



## キャピラリー電気泳動による光学異性体の分離

西 博 行

### 1 はじめに

キャピラリー電気泳動(CE)が Mikkers<sup>1)</sup>や Jorgenson<sup>2)</sup>によって発表されてから20年以上、またCE装置が市販されるようになってからも10年以上が過ぎようとしている。1990年代半ばからはCE装置の普及に伴って、CE研究者数も報告論文数も飛躍的に増加した。また、HPLCと同様に質量分析計(MS)との結合が検討され、現在では市販のCE/MS装置も利用できるようになった。

CEで方法的に成功している分野としては、DNAの塩基配列決定法への応用が挙げられる。今日、多用されているDNAマルチキャピラリーシーケンサーはヒトゲノム解析に大きく寄与した。その他としては医薬品分析、特に今回取り上げる光学異性体の分離分析がある。CEでは一般にシクロデキストリン(CD)のような光学異性体識別剤(以下、キラルセクター)を泳動液に添加するのみで光学異性体の分離分析が可能で、比較的短時間で試験法の検討が行えるなどのメリットがあることから、キラル分離法として広く浸透している。

本誌でCEに関する記事が登場したのは1994年であるが、その後のCEの進歩は速く、CE研究はナノテクノロジーを中心とした次段階に移行しつつある。本総説のタイトルであるCEによる光学異性体の分離分析については、1997年の進歩総説<sup>3)</sup>に一部記載があり、*Electrophoresis*誌<sup>4)-7)</sup>や *Journal of Chromatography A*誌<sup>8)</sup>などの論文誌においてもここ数年間で多くの特集号が出され、単行本<sup>9)</sup>も出版された。最近の光学異性体の分離に関する総説・特集号<sup>10)11)</sup>ではCEはHPLCと並び報告例が多い。千を越すと思われる関連論文のすべてを本総説でまとめることは困難であるので、CEによる光学異性体の分離の実際については、個別の論文や上記特集号を参照されたい。本総説では1997年以降の研究報告を中心に、最近の話題であるキャピラリー電気クロマトグラフィー(CEC)による光学異性体の分離分析の動向を含め、少し切り口を変えてまとめてみたい。

### 2 CEによる光学異性体の分離分析/方法論

1980年代から医薬、農薬、生化学分野で光学異性体の分離は重要課題となり、HPLCあるいはGCでは多くのキラルカ

ラムが開発・市販されるに至った。これらキラルカラムの普及に伴い、医薬品開発ではICHの品質ガイドラインQ6A<sup>12)</sup>により、光学異性体の評価は必須となっている。CEにおける光学異性体の分離も、原理的にはクロマトグラフィーと同じである。 $pK_a$ 値や電気泳動移動度などの物性値が等しい光学異性体を分離するには、エナンチオマーをジアステレオマー関係に導く必要がある。HPLC用として開発されたキラル誘導体化試薬により、あらかじめ試料をジアステレオマーとしてCEで分離するいわゆる間接法も、アミノ酸等の適切なUV吸収のない化合物や高感度分析を要求される場合では多数報告されている<sup>13)</sup>(本総説では触れない)。しかし、CEによる光学異性体の分離では、簡便さからキラルセクターを泳動液に添加して、キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)あるいは動電クロマトグラフィー(EKC)で行う方法がやはり中心である。エナンチオマー間で、キラルセクターに対して異なる結合定数を有し、その結果、電気泳動移動度にも差が生じることで光学異性体の分離が得られる。これに対し、キャピラリー内にキラルな固定相を充填して電気泳動により光学異性体の分離を行うCEC研究が盛んになってきた。

#### 2.1 CE法(CZE及びEKC)

CEは、上述のCZE、EKC(ミセルを擬似固定相として用いる場合はMEKC)、CECのほか、キャピラリー等電点電気泳動(CIEF)、キャピラリー等速電気泳動(CITP)、キャピラリーゲル電気泳動(CGE)と六つの分離モードに分類されるのが一般的である。これらのモードすべてで光学異性体の分離報告があるが、前者3手法によるものが大多数を占めている。これまでのCEによる光学異性体の分離に関する総説では、分離モードの分類に基づき、電氣的に中性なキラル化合物を電気泳動的な手法で分離できるEKC、電荷を持ったキラル化合物を対象とするCZEのように、モード別にまとめたものが多い。前者では胆汁酸ミセル、電荷を持つCD誘導体、MEKCへのCD添加、イオン性多糖類であるムコ多糖類、タンパク質などが、後者ではCD、中性多糖類などがキラルセクターとして用いられている。EKCとCZEは、原理的には一方はクロマトグラフィー、他方は電気泳動として区別され、発展してきた。しかし、方法的に両者に違いがあるわけではなく、いずれとも泳動液にキラルな化合物を添加してCE装置による分析を行う。近年のCECの発展を考慮すると、これらはnon-CEC

Enantiomer Separation by Chiral Capillary Electrophoresis.

法,あるいは均一溶液系での分離分析ということで単に CE 法として括れる手法である。CE 法では天然のキラル化合物から合成されたものまで幅広いものがキラルセクターとして適用されており,これらについては以下の項で紹介したい。

