

卵殻を母体とした分取クロマトグラフィー

慶應義塾大学 理工学部 応用化学科
専任講師 蛭田 勇樹

2021年12月16日

背景

□高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

医薬品、食品分野など様々な分野で分離技術として利用

◆逆相液体クロマトグラフィー(RPLC)

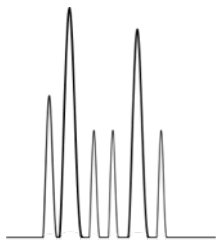
- 分配平衡による分離
- 固定相：低極性 … オクタデシルシリカ (ODS) カラム
- 移動相：高極性 … 水 / メタノール or アセトニトリル

□ODSカラム

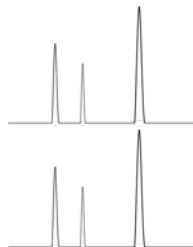
- ◆ RPLCで最も汎用
- ◆ 多孔性シリカゲル粒子にオクタデシル基が修飾

Advantages

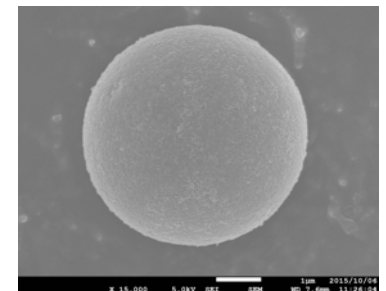
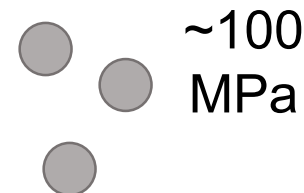
高分離能



高い再現性



高耐圧性



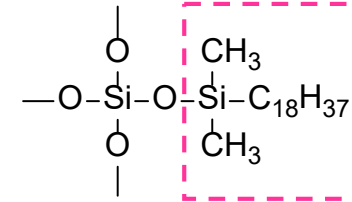
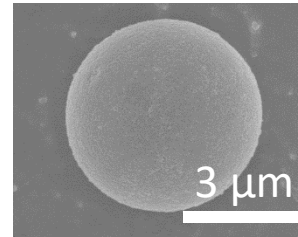
シリカゲルカラムの問題点

