高速液体クロマトグラフィーによるアプロチニン製剤の品質比較

松本直人, 大島和夫, 黒澤嘉幸
防衛医科大学校病院薬剤部*

Quality Testing for Aprotinin Preparation by High-Performance Liquid Chromatography

NAOTO MATSUMOTO, KAZUO OHSIMA, YOSHIYUKI KUROSAWA

Department of Pharmacy, National Defense Medical College Hospital*

(Received May 20, 1987)

The analytical method for aprotinin preparation has been established using reversed phase high performance liquid chromatography, and the characteristics of the four contaminating unknown compounds in this preparation were studied. Aprotinin and the four contaminants were separated by using C18 column (CHEMCOSORB 5-ODS-H) and 13% acetonitrile containing 0.1 M potassium dihydrogenphosphate adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid as a mobile phase, or by using a C4 column (CHEMCOSORB 300-7C4) and 10% acetonitrile solution containing the same phosphate buffer as the mobile phase.

Five commercially available aprotinin injection forms were found to be composed of aprotinin and identical ratios of the four contaminants. In addition, the four contaminants had weaker inhibitory activity than aprotinin. These four contaminants were considered to be originated from aprotinin as their amino acid compositions of these contaminants were the same as that of aprotinin. Therefore, the production of these four contaminants may occur through an irreversible or extremely biased equilibrium process.

Keywords—aprotinin; commercial aprotinin injection; contaminant; peptide; pharmaceutical test; proteolytic enzyme inhibitor; reversed phase high-performance liquid chromatography

緒 言

蛋白分解酵素阻害作用を有するアプロチニンは、16種のアミノ酸総計58個が鎖状に結合した分子量6,512のポリペプチドで、臨床上、注射剤として急性肺炎、ショック等の治療に用いられている。

アプロチニンは、健康な牛肺臓から抽出、精製されるが、その精製技術により品質に差異が生じたり、不純物の混入も考えられる。高杉ら¹⁾は、その注射剤としての薬剤学的評価を行い、製造メーカーにより品質に差異が生じたと指摘している。

今回著者らは、アプロチニンの逆相HPLCのイソクラティック溶出法による分析法の確立を試み、市販注射中に

含まれるアプロチニン様未知物質についてクロマトグラフィー的検討を行った。

実 験 の 部

1. 試薬及び試料

アセトニトリルはHPLC用(関東化学)、その他はすべて特級試薬を用いた。アプロチニン注射剤は、50,000単位の5社製品を用い、製造番号は、A社(Lot No. Y 322)、B社(Lot No. R020)、C社(Lot No. 4B179)、D社(Lot No. 4Y8140)、E社(Lot No. 234050)のものをを用いた。

2. 装 置

HPLC装置は、ALC/GPC 206型(6,000Aポンプ、U6 Kインジェクター、441ディテクター、730データモジュール、660グラジェントプログラマー)(ウォーターズ社)を用いた。カラムは、ケムコスorb 5-ODS-H(4.6

* 埼玉県所沢市並木 3-2; 3-2, Namiki, Tokorozawa-shi, Saitama, 359 Japan

Chart 1. Assay of Aprotinin and Unknown Fractions
BAPA (N α -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide)

I.D. $\times$ 150 mm) とケムコソルブ 300-7C4 (4.6 I.D. $\times$ 150mm) (ケムコ社) を用いた。アミノ酸分析装置は、日立 835 型を用い、発色はニンヒドリンで行った。加水分解は 6 N 塩酸で封管中 24 時間行った。

3. 阻害活性の測定

阻害活性の測定は、Kassel ら²⁾ の方法に準じて行った (Chart 1)。

4. 蛋白定量

Lowry-Folin 法³⁾ により行い、検量線は Bovine Serum Albumin を用いた。

5. アプロチニンおよび不純物の分取

アプロチニン 3,000 単位を、ケムコソルブ 300-7C4 カラムに注入し、各分画を分取した。脱塩はケムコソルブ 5-ODS-H カラムを用い、0.1% トリフルオロ酢酸-アセトニトリルのグラジェント溶出法 (アセトニトリル 0 $\rightarrow$ 20%, 5 分間, リニアグラジェント, 試料注入量 6ml) で行い、溶出液を遠心エバポレーターで濃縮し、トリフルオロ酢酸を除去した。

