

報 文

注射用デキストランのサイズ排除クロマトグラフィー
による分子量測定と分子量標準品に関する検討四方田千佳子^{®*}, 岡田 敏史^{*}

Determination of molecular-weight distribution of dextran for injection by size-exclusion chromatography and study for molecular-weight standards

Chikako YOMOTA and Satoshi OKADA^{*}^{*}National Institute of Health Sciences, Osaka Branch, 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540

(Received 22 July 1997, Accepted 20 October 1997)

It is well known that dextran for clinical use should have narrow molecular-weight (M_w) distributions, because any material with a M_w that is too small is rapidly lost from circulation, and is therefore therapeutically ineffective; also, any material with a M_w that is too high can interfere with the normal coagulation process of the blood. Therefore, accurate and rapid methods are necessary for measuring the M_w the distribution of dextran. In this study, the molecular weight of dextran for injection and dextran preparations were estimated by a method adopted in the European Pharmacopoeia (EP) using the polydisperse standard of dextran and also by the usual method using the pullulan standards. From the results, it has been clarified that pullulan is a useful standard for the injection of dextran, such as dextran 70 and dextran 40. It was also found that the molecular weights of almost all clinical dextran in Japan seem to be smaller than the specifications described in EP, whereas their limiting viscosities are in the range of the specifications in the Japanese Pharmacopoeia.

Keywords : dextran for injection; size-exclusion chromatography; pullulan standard; polydisperse dextran standards.

1 緒 言

デキストランはグルコースの主として α -1,6 結合からなるポリマーで、 α -1,3 あるいは α -1,4 結合による分子構造を有している、医薬品分野では代用血しょう剤として、出血及びそれによるショックの治療、手術時における輸血の節減、血栓症の予防及び治療等に使用されているが、その効果は分子量に大きく依存する。じん臓からの排せつは、分子量が 1.5 万以下では素通りに近く、

分子量 3 万以下では比較的速く排せつされるが、分子量 5.5 万以上では全く排せつされないと報告されている¹⁾。又、赤血球の凝集阻害作用は分子量 5.5 万以下では効果があるが、分子量 8 万以上では逆に凝集を促進するという報告も見られる¹⁾。デキストランのように分子量が大きな物質でその生理作用や特性が分子量に大きく依存する場合には、分子量及び分子量評価が重要な問題となる。分子量測定法には、末端基定量や浸透圧など数平均分子量 (M_n) を求めるものと、光散乱や沈降平衡などの重量平均分子量 (M_w) を求めるものがあり、これらは絶対分子量測定法である。そのほかに相対的な

^{*} 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所: 540 大阪府大阪市中央区法円坂 1-1-43

方法として、粘度測定法やサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) がある。粘度測定法では、分子量分布が同程度で、分子量の異なる一連の試料について、光散乱などの絶対的測定法による M_w と、極限粘度の関係を求めておく必要がある。又、SEC では M_w が既知の一連の試料について M_w と溶出容量の関係から、校正曲線を求めておかななくてはならない。分子量測定法は特殊な装置と高度の熟練を要するものが多いが、SEC は HPLC の一種であるための装置、操作の一般性と、クロマトグラムから容易に分子量分布に関する情報を得ることができるという利点から、最も採用されやすい方法と言える。しかし、一方では、相対的測定法であるために分子量標準品が必要という大きな問題点も抱えている。

現在の各薬局方におけるデキストランの分子量評価法をまとめてみると、従来デキストランのモノグラフが収載されていた英国薬局方 (BP), 日本薬局方 (JP) では極限粘度で分子量規格を設定しており、JP は現在も粘度規格を採用している。最近デキストランの分子量測定に関して、1991 年にアメリカ薬局方 (USP) フォーラムで、1992 年に Pharmeducopa で SEC の導入が相次いで提案され、その後、BP では 1996 年の Addendum で Appendix C. SEC の中にデキストランの分子量分布という項目が入れられ²⁾、ヨーロッパ薬局方 (EP) では 1997 年に 2.2.39. デキストランの分子量分布、という独立した項が設けられた³⁾。USP では 1995 年のフォーラムで再提案の状態となっている⁴⁾。SEC は以前より EP や BP には一般試験法として収載されていたが、デキストランは薬局方における初めての SEC 適用例である。ここで、デキストランに採用された、あるいは提案中の分子量測定法は、通常の SEC とは若干異なり、用いられるデキストラン分子量標準品が広い分子量分布を有しているために、校正曲線を求める際に 5 種類のデキストラン標準品に対し SEC により計算される分子量が、光散乱による分子量の $\pm 5\%$ 以内の差で計算できるように最適化を行っている⁵⁾⁶⁾。そのために、この方法では標準品のほかに、通常の SEC ソフトには含まれない特殊な計算ソフトが必要となるという問題がある。