これら CE 法による光学異性体の分離分析で開発された手法として, 1 キラルセクターのコンビネーション法, 2 部分注入法, 3 非水 CE 法などがある。1 の手法は CE による光学異性体の分離の開発当初から, 本法の持つ特長の一つとして挙げられていたもので, 2 種類(以上)のキラルセクターを組み合わせ用いる。特に, 中性 CD と硫酸化 CD 等の電荷を持つ CD との組み合わせは, 光学異性体の分離における選択性の改善に有効であることが報告され, dual CD 法<sup>14)-16)</sup>と称されている。2 種類(以上)のキラルセクターを用いると, 分析条件の最適化に試行錯誤的な要素が多くなるが, CE 法では条件変更が容易であるので苦にはならない<sup>17)</sup>。CD をキラルセクターとした CZE によるピナフチル類 3 種類(ピナフトール, リン酸ピナフチル, ピナフチルジカルボン酸)の分離では, トリメチル  $\beta$ -CD (TM- $\beta$ -CD) が前者二つの光学異性体の分離に有効で,  $\alpha$ -CD はピナフチルジカルボン酸に有効であった。そこで両者を併用したところ, 全 3 種類の一斉光学異性体の分離が達成された<sup>17)</sup>。CE では, HPLC や GC と比較して, 電気浸透流 (EOF) の大きさや向き, あるいはキラルセクターの変更により, 比較的容易にエナンチオマーの移動順を操作できることも特長の一つである。近年, 多くの CD 誘導体が合成され, CE による光学異性体の分離に適用されているが, CD の種類により, エナンチオマーの移動順が逆転することが報告されている<sup>18)-20)</sup>。抗精神薬プロメタジンは,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 及び  $\gamma$ -CD と TM- $\beta$ -CD で, また, single isomer である heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato) $\beta$ -CD と heptakis-(6-sulfato) $\beta$ -CD とでエナンチオマーの移動順が逆になっている<sup>18)</sup>。マラリア薬ワルファリン<sup>19)</sup>や Cox2 阻害薬<sup>20)</sup>でも同様のことが観察されており, 移動順の異なる結果を与えた 2 種類の CD を用い (dual CD 法), 一方の CD 濃度を変化させることで, エナンチオマーの移動順の操作が可能となっている。また, コンビネーションの組み合わせでは, 両者ともキラル化合物である必要はなく, ドデシル硫酸ナトリウムへの CD 添加 (CD 修飾 MEKC) はアミノ酸誘導体の分離<sup>13)</sup>に有効で, また CD のみの添加では不可能であった第一アミノ化合物類の光学異性体の分離が, アキラルなクラウンエーテルである 18-クラウン-6 を更に添加することで達成されている<sup>21)</sup>。

2 の部分注入法は Valtcheva ら<sup>22)</sup>が考案した手法で, タンパク質や抗生物質のように UV 吸収を持つ化合物をキラルセクターとする場合, それ自身の UV 吸収のために試料検出が困難となることを回避する方法である。すなわち, キャピラリーの一部分だけにキラルセクターを注入し, 試料検出部の泳動液中には含まないようにする。本法では, これらセクターの吸着を防ぐためにキャピラリー内壁をコートしたものを使用する。この場合, EOF は発生しないので, 条件の設定 (泳動液の pH) 次第ではキラルセクターをフルにキャピラリー内に充填しても, キラルセクター自身の電気泳動により試料検出部から移動して, 妨害を回避できる。いずれの場合も, 分離に用いる泳動液はキラルセクターのないものを用い

る。部分注入法では, 検出器に対して応答の高い化合物をキラルセクターとして利用できることのほか, CE/MS への適用<sup>23)24)</sup>を容易にすることも特長として挙げられる。

3 の非水 CE (NACE) 法は, 水系の泳動液の代わりに, 有機溶媒を泳動液に用いる CE 法である。ホルムアミド, *N,N*-ジメチルホルムアミド, アセトニトリルのほか, メタノールなどの低級アルコール類が用いられ, ギ酸アンモニウムや酢酸などの電解質が添加される場合が多い。本法では一般的に電流値は低く, ジュール熱発生が小さいこと, すなわち高印加電圧での迅速分析が可能であること, 水系への溶解性や安定性に劣る試料やキラルセクターへの適用が可能であること, MS との結合が容易であること, 水系と比較して選択性が異なることなど, 多くの有利な点が挙げられる。特に, 水系の CE では相互作用が弱いと考えられる, キラルなイオン対試薬が有効となる場合が多い。(+) -カンファースルホン酸添加の NACE による塩基性薬物の光学異性体の分離<sup>25)</sup>やキニーネ類添加の NACE によるアミノ酸誘導体の光学異性体の分離<sup>26)</sup>が報告されている。水系の CE では困難であった 1-フェニルエチルアミン等の第一アミノ化合物の光学異性体分離が, キラルなクラウンエーテルである 18-クラウン-6 テトラカルボン酸 (18C6H4) を添加したホルムアミドを泳動液とする NACE で達成されている<sup>27)</sup>。この泳動液にテトラブチルアンモニウムを添加することで, 光学異性体の分離が改善されている。NACE による光学異性体の分離については総説<sup>28)29)</sup>もあるので参照されたい。また, 非水系溶媒は後述の CEC でも適用が多い。

## 2.2 CEC (CEC vs HPLC)

CEC は, マイクロ HPLC と CE とを組み合わせたハイブリッド型の分析法である。CE 装置を用いて分離カラムであるキャピラリー管の両端に高電圧を印加して, 発生する EOF により移動相を送液する。キャピラリーカラムでの圧力損失がなく, 粒子径の小さな充填剤を用いることができるので高性能が期待される。原理上, EKC (とりわけ MEKC), あるいは HPLC と同様に中性・イオン性の両化合物が対象となるので, CEC の初期の論文にはそれらとの比較検討した研究報告が多く見られる。CEC の詳細は総説<sup>30)</sup>や特集号<sup>31)</sup>が, また CEC キラル分離についても総説<sup>32)33)</sup>があるので参照されたい。CEC では, キラルセクターを消費しない, CE/MS などのオンライン分析で問題を生じない, HPLC で開発されたキラルカラムテクノロジーを応用できるなどの特長がある。反面, キャピラリー製作 (充填やフリット作製など) に技術を要し, EOF を発生させるための工夫もいる。

CEC はカラムの違いから大きく三つに分類されることが多い。最初に CEC に適用されたのは中空キャピラリー CEC (OT-CEC) である。これは GC で進展したキャピラリー内壁面に固定相を生成させた, いわゆる WCOT キラルカラムを CE 装置に装着して分析を行うというものである。1992 年に Schurig らがメチル化  $\beta$ -CD をキラル部位とした, いわゆる Chirasil-Dex 固定相を内壁被覆したキャピラリーカラムにより, 最初の OT-CEC による光学異性体の分離を報告<sup>34)</sup>してから, その簡便性や高性能からいくつかの報告がなされている。