結果及び考察

1. HPLC 条件の検討

シリカゲル基体の逆相系カラムを用いて蛋白質、ペプチドを分析するとき、シリカゲル表面のシラノール基による吸着、ピークのテーリング現象が問題³⁾ となる。これらを低減するには移動相に塩、高級アミン、対イオ

ン⁴⁾ の添加で解決できる。そこで、アプロチニンの逆相 HPLC による分析法を確立するにあたり、その条件を考慮し、カラムにオクタデシルシラン (C18) とブチルシラン (C4) 充填カラムを用い、移動相条件を種々検討した。

塩基性の高い蛋白質やペプチドの分析では、移動相の pH を酸性側に設定することが望ましい⁵⁾ ことから、移動相には 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.0), 0.1 M トリエチルアミン-リン酸 (pH 3.0), 0.1% トリフルオロ酢酸等を含む 3 種のアセトニトリル水溶液のイソクラティック溶出法で検討したところ、いずれのカラムでも、0.1 M リン酸緩衝液を含むアセトニトリル水溶液が、最もピークのテーリングが少なく、各成分の分離も良好であった。その溶出パターンは、Gazdag ら⁶⁾ の結果と同様で、アプロチニンの溶出位置より早い時間に 4 つの未知成分が溶出した (Fig. 1)。

一般に、逆相 HPLC のイソクラティック溶出法で蛋白質やペプチドを分析する場合、移動相中の有機溶媒量のわずかな違いが、保持能へ大きく影響する⁵⁻⁶⁾ ことは知られている。そこで、本実験も C18 と C4 カラムにおいて、アプロチニンの保持能に及ぼす影響について検討したところ、いずれのカラムにおいてもアセトニトリル量と保持能の対数は直線性を示したが、その傾きは、C18 カラムで -0.414, C4 カラムで -0.200 であり、C18 カラムが大きく影響を受けることがわかった (Fig. 2)。

カラムからの回収率は、アプロチニン 1,000 単位注入時、C18 カラムで 93.5%, C4 カラムで 95.8% で、ともに高回収率を示した。

Fig. 1 において、2 つのクロマトグラムを比較すると、C18 カラムが理論段数において優れているが、その反面、保持能がアセトニトリル量に大きく影響を受けること、分取するために大量注入した場合ピークのテーリングがみられることから、以後の実験は C4 カラムを用いて行った。

定量は、UV 214nm のピーク面積値の絶対検量線法で行った。Table 1 に、アプロチニン 100 単位注入時の再現性について示したが、アプロチニンと 4 つの未知物質の再現性は、C.V. 値 1.18—2.93% と良好であった。検量線は、10—1,000 単位の間で良好な直線性を示した (Table 2)。

2. 市販アプロチニン注射剤の分析

Fig. 3 に市販アプロチニン注射剤 5 製品の 100 単位注入時のクロマトグラムを示した。E 社は、先端に添加剤のベンジルアルコールが溶出する以外、各製品とも Gazdag ら⁶⁾ の溶出パターンと同様で、アプロチニンの

Fig. 1. Chromatograms of Aprotinin Preparation (Injection) in C18 Column (a) and C4 Column (b)

HPLC condition: column, (a): CHEMCOSORB 5-ODS-H (4.6 I.D. $\times$ 150mm), (b): CHEMCOSORB 300-7C4 (4.6 I.D. $\times$ 150mm); mobile phase, 13% acetonitrile-water + 0.1M potassium dihydrogenphosphate, pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid (C18 column), 10% acetonitrile-water + 0.1M potassium dihydrogenphosphate, pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid (C4 column); column temperature, ambient; flow rate, 1.0ml/min; detection, UV 214nm, 0.2 aufs; sample size, 100 units as aprotinin

Fig. 2. Effect of Acetonitrile Concentration on Capacity Factor (K') of Aprotinin

