

ヘパリン不純物の NMR 分析法

山口秀幸, 品川麻衣, 榛葉信久,* 宮野 博, 鈴木榮一郎

NMR Analysis of a Contaminant in Heparin

Hideyuki YAMAGUCHI, Mai SHINAGAWA, Nobuhisa SHIMBA,*

Hiroshi MIYANO, and Eiichiro SUZUKI

*Institute of Life Sciences, Ajinomoto Co., 1-1 Suzuki-cho,
Kawasaki-ku, Kawasaki 210-8681, Japan*

(Received June 13, 2008; Accepted July 22, 2008)

Recently, it has been reported that certain lots of heparin are associated with an acute, rapid onset of serious side effects indicative of allergic reaction, and ^1H NMR is one of the convenience but strong analytical methods to identify a contaminant in heparin. However, an NMR signal from the contaminant in some cases is overlapped with a satellite peak from heparin, leading a misunderstanding of the presence of the contaminant. Here, we show the satellite peak observed close to the NMR signal of the contaminant, and recommend the ^{13}C decoupling NMR to discriminate the satellite peak from the contaminant.

Key words—heparin; contaminant; NMR analysis

ヘパリンはグリコサミノグリカン重合によって形成された多糖であり、血液透析時の血液凝固の防止や血栓塞栓症の治療等、種々のケースにて抗凝血剤として使用されている。しかしながら、今年初め、米国にて、ヘパリンを静脈内注射数分後に血管性浮腫や血圧低下、若しくはそれらに関連したアナフィラキシー様症状が現れ、患者が死亡する事例が報告された。これらはヘパリンに混入した不純物が原因とされ、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸が原因物質と考えられている。¹⁾ 日本においても、2008年3月よりヘパリン製剤の一部回収が行われるなど大きな社会問題となっている。

早期に問題の沈静化を図るために、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の検出には NMR 法が提唱された。²⁾ 簡便な方法であり、当面は、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の検出に適していると考えられている。ヘパリンのアセチル基のプロトンシグナルが 2.04 ppm に観測される一方、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸のアセチル基のプロトンシグナルは 2.15 ppm であり、この化学シフト差を使って過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の存在を確認す

ることができる。しかし、天然には ^{13}C が約 1.1% 存在しており、 ^{13}C に結合したプロトンのシグナル (サテライトシグナルと呼ぶ) が ^{13}C - ^1H のカップリング定数に応じて異なる化学シフトに観測される。過硫酸化されたコンドロイチン硫酸が含まれていなくても、ヘパリンのアセチル基由来のサテライトピークが 2.15 ppm 近傍に観測されることがあり、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸とヘパリンのサテライトピークを識別する必要がある。そこで、サテライトピークの存在とその識別方法について報告する。

Figure 1 (a), (b) に代表的なヘパリンのプロトン 1 次元スペクトルを示す。2.04 ppm にヘパリンのアセチル基由来のシグナルが観測されている。一方、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸のアセチル基由来のシグナルが観測される 2.15 ppm 付近にも、わずかながらピークが観測されている。そこで、 ^{13}C をデカップリングして同様にスペクトルを測定してみると、その領域にはシグナルが観測されていない [Fig. 1 (c)]。 ^{13}C をデカップリングしてプロトンの NMR シグナルを観測することによって、 ^{13}C に結合したプロトンのシグナルが ^{12}C に結合したプロトンと同一の化学シフトに観測されるように