当初は同一カラムを GC, 超臨界流体クロマトグラフィー (SFC), マイクロ HPLC と異なるモードで適用し, 比較検討した結果が報告されている<sup>35)</sup>。CEC として使用した場合は, 未処理のキャピラリーと比較して EOF が 30% 低下し, 移動時間が長くなっている。キラルセクターとしては CD 類を用いたもの<sup>34)~36)</sup>が多いが, ヒト血清アルブミン (HSA)<sup>37)</sup>, ウシ血清アルブミン (BSA)<sup>38)</sup>, アビジン<sup>39)40)</sup>などのタンパク質, HPLC で有用であることが分かっているセルロース系多糖類<sup>41)</sup>なども検討されている。固定化には物理吸着法, シリル化剤による共有結合法, ゼルゲル法などが用いられている。OT-CEC では, 一般に移動相に対する固定相量が少ないので保持が弱く, 分離が不十分であることが多い。内径の小さなキャピラリー管が用いられるが, その場合は感度が劣る。これらの改善策として, 固定相の厚みを厚くする<sup>41)</sup>とか, エッチングとか特殊な処理により内表面積を増やす<sup>40)~42)</sup>などの方法が検討されている。また, 感度についてはバブルセルの使用<sup>40)</sup>も試みられている。

一方, いわゆる充填剤を“充填”して調製した充填型キャピラリーを用いる CEC (P-CEC) と, キャピラリー内で重合反応等を行って固定相を調製するモノリス型キャピラリーを用いる CEC (M-CEC) の研究が盛んに行われている。前者の場合は, 従来の HPLC で開発されたキラル固定相が適用できるメリットがある。方法論的には, 通常の ODS 等のアキラルな充填型キャピラリーを用いて, 移動相にキラルセクターを添加する手法もある。この手法では上記 CE による光学異性体の分離と同じで, 添加するキラルセクターの濃度や種類による選択性の改善が容易であることが利点となる。キラルな充填剤としては, HSA<sup>43)</sup>や  $\alpha_1$  酸性糖タンパク質 ( $\alpha_1$ -AGP)<sup>44)</sup>などのタンパク質, バンコマイシン<sup>45)46)</sup>やテイコプラニン<sup>47)48)</sup>などの抗生物質, CD 誘導体<sup>49)50)</sup>, Pirkle 型<sup>51)52)</sup>のほか, 最近では HPLC で汎用されている chiralcel OD や chiralpak AD のような多糖類型キラル充填剤<sup>53)~55)</sup>を適用した報告が目立つ。多糖類型キラル充填剤では, 水-有機溶媒混液系での適用<sup>53)</sup>のほか, 非水系溶媒でも検討<sup>54)55)</sup>が行われている。HPLC と同様に移動相組成, カラム温度, 有機溶媒の種類, 充填剤の粒子 (ポアサイズ, 粒子径) などが光学異性体の分離に影響を及ぼす。充填する必要があるため, 従来の CE と比較してやや広い内径 (50~100  $\mu\text{m}$ ) のキャピラリー管が用いられ, 3  $\mu\text{m}$  以下の微小粒子径のものが使用されている。これらのカラムはマイクロ HPLC でも使用できるので比較検討がされているが, 同一条件下では CEC のほうが高性能であることが報告されている。Chiralcel OD を内径 100  $\mu\text{m}$  のキャピラリー (全長 32.5 cm) に 24 cm ほど充填したカラムを, 10 mM 酢酸アンモニウムを含むメタノールを溶媒とした非水 CEC で用いた検討結果<sup>55)</sup>では, マイクロ HPLC では 1 万段前後であったピーク理論段数が 2~4 万段となっており, 前者では分離されなかったもの, あるいは不十分であったエナンチオマーの分離が達成されている。

モノリス型キャピラリーカラムは, 重合反応等により固定相をキャピラリー管の内部に形成させもので, 充填型のキャピラリーカラムと比較してフリット作製の必要はなく, 充填行為がないのでカラム間のばらつきも少ない。Allyl 化した CD 誘導

体<sup>56)57)</sup>や 18C6H<sub>4</sub><sup>58)</sup>をアクリルアミド等とともにキャピラリー内に導入し, いわゆるゲル化反応により重合させ, 固定相を作製させたカラムでの光学異性体の分離が検討されている。化合物にもよるが 1 m あたり 10 万段以上の理論段数が得られている。別にシリカ基材のキラルモノリスカラムが, ゼルゲル法<sup>59)60)</sup>や多孔質シリカ充填剤の焼結溶融<sup>61)</sup>等により作製されている。HPLC との比較では 2~3 倍の高い理論段数が得られている。モノリス型キャピラリーカラムの HPLC 及び CEC への適用については総説もあるので参照されたい<sup>62)</sup>。そのほかにモレキュラーインプリント (MIP) 法によって調製されたキラルカラムが, 上記の O-CEC, P-CEC 及び M-CEC いずれにおいても適用検討されている<sup>63)~65)</sup>。しかし, MIP カラムでは現在までのところ, ピークの理論段数, 特に後から溶出する MIP に対してアフィニティーの高いエナンチオマーの段数が低い。

CEC ではキャピラリー製作 (充填やフリット作製など) に一種のテクニックを要するので実用に適していないが, CEC で開発・適用されたマイクロな注入法, 送液法, 検出系などの新技術は逆に HPLC に応用され, 近年のマイクロ HPLC の発展に寄与している。CEC-LC 兼用装置も市販されていることから想像されるが, CEC と HPLC は相補的に利用されてゆくものと思われる。更に以下に述べるマイクロチップでは, O-CEC あるいはモノリス型の固定相が有望と思われる。

### 2.3 CITP, CIEF 及び CGE (セミ分取)

CE (CZE) で高性能化が報告された後, 旧来の電気泳動モードであるゲル電気泳動法や等電点電気泳動法においても, キャピラリー管を用いる高性能化検討がなされ, CGE, CIEF として発展した。一方, 等速電気泳動法 (ITP) は, 従来から細管式等速電気泳動 (CITP) として進展した経緯がある。これらのモードでは, 光学異性体の分離というよりは, セミ分取を目的とした (キャピラリー管を用いない) 光学異性体の分離報告が多い。ITP では, その濃縮効果あるいは複雑なマトリックスからの精製効果を利用した検討が報告されている<sup>66)~68)</sup>。Dankova らは, ITP を濃縮・精製に使用し, オンラインで結合した CZE (ITP-CZE) により, 90 成分からなるマトリックス中のトリプトファンの光学分離に成功した<sup>66)</sup>。一方, CGE では CD などをゲル内に固定化, あるいは泳動液に添加して光学異性体の分離を行う<sup>69)</sup>。これらの手法により, ほぼ mg 単位のセミ分取が達成<sup>67)~69)</sup>されている。また, Vigh ら<sup>70)</sup>により, 従来は光学異性体の分離に適していないと考えられていた CIEF での検討がなされ, Dns-フェニルアラニンの mg/h レベルのエナンチオマー分取が報告されている。

