**, 331-346 (1998).
- 11) Girard M., Bietlot H. P., Cyr T. D.: *J. Chromatogr. A*, **772**, 235-242 (1997).

- 12) Peters T.: *In All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*. Academic Press, Properties of Thiol Group, 1996, p. 51-54.
- 13) Wada, Y.: *J. Mass Spectrom.*, **31**, 263-266 (1996).
- 14) 川崎ナナ, 原園 景, 川西 徹: *医薬品研究*, **37**(7), 438-447 (2006).
- 15) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方, 2006, p. 1652-1655.

#### 別紙

##### ペプチド及びたん白質の質量分析

質量分析 (以下「MS」という) は、適当な手法によりイオン化した分子を質量電荷比 ( $m/z$ ) に応じて分離し、検出する方法である。得られたデータは、イオンの  $m/z$  を x 軸に、それに対するイオンの相対強度を y 軸に示したマススペクトルとして示される。電荷数 ( $z$ ) と  $m/z$  より、分子の質量を求めることができる。タンデム質量分析 (以下「MS/MS」という) は、一つの前駆イオンから分解して生じるプロダクトイオンを  $m/z$  に応じて検出する方法であり、観測されたプロダクトイオンの  $m/z$  により、構造の確認や推定が可能である。MS 及び MS/MS は、ペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験などに用いられる。

質量分析は、イオンの分離を行う原理に、真空中の電界及び磁界を運動する荷電粒子の受ける力  $F$  は、

$$F = q(E + v \times B) = ma$$

$F$ : 力

$q$ : 電荷

$E$ : 電場

$v$ : イオンの運動ベクトル

$B$ : 磁束密度

$\times$ : ベクトルの外積

$m$ : 質量

$a$ : 加速度

であることを利用している。

#### 装置

質量分析計は、イオン源、分析部、検出部及びデータ処理部からなる (図 1)。導入された試料は、イオン源においてイオン化される。ペプチド及びた

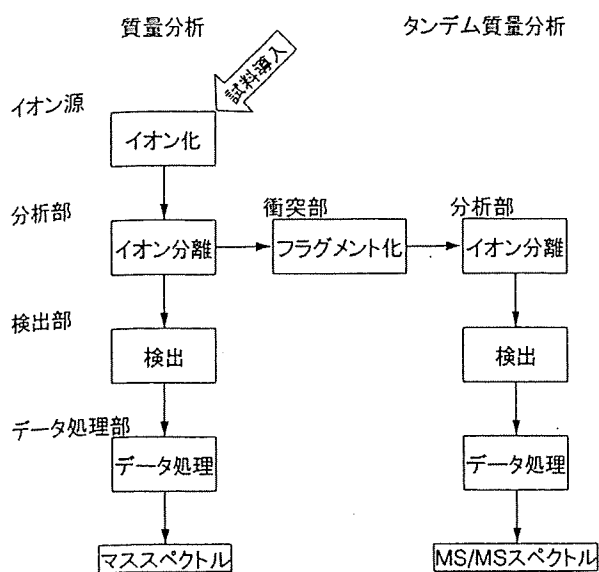


図1 質量分析計

ん白質のイオン化には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI: Matrix-assisted laser desorption ionization) 又はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI: Electrospray ionization) などが用いられる。分析部は、生成されたイオンを  $m/z$  に応じて分離する部位で、四重極型、飛行時間型 (TOF: Time-of-flight) 又はイオントラップ型分析計などが用いられる。MS/MS では、通例、複数の分析部を組み合わせた装置が用いられる。第1分析部で分離されたイオンは、衝突部でフラグメント化され、生じたイオンは次の分析部で  $m/z$  に応じて分離される。イオントラップ型の分析計は単独で MS/MS を行うことができる。通例、フラグメント化には、衝突誘起解離 (CID: Collision-induced dissociation) などが利用される。MALDI TOF MS においては、ポストソース分解 (PSD: Post source decay) を利用することもできる。検出部は、分離されたイオンを信号として検出する部位であり、検出された信号は、データ処理部で処理され、マススペクトル又は MS/MS スペクトルとして出力される。