□HPLCのためのシリカゲルカラム

◎ 高分離効率

- ✓ 多孔性
- ✓ 高耐圧性
- ✓ シランカップリング剤による修飾

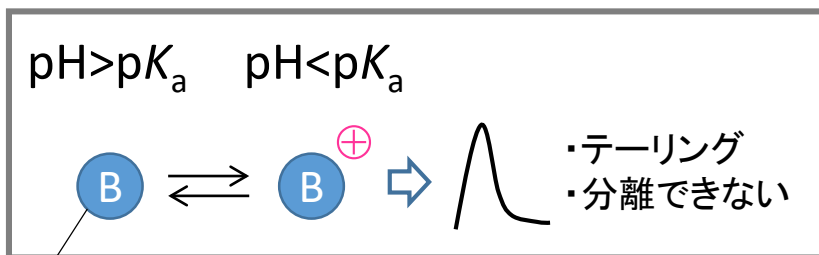
ex.) オクタデシルシリカ (ODS) カラム
✓ 汎用されている逆相カラム



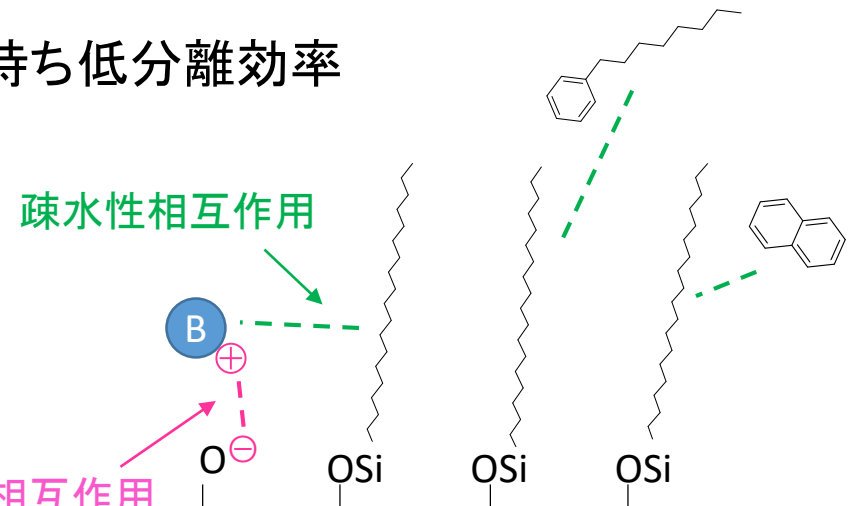
シリカODS 修飾部位

× 低アルカリ耐性

- ✓ Si-O-Si結合が**低アルカリ耐性**
→ アルカリ性移動相が使えない
- ✓ 中性以下で塩基性化合物が正電荷を持ち低分離効率



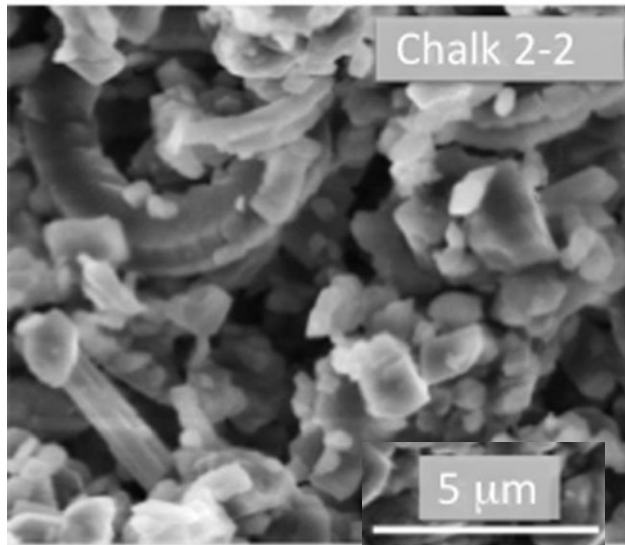
塩基性化合物



高アルカリ耐性の逆相カラムが求められている

クロマトグラフィーの歴史

カラムクロマトグラフィーは、チョークの粉末炭酸カルシウムからスタート



- アルカリ耐性無機材料
- 無害で安価

アルカリ耐性充填剤
への応用可能性



Mikhail Tswett
From Wikipedia

チョークのSEM像

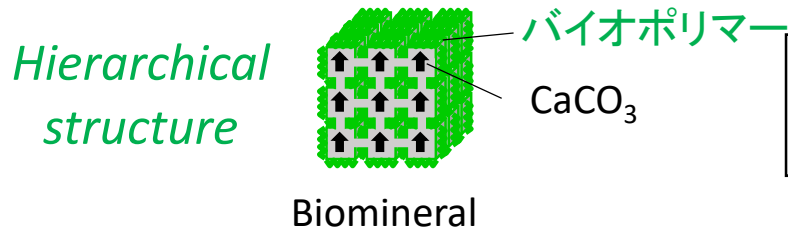
J. Phys. Chem. C, 2017 121(26), 14088-14095

高性能RPLC充填剤にするために

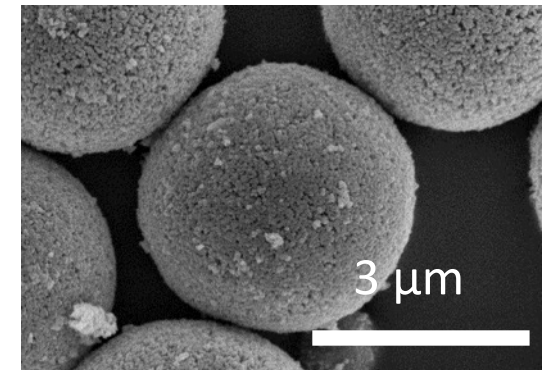
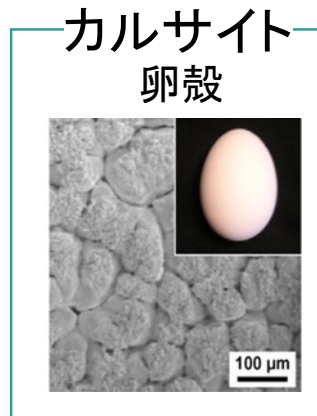
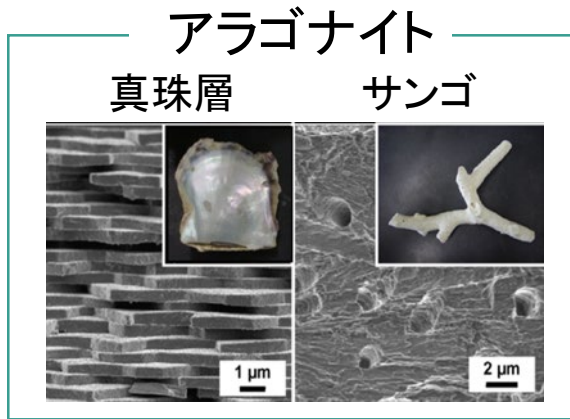
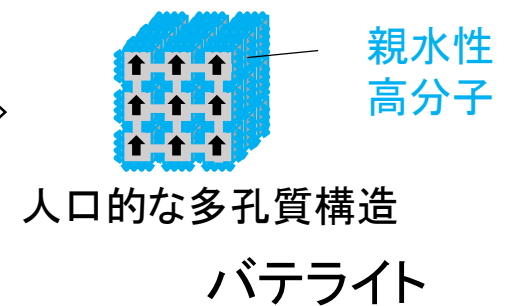
- 多孔性かつ単分散の粒子
- ODSのように均一に有機官能基を表面修飾