### 2.4 マイクロチップ電気泳動

近年のチップテクノロジーの進展は, 分析化学に新たな分野を提供した。本誌においても 1998 年の進歩総説<sup>71)</sup>に加え, 2002 年 5 月号では「マイクロチップを用いる分析化学」としての特集企画が掲載されている。癌をはじめとする各種疾病の診断用 DNA チップやタンパクチップの実用化に向けた研究は, 国家プロジェクトとしての推進が確定している。CE では, その分離溶液の駆動に特殊な装置は要らず電極を装着すれ

ばよいので、CE 自体がマイクロチップ化に適していると言える。特に DNA 解析の分野で急速に進展しており、既に国内外の 3 社のメーカー（島津製作所，Agilent 社，日立電子）から装置が市販された。特長として，他のマイクロ流体システムと同様にダウンサイジング化によるスケール効果が挙げられ，従来の分析法に比べて大幅なハイスループット化が実現されている<sup>72)73)</sup>。1999 年からはマイクロチップ電気泳動法による光学異性体の分離が報告され始めた<sup>74)~77)</sup>。Hutt ら<sup>74)</sup>は蛍光ラベル化されたアミノ酸誘導体（Val, Ala, Glu, Asp）の光学異性体の分離を，CD 修飾 MEKC モード（ $\gamma$ -CD, SDS）により，200 秒前後で終了したと報告している。また，Schwarz ら<sup>76)</sup>は，カルボキシメチル化  $\beta$ -CD（CM- $\beta$ -CD）をキラルセクターとした CZE により，カテコールアミン類の光学異性体の分離を 180 秒以内で終えている。CM- $\beta$ -CD を含む泳動液への 18-クラウン-6 の添加が光学異性体分離に有効であったとも報告している。

### 3 キラルセクター/CE 法での添加剤

#### 3.1 CD 誘導体

CD 誘導体は，CE による光学異性体の分離において最も汎用されているキラルセクターである<sup>78)</sup>。D-(+)-グルコピラノースが 6 個，7 個及び 8 個環状になったものは以前より  $\alpha$ -， $\beta$ -及び  $\gamma$ -CD として分析に適用されていたが，ここ数年で様々な CD 誘導体が市販されるようになった。これらはグルコピラノースの 2 位，3 位及び 6 位の水酸基に対して修飾がなされたものである。電気的中性な CD 誘導体として，上記 3 種類の CD にメチル基，ヒドロキシプロピル基，ヒドロキシエチル基などを導入したものがあ

一方，電荷を持つ CD 誘導体としては，リン酸化，硫酸化，スルホブチルエーテル化，スルホエチルエーテル化，スクシニル化，カルボキシメチル（CM）化，カルボキシエチル化したものが陰イオン性の誘導体として，アミノ基を導入したものが陽イオン性の誘導体として利用できる<sup>93)</sup>。両性の CD 誘導体や CD を重合したポリマー CD も市販されている。高価なものも多いが，CE では使用量が少なく済むという利点を活かせる。

これら市販の CD 誘導体，例えば DM- $\beta$ -CD や硫酸化 CD などでは反応を制御して合成されたものではないため，使用する（購入した）試薬メーカーの違いあるいはバッチの違いにより分離選択性が大きく異なり，極端な場合は光学異性体の分離がなされないような事例が報告されている<sup>80)81)</sup>。これは置換基の導入率のわずかな違いが原因であることが分かっている。これらを改善すべく，Vigh らのグループを中心に single isomer の合成研究と CE による光学異性体の分離への応用が報告された<sup>82)~84)</sup>。再現性の向上に有効であるほか，CD との結合様式，光学認識機構の解明等では，“混合物”でない CD を使用することが推奨される。

#### 3.2 非環状オリゴ糖，多糖類

マルトデキストリンなどの非環状オリゴ糖やヘパリンなどの多糖類も有用なキラルセクターである<sup>85)86)</sup>。中性糖類としては，マルトデキストリン，アミロース，プルラン，ラミナラン，デキストランなどが用いられている。これらの中では $\alpha$ -

[1-4] 結合を有し，ラセン構造をとることができるデキストリン類が， $\alpha$ -[1-6] 結合からなるデキストラン類よりも広範囲の化合物に対して光学認識能を示している。これはラセン構造に由来してデキストリン類で形成される CD の空洞と類似した，よりフレキシブルな疎水性空洞が光学異性体の分離に有効に寄与していると考えられている。ほかに単糖類や二糖類などの糖類もキラルセクターとして適用され，ピナフチル類の光学異性体分離が報告されている。

一方，イオン性糖類としてはヘパリン，コンドロイチン硫酸類（A, B 及び C），ペクチンやコロミン酸のような天然多糖類のほかに，デキストラン硫酸，ペントサン硫酸，CM-デキストラン，CM-アミロースや CM-セルロース等，硫酸基や CM 基などのイオン性置換基を導入した合成，あるいは半合成糖類が適用されている。更に，アミノグリコシド系抗生物質であるカナマイシンやストレプトマイシンなども用いられている。

#### 3.3 クラウンエーテル類

クラウンエーテルとしては，18C6H4 が第一アミノ化合物の光学異性体の分離に用いられている。多様なアミノ化合物に対して光学認識能が示されているが高価な試薬である。キラルなクラウンエーテルとして現在市販されているものはこの一種類であるが，近々ピナフチル系のものが数種類，市販予定と聞いている。また，アキラルである 18-クラウン-6 を CD と組み合わせることで，多くの第一アミノ化合物の光学異性体の分離が達成されている。

#### 3.4 キラル界面活性剤

HPLC では使用されていない CE 独特のキラルセクターとして，キラルな界面活性剤がある。MEKC による光学異性体の分離では天然の胆汁酸塩類のほかに，極性部位にアミノ酸や糖類を用いた合成キラル界面活性剤が適用されている<sup>87)</sup>。更に，近年ではポリマー型の界面活性剤が多種類合成され，MEKC による光学異性体の分離に適用された<sup>88)</sup>。