—●—: C4 column, —▲—: C18 column
HPLC condition were the same as described in Fig. 1 in the presence of 0.1M potassium dihydrogenphosphate

大きなピークが溶出する以前に4つの小さなピークが溶出し、その保持時間は各製品とも一致した。また、C18カラムにおいても4つの小さなピークの保持時間が各製

Table 1. Reproducibility Analysis of Aprotinin and Unknown Compound

Injection No.	Peak Area Ratio				
	Fraction No.				
	1	2	3	4	5 (aprotinin)
1	1754	2436	2088	1926	31556
2	1716	2555	1985	2029	31258
3	1749	2516	1963	1931	30967
4	1715	2463	2025	1918	30165
5	1755	2451	2022	2031	29670
$\bar{x}$	1738	2484	2017	1967	30723
C.V.(%)	1.18	2.00	2.36	2.93	2.55

HPLC condition were the same as described in Fig. 1 using CHEMCOSORB 300-7C4

品間で一致することから、アプロチニン以外の4つピークは各製品間とも同じ成分と考えられた。以後、この分析条件で溶出してくるピークを溶出順序ごとに1～5の番号で示す。

Table 3に、ベンジルアルコールを除き、溶出してくるピークの全面積を100%としたときの各分画の面積百分率を示したが、いずれの製品もアプロチニン含量比率には大きな違いはなく70%前後で、4つの分画含量にも

Table 2. Calibration Curves for Aprotinin and Unknown Compound

	Fraction No.				
	1	2	3	4	5 (aprotinin)
Slope	17.0	24.4	19.8	19.7	323
Intercept	5	22	-65	-38	-1498
r	0.995	0.998	0.999	0.997	0.999

Aprotinin injection 10-1000 units

Fig. 3. Chromatograms of Five Commercial Aprotinin Injection

HPLC condition were the same as described in Fig. 1
in the presense of CHEMCOSORB 300-7C4

Table 3. Composition of Aprotinin and Unknown Fractions in the Five Commercial Injections

Fraction No. Com.	1	2	3	4	5	Total %
A	4.0	5.4	5.3	5.9	77.7	98.3
B	3.6	4.5	4.1	7.0	77.9	97.1
C	5.1	6.5	6.2	6.3	70.6	94.7
D	4.8	7.6	4.5	6.2	67.7	90.8
E	5.5	6.9	4.4	4.8	75.8	97.4

Each value represents the mean for three separate experiment.

Except for benzylalcohol peak in E commercial preparation.

大きな違いはなかった。

3. 各分画の比較

アプロチニン以外の4つの分画が、まったくの異種化

合物であるならば、その製剤の抽出、精製方法に改良が必要と考えられる。そこで5つの分画を分取し、阻害活性の有無、構成アミノ酸について検討した。なお、分画1から4は各製品間においても同一成分と考えられたため、今回はA社の製品の分画1から5について行った。

Table 4に、各分画の阻害活性について示した。蛋白量 20 μ g/ml に揃えた各分画の阻害率は、アプロチニン分画が67.6%と大きく、1から4の分画はアプロチニンよりやや小さいが、いずれも阻害活性を有することが認められた。

ゲルろ過法では各分画の分離はできない²⁾ こと、Lowry-Folin法で定量できること、阻害活性を有することから、1から4の分画はアプロチニンと分子量が近い類似のポリペプチドと推測できる。次に、各分画のアミノ酸組成を比較した。Table 5に各分画のアミノ酸組成について示した。分画1から4までのアミノ酸組成は、アプロチニンと同じであり、文献値²⁾ と一致したことが

Table 4. Activity of Aprotinin and Unknown Fractions

Fraction No.	Inhibitory Activity (%)
1	57.6
2	57.7
3	62.7
4	60.8
5 (Aprotinin)	67.6