他方、河原らは、プルランの粘度式 $[\eta] = KM_w^a$ は分子量 20 万以下の範囲ではデキストランの粘度式とよく一致することを報告している⁷⁾。SEC における分離モードは分子量ではなく分子サイズであるため、分子量と粘度の関係が目的の高分子と類似しているものは標準品として使用できる可能性がある。

そこで、EP 法及びプルランを標準品とした従来の SEC 法により我が国のデキストラン製剤の分子量評価

を試みて得られた分子量値を比較するとともに、JP による極限粘度の測定結果とも比較検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

デキストランとして JP 注射用デキストラン 40 及び注射用デキストラン 70, 市販デキストラン製剤としてデキストラン 40 注射液, ブドウ糖含有デキストラン 40 注射液, デキストラン 70 注射液, ブドウ糖含有デキストラン 70 注射液を用いた。EP 法における分子量標準品として、ファルマシア製校正用デキストラン標準品のデキストラン 4, 10, 40, 70 及び 250, ファルマシア製デキストラン T2000, ブドウ糖を用いた。通常の SEC 法における分子量標準品として、昭和電工製プルラン標準品 P-82 を用いた。

2.2 SEC 装置及び操作

SEC 装置として、ポンプ Tosoh CCPD, 検出器 Tosoh RI-8012 示差屈折計, カラムオープン Tosoh CO-8010, 水系 SEC 用カラムとして TSKgel 6000 PWxl+TSKgel 3000 PWxl (7.5 mm i.d. $\times$ 30 cm) を用い、Tosoh システムコントローラー SC-8020 及び GPC データ処理用プログラムによりデータ解析を行った。なお EP 法の近似計算では、東ソーにより供与されたソフトを用いた。現在は GPC データ処理用プログラムに近似方法の一つ USP として取り入れられている。

デキストラン製剤の試料及びプルラン標準品を 2 mg/ml となるように水で溶解あるいは希釈し、試料溶液及び標準溶液を調製した。これらの液 100 μ l につき SEC による分子量測定を行った。デキストラン標準品は、EP 法に従ってデキストラン 4 及び 10 は 15 mg を、デキストラン 40, 70, 250 はそれぞれ 10 mg を移動相 1 ml に溶解させ標準溶液とした。マーカー溶液としてブドウ糖 5 mg を、デキストラン T 2000 の 2 mg をそれぞれ移動相 1 ml に溶解した。SEC 操作条件は、溶離液として 0.05 M 硫酸ナトリウム溶液を用い、流量 0.8 ml/min, カラム温度 40°C とした。

2.3 極限粘度測定

デキストラン製剤を生理食塩液を加えて溶解又は希釈し、オストワルド希釈型粘度型を用いて、JP 一般試験法の粘度測定法に従って測定した。デキストラン注射液のうち、ブドウ糖含有製剤ではあらかじめエタノール沈殿によりブドウ糖を除去後、デキストランのみの粘度を測定した。

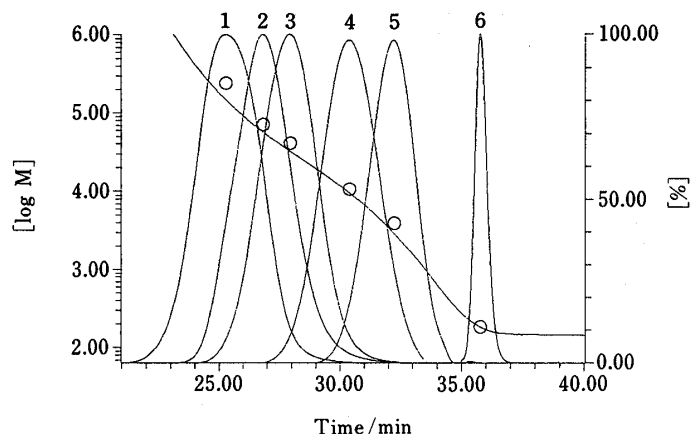


Fig. 1 Elution pattern of dextran standards and calibration curve calculated following the EP method