#### 3.5 抗生物質

マクロサイクリックな抗生物質は光学認識能に優れており，数種類の HPLC キラルカラムが市販され，様々な化合物が光学異性体分離されている。CEC でも適用が報告されているが，抗生物質をキラルセクターとして添加した検討も多数ある<sup>89)</sup>。リファマイシン類，リストセチン，テイコブラニン，バンコマイシン，アボバルシン，ツボクラニンなどが適用されているが，これらには強い UV 吸収があるので部分注入法などの工夫が必要である。

#### 3.6 ペプチド，タンパク質

タンパク質も光学認識能に優れ，多くの HPLC キラルカラムが市販されている。CE による光学異性体の分離においても，HPLC で適用された BSA, HSA,  $\alpha_1$ -AGP, アビジン，オボムコイドなどのタンパク質が適用されている<sup>90)91)</sup>。抗生物質と同様に強い UV 吸収があるので部分注入法が用いられる場合が多い。また，カラム内壁への吸着も起こるので，コーティングキャピラリーが用いられる。一方，ペプチド類をキラルセ

クターとして適用する検討も報告されている。なお、HPLCと異なり、CEではタンパク質は固定化されていないので、単に光学異性体分離する以外に、各エナンチオマーのタンパク質に対する結合定数の計測がCEでは可能である。

### 3.7 その他

CEによる光学異性体の分離では、溶解する化合物はキラルセクターとして適用できる。UV吸収のないものを使いやすいが部分注入法などを用いればよい。上記以外のキラルセクターとしてカリックスアレーン類<sup>(92)93)</sup>の適用が報告されている。その他、配位子交換能を持つ化合物が金属とともにキラルセクターとして用いられている<sup>(94)95)</sup>。L-ヒスチジン、アスパルテール、*N,N*-ジデシル-L-アラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリンなどと銅(II)との錯体がアミノ酸誘導体類の光学異性体分離に適用され、良好な結果が報告されている。

### 4 CEによる光学異性体分離分析の実際

光学異性体分離の目的の一つは、光学活性な化合物、特に農薬や医薬品などの安全性や有効性を確保するための品質評価法の設定にある。HPLCキラルカラムが普及するようになったことから、医薬品開発で適用されるICH品質ガイドライン(Q6A)により、キラルな不純物についても従来の不純物と同様に試験法を設定し、評価することが規定された。キラルな不純物に対して必要とされる試験法をフローチャートとして示したものをガイドラインから引用し、図1<sup>(12)</sup>に示す。1日最大投与量が2gを超えない、バイオ医薬品や発酵生成物などを除く通常の合成医薬品の場合であれば、0.15%未満の不純物が安

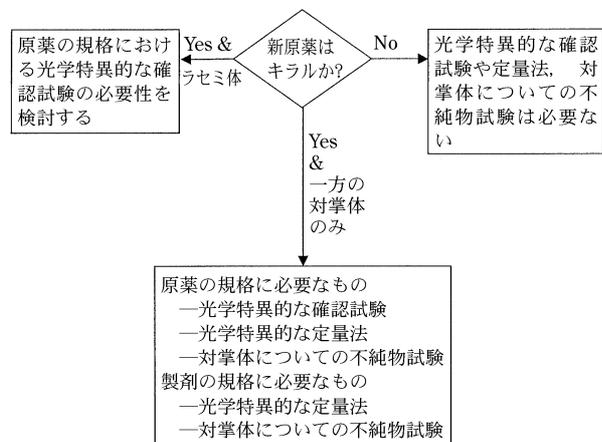
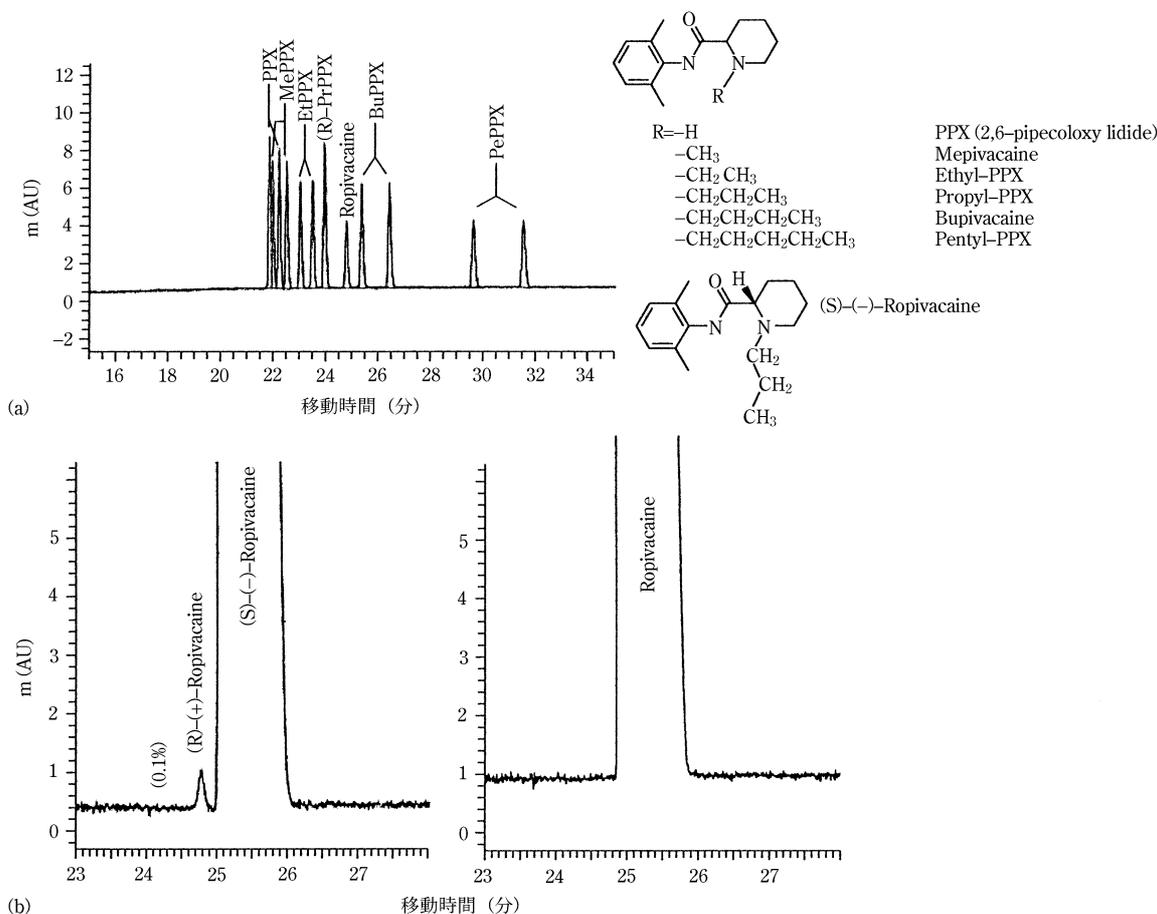


