

第十七改正日本薬局方に準拠したヒアルロン酸の分析

Analysis of hyaluronic acid in accordance with the 17th edition of the Japanese Pharmacopoeia

ヒアルロン酸は、*D*-グルクロン酸と *N*-アセチル-*D*-グルコサミンの二糖単位が直鎖状に結合したグルコサミノグリカンの一種で、その分子量は、百万以上になると言われています。鶏冠からの単離や微生物による合成により得られる生物由来物質であり、弾力性や保水性も有することから、医療現場においても広く利用されています。代表的な例として、点眼剤(ドライアイ用の目薬、眼科手術補助剤)、関節機能改善剤(関節痛の治療のための注射)、内視鏡用粘膜下注入材等が挙げられます。

第十七改正日本薬局方(2016年4月)の医薬品各条に、“精製ヒアルロン酸ナトリウム点眼液”と“精製ヒアルロン酸ナトリウム注射液”が新たに収載されました。このうち、“精製ヒアルロン酸ナトリウム点眼液”の定量法として、HPLC法が採用されています。収載された方法は、低分子分析用のSECカラムを用いてヒアルロン酸を排除限界容量付近に溶出させ、そのピーク面積から定量を行うものです。

本報では、第十七改正日本薬局方に基づいてヒアルロン酸ナトリウムを分析し、システム適合性の確認を行った例を紹介します。

分析カラムには、定量法の試験条件に合致するカラム TSKgel G2500PWXL (7.8 mmI.D. x 300 mm, 7 µm)を使用しました。収載された条件で流速を 1.0 mL/min に設定した場合、ヒアルロン酸の保持時間は 5.1 分となりました。

システム適合性を確認した結果、1)ヒアルロン酸と内標物質である ϵ -アミノカブロン酸(IUPAC名: 6-アミノヘキサン酸)の溶出順序、2)ヒアルロン酸と ϵ -アミノカブロン酸のピークの分離度、3)繰り返し測定におけるヒアルロン酸のピーク面積の相対標準偏差、のいずれの項目に関しても適合している結果が得られました。

表1 日本薬局方に収載されている定量法の試験条件

カラム:	内径 7.8 mm、長さ 30 cm のステンレス管に 7 µm の液体クロマトグラフィー用多孔性ポリメタクリレートを充填する
移動相:	硫酸ナトリウム十水和物 32.2 g を水に溶かし、1000 mL とする
流量:	ヒアルロン酸の保持時間が約 5 分になるように調整する
カラム温度:	40 °C 付近の一定温度
検出器:	紫外吸光光度計 (測定波長: 210 nm)

表2 分析条件

Instrument :	Agilent 1200SL series
Column :	TSKgel G2500PWXL (7.8 mmI.D. x 300 mm, 7 µm)
Eluent :	1.0 mol/L Sodium sulfate
Flow rate :	1.0 mL/min
Column temp. :	40 °C
Injection volume :	20 µL
Detector :	UV 210 nm

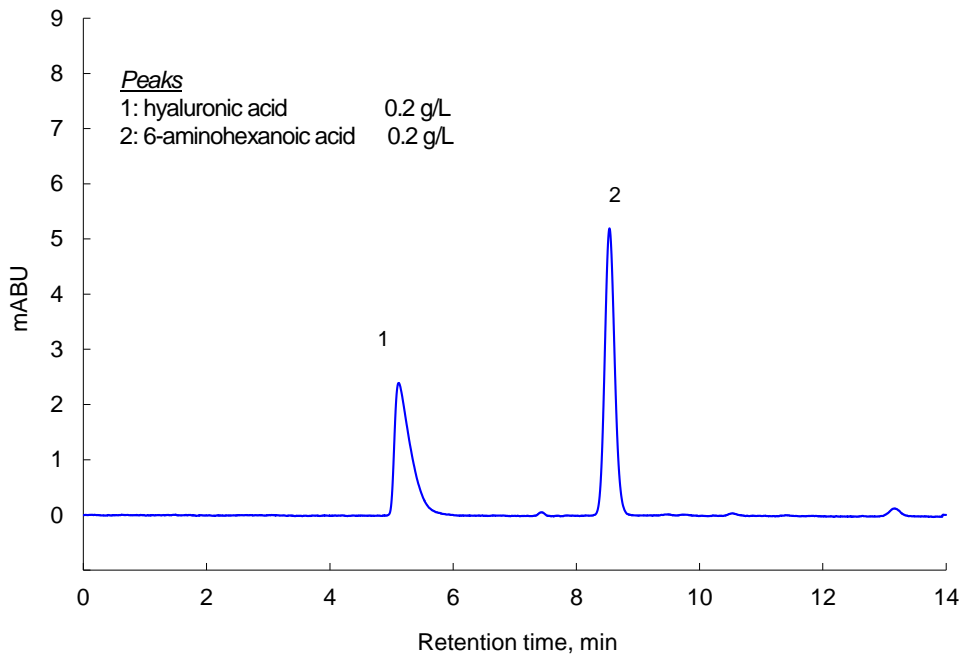


図1 システム適合性試験試料のクロマトグラム

表3 システム適合性試験

システム適合性試験用溶液：

精製ヒアルロン酸ナトリウム 50 mg を塩化ナトリウム溶液(9→1000) 50 mL に溶かす。
 この液 1 mL 及び ε-アミノカプロン酸溶液(1→500) 2 mL をとり、移動相を加えて 20 mL とする。

システム適合性試験の規定

1. ヒアルロン酸、ε-アミノカプロン酸の順番に溶出する
 → 規定通りの溶出順
2. ヒアルロン酸、ε-アミノカプロン酸の分離度は5以上
 → 分離度 9.0
3. 注入量 20 μLにつき、6回繰り返し測定したときの、ヒアルロン酸のピーク面積の相対標準偏差は2.0%以下
 → 相対標準偏差 0.29%

表4 6回繰り返し測定時のピーク面積値

Run	Peak area(mABU・sec)
1 st	43.172
2 nd	42.865
3 rd	43.098
4 th	43.126
5 th	43.039
6 th	42.902
Average	43.034
RSD(%)	0.29