報 文

ポリエチレングリコールの比色定量

長谷川重男*・相沢 主税*・藤原 充*・吉岡 勇雄*
橋本 喬*・加賀 一兄*・原 一郎**

* 北里研究所 (東京都港区白金 5-9-1)

** 東京医科歯科大学 (千葉県市川市国府台 2-8-30)

Colorimetric Determination of Poly(ethylene glycol)

Shigeo HASEGAWA*, Chikara AIZAWA*, Mitsuru FUJIWARA*, Isao YOSHIOKA*,
Takashi HASHIMOTO*, Kazue KAGAWA*, and Ichiro HARA**

* The Kitasato Institute (5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo)

** Tokyo Medical and Dental University (2-8-30, Koonodai, Ichikawa-shi, Chiba)

Poly (ethylene glycol) (PEG) has widely been used as a nonionic surfactant for dispersion, solubilization, and dehydration of protein or lipid.

Recently, PEG is used for purification or concentration of biological substances such as viral suspension.

Sensitive method is required for the measurement of PEG in the presence of impurities since the biological substances are usually contained large amounts of proteins or lipids.

By Stevenson's method which is widely used for the measurement of PEG, it was difficult to measure the PEG in the presence of protein or lipid because nonspecific color development occurred by impurities.

In this paper, we determined the substances which caused the nonspecific color development and found the procedure which removed them from samples. We described also more sensitive procedure for the measurement of PEG by the modification of concentration of chemical reagents which are used in Stevenson's method.

1 緒 言

近年, ポリエチレングリコール [Poly (ethylene glycol)] は, 非イオン界面活性剤として脂質やタンパク質などの分散¹⁾, 可溶化^{2),3)}, 脱水⁴⁾⁻⁶⁾ に広く使われている。ことに, 最近ワクチン作製のためのウイルスの精製や濃縮^{7),10)} に沈降剤として使用されるようになり, 微量定量方法の確立が必要になってきた。

現在, ポリエチレングリコールを定量する方法としては, Stevenson の錯塩の発色による比色定量法^{7),8)} が一般に使われている。この方法は, 測定限界 1 μg で, 再現性の高い方法であるが, 脂質やタンパク質の混在する試料では, 非特異的な発色が起こり, 正確な定量は困難である。そこで著者らは, この非特異的な発色物質を決定するとともに, その除去方法について検討した。

また, Stevenson の定量方法で使用する試薬の一部

の濃度を変えることにより, ポリエチレングリコールの検出感度を高めることができたので, あわせて, 報告する。

2 実 験

2.1 実験材料

2.1.1 ポリエチレングリコール (PEG)

PEG は, 和光純薬社製の平均分子量 6,000 のものを使用した。

2.1.2 タンパク質

卵白アルブミン, 硫酸プロタミン及びゼラチンは, 市販品を用いた。

2.1.3 脂質

ホスファチジルコリン (レシチン), ホスファチジルエタノールアミン (ケファリン), ホスファチジルセリン, トリグリセリド, ステアリン酸及びコレステロール

は、市販品を用いた。

2.1.4 ステロイドホルモン

エストロン及びテストステロンは、市販品を用いた。

2.1.5 糖

グルコース及びラクトースは、市販品を用いた。

2.1.6 生体材料 [マウス脳乳剤, 20% (wt/vol)]

体重約 20 g のマウスから脳を取り出し、N/100 のリン酸緩衝液 80 ml を加えて、乳化したものを、10,000 rpm, 30 min 遠心し、その上清を用いた。

2.2 試薬

2.2.1 塩酸溶液：濃塩酸 1 容を蒸留水 4 容に希釈した。

2.2.2 塩化バリウム溶液： $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の 10% 塩化バリウム溶液を用いた。

2.2.3 リンモリブデン酸溶液： $\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 20\text{Mo} \cdot \text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ の 10% リンモリブデン酸溶液を用いた。

2.2.4 塩化スズ (II) 溶液： $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の 2 g に濃塩酸 10 ml を加え、溶解し、蒸留水で全量を 100 ml とし、溶液中に少量のスズを加えた。

2.2.5 濃硫酸、メチルアルコール、エチルアルコール、アセトン、四塩化炭素、クロロホルム、イソプロピルアルコール、酢酸エチルは和光純薬社製の純度 99% 以上のものを使用した。

2.3 測定方法

吸光度の測定には、日立-Perkin Elmer の分光光度計 111 型を使用した。セルは光路 10 mm のものを使用した。また温度設定には、シャープ電子恒温器 TE-106 型を、反応時のかくはんにはイワキ KM 式シェーカー (300 rpm) を使用した。試料の遠心沈降には、国産遠心機 H-107 型を使用した。

2.4 試料の調製

PEG の 10 mg, 25 mg, 50 mg をそれぞれ蒸留水 1,000 ml に溶解し、10 μg , 25 μg , 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 標準溶液とした。

2.5 PEG と各物質 (きょう雑物) との混合溶液

PEG の 25 μg 及び 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 標準溶液、5 ml に種々の濃度の各物質 (きょう雑物) の溶液 5 ml を加え、2 成分系試料を調製した。