操作法及び調整法

1. MS

あらかじめ適切な試料を用いて質量測定を行い、感度及び分解能を確認する。必要であれば、イオン源、分析部又は検出部の電圧などを調整する。適切

な質量校正標準物質を用いて質量校正を行う。医薬品各条で規定した物質を用いて質量測定を行い、理論質量と測定質量の差などが医薬品各条に定める基準値に適合していることを確認する。医薬品各条に規定した方法で試料を調製し、質量測定を行う。通例、イオン化方法に応じて以下の方法で操作する。

(1) MALDI MS

脱塩した試料ペプチド/たん白質を適切な溶媒に溶解して試料溶液とする。通例、溶媒にはトリフルオロ酢酸水溶液などを用いる。別に、試料ペプチド/たん白質の構造特性に応じて適切なマトリックスを選び、トリフルオロ酢酸水溶液とアセトニトリルなどの混合液に溶かしてマトリックス溶液とする。通例、ペプチド/たん白質の測定には、 $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (CHCA)、2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) 又は、シナピン酸 (SA) などを用いる。試料溶液とマトリックス溶液を通例 1:1~5 の割合で混合し、サンプルプレートに滴下し乾燥させる。サンプルプレートをイオン源に設置し、適切な強度のレーザーを照射して試料をイオン化させる。イオンを分析部/検出部に導入し、マススペクトルを測定する。

(2) ESI MS

脱塩した試料ペプチド/たん白質を適切な溶媒に溶解して試料溶液とする。通例、溶媒には 0.1~1.0 % 酢酸などを含む水/メタノール又はアセトニトリル混合液を用いる。試料溶液は、シリンジインフュージョン又は HPLC 法などにより ESI チップに導入する。ESI チップに電圧をかけて試料をイオン化し、マススペクトルを測定する。

2. MS/MS

必要に応じて、適切な試料を用いて MS/MS の質量校正を行う。あらかじめ医薬品各条で規定した物質を用いて MS/MS 測定を行い、感度及びフラグメント化が医薬品各条に定める基準値に適合していることを確認する。MS と同様に試料ペプチドを導入してイオン化する。前駆イオンを選択し、適切な MS/MS の条件を設定し、MS/MS スペクトルを測定する。

確認試験

(1) 分子質量の確認

MS により分子質量を確認する。単同位体ピークが確認できる場合には、単同位体質量を用いる。単



同位体ピークが確認できない場合は、ピークの頂点より分子質量を求める。試料たん白質が多数の多価イオンとして観測されている場合には、デコンボリューション処理により分子質量を求める。測定値が規格内であることを確認する。

#### (2) アミノ酸配列などの確認

試料ペプチドの分子質量を確認した後、MS/MSスペクトルを測定する。医薬品各条で規定したフラグメントイオンの有無を確認することにより、アミノ酸配列などを確認する。分子内にジスルフィド結合を含むペプチドを測定する場合は、通例、試料を還元アルキル化した後、MS/MSを行う。還元試薬として通例、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール及びトリス(2-カルボキシエチル)フォスフィンなどが用いられる。また、アルキル化試薬と

して通例、ヨード酢酸、ヨードアセトアミド、4-ビニルピリジンなどがよく用いられる。還元アルキル化の効率は、たん白質ごとに異なり、アルキル化の種類は、ペプチドのイオン化に影響を与える。

#### (3) 分子量の大きなペプチド及びたん白質の確認

分子量が大きく、MS/MSにより有用なフラグメントイオンが観測できない場合、還元アルキル化及び酵素消化などにより断片化し、医薬品各条で規定したペプチド断片を確認することにより、ペプチド/たん白質の確認を行う。また、断片化ペプチドのMS/MSによりアミノ酸配列の確認ができることがある。ペプチド/たん白質の断片化方法は、ペプチドマップ法におけるペプチド結合の選択的切断を参照すること<sup>19)</sup>。



