

氏 名	薬原由佳里 <small>くわ はら ゆかり</small>				
学位の種類	博士(薬学)				
学位記番号	薬第57号				
学位授与の日付	平成17年12月15日				
学位授与の要件	学位規程第4条第2項該当				
学位論文題目	キャピラリー電気泳動法の製剤分析および生薬分析への応用に関する研究				
論文審査委員 (主査)	教授	掛	樋	一	晃
(副主査)	教授	岩	城	正	宏
(副主査)	教授	坊	木	佳	人

論文内容の要旨

キャピラリー電気泳動 (CE) 法は、メソッド開発が容易であり、分析条件の検討にあまり時間をかけることなく高分離性能が得られ、分析時間も液体クロマトグラフ (HPLC) 法と比較して短いという利点を有する分離分析法である。このような特徴を生かした CE 法の医薬品分析への応用・実用化検討として、光学異性体の分離分析、製剤分析および生薬分析を検討し、様々な知見を得た。

第1章では、CE 法による光学異性体分離のためのキラルセクターとして、ジメチル-β-シクロデキストリン (DM-β-CD)、硫酸化シクロデキストリン (硫酸化 CD)、カルボキシメチル化多糖類 (CM 化多糖) および 18-クラウン-6-テトラカルボン酸 (18C6H₄) について光学認識能の検討を行った。

DM-β-CD の光学認識能に関する検討では、CE 法による光学異性体分離、HPLC 法による DM-β-CD の純度試験および MALDI TOF / MS 法による DM-β-CD の分子量分布測定結果より、置換基の導入度や位置が光学認識能に大きく影響することを明らかにした。本検討により、DM-β-CD をキラルセクターとした光学異性体分離を行う場合は、同一条件で分析を行っても同じ分離が得られない場合があるため、品質試験などで光学純度試験に使用する際にはキラルセクターの純度に留意する必要があることが分った。

硫酸化 CD の光学認識能に関する検討では、硫酸化 CD が電気的に中性の CD と比較して、幅広い光学認識能を有し、特に硫酸化 β-CD は光学異性体分離に有効であることが分った。また、硫酸基の置換度に違いのある 2 種類の硫酸化 β-CD を用いて、トリメトキノールおよびデノパミンの結合定数 K を算出し、これらの比率からエナンチオ選択性: $\alpha_{1/2} = K_1/K_2$ を求めた。その結果、両化合物とも硫酸基の導入度の高い硫酸化 β-CD の値よりも、硫酸基の導入度の低い硫酸化 β-CD の値の方が大きい結果となり、両化合物の光学認識には、硫酸基の導入度が高いものよりも、低い導入度の硫酸化 β-CD が優れていることが示された。これらの結果より、わずかな置換基の導入度の違いが光学認識能に影響していることが明らかになった。さらに、トリメトキノールおよびデノパミンの光学異性体分離において、硫酸化 CD の孔径の種類により光学異性体の泳動順序が反転するという興味深い現象が確認され、純度試験などで光学異性体の泳動順序を反転させたいときに応用できることが分った。

カルボキシメチル化多糖の検討では、カルボキシメチルデキストラン (CM-dextran)、カルボキシメチルデキストリンおよびカルボキシメチルセルロースの光学認識能を検討した。その結果、これら CM 化多糖は、いずれも 3% 以下の低濃度で幅広い光学認識能を示すことが分った。また、CM-dextran の光学認識能に関する検討では、デキストランをカルボキシメチル化 (CM 化) することで光学認識能が広がるが、CM 化度の違いが光学認識能に影響することが分った。