2.6 きょう雑物の除去

PEG ときょう雑物を含んだ 2 成分系試料 20 ml と有機溶媒 20 ml とを混合し、室温で 30 min incubate したのち、3,000 rpm, 20 min, 遠心し、きょう雑物を沈降除去した。

2.7 Stevenson による PEG の定量法

試料 1 ml を 10 ml の目盛付き遠心管に入れ、蒸留水で 5 ml に希釈した。これに 3 滴の希塩酸と 2 滴の 10% 塩化バリウム溶液及び 10% リンモリブデン酸溶液を加え、かくはんしながら、20 min 沈殿生成させ、その沈

殿を 3,000 rpm, 15 min, 遠心分離した。上清は傾斜して除去し、沈殿を 5 ml の蒸留水で洗浄し、5 ml の蒸留水で再浮遊した。蒸留水で 6 ml まで希釈し、10% チオシアン酸アンモニウム溶液の 1 ml と 2% 塩化スズ (II) 溶液の 0.5 ml を加え、全量を蒸留水で 10 ml とした。20 min 後に波長 460 nm における吸光度を測定した。

あらかじめ、PEG の標準溶液を用いて、上記の操作により検量線を作成しておき、吸光度より、PEG 量を算出した。

3 結 果

3.1 Stevenson の PEG 定量法の改良

チオシアン酸アンモニウムの濃度の検討

1 ml 中に 25 μg 及び 50 μg の PEG を含む標準溶液 1 ml を、Stevenson による PEG の定量法に従って操作し、原法で使用される、チオシアン酸アンモニウムの濃度を種々の濃度にかえて測定した (Fig.-1)。この結

Fig.-1 Influence of the concentration of ammonium thiocyanate solution on the sensitivity of PEG measurement.

果、チオシアン酸アンモニウムの濃度は 10% で吸光度は平衡に達し、一方、Blank の吸光度は、チオシアン酸アンモニウム濃度 10% 以上で吸光度は漸増した。チオシアン酸アンモニウム濃度 10% での吸光度は、原法で使用される濃度 5% での吸光度に比べ、約 1.3 倍であった。

3.2 塩化スズ (II) の濃度の検討

1 ml 中に 25 μg 及び 50 μg の PEG を含む溶液 1 ml を試料として材料と実験方法に従って操作し、塩化スズ (II) の濃度を 0.1% から 40% までの各濃度に変えて、PEG の検出感度に及ぼす影響を調べた (Fig.-2)。その結果、Blank に対し、PEG 溶液では塩化スズ (II) 濃度の上昇に従い吸光度は漸減した。原法で使用する塩化スズ (II) 濃度を 2% に変えると吸光度は、約 1.7 倍になった。

Stevenson の原法と一部試薬濃度を変えた改良法で、

Fig.-2 Influence of the concentration of stannous chloride solution on the sensitivity of PEG measurement.

Fig.-3 Comparison of original Stevenson's method with modified method for the PEG measurement.

PEG の標準溶液を定量比較した (Fig.-3)。この結果、PEG 濃度 10 μg/ml では、吸光度は、改良法 (b) は、原法 (a) の約 2 倍、PEG 30 μg/ml では、約 1.8 倍といずれも改良法が高い吸光度を示した。

3.3 きょう雑物による非特異的発色

生体成分の混入による非特異的発色を調べるため、マウス脳の乳剤を標準 PEG 溶液に添加して PEG 定量に及ぼす影響を調べた (Fig.-4)。PEG の 10 μg, 25 μg, 50 μg/ml 標準溶液 20 ml に 10 倍から 8,000 倍に希釈したマウス脳の乳剤をそれぞれ 20 ml 添加し、Stevenson の改良法で PEG 量を測定した。その結果、1,600 倍以上希釈したマウス脳乳剤 (タンパク含有量 0.5 μg/ml) の存在下では、PEG の定量に影響は認められない

Fig.-4 Influence of mouse brain suspension on the measurement of various amount of PEG.

が、1,600 倍以下の希釈では、非特異的発色が認められた。このことから、非特異的発色を起こす物質の究明と、その除去方法の確立が必要となった。

3.4 発色に影響を及ぼす物質

PEG の標準溶液にきょう雑物として、卵白アルブミン、硫酸プロタミン、ゼラチン、レシチン、セファリン、ホスファチジルセリン、コレステロール、トリオレン、ステアリン酸、エストロン、テストステロン、グルコース、ラクトースを添加し、吸光度に及ぼす影響をみた (Fig.-5 ○—○ 及び □—□)。きょう雑物は、20, 60, 80, 100 μg/ml の 5 段階の濃度で、PEG は、10, 25 μg/ml の 2 段階の濃度で用いた。その結果、卵白アルブミン、硫酸プロタミン、ゼラチン、レシチン、セファリン、ホスファチジルセリンなどタンパク質と脂質に非特異的発色が認められた。コレステロール、トリオレン、ステアリン酸、エストロン、テストステロン、グルコース、ラクトースには、非特異的発色は認められなかった。

3.5 非特異的発色物質の除去

非特異的発色により PEG 定量を妨害するタンパク質及び脂質を試料中から除去する目的で、種々の有機溶媒で試料 (マウス脳乳剤) を処理した (Table-1)。試料 20 ml に、アセトン、メチルアルコール、エチルアルコール、クロロホルム、イソプロピルアルコール、四塩化炭素及び酢酸エチルをそれぞれ 20 ml 添加し、シェーカーで各時間かくはんしたのち、3,000 rpm, 20 min 遠心し、その上清について、PEG 量を測った。その結果、

Fig.-5 Determination of substances causing nonspecific color development and removal of them.