味の素㈱ライフサイエンス研究所

*e-mail: nobuhisa_shimba@ajinomoto.com

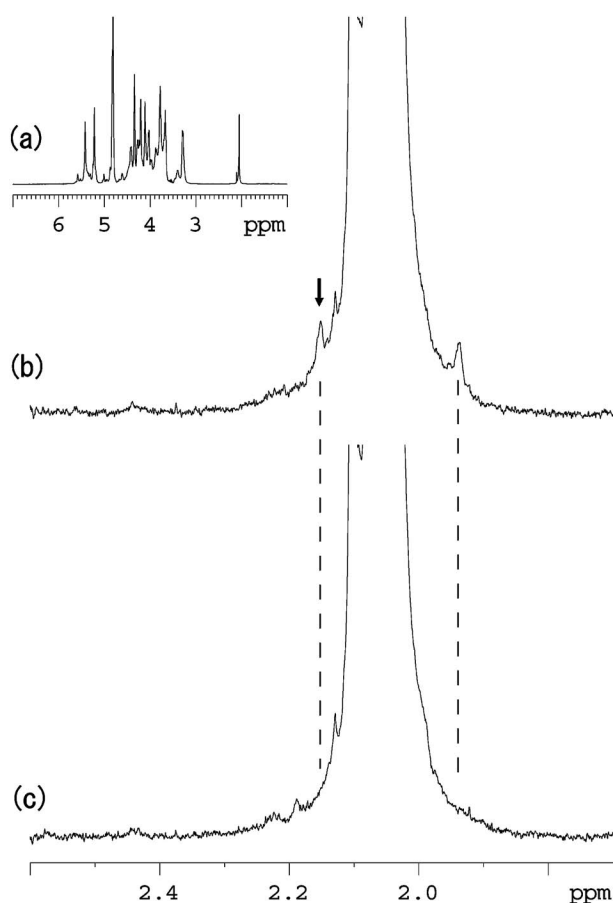


Fig. 1. NMR Spectra of Heparin

NMR spectra of Heparin (a), and the extended region (b) in which the satellite peaks are clearly observed. One of the satellite peaks shown with the arrow, is overlapped with the signal from the contaminant. (c) NMR spectrum with ^{13}C decoupling, in which the satellite peaks are apparently disappeared.

なるため、見掛け上サテライトピークが消去されたスペクトルが得られる。したがって、2.15 ppm 付近にシグナルが観測されていても、これはヘパリンのサテライトピークであり、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の存在を示すものではないと結論できる。

サテライトピークの観測される化学シフトは、 ^1H - ^{13}C カップリング定数に応じて決まる。ヘパリンのアセチル基由来のプロトンの場合、 ^1H - ^{13}C カップリング定数は 130 Hz である。したがって、 ^1H の共鳴周波数 600 MHz の装置にて測定した場合、 $130 \text{ Hz}/600 \text{ MHz}=0.22 \text{ ppm}$ 、すなわち中心から $\pm 0.11 \text{ ppm}$ 分離したサテライトピークが観測される。つまり、ヘパリンのアセチル基由来のプロトンシグナルが 2.04 ppm の場合、 $+0.11 \text{ ppm}$ の位置である 2.15 ppm にサテライトピーク的一方が観測さ

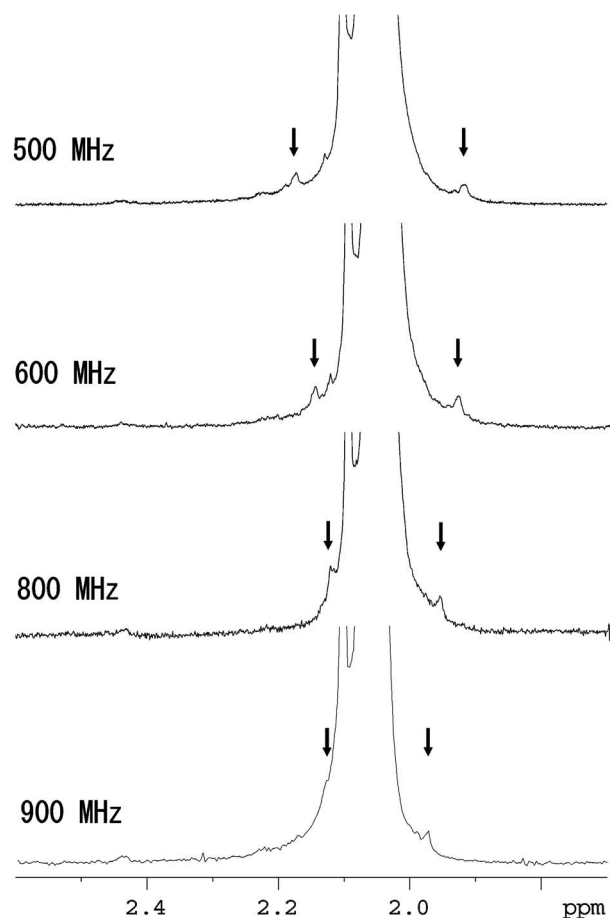


Fig. 2. Magnetic Field Dependence of the Satellite Peaks

NMR spectra of Heparin measured with 900 MHz, 800 MHz, 600 MHz and 500 MHz NMR spectrometers. Chemical shifts of the satellite peaks depend on the magnetic fields.