## ヘパリン純度試験に関する研究 (第1報)

<sup>1</sup>H-NMRによるヘパリンナトリウム純度試験に関する研究

橋井 則貴<sup>\*1</sup>, 川崎 ナナ<sup>\*1</sup>, 高倉 大輔<sup>\*1</sup>, 伊藤さつき<sup>\*1</sup>, 川原 信夫<sup>\*2</sup>,  
 正田 卓司<sup>\*3</sup>, 杉本 直樹<sup>\*4</sup>, 齋島 由二<sup>\*5</sup>, 品川 麻衣<sup>\*6</sup>, 榛葉 信久<sup>\*6</sup>,  
 宮田 一義<sup>\*7</sup>, 塚本 秀樹<sup>\*8</sup>, 千秋 和久<sup>\*8</sup>, 長谷川泰介<sup>\*9</sup>, 河合 健蔵<sup>\*10</sup>,  
 余田 光<sup>\*10</sup>, 木下 充弘<sup>\*11</sup>, 掛樋 一晃<sup>\*11</sup>, 合田 幸広<sup>\*2</sup>, 奥田 晴宏<sup>\*3</sup>,  
 棚元 憲一<sup>\*4</sup>, 山口 照英<sup>\*1</sup>

(受付:平成20年8月14日, 受理:平成20年9月22日)

## Studies on the Heparin Purity Test (Part 1)

Study on the Heparin Sodium Purity Test by <sup>1</sup>H-NMR

Noritaka HASHII<sup>\*1</sup>, Nana KAWASAKI<sup>\*1</sup>, Daisuke TAKAKURA<sup>\*1</sup>, Satsuki ITOH<sup>\*1</sup>,  
 Nobuo KAWAHARA<sup>\*2</sup>, Takuji SHODA<sup>\*3</sup>, Naoki SUGIMOTO<sup>\*4</sup>, Yuji HAISHIMA<sup>\*5</sup>,  
 Mai SHINAGAWA<sup>\*6</sup>, Nobuhisa SHIMBA<sup>\*6</sup>, Kazuyoshi MIYATA<sup>\*7</sup>,  
 Hideki TSUKAMOTO<sup>\*8</sup>, Kazuhisa SENSU<sup>\*8</sup>, Taisuke HASEGAWA<sup>\*9</sup>, Kenzo KAWAI<sup>\*10</sup>,  
 Hikaru YODEN<sup>\*10</sup>, Mitsuhiro KINOSHITA<sup>\*11</sup>, Kazuaki KAKEHI<sup>\*11</sup>, Yukihiro GODA<sup>\*2</sup>,  
 Haruhiro OKUDA<sup>\*3</sup>, Kenichi TANAMOTO<sup>\*4</sup> and Teruhide YAMAGUCHI<sup>\*1</sup>

## 緒 言

ヘパリンナトリウムは、健康な食肉獣、主にブタの腸から得られる硫酸化グリコサミノグリカンのナトリウム塩で、ウロン酸 (L-イズロン酸又はD-グルクロン酸) 及びグルコサミン (GlcN) の2糖繰り返し構造に平均2~2.5個の硫酸エステル基が結合した構造からなる (Fig. 1A)。ヘパリンナトリウムは、血液透析その他の体外循環装置使用時の抗凝固剤として世界中で用いられており、日本薬局方をはじめ、米国薬局方や欧州薬局方に収載されている。また、ダルテパリンナトリウム、パルナパリンナトリウム、レビパリンナトリウム、エノキサパリンナトリウムなどの低分子量ヘパリンの原料としても使用されている。