Table-1 Treatment of mouse brain suspension with various organic solvents to remove the non-specific chromogenic substances.

Organic solvent	Time treated (min)					
	10	20	30	40	50	60
Acetone	98.9	98.7	98.5	100	99.5	100
Methyl alcohol	98.6	90.6	84.1	84.7	115.6	109.2
Ethyl alcohol	94.3	90.3	116.6	105.0	115.1	115.7
Chloroform	86.2	71.8	72.2	75.5	72.0	71.7
Isopropyl alcohol	90.0	90.9	90.1	90.9	90.1	90.5
None	100	100	100	100	100	100

Numbers show the percentage of PEG recovered after treatment with various organic solvents.

アセトン、メチルアルコール、エチルアルコール、クロロホルム、イソプロピルアルコールで処理した PEG 標準液はいずれもきょう雑物を含まない PEG 標準液の PEG 量と同値を示し、非特異的発色物質の除去に有効であることがわかったが、その中でもアセトンが最も安定した効果を示した。そこで、PEG ときょう雑物の混合試料 20 ml にアセトンを 20 ml 添加し、シェーカーで 30 min かくはんしたのち、3,000 rpm、20 min 遠心し、その上清の PEG 量を測った (Fig.-5 ●—● 及び ■—■)。その結果、きょう雑物として添加した、卵白アルブミン、硫酸プロタミン、ゼラチン、レシチン、

セファリン、ホスファチジルセリン、マウス脳乳剤のいずれの試料もきょう雑物を含まない PEG 標準液の PEG 量と同値を示し、非特異的発色物質の除去が認められた。

4 考 察

最近、人や動物に用いるワクチン^{9),10)}や、血清グロブリンの精製や濃縮に沈殿剤として PEG がしばしば使用されるようになってきたが、それに伴って、PEG を使って精製、濃縮された生物学的製剤中の PEG 残留をチェックする方法が、必要となってきた。現在、Steven-son の比色定量法は、PEG の定量法として広く使われており、PEG 錯塩の発色を応用した、鋭敏で安定した方法であるが、タンパク質など PEG 発色操作により同時に発色する物質が混在すると、定量は困難になる。一般に、生物学的製剤にはかなりの量の有機物が含まれており、そのままの状態では、PEG の定量は困難である。そこで、あらかじめ、試料から、非特異的発色物質を除去することが必要となるが、その非特異的発色の原因となる物質は、主として、タンパク質と脂質であると考えられる。糖は影響しないと思われる。非特異的発色物質の除去には、アセトンなど有機溶媒による処理が有効であったが、ことに、アセトンが安定かつ効果的であった。タンパク質や脂質の試料への混入が、なぜ、PEG 定量操作で非特異的発色をするのか、また、構造の全く異なるタンパク質と脂質がアセトンなど、同一の有機溶媒で

簡単に除去されるのか、不明であるが、非特異的発色がタンパク質や脂質などの混入による試料の単なる懸濁に由来するものではないと思われる。

一方、Stevenson の方法で用いられる試薬の中、チオシアン酸アンモニウムの濃度 5% を 10% に、塩化スズ(II) の濃度 35% を 2% に変えると、PEG の検出感度が高くなることが認められた。

(昭和 56 年 3 月 11 日受理)

文 献

- 1) A.M. Mankowich, *Ind. Eng. Chem.*, **44**, 1151 (1952)
- 2) J. Swarbrik, *J. Pharm. Sci.*, **1965**, 1229
- 3) K.S., T.O., *J. Colloid. Interface Science.*, **24**, 56

- (1967)
- 4) P.G. Walker, G.A. Lewy, *Biochem. J.*, **49**, 620 (1951)
- 5) C. Carruthers, A. Baumler, *Arch. Biochem. Biophys.*, **99**, 458 (1962)
- 6) 松村久吉, 井口定男, 西田守衛, *薬誌*, **76**, 1355 (1956)
- 7) D.G. Stevenson, *Analyst.*, **79**, 504 (1954)
- 8) Willey-Interscience, "Systematic analysis of surface-active agents" John Wiley and Sons Inc., New York, Vol. 12, (1972) p. 347
- 9) C. Aizawa, S. Hasegawa, C. Chih-Yuan, I. Yoshiooka, *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 54 (1980)
- 10) J.T. Heyward, R.A. Klimas, M.D. Stapp, J.F. Obijeski, *Arch. Virol.*, **55**, 107 (1977)