

氏 名	田 中 喜 秀
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 594 号
学位授与の日付	平 成 10 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	キャピラリー電気泳動による光学活性医薬品の分離分析法に関する研究

(主査)

論文調査委員 教授 中川照眞 教授 半田哲郎 教授 川寄敏祐

### 論 文 内 容 の 要 旨

光学異性体を含む医薬品は薬理活性、毒性及び薬物動態に関して異性体間で性質が異なることが知られており、そのような医薬品の開発においてはその光学純度や立体選択的薬物動態などを研究するために、迅速、簡便かつ高分離性能を有する分離分析法の開発が重要となる。この目的で、従来より高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が汎用されており、多種類の光学異性体分離用カラムが市販されてきたが、分離条件の選択及び最適化が困難な場合が多い。一方、キャピラリー電気泳動 (CE) はHPLCに比べると分離性能が格段に高く、キラル識別剤の選定や分離条件の検討も容易である。CEのキラル識別剤として従来より中性のシクロデキストリン (CD) 類が汎用されてきたが、多様な光学分離を行う上でより多くのキラル識別剤の開発、応用に関する研究が必要である。

著者はタンパク質及びイオン性CD誘導体をキラル識別剤とするCEによる光学異性体の分離分析法を新たに開発し、多くのラセミ医薬品の分離に成功した。この方法を医薬品の光学純度試験、血漿試料中の光学活性薬物の分離定量に応用し、実用性の高い方法であることを明らかにした。

塩基性タンパク質である卵白アビジンは光学異性体分離用HPLCカラムのリガンドとして利用され、多くの酸性ラセミ化合物に対して光学認識能を有することが知られている。しかし、CEでのキラル識別剤としては検討されていなかった。タンパク質をキラル識別剤として泳動液に添加して行うCEは、アフィニティーCEと呼ばれる。著者は卵白アビジンをキラル識別剤とするアフィニティーCEにより13種類の酸性ラセミ化合物の光学異性体分離を達成した。本法は卵白アビジンの濃度、緩衝液のpH及び泳動液に添加する有機溶媒の種類を検討することにより分離条件を最適化でき、HPLCに比べると分離条件の検討に要する時間は格段に短縮可能である。アフィニティーCEではタンパク質濃度を上げると分離選択性が改善されることが多いが、同時にタンパク質濃度が増すにつれてタンパク質自身の紫外吸収により試料検出を妨害する。そこで、タンパク質による検出妨害を避ける方法として、キャピラリーの一部分にのみタンパク質を含む分離溶液を満たす部分注入法を実用化した。この部分注入法を採用することにより、試料検出の妨害を受けずにタンパク質濃度を上げて分離選択性を改善することが可能となり、卵白アビジン、牛血清 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質などをキラル識別剤として用いて47種類のラセミ化合物の光学異性体分離を達成した。本法をスルピリド光学活性体の光学純度試験及び血漿試料中のケトプロフェン濃度測定などに応用し、実用性が高いことを明らかにした。また、卵白アビジンはビオチンと特異的結合を示すことはよく知られているが、ビオチンを添加して複合体を形成することにより、卵白アビジンの光学認識能及び試料との相互作用は著しく低下することを明らかにした。

CEによる光学分離では多種類のCD誘導体がキラル識別剤として利用されていたが、大部分は中性のCD誘導体であった。しかし、CEでは試料と反対の電荷を持つキラル識別剤を選択するほうが光学異性体の分離に適していることが多い。そこで著者はスルホブチル基、リン酸基及びカルボキシル基を有する市販の陰イオン性CD誘導体を用い、41種類の塩基性ラセミ化合物の光学異性体分離を達成した。イオン性CD誘導体では中性CD誘導体とは異なる分離選択性も得られた。更に、光

学分離条件はラセミ化合物のCD誘導体に対する結合定数の大きさ及び光学異性体間における結合定数の差に関係していることを示し、分離条件を簡単に検討する方法を示した。陰イオン性CD誘導体は中性ラセミ試料の光学異性体分離にも有用であり、従来のように分離溶液としてCDの他に陰イオン性界面活性剤の添加を必要とせず、このようなCD誘導体を単独で用いることにより光学分離が可能となった。

市販の第4級アンモニウム基を持つCD誘導体はグルコース骨格上の置換基の数や位置が異なる混合物であり、その組成は明らかでなかった。キラル識別剤の組成は分離再現性に大きな影響を与えると考えられるので、CE-間接吸光検出法及びCE/質量分析法(CE/MS)を併用することにより、CD誘導体の組成を決定した。この陽イオン性CD誘導体をキラル識別剤として用い、11種類の酸性ラセミ化合物の光学異性体分離を達成した。中性CD誘導体による分離と比較し、陽イオン性CD誘導体の有用性を明らかにした。