2007年11月以来米国及びドイツにおいて、ヘパリンナトリウムの静脈急速大量投与による血管性浮腫、血圧低下、頻脈、蕁麻疹、及び悪心等を伴う急

性炎症反応の事例が頻発し、2008年4月までに81名の患者の死亡が報告された。米国食品医薬品局 (FDA) は2008年3月に急性炎症反応の原因物質として、ヘパリンナトリウムに混入していた過硫酸化コンドロイチン硫酸 (over-sulfated chondroitin sulfate; OSCS) を特定した<sup>1)</sup>。天然に存在するコンドロイチン硫酸エステルは、グルクロン酸とN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の2糖単位に硫酸エステル基が1~3個結合した多糖類であるが<sup>2)</sup>、混入していたOSCSは、4つの水酸基がすべて硫酸エステル化された非天然型のコンドロイチン硫酸エステルであった (Fig. 1B)<sup>3-5)</sup>。その後、有害事象を引き起こしたヘパリンナトリウムには、OSCS以外に、デルマタン硫酸 (DS; 別名、コンドロイチン硫酸エステルB) (Fig. 1C)、たん白質及び低分子量物質等も、従来の製品より多く含まれていることが明かにされた。

FDAは原因物質としてOSCSを特定したことを

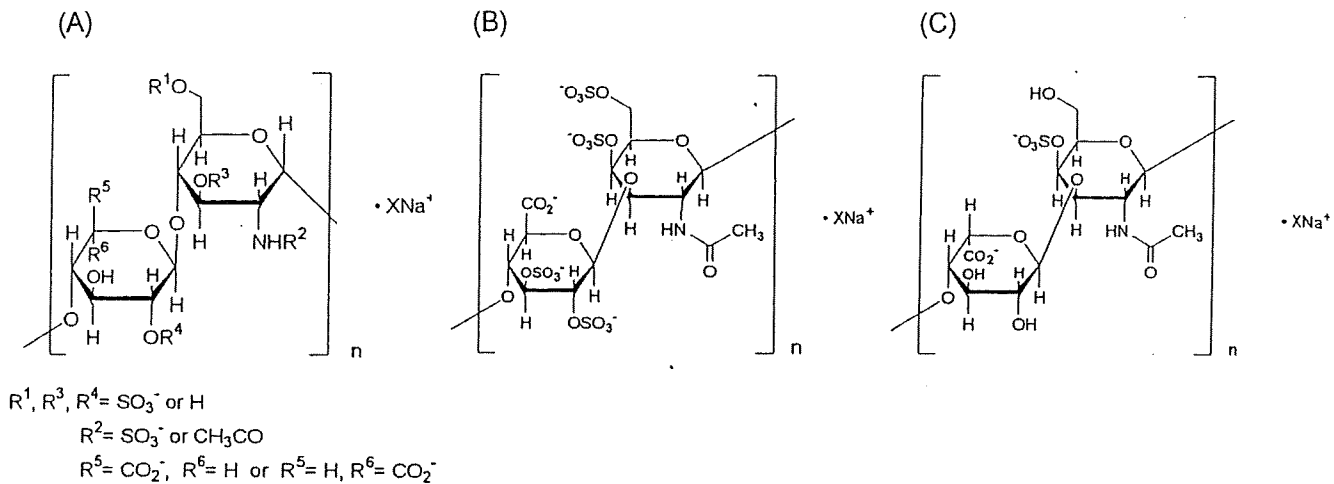


Fig. 1 (A) ヘパリンナトリウム, (B) OSGS及び (C) DS

公表すると前後して<sup>1)</sup>, <sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトル (NMR) とキャピラリー電気泳動法を用いた不純