18C6H₄についての検討では、CE法による間接吸光法を用いた非誘導体化アミノ酸の光学異性体分離を行うことにより光学認識能の検討を行った。その結果、間接吸光試薬としてクリソイジンが利用できることが分った。また、光学異性体分離された9種類の非誘導体化アミノ酸のうち、セリン、スレオニンおよびメチオニン以外のアミノ酸はL-体、D-体の順で泳動し、D-体、L-体の順で泳動したセリン、スレオニンおよびメチオニンは18C6H₄との相互作用が異なることが分った。これらCE法により光学異性体分離された9種類の非誘導体化アミノ酸の泳動順を、18C6H₄をシリカゲルに固定化したカラムを用いたHPLC法による既報の検討結果と比較したところ、メチオニンを除くほとんど全てのアミノ酸に関して、CE法およびHPLC法でよく一致した結果が得られた。メチオニンに対する18C6H₄の光学認識能が、CE法とHPLC法で異なっていたことに関しては、18C6H₄とメチオニンの相互作用の解析状態が、CE法は双方が溶液中で自由な状態であるのに対し、HPLC法では18C6H₄がシリカゲルに固定化され、自由度を失った状態で相互作用していることが影響していると考えられた。このことより、CE法は、キラルセクターと化合物の相互作用を自由溶液中で検討できるため、光学認識能の検討手段として有利な手法であることが分った。

第2章では、第1章でのキラルセクターの検討結果を踏まえ、塩酸ジルチアゼム製剤、塩酸トリメトキノール製剤およびデノパミン製剤の光学純度測定を兼ねた分析法を設定し、これら3製剤につき、含量均一性試験および定量法の試験を行い、CE法の応用・実用化検討を行った。

塩酸ジルチアゼム製剤に関しては、デキストリンをキラルセクターとし、キャピラリー長を20cmと短くすることで、分析時間が270秒以内の光学純度測定を兼ねた迅速定量法を設定した。塩酸トリメトキノール製剤では、DM-β-CDをキラルセクターとし、キャピラリー長を20cmと短くすることで、分析時間が270秒以内の光学純度測定を兼ねた迅速定量法を設定した。デノパミン製剤については、DM-β-CDをキラルセクターとした光学純度測定を兼ねた迅速分析法の検討を行い、キラルセクターの最適濃度を、DM-β-CDとの結合定数から算出した。その結果、DM-β-CDを50mM添加した条件で、光学純度測定を兼ねた10分以内の迅速分析法を設定できた。これら3製剤につき、設定した分析法を用いて、日局・一般試験法の含量均一性試験を行った結果、いずれの製剤においても判定値は15.0%以下となり、日局・一般試験法の含量均一性試験に適合した。また、これら3製剤の主薬の含量を測定するため、設定した光学純度測定を兼ねた分析法により定量試験を行った。その結果、いずれの製剤においても、既報のHPLC法での測定結果とよく一致した結果が得られ、相対標準偏差も1%以下の再現性の良い結果が得られた。以上の合成医薬品の製剤分析に関する検討結果より、CE法は既存のHPLC法と比較して遜色はなく、品質試験に応用可能な分離分析法であることが示さ

れた。

第3章では、医薬品の中でも複雑な組成を持つ生薬に着目し、原生薬とその配合製剤を対象として、CE法による指標成分の確認および定量について検討を行った。CE法の分析モードの中で、中性物質の評価も可能であるミセル動電クロマトグラフ(MEKC)法により、日局収載生薬であるオウギおよびビャクジュツについて指標成分の検討を行った。

オウギに関する生薬分析では、オウギおよびオウギ流エキスの双方に含有が確認されているカリコシンをオウギの指標成分として、オウギ流エキスの分析をCE法のMEKCモードにて行った。その結果、HPLC法(分析時間:40分)と比較して10分以内という短時間でオウギ流エキスのパターン分析が可能であり、オウギ流エキス中のカリコシンの確認試験にも適用できることが分った。また、オウギ流エキス配合生薬製剤(ドリンク剤)中からのカリコシンの抽出操作を含めた定量法を設定し、日局およびICHガイドラインを参考に分析法バリデーションデータを取得したところ、設定した分析法は抽出操作を含めて問題はなく、カリコシンを特異的に精度よく正確に分析できることが示された。本試験法を用いて、オウギ流エキス配合のドリンク剤3ロットにつき、各ロット繰り返し3回のカリコシンの定量試験を行った。その結果、いずれのロットにおいても、相対標準偏差が1%以下の再現性のある結果が得られた。