炭酸カルシウムからなるバイオミネラル

◆バイオミネラルは階層構造を持つ



◆人口的に合成したCaCO₃



Y. Oaki et al., *Adv. Funct. Mater.*, **2006**, 16, 1633-1639

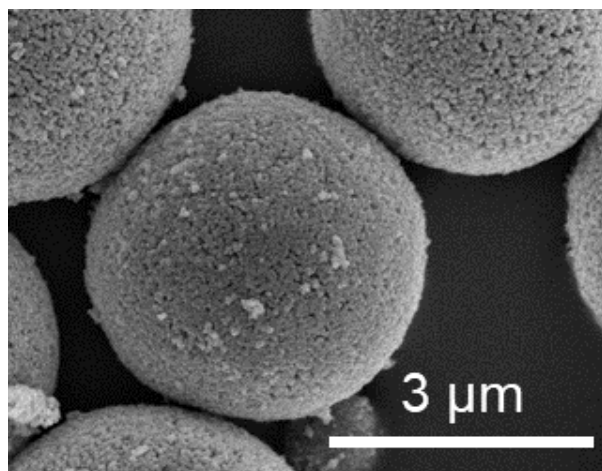
H. Imai et al., *Cryst. Growth Des.* **2012**, 12, 876-882

- ✓ 高いアルカリ耐性
- ✓ 多孔質構造
- ✓ 人体に無毒& 安価

◎高アルカリ耐性充填剤として
適した材料

高アルカリ耐性逆相充填剤

◆ベース充填剤
バテライト CaCO_3
多孔性マイクロスフェア



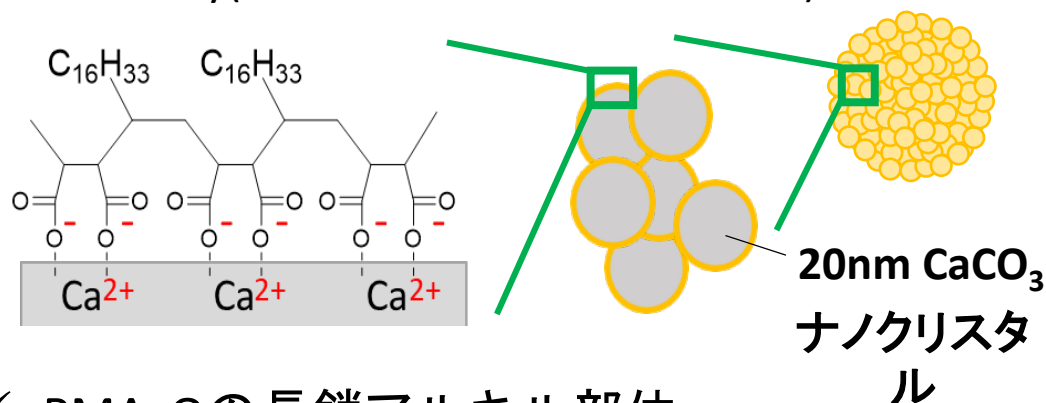
- ✓ 高アルカリ耐性
- ✓ 20 nmの多孔質構造
- ✓ 球状の均一な粒子径