物検出法をウェブサイト公開した<sup>1)</sup>. <sup>1</sup>H-NMR は、ヘパリンの *N*-アセチルグルコサミン (Glc-

- \*1 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)  
 Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1  
 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
- \*2 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 同上  
 Division of Pharmacognosy, Photochemistry and Narcotics
- \*3 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 同上  
 Division of Organic Chemistry
- \*4 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 同上  
 Division of Food Additives
- \*5 国立医薬品食品衛生研究所療品部 同上  
 Division of Medical Devices
- \*6 味の素(株)ライフサイエンス研究所 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 (〒210-8681)  
 Institute of Life Sciences, Ajinomoto Co., 1-1 Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-  
 8681, Japan
- \*7 (株)大塚製薬工場 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 115 (〒772-8601)  
 Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., 115 Kuguhara, Tateiwa, Muya-cho, Naruto, Tokushima 772-  
 8601, Japan
- \*8 テルモ(株)評価センター 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口 1500 (〒259-0151)  
 Evaluation Center, Terumo Co., 1500, Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa, 259-  
 0151, Japan
- \*9 日本臓器製薬(株)生物活性科学研究所 兵庫県加東市木梨川北山 442-1 (〒673-1461)  
 Institute of Bio-Active Science, Nippon Zoki Pharmaceutical Co., 442-1 Kawakitayama, Kinashi,  
 Kato, Hyogo 673-1461, Japan
- \*10 扶桑薬品工業(株)研究開発センター 大阪市城東区森之宮 2-3-30 (〒536-8523)  
 Research and Development Center, Fuso Pharmaceutical Industries, 2-3-30 Morinomiya, Joto-ku,  
 Osaka 536-8523, Japan
- \*11 近畿大学薬学部 東大阪市小若江 3-4-1 (〒577-8502)  
 School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan
- Corresponding author: Nana Kawasaki, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National  
 Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan  
 E-mail: nana@nihs.go.jp

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)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20 mg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°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±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、ダミーキャンは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。ウイ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

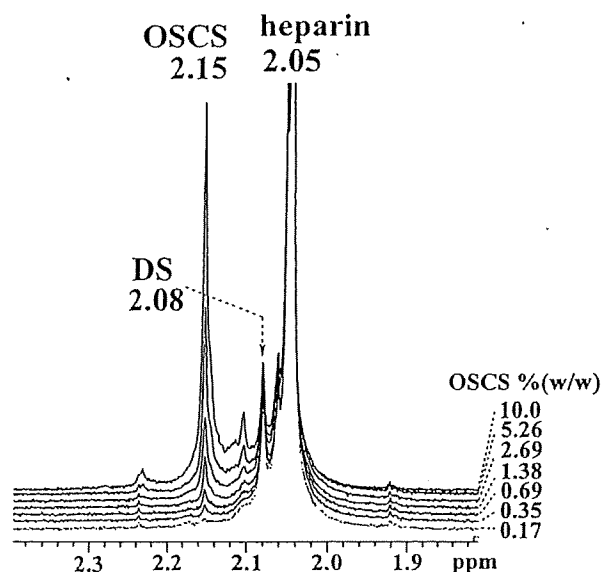


Fig. 2 ヘパリンナトリウム及びOSCSのN-アセチル基のプロトンの化学シフト

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.

て<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( $R^2$ )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

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	0.4-10.0 %

<sup>a</sup>0.4 %OSCS を用いた(n=3).

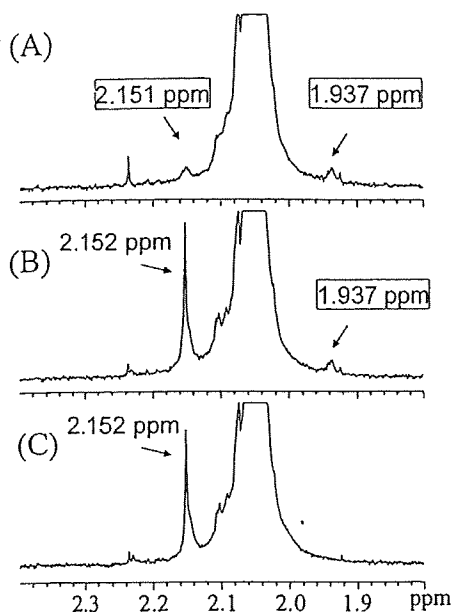


Fig. 3 ヘパリンナトリウム *N*-アセチル基のプロトン由来 <sup>13</sup>C-サテライトピーク (1.937 及び 2.151 ppm), 及び OSCS の *N*-アセチル基のプロトンのシグナル (2.152 ppm)

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).