次に、CE法による検討が行われていなかったビャクジュツの指標成分、アトラクチレノリドⅢの定量法をMEKC法を用いて検討した。その結果、ドデシル硫酸ナトリウム濃度を50mMとし、10分以内に測定が完了する迅速分析法を設定することができた。また、アトラクチレノリドⅢの抽出操作を含めた定量法に関して、日局およびICHガイドラインを参考に分析法バリデーションを取得したところ、本法は、抽出操作を含めて問題はなく、アトラクチレノリドⅢを特異的に精度よく正確に分析できることが示された。設定した試験法により、ビャクジュツ原生薬およびビャクジュツ配合エキス剤各3ロットを用いて、各ロット繰り返し3回のアトラクチレノリドⅢの定量試験を実施したところ、いずれの試験結果も再現性のある良好な結果が得られた。また、原生薬中のアトラクチレノリドⅢのCE法による定量結果は、既報のHPLC法によるビャクジュツ中のアトラクチレノリドⅢの定量結果と相関のある結果であった。以上のCE法による生薬分析に関する検討結果より、複雑な成分を含む生薬や漢方製剤の品質評価法の一つとして、MEKC法は有用な手法であることが分かった。

以上のように、著者は、CE法による光学異性体分離を含めた製剤分析および生薬分析に関して種々検討を行い、CE法の実用分析法としての確立および普及に貢献した。

論文審査結果の要旨

本論文は、高い分離性能を持ち、迅速分析が可能であるキャピラリー電気泳動（CE）法を、医薬品の製剤分析及び生薬分析に応用した検討結果を述べている。CE法は既にバイオ関連試料や環境試料の分析では広く利用されているが、分析の精度・再現性で液体クロマトグラフ法にやや劣る。そこで、医薬品分析における実用化、更なる汎用化、応用研究を目的として、高い精度が要求されない純度試験、とりわけ、CE法のメソッド開発が容易である特色を活かした光学純度測定法への適用、また、定量分析に着目し、詳細な検討を行っている。

まず、CE光学異性体分離で汎用されているキラルセクターであるシクロデキストリン（CD）の中で、ジメチル-β-シクロデキストリンと硫酸化シクロデキストリンについて、その置換基の導入率（DS）の異なるものを用いて詳細な検討を行っている。その結果、DSが光学認識能に大きく影響すること、また、CDの孔径により、エナンチオマーの移動順が逆転することなどを明らかにしたことは特筆される。同様の検討をカルボキシルメチル（CM）基を導入したデキストランで実施し、CM基のDSが分離選択性に大きく影響していることを確認している。

別に、アミノ化合物の光学異性体の分離に有効である18-クラウン-6-テトラカルボン酸（18C6H₄）について、アミノ酸の光学認識能の検討を行っている。アミノ酸の各エナンチオマーと18C6H₄との真の相互作用を検討するために、CE法に間接吸光法を導入し、アミノ酸を誘導体化することなく、光学異性体の分離検出に成功している。

次に、これらの検討で得た知見を基に医薬品製剤への実用化検討を行い、塩酸ジルチアゼム錠、塩酸トリメトキノール錠及びデノパミン錠について、CE法による光学純度試験法も兼ねた迅速な定量法及び含量均一性試験法を開発している。また、医薬品の中でも複雑な組成を持つ生薬に対し、原生薬とその配合製剤を用いて、CE法の一つであるミセル動電クロマトグラフ（MEKC）法による指標成分の確認及び定量について検討し、MEKC法によるオウギ中のカリコシン、ビャクジュツ中のアトラクチレノリドⅢの迅速、簡便な確認・定量分析を可能としている。

以上のように、本論文はCE法を医薬品の製剤分析及び生薬分析に応用し、医薬品の光学純度試験法及び定量分析法として有用であることを示したもので、終始一貫しており、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。

氏名	木下充弘
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	薬第62号
学位授与の日付	平成18年3月22日
学位授与の要件	学位規程第4条第2項該当
学位論文題目	規則性の高い酸性多糖の分析と生理機能解析に関する研究
論文審査委員（主査）	教授 掛 樋 一 晃
（副主査）	教授 岡 部 亘 雄
（副主査）	教授 川 畑 篤 史