図1 キラルな原薬及びキラルな原薬を含む新製剤における確認試験、定量法ならびに対掌体についての不純物試験の設定フローチャート。



(a) ロピバカインのマイナーエナンチマー(4R体)を含む関連化合物(エナンチオマー)の一斉光学分離; (b) ロピバカインのマイナーエナンチオマーの検出限界(0.1%)。印加電圧: 30 kV, 分離管: 50  $\mu$ m i.d.  $\times$  80.5 cm (有効長 72.0 cm), 検出: 206 nm, 温度: 30  $^{\circ}$ C。

図2 ロピバカイン(4S体)のDM- $\beta$ -CDを用いるCZEによる光学純度試験法

全性確認の閾値となっており、0.1%レベルのエナンチオマー評価法の設定が目標となる。現状のCEによる光学異性体の分離ではエナンチオマー間の分離度が大きく、検出等で感度に問題がない場合は、このレベルを十分評価できる。HPLCと同様に対象とするマイナーなエナンチオマーが先に移動するほうが好ましいが、CEではエナンチオマーの移動順の操作が比較的容易にできる利点がある。光学純度試験の一例として、1996年の報告だが、局所麻酔薬であるロピバカインの例<sup>96)</sup>を図2に示す。0.1 M リン酸溶液(トリエタノールアミンでpH 3.0に調整)にキラルセクターとしてDM- $\beta$ -CDを10 mM添加し、+30 kVでCZE分析を行っており、マイナーエナンチオマーの0.1%が良好に評価されている。また、同条件下でロピバカイン関連物質の分離(エナンチオマー分離)も可能であることが示されている。

CEの公定法としての採用に関しては1998年までの状況を本誌談話室<sup>97)</sup>で紹介したが、その後、若干の進展があった。公定書への収載としては、アメリカ薬局方(USP)が最も早く、第24改正USPのSupplement 2(2000年5月1日)で、ヨーロッパ薬局方(EP)ではThird Edition Supplement 2001にCE法が新規収載された。日本薬局方(JP)では第14改正(2001年4月1日)の段階でも一般試験法としての新規収載はないが、ICHでの試験法に関する国際調和の進展とともにポリアクリルアミド電気泳動法等とあわせて収載されるものと予想される。実際の医薬品のCE分析法(公定法)としては、1997年のUSPフォーラムにホウ酸エピネフリン点眼液と塩酸エタンブール錠の各定量法が公表されている。前者では泳動液にDM- $\beta$ -CDを用い、光学選択的な定量法となっている。両定量法とも内標準(IS)法を採用し、IS物質に対する試料ピークの面積比でのCV%をそれぞれ2.0%、3.0%以下と規定している。また、ここ1~2年の間でエピネフリン製剤<sup>98)</sup>、塩酸エフェドリン<sup>99)</sup>、メチルドーパ<sup>100)</sup>について、従来のHPLCキラル分離との比較検討が公定書関連雑誌に報告された。いずれもCD類をキラルセクターとしている。CEによる試験法を設定するにあたっての分析法バリデーションに関しては、2000年8月にFDAから公表されたガイドライン(ドラフト版<sup>101)</sup>や成書<sup>102)</sup>が参考になる。個別の対象化合物の泳動条件最適化では、実験計画法を用いた手法の報告も増えている。しかし、実際にCEを医薬品開発に適用したケースについては、申請関連資料ということで公表されないことが多く、実態は把握しにくい。推測だが、いわゆる代替法(alternative procedures: 医薬品の承認申請書記載方法と同等あるいはそれ以上にうまく管理できる方法のこと)としての地位は、特に欧州では確立されているように思われる。

## 5 総括

ここ数年でのCEの発展は目覚しく、研究の中心はナノテクノロジーを核とした次段階に移行しつつある。CEはヒトゲノム解析で貢献があったものの、光学異性体の分離分析を含めHPLCがテリトリートとしている応用分野では、実用化の観点からは成功したとは言いがたい。上記のように、医薬品開発においては定量法や純度試験法において代替法という位置付けで採用されていると思われるが主役ではない。今後のCE/MSの発