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 600 MHz 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

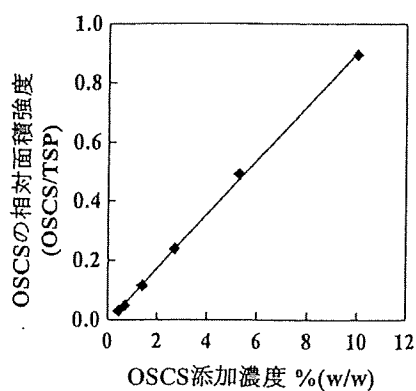


Fig. 4 <sup>1</sup>H-NMRによるOSCSの直線性

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。

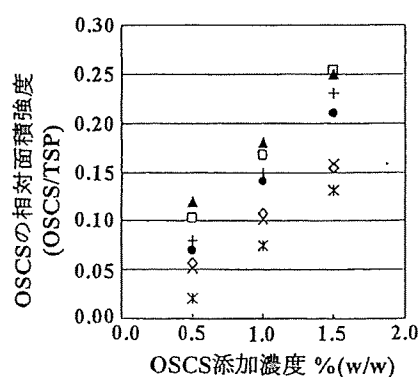


Fig. 5 <sup>1</sup>H-NMRを用いたOSCS限度試験共同検定結果

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

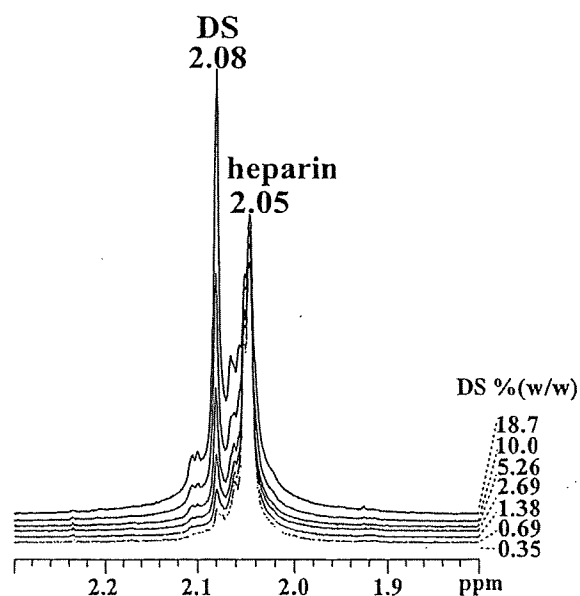


Fig. 6 ヘパリンナトリウム及び DS の *N*-アセチル基のプロトンの化学シフト

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

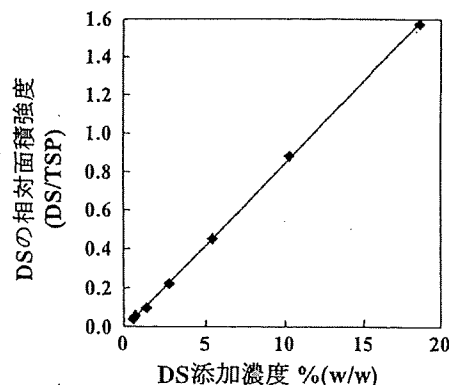


Fig. 7 <sup>1</sup>H-NMR による DS の直線性

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) Fig. 7 参照
範囲	0.6-18.7 %

<sup>a</sup>0.6 %DS を用いた(n=3).

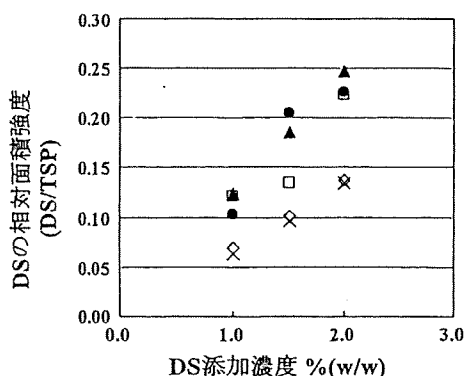


Fig. 8 <sup>1</sup>H-NMRを用いたDS限度試験共同検定結果

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OSCSの *N*-アセチル基のプロトンシグナルと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OSCS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OSCS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鷲田淳専門官、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).