Peaks: 1, dextran 250 (M_w , 238.2×10^3); 2, dextran 70 (M_w , 70.3×10^3); 3, dextran 40 (M_w , 40.9×10^3); 4, dextran 10 (M_w , 10.5×10^3); 5, dextran 4 (M_w , 3.8×10^3); 6, glucose

3 結果及び考察

3.1 EP 法による SEC 校正

光散乱による M_w が既知のデキストラン標準品 5 種類を SEC により分析し, カラムの排除限界 V_0 をデキストラン T2000 のピークの立ち上がり位置から, カラムの全溶出容量 V_t をブドウ糖のピークトップから求め, デキストランの各溶出量 V_i における分配係数 K_i を V_0 と V_i により $K_i = (V_i - V_0) / (V_t - V_0)$ のように定義する. ある溶出位置 V_i における分子量 M_i は次式で与えられる.

$$M_i = b_5 + \exp(b_4 + b_1 K_i + b_2 K_i^2 + b_3 K_i^3)$$

これより, あるピークの重量平均分子量 M_w は y_i をピーク高さとするとき次式より与えられる.

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^a (y_i M_i)}{\sum_{i=1}^a y_i}$$

デキストラン標準品の SEC による M_w が光散乱による M_w と 5% 以内の差で計算されるように b_1 – b_5 の最適値を近似して分子量校正曲線を求めた.

EP 法に従って得られたデキストランによる校正曲線及びデキストラン標準品の溶出曲線を Fig. 1 に示した. Fig. 1 中のプロットはそれぞれのピークトップ位置を示しており, 分子量が大きな標準品ほど近似により得られた校正曲線から上側にずれている. なお, 近似により

Table 1 Comparison of molecular weights for dextran calibration standards obtained by light scattering and by SEC following the EP method

Dextran	Molecular weight		Difference, %	M_w/M_n
	Light scattering [†]	SEC		
250	238200	238100	0.04	2.29
70	70300	71000	1.00	1.58
40	40900	40000	2.20	1.44
10	10450	10800	3.34	1.53
4	3850	3700	3.90	1.53
Glucose	180	180	0.00	1.00

[†] Proposed values by Pharmacia Co.

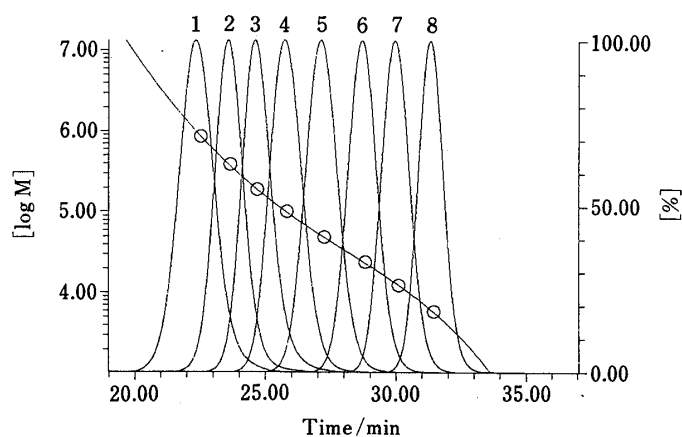


Fig. 2 Elution pattern of pulullan standards and common calibration curve

Peaks: 1, P-800 (M_w , 853×10^3); 2, P-400 (M_w , 380×10^3); 3, P-200 (M_w , 186×10^3); 4, P-100 (M_w , 100×10^3); 5, P-50 (M_w , 48×10^3); 6, P-20 (M_w , 23.7×10^3); 7, P-10 (M_w , 12.2×10^3); 8, P-5 (M_w , 5.8×10^3)

得られた校正曲線はブドウ糖のピーク部分から水平部分が延びているが, 近似ソフトのプロット上の問題で, 実際にはこの部分にはピークは溶出してこないで計算上の意味はない. Fig. 1 を用いて, デキストラン標準品の重量分子量 M_w を求め, ファルマシア社により求められている光散乱法での M_w との差 %, 数平均分子量との比 M_w/M_n 値をあわせて Table 1 にまとめた. 絶対測定法による M_w 値との差は最大 3.9% で, 5% 以下という許容範囲内にあり, 近似が十分行われたことを意味している. 又, デキストラン標準品の分散比 M_w/M_n はデキストラン 250 では 2.29 と他の四つの 1.44–1.58