展とCEで培われた技術が次世代の分離分析法として実用化されることを期待したい。

## 文 献

- 1) F. E. Mikkers, F. M. Everaerts, T. P. E. M. Verheggen: *J. Chromatogr.*, **169**, 11 (1979).
- 2) J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs: *Anal. Chem.*, **53**, 1298 (1981).
- 3) 西 博行: ぶんせき, **1997**, 559.
- 4) S. Fanali, (Ed.): *Electrophoresis*, **18**, 841 (1997).
- 5) S. Fanali, (Ed.): *Electrophoresis*, **20**, 2577 (1999).
- 6) Z. El Rassi, (Ed.): *Electrophoresis*, **21**, 3871 (2000).
- 7) S. Fanali, B. Chankvetadze, (Eds.): *Electrophoresis*, **22**, 3077 (2001).
- 8) H. Nishi, S. Terabe (Eds): *J. Chromatogr. A.*, **875**, 1 (2000).
- 9) B. Chankvetadze: "Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis", (1997), (John Wiley & Sons, New York).
- 10) B. Chankvetadze, (Ed.): *J. Chromatogr. A.*, **906**, 1 (2001).
- 11) B. Chankvetadze, J. Crommen, (Eds.): *J. Pharm. & Biomed. Anal.*, **27**, 355 (2002).
- 12) ICH ガイドライン Q6A 「新医薬品の規格及び試験方法の設定に関するガイドライン」
- 13) H. Wan, L. G. Blomberg: *J. Chromatogr. A.*, **875**, 43 (2000).
- 14) S. Izumoto, H. Nishi: *Electrophoresis*, **20**, 189 (1999).
- 15) I. S. Lurie: *J. Chromatogr. A.*, **792**, 297 (1997).
- 16) M. Fillet, Ph. Hubert, J. Crommen: *J. Chromatogr. A.*, **875**, 123 (2000).
- 17) H. Nishi: *J. High Res. Chromatogr.*, **18**, 659 (1995).
- 18) B. Chankvetadze, I. Kartoza, N. Burjanadze, D. Bergenthal, H. Luftmann, G. Blaschke: *Chromatographia*, **53**, S290 (2001).
- 19) B. Chankvetadze, N. Burjanadze, J. Crommen, G. Blaschke: *Chromatographia*, **53**, S296 (2001).
- 20) C. Calvet, R. Cuberes, C. P. Maseda, J. Frigola: *Electrophoresis*, **23**, 1702 (2002).
- 21) W. X. Huang, H. Xu, S. D. Fazio, V. Vivilecchia: *J. Chromatogr. A.*, **875**, 361 (2000).
- 22) L. Valtcheva, J. Mohammed, G. Pettersson, S. Hjerten: *J. Chromatogr.*, **638**, 263 (1993).
- 23) Y. Tanaka, Y. Kishimoto, S. Terabe: *J. Chromatogr. A.*, **802**, 83 (1998).
- 24) B. Toussaint, M. Palmer, P. Chiap, P. Hubert, J. Crommen: *Electrophoresis*, **22**, 1363 (2001).
- 25) I. Bjornsdottir, S. H. Hansen, S. Terabe: *J. Chromatogr. A.*, **745**, 37 (1996).
- 26) V. Piette, M. Fillet, W. Lindner, J. Crommen: *J. Chromatogr. A.*, **875**, 353 (2000).
- 27) Y. Mori, K. Ueno, T. Umeda: *J. Chromatogr. A.*, **757**, 328 (1997).
- 28) F. Wang, M. Khaleli: *J. Chromatogr. A.*, **875**, 277 (2000).
- 29) B. Chankvetadze, G. Blaschke: *Electrophoresis*, **21**, 4159 (2000).
- 30) L. A. Colon, G. Burgos, T. D. Maloney: *Electrophoresis*, **21**, 3965 (2000).
- 31) Cs. Horvath (Ed.): *J. Chromatogr. A.*, **887**, 1 (2000).
- 32) D. Wistuba, V. Schurig: *Electrophoresis*, **21**, 4136 (2000).
- 33) S. Fanali, P. Catarcini, G. Blaschke, B. Chankvetadze: *Electrophoresis*, **22**, 3131 (2001).
- 34) S. Mayer, V. Schurig: *J. High. Resol. Chromatogr.*, **15**, 129 (1992).
- 35) V. Schurig, M. Jung, S. Mayer, M. Fluck, S. Negura, H. Jakubetz: *J. Chromatogr. A.*, **694**, 119 (1995).
- 36) V. Schurig, S. Mayer: *J. Biochem. Biophys. Methods*, **48**, 117 (2001).
- 37) J. Jang, D. Hage: *Anal. Chem.*, **66**, 2719 (1994).
- 38) H. Hofstetter, O. Hofstetter, V. Schurig: *J. Microcol. Sep.*, **10**, 287 (1998).
- 39) Z. Liu, K. Otsuka, S. Terabe: *J. Sep. Sci.*, **24**, 17 (2001).
- 40) Z. Liu, K. Otsuka, S. Terabe: *J. Chromatogr. A.*, **961**, 285 (2002).
- 41) E. Francotte, M. Jung: *Chromatographia*, **42**, 521 (1996).