## ヘパリン純度試験に関する研究 (第2報)

<sup>1</sup>H-NMRによるヘパリンカルシウム純度試験に関する研究

橋井 則貴<sup>\*1</sup>, 川崎 ナナ<sup>\*1</sup>, 高倉 大輔<sup>\*1</sup>, 伊藤さつき<sup>\*1</sup>,  
 福原 潔<sup>\*2</sup>, 品川 麻衣<sup>\*3</sup>, 榛葉 信久<sup>\*3</sup>, 有村 雅敏<sup>\*4</sup>,  
 辰巳 昌史<sup>\*4</sup>, 奥田 晴宏<sup>\*2</sup>, 山口 照英<sup>\*1</sup>

(受付:平成20年8月14日, 受理:平成20年9月22日)

## Studies on the Heparin Purity Test (Part 2)

Study on the Heparin Calcium Purity Test by <sup>1</sup>H-NMR

Noritaka HASHII<sup>\*1</sup>, Nana KAWASAKI<sup>\*1</sup>, Daisuke TAKAKURA<sup>\*1</sup>, Satsuki ITOH<sup>\*1</sup>,  
 Kiyoshi FUKUHARA<sup>\*2</sup>, Mai SHINAGAWA<sup>\*3</sup>, Nobuhisa SHIMBA<sup>\*3</sup>,  
 Masatoshi ARIMURA<sup>\*4</sup>, Masashi TATSUMI<sup>\*4</sup>,  
 Haruhiro OKUDA<sup>\*2</sup> and Teruhide YAMAGUCHI<sup>\*1</sup>

## 結 言

ヘパリンカルシウムは、健康なブタの腸から得られるグリコサミノグリカンのカルシウム塩で、ウロン酸 (L-イズロン酸又はD-グルクロン酸) とD-グルコサミンの2糖単位に硫酸エステル基が2~2.5個結合した構造をもつ (Fig. 1A)。抗凝固活性を有し、血液体外循環時における灌流血液の凝固防止 (人工腎臓及び人工心肺等)、汎発性血管内血液凝固症候群の治療、血管カテーテル挿入時の血液凝固の防止、輸血及び血液検査の際の血液凝固の防止、血

栓塞栓症 (静脈血栓症, 心筋梗塞症, 肺塞栓症, 脳塞栓症, 四肢動脈血栓塞栓症, 手術中・術後の血栓塞栓症等) の治療及び予防に適応されている。ヘパリンカルシウムは、米国薬局方及び欧州薬局方に収載されているが、我が国においては日本薬局方外医薬品規格2002 (局外規) 収載品目であり、今後日本薬局方第15改正第二追補への収載が予定されている。

2007年11月以降米国及びドイツにおいて、ヘパリンナトリウムを急速大量投与された患者における急激な血圧低下や急性炎症反応が相次いで報告され

- <sup>\*1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-8501)  
 Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1  
 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
- <sup>\*2</sup> 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 同上  
 Division of Organic Chemistry
- <sup>\*3</sup> 味の素(株)ライフサイエンス研究所 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 (〒210-8681)  
 Institute of Life Sciences, Ajinomoto Co., 1-1 Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-8681, Japan
- <sup>\*4</sup> 沢井製薬(株) 大阪市淀川区宮原5-2-30 (〒532-0003)  
 Sawai Pharmaceutical Co., 5-2-30 Miyahara, Yodogawa-Ku, Osaka 532-0003, Japan
- Corresponding author: Nana Kawasaki, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan  
 E-mail: nana@nihs.go.jp