Each value represents the mean for six separate experiment

ら、異種ポリペプチドであることは否定された。

アプロチニンは、中性状態において二量体を形成⁹⁾することから、1から4の分画は、結合部位がわずかに異なる二量体と考えられる。すなわち、二量体であるならば、平行状態を保つため、単一成分で保存した場合各分画はアプロチニンに移行し、Fig. 1の分析条件において、アプロチニンのピークを与えられと考えられる。Fig. 4に、A社の製品について各分画を分取、脱塩、濃縮し、蛋白量50 μ g/mlの濃度で2週間遮光下で保存後のクロマトグラムを示した。その結果、分画1と2は2週間後においてもそれぞれ単一のピークを与え、分画3と4はいずれも分画1と2のピークを与えたが、分画1から4のいずれもアプロチニンのピークは与えなかった。一方、アプロチニン分画は1から4のピークのすべてを与えた。

Table 5. Amino Acid Composition of Aprotinin and Unknown Fractions

Amino acid	Residues per molecule					Ref.
	1	2	3	4	5	
Alanine	6.0	6.3	5.4	5.5	6.3	6
Arginine	5.6	5.6	5.9	5.7	5.5	6
Aspartic acid	4.6	4.6	4.8	4.3	4.6	5
Half-cystine	5.4	5.5	5.8	5.9	5.7	6
Glutamic acid	3.3	3.2	3.3	3.4	3.2	3
Glycine	5.8	5.9	5.1	6.1	5.8	6
Histidine	0	0	0	0	0	0
Isoleucine	1.4	1.0	1.5	1.4	1.3	2
Leucine	2.1	2.1	2.1	2.1	2.0	2
Lysine	3.9	3.9	4.0	4.1	3.9	4
Methionine	0.8	0.9	1.0	1.0	1.0	1
Phenylalanine	4.0	3.9	4.1	4.0	3.9	4
Proline	5.1	4.7	5.5	5.0	5.1	4
Serine	1.1	1.1	1.1	1.1	1.0	1
Threonine	3.0	3.1	3.1	3.2	3.0	3
Tryptophane	0	0	0	0	0	0
Tyrosine	3.9	3.8	3.9	4.0	3.9	4
Valine	1.0	0.9	1.1	1.0	1.0	1

これらのことは、分画1から4は二量体であることは否定されたが、アプロチニン由来の成分であることが考えられた。また、その生成過程は、アプロチニンから不可逆的もしくは平衡が極端にずれておけると考えられた。

Fig. 4. Chromatograms of Aprotinin and Unknown Fractions after Two Weeks Preservation

文 献

- 1) 高杉益充, 梅田貴文, 服部曉昌, 京谷庄二郎, 庄野文章, 水口和生, 宮田一好: 病院薬学, **8**, 129 (1982).
- 2) B. Kassel: Meth. Enzym., **19**, 844 (1970).
- 3) Lowry, O.H., Roserbrough, N.J., Farr, A. L., and Randall, R.J.: J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- 4) 笹川 立, 千谷晃一: 蛋白質核酸酵素, **127**, 1056 (1982).
- 5) 中沢宏, 長瀬正之: 薬学雑誌, **106**, 398(1986).
- 6) M. Gazdag, G. Szepesi: J. Chromatogr., **218**, 603 (1981).
- 7) A. Nakum, C. Horvath: J. Chromatogr., **203**, 53 (1981).
- 8) バイエル薬品(株)社内資料: HPLC による他社製品との品質比較
- 9) I. Trautschold: Habilitationsschrift der Med. Fakultät, München, 1965.

●用法・用量、適用上の注意、取扱い上の注意等は製品添付文書をご参照ください。

三井物産

株式会社三井物産
〒541 大阪市東区今橋1-15-1

静注用免疫グロブリン製剤

ウェノグロブリン®-I

乾燥ポリエチレングリコール処理免疫グロブリン〈薬価基準収載〉

1. 酵素による分解や、スルホ化、アルキル化などの化学修飾を受けていない、日本で最初の非修飾型 (intact) の静注用免疫グロブリン製剤です。
2. 投与直後からオプソニン活性など native な IgG がもつすべての生物活性を発揮します。
3. 血中半減期は長く native な IgG とほぼ同等です。

●効能・効果

1. 重症感染症において抗生物質との併用
2. 低ならびに無ガンマグロブリン血症
3. 特発性血小板減少性紫斑病(他剤が無効で、著明な出血傾向があり、外科的処置又は出産等一時的止血管理を必要とする場合)