CE/MSでは分離溶液に含まれる揮発性のキラル識別剤がCE/MS用インターフェース及びMS装置を汚染し、分析に不都合を生じることがある。本研究によって実用化された部分注入法はCE/MSへの適用が有利であり、上記の問題を回避することができた。キラル識別剤としてタンパク質及びCD類を用いて検討し、光学異性体の分離分析法としてCE/MSも利用できることを明らかにした。MS検出では紫外吸収が弱い試料も高感度で検出でき、ショウノウスルホン酸の光学純度試験において、約1%のエナンチオマーを分析することができた。

以上、本研究はキラル識別剤としてCD誘導体やタンパク質を用いることにより、選択性の高い精密分離分析を可能とすると共に、その分析法の決定に必要な基礎情報を的確に把握するための有益な知見を与えるものである。この結果、CEによる光学活性医薬品の高分離分析法の実用化に貢献することができた。

#### 論文審査の結果の要旨

光学異性体を含む医薬品は薬理活性、毒性及び薬物動態に関して異性体間で性質が異なることが知られており、このような医薬品の研究開発においては、その光学純度や立体選択的薬物動態などを研究するために迅速、簡便かつ高分離性能を有する分離分析法の開発が重要となる。この目的で従来から高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が汎用されてきたが、光学異性体分離用カラムの選択及び分離条件の最適化にかなりの時間を要する場合が多い。一方、キャピラリー電気泳動(CE)はHPLCに比べると分離性能が格段に高く、キラル識別剤の選定や分離条件の検討も容易である。CEのキラル識別剤としては従来から中性のシクロデキストリン(CD)類が利用されてきたが、多様な光学異性体分離を行う上で多くのキラル識別剤の開発、応用に関する研究が必要である。

著者はタンパク質及びイオン性CD誘導体をキラル識別剤とするCEによる光学異性体の分離分析法を新たに開発し、多くのラセミ医薬品の光学異性体分離に成功した。更に医薬品の光学純度試験、血漿試料中の光学活性薬物の分離定量に応用し、実用性の高い方法であることを明らかにした。

タンパク質をキラル識別剤として泳動液に添加して行うCE(アフィニティーCE)では、卵白アビジンが酸性ラセミ化合物の光学異性体分離に対して有用であった。また、卵白アビジンはビオチンと特異的結合を示すことは知られているが、ビオチンを添加して複合体を形成することにより、卵白アビジンの光学認識能及び試料との相互作用は著しく低下することを明らかにした。一方、塩基性ラセミ化合物に対しては牛血清 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質などをキラル識別剤として用いた。分離条件としてタンパク質濃度及び緩衝液のpHなどを最適化し、多くのラセミ化合物の光学異性体分離を達成した。本法によって、HPLCに比べて分離条件の検討に要する時間が大幅に短縮可能となった。一般に、アフィニティーCEではタンパク質濃度を上げると分離選択性が改善されることが多いが、同時にタンパク質濃度が増すにつれてタンパク質自身の紫外吸収により試料検出が妨害される。そこで、タンパク質による検出妨害を避ける方法として部分注入法を実用化し、試料検出の妨害を受けずにタンパク質濃度を上げて分離選択性を改善することが可能となった。

CD誘導体をキラル識別剤として用いる光学異性体分離では、試料と反対の電荷を持つイオン性CD誘導体を用いるほうが有利であると考えられた。そこで、著者は数種類の市販のイオン性CD誘導体を用いて、多くのラセミ化合物の光学異性体分離を達成した。また、光学分離条件はラセミ化合物のCD誘導体に対する結合定数の大きさ及び光学異性体間における結合定数の差に関係していることを示し、そのことを利用して分離条件を簡単に検討する方法を示した。更に、陰イオン性C

D誘導体は中性ラセミ化合物の光学異性体分離にも有用であり、従来のように分離溶液としてCDのほかに陰イオン性界面活性剤の添加を必要とせず、このようなCD誘導体を単独で用いることにより光学分離が可能となった。

次に、光学異性体の分離・検出法としてCE/質量分析法 (CE/MS) の適用を検討した。CE/MSでは分離溶液に含まれる不揮発性のキラル識別剤がMS装置を汚染し、分析に不都合を生じることがあるが、本研究によって実用化された部分注入法をMSと組み合わせることにより、この不都合を回避することができた。MS検出では紫外吸収の弱い試料を高感度で検出でき、ショウノウスルホン酸の光学異性体の分離検出も可能となった。

以上、本研究はキラル識別剤としてCD誘導体やタンパク質を用いることにより、選択性の高い精密分離分析を可能とすると共に、その分析法の決定に必要な基礎情報を的確に把握するための有益な知見を与えるものである。この結果、CEによる光学活性医薬品の高分離分析法の実用化に貢献することができた。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値のあるものと認める。

更に、平成10年9月10日論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果優秀と認定した。