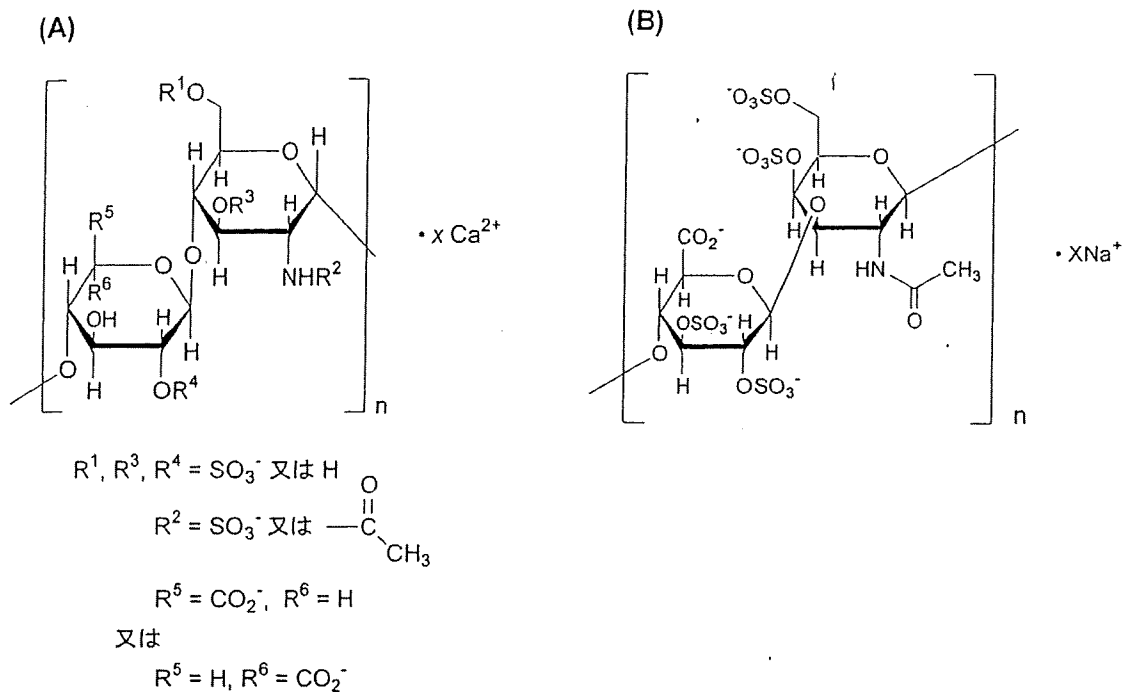


Fig. 1 (A) ヘパリンカルシウム及び (B) OSCS の構造

た。米国食品医薬品庁 (FDA) は、有害事象の原因物質としてヘパリンナトリウムに混入していた過硫酸化コンドロイチン硫酸 (Over-sulfated chondroitin sulfate, OSCS) を特定し (Fig. 1B)<sup>1,2)</sup>, <sup>1</sup>H-NMR 及びキャピラリー電気泳動を用いたヘパリンナトリウム中の OSCS スクリーニング法を公開した<sup>3)</sup>。各国の規制当局及びヘパリン製造メーカーは、直ちに FDA の方法を用いたヘパリンナトリウムの分析を実施し、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おける OSCS の限度試験の設定を検討することとなった<sup>4,5)</sup>。同時に各国では、ヘパリンカルシウムや低分子量ヘパリンナトリウム等についても OSCS の限度試験の設定の必要性が検討された<sup>6,7)</sup>。

本研究は、我が国におけるヘパリンカルシウムの品質・安全性確保を目的として、<sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトル (<sup>1</sup>H-NMR) を用いたヘパリンカルシウム中の OSCS 分析法を開発するとともに、局外規各条ヘパリンカルシウム純度試験としての適用可能性を検証したものである。

### 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カラムを接続した HPLC で精製したものをを用いた<sup>8)</sup>。ヘパリンカルシウムは味の素(株)及び沢井製薬(株)から供与されたヘパリンカルシウムを使用した。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

ヘパリンカルシウム原薬 20 mg 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°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 ±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、ダミーキャンは 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 比が 200 以上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。