れることになる。これが過硫酸化されたコンドロイチン硫酸のシグナルと重なるために、サテライトピークであることを証明することは、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の存否を論じる上で重要なポイントとなる。

ただし、 ^1H の共鳴周波数の異なる NMR 装置にて測定すると、サテライトピークと過硫酸化されたコンドロイチン硫酸由来のピークの化学シフトは、かならずしも重ならない。例えば、 ^1H の共鳴周波数 900 MHz の装置では、 $130 \text{ Hz}/900 \text{ MHz}=0.14 \text{ ppm}$ 、すなわち中心から $\pm 0.07 \text{ ppm}$ となり、ヘパリンのアセチル基由来のプロトンシグナルが 2.04 ppm の場合、2.11 ppm にサテライトピーク的一方が観測されることになる。同様に、800 MHz, 700 MHz, 500 MHz の装置では、それぞれ 2.12 ppm, 2.13 ppm, 2.17 ppm となる (Fig. 2)。米国の Food and Drug Administration より、2.13–2.17 ppm の領

域に観測されるシグナルが過硫酸化されたコンドロイチン硫酸である恐れがあると報告されている。¹⁻³⁾したがって、¹H の共鳴周波数 500 MHz から 700 MHz の装置にて分析した場合、特にサテライトピークとの識別が重要となる。若しくは、このようなサテライトピークの特徴を利用して、複数の磁場にて測定することによって、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸とサテライトピークの区別も可能である。

アセチル基のようにメチル基を有する場合、プロトンのシグナル強度が大きくなり、ヘパリンのように分子量が大きくても化学シフトの識別が容易となる。そのため、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の存在を確認する上で好ましい指標と言える。一方で、メチル基のシグナル強度が大きいゆえに、サテライトピークも観測される。いまだに副作用の機構の全容が解明されたとは言えない状況ではある。しかし、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸は、その原因とされ、ヘパリンに含まれないことを絶えず確認していく必要がある。その目的で、ヘパリンを分析する際に、ヘパリンのサテライトピークと識別することをかならず考慮するべきであり、その1つの方法として¹³C をデカップリングしてプロトンの NMR シグナルを観測することを推奨する。

謝辞 サテライトピークの磁場依存性の実験には、横浜市立大学先端研究施設共用イノベーション創出事業を通じて様々な磁場の NMR 装置を使用させて頂きました。横浜市立大学西村善文教授始め関係者・関係各所に、この場を借りて御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Kishimoto T. K., Viswanathan K., Ganguly T., Elankumaran S., Smith S., Pelzer K., Lansing J. C., Sriranganathan N., Zhao G., Galcheva-Gargova Z., Al-Hakim A., Bailey G. S., Fraser B., Roy S., Rogers-Cotrone T., Buhse L., Whary M., Fox J., Nasr M., Pan G. J. D., Shriver Z., Langer R. S., Venkataraman G., Austen K. F., Woodcock J., Sasisekharan R., *N. Engl. J. Med.*, **358**, 2457–2467 (2008).
- 2) Guerrini M., Beccati D., Shriver Z., Naggi A., Viswanathan K., Bisio A., Capila I., Lansing J. C., Guglieri S., Fraser B., Al-Hakim A., Gunay N. S., Zhang Z., Robinson L., Buhse L., Nasr M., Woodcock J., Langer R., Venkataraman G., Linhardt R. J., Casu B., Torri G., Sasisekharan R., *Nat. Biotechnol.*, **26**, 669–675 (2008).
- 3) 〈<http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>〉