◆表面修飾



両親媒性交互ポリマーによる化学吸着

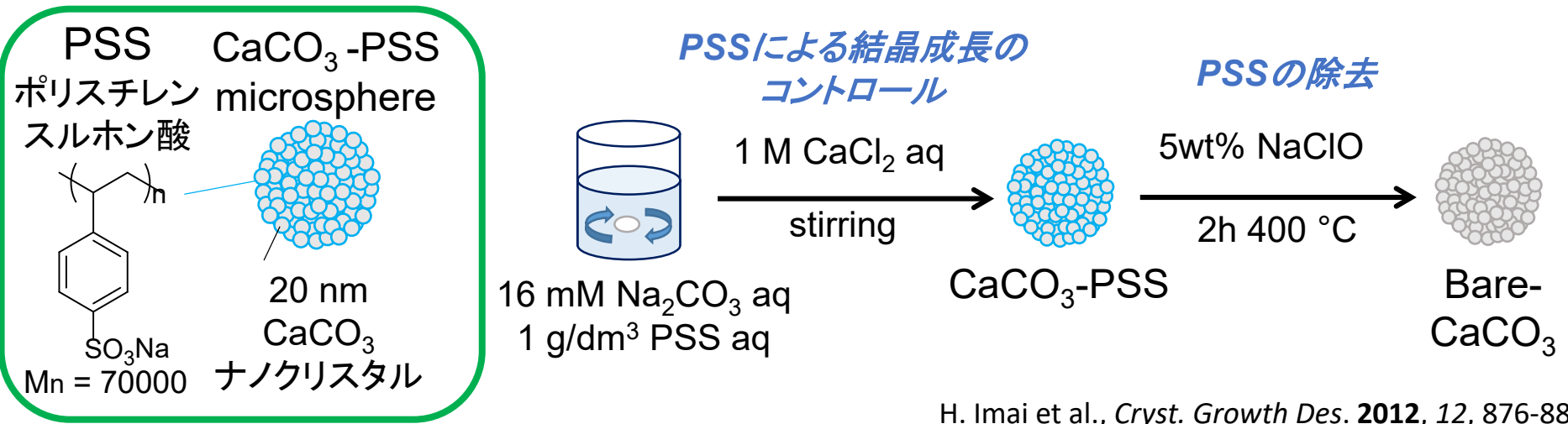
PMaCO : Poly(maleic acid-*alt*-1 octadecene)



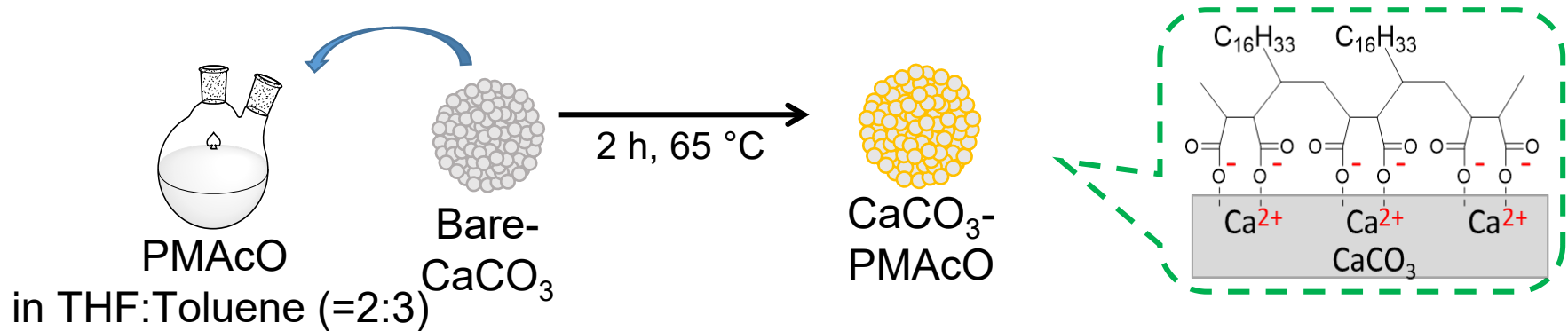
- ✓ PMaCOの長鎖アルキル部位
→ 逆相クロマトグラフィー
- ✓ ポリマー由来の複数の結合サイト
→ 高耐久性