- 42) J. J. Pesek, M. T. Matyska : *J. Chromatogr. A.*, **736**, 313 (1996).
- 43) D. K. Lloyd, S. Li, P. Ryan : *J. Chromatogr. A.*, **694**, 285 (1995).
- 44) S. Li, D. K. Lloyd : *Anal. Chem.*, **65**, 3684 (1993).
- 45) H. Wikstrom, L. A. Svensson, A. Torstensson, P. K. Owens : *J. Chromatogr. A.*, **869**, 395 (2000).
- 46) S. Fanali, P. Catarcini, M. G. Quaglia : *Electrophoresis*, **23**, 477 (2002).
- 47) C. Karlsson, H. Wikstrom, D. W. Armstrong, P. K. Owens : *J. Chromatogr. A.*, **897**, 349 (2000).
- 48) C. Karlsson, H. Wikstrom, P. K. Owens, *Chromatographia*, **53**, 419 (2001).
- 49) D. Wistuba, V. Schurig : *Electrophoresis*, **20**, 2779 (1999).
- 50) D. Wistuba, K. Cabrera, V. Schurig : *Electrophoresis*, **22**, 2600 (2001).
- 51) C. Wolf, P. L. Spence, W. H. Pirkle, E. M. Derrico, D. M. Cavender, G. P. Rozing : *J. Chromatogr. A.*, **782**, 175 (1997).
- 52) C. Wolf, P. L. Spence, W. H. Pirkle, D. M. Cavender, E. M. Derrico : *Electrophoresis*, **21**, 917 (2000).
- 53) K. Kawamura, K. Otsuka, S. Terabe : *J. Chromatogr. A.*, **924**, 251 (2001).
- 54) M. Girod, B. Chankvetadze, G. Blaschke : *Electrophoresis*, **22**, 1282 (2001).
- 55) L. Chankvetadze, I. Kartozia, C. Yamamoto, B. Chankvetadze, G. Blaschke, Y. Okamoto : *Electrophoresis*, **23**, 486 (2002).
- 56) T. Koide, K. Ueno : *Anal. Sci.*, **14**, 1021 (1998).
- 57) T. Koide, K. Ueno : *J. Chromatogr. A.*, **893**, 177 (2000).
- 58) T. Koide, K. Ueno : *J. Chromatogr. A.*, **909**, 305 (2001).
- 59) M. Kato, M. T. Dulay, B. Bennett, J. Chen, R. N. Zare : *Electrophoresis*, **21**, 3145 (2000).
- 60) J. Kang, D. Wistuba, V. Schurig : *Electrophoresis*, **23**, 1116 (2002).
- 61) D. Wistuba, V. Schurig : *Electrophoresis*, **21**, 3152 (2000).
- 62) H. Zou, X. Huang, M. Ye, Q. Luo : *J. Chromatogr. A.*, **954**, 5 (2002).
- 63) L. Schweitz, L. I. Andersson, S. Nilsson : *Anal. Chem.*, **69**, 1179 (1997).
- 64) L. Schweitz, L. I. Andersson, S. Nilsson : *Chromatographia*, **49**, 93 (1999).
- 65) J. M. Lin, K. Uchiyama, T. Hobo : *Chromatographia*, **47**, 625 (1998).
- 66) M. Dankova, D. Kaniansky, S. Fanali, F. Ivanyi : *J. Chromatogr. A.*, **838**, 31 (1999).
- 67) D. Kaniansky, E. Simunicova, E. Olvecka, A. Ferancova : *Electrophoresis*, **20**, 2786 (1999).
- 68) P. Hoffmann, H. Wagner, G. Weber, M. Lanz, J. Caslavska, W. Thormann : *Anal. Chem.*, **71**, 1840 (1999).
- 69) A. M. Stalcup, K. H. Gahm, S. R. Gratz, R. M. C. Sutton : *Anal. Chem.*, **70**, 144 (1998).
- 70) P. Glukhovskiy, G. Vigh : *Anal. Chem.*, **71**, 3814 (1999).
- 71) 大塚浩二 : *ぶんせき*, **1998**, 522.
- 72) N. A. Lacher, K. E. Garrison, R. S. Martin, S. M. Lunte : *Electrophoresis*, **21**, 2526 (2001).
- 73) J. Khandurina, A. Guttaman : *J. Chromatogr. A.*, **943**, 159 (2002).
- 74) L. D. Hutt, D. P. Glavin, J. L. Bada, R. A. Mathies : *Anal. Chem.*, **71**, 4000 (1999).
- 75) I. Rodriguez, L. J. Jin, S. F. Y. Li : *Electrophoresis*, **21**, 211 (2001).
- 76) M. A. Schwarz, P. C. Hauser : *J. Chromatogr. A.*, **928**, 225 (2001).
- 77) S. I. Cho, K. -N. Lee, Y. -K. Kim, J. Jang, D. S. Chung : *Electrophoresis*, **23**, 972 (2002).
- 78) S. Fanali : *J. Chromatogr. A.*, **875**, 89 (2000).
- 79) 例えば, Cyclolab 社 (Hungary) カタログ参照 .
- 80) 桑原由佳里, 西 博行, *薬学雑誌*, **119**, 288 (1999) .
- 81) K. Otsuka, S. Honda, J. Kato, S. Terabe, K. Kimata, N. Tanaka : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17**, 1177 (1998).
- 82) J. B. Bincent, A. D. Sokolowski, T. V. Nguyen, G. Vigh : *Anal. Chem.*, **69**, 4226 (1997).
- 83) J. B. Bincent, D. M. Kirby, T. V. Nguyen, G. Vigh : *Anal. Chem.*, **69**, 4419 (1997).
- 84) M. B. Busby, O. Maldonado, G. Vigh : *Electrophoresis*, **23**, 456 (2002).
- 85) H. Nishi, Y. Kuwahara : *J. Biochem. Biophys. Methods*, **48**, 89 (2001).
- 86) H. Nishi : *J. Chromatogr. A.*, **792**, 327 (1997).
- 87) K. Otsuka, S. Terabe : *J. Chromatogr. A.*, **875**, 163 (2000).
- 88) H. H. Yarabe, E. Billiot, I. M. Warner : *J. Chromatogr. A.*, **875**, 179 (2000).
- 89) T. J. Ward, T. M. Oswald : *J. Chromatogr. A.*, **792**, 309 (1997).
- 90) J. Haginaka : *J. Chromatogr. A.*, **875**, 235 (2000).
- 91) Y. Tanaka, S. Terabe : *J. Biochem. Biophys. Methods*, **48**, 103 (2001).
- 92) M. S. Pena, Y. Zhang, I. M. Warner : *Anal. Chem.*, **69**, 3239 (1997).
- 93) T. Grady, T. Joyce, M. R. Smyth, S. J. Harris, D. Diamond : *Anal. Commun.*, **35**, 123 (1998).
- 94) M. G. Schmid, N. Grobuschek, O. Lecnik, G. Gubitz : *J. Biochem. Biophys. Methods*, **48**, 143 (2001).
- 95) Z. Chen, K. Uchiyama, T. Hobo : *Anal. Sci.* : **16**, 131(2000).
- 96) C. E. S. van de Griend, K. Groningsson : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**, 295 (1996).
- 97) 西 博行 : *ぶんせき*, **1998**, 297.
- 98) 新井 隆, 福西武史, 飯川玲子, 林 奈美, *医薬品研究* : **32**, 1 (2001) .
- 99) J. H. McB. Miller, U. Rose : *Pharmeuropa*, **13**, 3 (2001).
- 100) M. Dolezalova : *Pharmeuropa*, **14**, 298 (2002).
- 101) FDA Guidance for Industry, “Analytical Procedures and Methods Validation- Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation, August 2000”.
- 102) 西 博行, 田中喜秀 : “ICH ガイドラインをふまえた分析法バリデーションの実施と具体的な統計手法”, 技術情報協会編, pp. 190-226 (2001) .



西 博行 (Hiroyuki NISHI)

田辺製薬株式会社生産技術研究所分析研究部 (〒532-8505 大阪市淀川区加島3-16-89) 京都大学大学院工学研究科工業化学専攻修士課程修了。薬学博士。現在の研究テーマ キャピラリー電気泳動の医薬品分析への応用, HPLC キラル分離。主な著書 “キャピラリー電気泳動 基礎と実際” (分担執筆)(講談社)。趣味 旅行, 古都散策, 考古学。

E-mail: nishi-h@tanabe.co.jp