に比べ大きく、通常の SEC に用いられるプルランの分散比 1.07~1.14 と比べると、デキストラン標準品ではいずれもかなり分布が広い。

3・2 プルランによる較正曲線

同様の系で、プルランを標準とした通常の SEC 法による較正曲線を求めて Fig. 2 に示した。プロットはピークトップ位置を示しており、三次式による近似曲線を描いた。ここで、Fig. 1 と 2 の分子量較正曲線を比較するため、Fig. 3 に重ね書きを示した。分子量 15 万以下の範囲では、二つの曲線はほぼ一致しており、河原らのデキストランとプルランの粘度式が 20 万以下ではほぼ一致するという報告⁷⁾と符合する。デキストランは分岐を有するため、高分子領域では分子量が大きくなるほどには粘度すなわち分子サイズは大きくならないため、分子量が 15 万以上の領域では、デキストランの分子量較正曲線はプルランの場合よりも上側にずれている。分子量 15 万以下のデキストランは分岐がほとんどなく直鎖に近いと考えられる。Fig. 3 中の二つのピークはそれぞれ左から注射用デキストラン 70、注射用デキストラン 40 の典型的な溶出パターンであり、注射用デキストランのピークは分子量のごく大きな部分を除きほぼこの両者の較正曲線が一致する範囲で分子量計算が行われることを示している。そこで、実際に二つの較正曲線を用いて、デキストラン製剤の分子量測定を行った。

3・3 注射用デキストラン及びデキストラン製剤の SEC

Fig. 1, 2 の較正曲線を用いて、注射用デキストラン原体 5 種及び市販デキストラン注射液 7 種の SEC 測定を試みた。Fig. 4 にそれぞれの溶出曲線を示した。(A) は注射用デキストランの場合で、No. 1~No. 4 はデキストラン 70、No. 5 はデキストラン 40 のパターンを示している。デキストラン 70 では、No. 1, No. 2 は No.

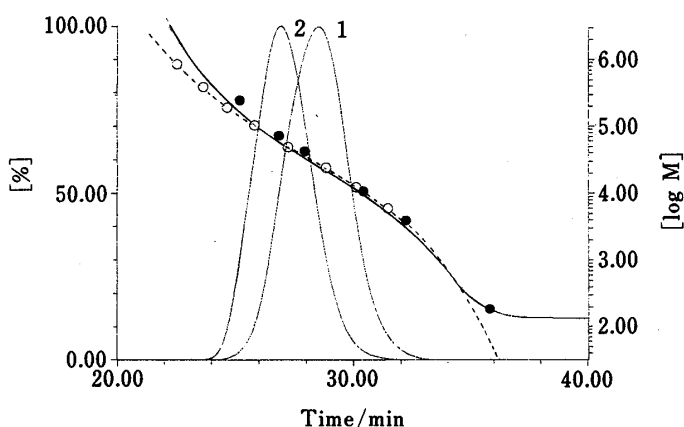


Fig. 3 Comparison of two kinds of calibration curve shown in Fig. 1 and Fig. 2

Dotted line indicates the calibration curve using pulullan standards and solid line is using dextran standards. Two peaks are typical eleution pattern corresponding to dextran 40 for injection (1) and dextran 70 for injection (2)

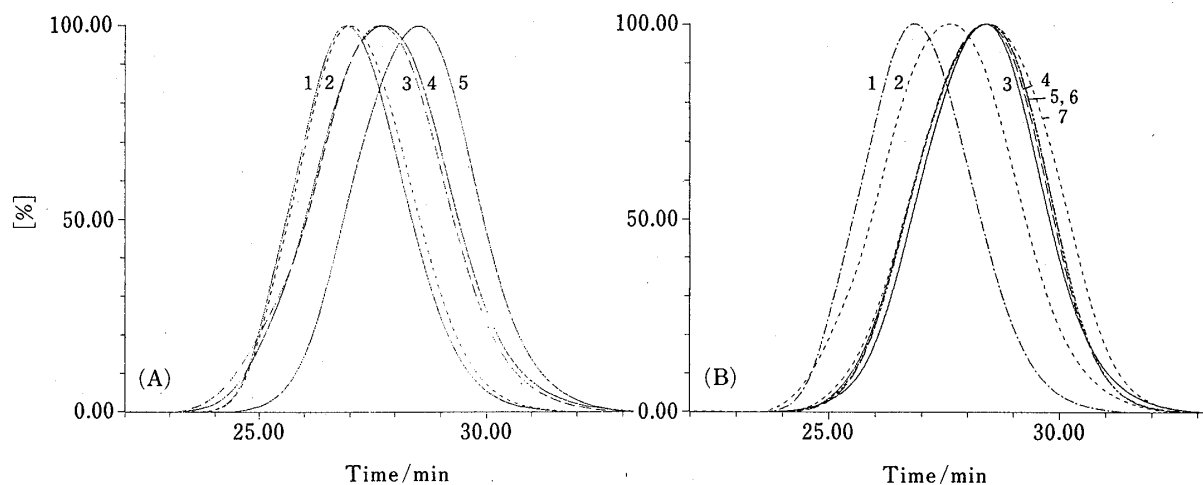


Fig. 4 Elution pattern of dextran for injection (A) and elution patten of dextran injection (B)

Peaks: (A) No. 1~No. 4, dextran 70; No. 5, dextran 40; (B) No. 1~No. 2, dextran 70; No. 3~No. 7, dextran 40

Table 2 Molecular weights of dextran for injection calculated following the EP method using dextran standards and by common calibration curve using pulullan standards ($n=3$)

Sample	Standard	M_w		M_n		M_w/M_n	$HM_w(10\%)$	$LM_w(10\%)$
		Mean	S.D.	Mean	S.D.			
Dextran 70 for injection								
No.1	Dex	63900	230	43000	150	1.49	119400	23700
	Pull	62900	210	45500	150	1.38	111900	25800
No.2	Dex	60700	170	40200	150	1.51	114100	22000
	Pull	60000	170	42700	100	1.41	107300	24000
No.3	Dex	55900	810	29600	350	1.89	108200	15800
	Pull	53700	420	32000	320	1.68	103100	17200
No.4	Dex	49300	700	27200	200	1.81	96600	14600
	Pull	48900	560	29600	200	1.65	93600	15900
Dextran 40 for injection								
No.5	Dex	30500	100	19800	260	1.54	56100	11300
	Pull	32300	0	21800	210	1.48	58600	12100

Table 3 Molecular weights of dextran injection calculated following the EP method using dextran standards and by common calibration curve using pulullan standards ($n=3$)

Sample	Standard	M_w		M_n		M_w/M_n	$HM_w(10\%)$	$LM_w(10\%)$
		Mean	S.D.	Mean	S.D.			
Dextran 70 injection								
No.1	Dex	65000	750	43500	470	1.50	121500	24100
	Pull	63900	720	46000	470	1.39	113600	26200
No.2	Dex	51100	700	30300	250	1.69	100000	16100
	Pull	50500	900	32600	250	1.73	95700	17600
Dextran 40 injection								
No.3	Dex	35300	550	23000	400	1.54	66100	12600
	Pull	36600	400	25000	450	1.46	67400	13800
No.4	Dex	33100	750	20300	300	1.63	63700	10600
	Pull	34300	400	22100	290	1.55	65100	11700
No.5	Dex	33700	700	22400	310	1.51	62800	12300
	Pull	35100	510	24400	310	1.44	64200	13500
No.6	Dex	33600	800	22100	500	1.52	52800	12100
	Pull	35100	610	24100	560	1.46	64500	13300
No.7	Dex	32900	700	21500	210	1.52	60000	12000
	Pull	34500	700	23500	210	1.47	62300	13100

3, No. 4 よりも溶出が速くピーク幅がやや狭い傾向が見られ, 原体により大きな差があった. (B) は市販注射液のパターンを示し, No. 1, No. 2 はデキストラン 70 でかなり分布に差が認められた. No. 3~No. 7 はデキストラン 40 の場合で, No. 3~No. 6 はかなり類似したパターンとなっているが, No. 7 はピークの広がりが大きく, 特に低分子量部分を多く含んでいた. ここで (B) の No. 2, 4, 5 はブドウ糖含有製剤でブドウ糖 5% を含有しているが, SEC パターンではデキストラン部分

のみを示した.

それぞれのデキストランの M_w , M_n , 分散比 M_w/M_n , 高分子量部分 10% の重量平均分子量 HM_w , 低分子量部分 10% の重量平均分子量 LM_w をまとめて Table 2 及び 3 に示した. 標準品にデキストランを用いた EP 法による値を上, 通常のプルランを標準とした分子量を下に示した. 両者の値を比較すると, 全体としてデキストラン 40 ではプルランを標準としたほうがやや大きく, デキストラン 70 ではプルランを標準とした

Table 4 Specifications described in EP or USP forum

	M_w	$HM_w(10\%)$	$LM_w(10\%)$
Dex40	35000~45000(EP)	110000>	> 7000
	35000~45000(USP)	120000>	> 5000
Dex70	64000~76000(EP)	1850000>	>15000
	63000~77000(USP)	1950000>	>13000
Dex60	54000~66000(EP)	1800000>	>14000

ほうがやや小さくなる傾向が見られたが、その差は最大 5% 程度であり両法ではほぼ近い値が得られることが示された。従って、注射用デキストランの分子量は、特殊な EP 法によらなくても、プルランを標準品とすることで通常の SEC で評価可能なことが示唆された。

更に、Table 4 に EP 及び USP フォーラムにおける分子量規格値をまとめて示した。規格値は両者で少しずつ異なっており、特に EP ではデキストラン 60 という中間の製剤が収載されている。Table 2, 3 の EP 法による値を規格値と比較すると、Table 2 ではデキストラン 70 の No. 1 のみはかろうじて規格内に入っているが、他のデキストラン 70 の 3 種とデキストラン 40 では M_w 値は規格を下回っていた。Table 3 ではデキストラン 40 注射剤の No. 3、デキストラン 70 製剤の No. 1 の M_w は規格内に入っているが、その他は規格より小さな M_w 値を有していた。特にデキストラン 70 での規格値からのずれが大きく、Table 2 の No. 2 及び 3 では EP のデキストラン 60 の規格範囲にあり、Table 2 の No. 4 及び Table 3 の No. 2 では、デキストラン 60 に対する規格値よりも更に低い M_w 値であった。

4 注射用デキストランの極限粘度

SEC 測定を行った注射用デキストラン及びデキストラン注射液について、極限粘度を測定し、結果を Fig. 5 及び 6 に示した。JP の極限粘度による規格は、デキストラン 40 では 0.2~0.5 g/100 ml の濃度範囲で極限粘度は 0.16~0.19、デキストラン 70 では 0.24~0.48 g/100 ml の濃度範囲で、極限粘度は 0.24~0.48 となっている。但し、ブドウ糖含有製剤の No. 2, 4, 5 は局方収載品でないため、必ずしも粘度規格は適用されない。測定結果を規格値と比較すると Fig. 6 のデキストラン 70 製剤の No. 2 以外は、すべてこの規格範囲内にあった。ここで、JP における粘度規格に適合しているデキストランの多くが EP, USP における SEC による規格を下回っているのは注目に値する。JP における極限粘度規

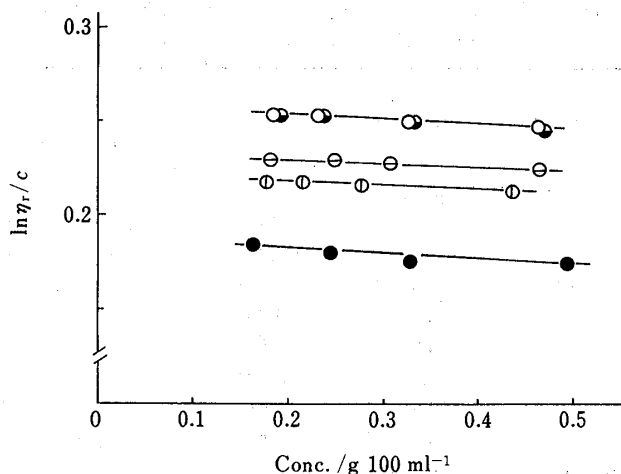


Fig. 5 Logarithmic viscosity number of dextran for injection versus concentration

Dextran70: ○, No. 1; ●, No. 2; ⊙, No. 3; ⊕, No. 4; Dextran40: ●, No. 5

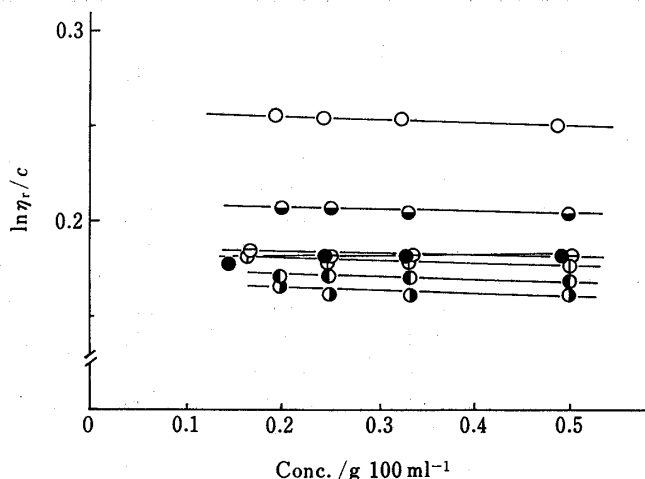


Fig. 6 Logarithmic viscosity number of dextran injection versus concentration

Dextran70: ○, No. 1; ●, No. 2; Drxtran40: ●, No. 3; ●, No. 4; ⊙, No. 5; ⊕, No. 6; ⊕, No. 7

格は、EP, USP による SEC の規格よりも、分子量範囲をより小さな方へ設定している可能性がある。

なお、我が国のデキストラン製剤の分子量値が低い傾向があるという報告は、1978 年に Nilsson らが、世界各国のデキストラン製剤 120 検体について光散乱法による M_w 値を測定した例にも見られる¹⁾。この中で、我が国のデキストラン 40 の M_w 値は、32200, 34700, 29500, 29700, デキストラン 70 では、48400, 44300 という値が報告され、他国に比べて小さめの M_w 値とな

っており、特にデキストラン 70 では各国の 38 検体中で最も小さな値であった。

本報告では、市販プルラン標準品を使用することにより、通常の SEC でも EP 法とほぼ同様にデキストランの分子量評価が可能であることが明らかとなった。分布の広いデキストラン標準品を用いる EP 法では、デキストラン分子量標準品のほかに特殊な計算ソフトが必要であるという問題がある。今後、デキストランに対する SEC 法の採用に当たっては、プルラン標準品を用いる方法もその一般性、簡便性から十分に考慮すべきであると思われる。

又、我が国のデキストラン製剤は分子量が小さめであることが示され、SEC 法の導入に当たっては、規格値の設定を慎重に考慮する必要があると思われる。

最近、エイズ治療薬におけるデキストラン硫酸などの高分子性医薬品の増加に加え、医薬品を結合させたデキストランがアメリカ食品医薬品局 (FDA) により許可されるなど、今後ますます高分子物質の分子量評価が重要になるとと思われる。薬局方などの公定法における分子

量評価では、デキストランのみの特殊な例として一方法を取り上げるのではなく、広く体系的に検討するべき時期が来ていると思われる。

粘度測定に一部御協力いただきました宮崎玉樹氏に深謝します。

(1994 年 10 月, 第 44 回日本薬学会)
(近畿支部大会にて一部発表)

文 献

- 1) K. Nilsson, G. Soderlund: *Acta. Pharm. Suec.*, **15**, 439 (1978).
- 2) European Pharmacopoeia, 3rd Ed., 41~43 (1997).
- 3) British Pharmacopoeia 1993, Addendum 1996, Appendices A499-A501.
- 4) US Pharmacopoeial Forum, 21, 1267~1282 (1995).
- 5) G. Nilsson, K. Nilsson: *J. Chromatogr.*, **137**, 101 (1974).
- 6) R. M. Alop, G. J. Vlachogiannis: *J. Chromatogr.*, **246**, 227 (1982).
- 7) K. Kawahara, K. Ohta: *Carbohydrate Polymer*, **4**, 335 (1984).

要 旨

注射用デキストランのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による分子量評価を試みるとともに、分子量標準品について検討した。最近ヨーロッパ薬局方 (EP) や英国薬局方 (BP) に分子量分布の広いデキストラン標準品を用いる特殊なデータ解析法が収載されたが、中性多糖であるプルラン分子量標準品をデキストランの SEC 用標準品とすることができると推測した。EP 収載法及びプルラン標準品を用いる通常の SEC 測定を行い、両法で得られたデキストランの分子量を比較したところ、その差は最大 5% 程度であり、プルランを標準品とする通常の方法もデキストランの分子量評価に適用できることが明らかとなった。また、我が国の市販デキストラン製剤の分子量測定から、日本薬局方 (JP) の粘度規格に適合するものでも、EP の SEC 規格に適合しないものがあることが示唆され、諸外国の製品に比べかなり分子量が小さいことが示された。