充填剤の合成

□CaCO₃粒子の合成

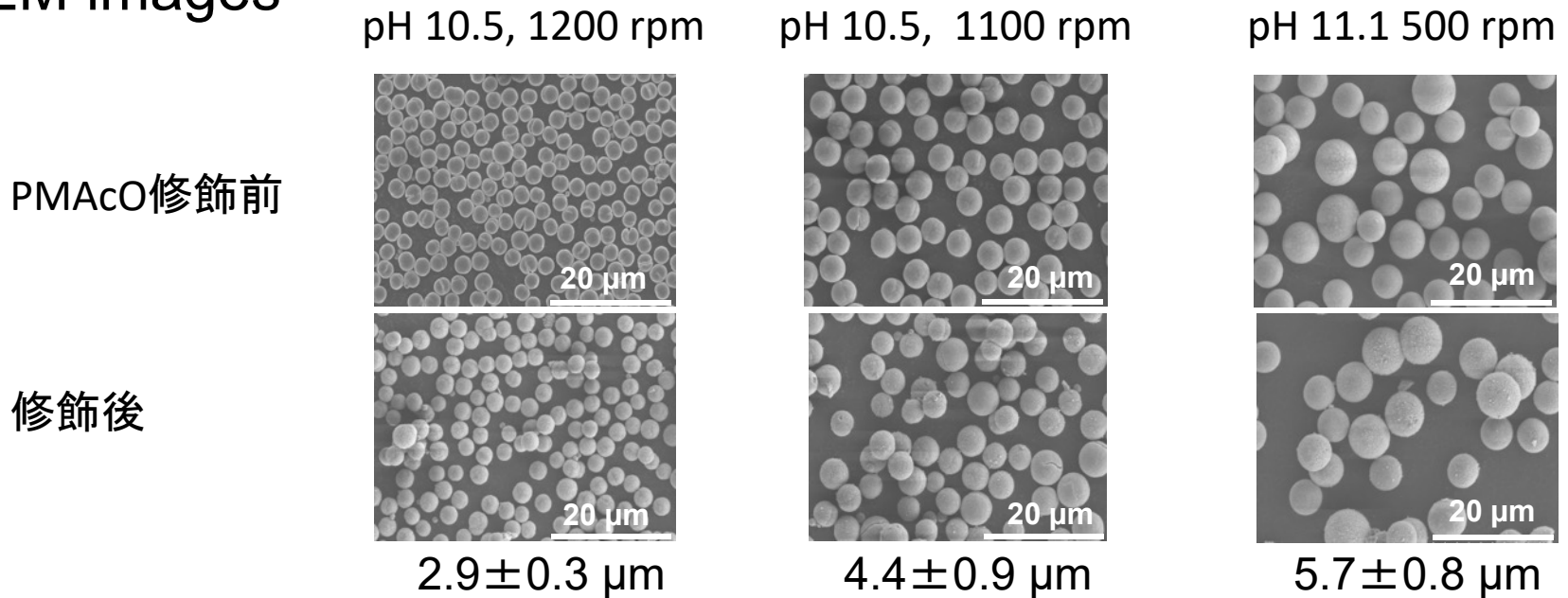


□CaCO₃粒子表面へのPMAcO修飾

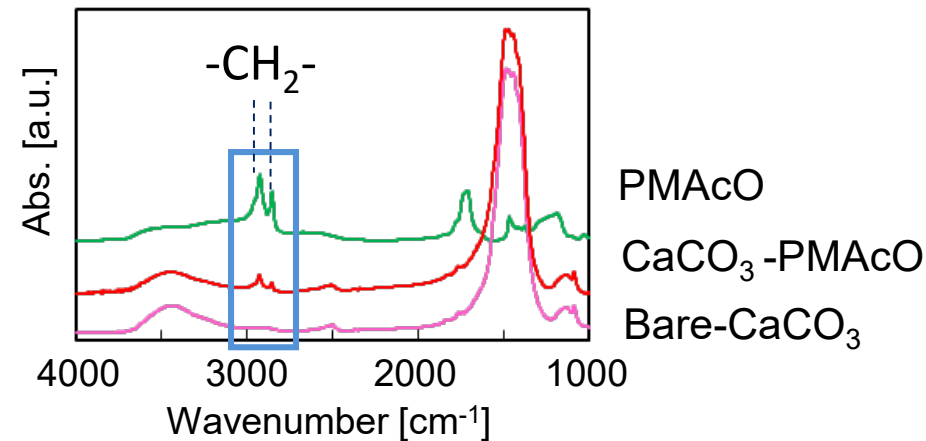


CaCO₃-PMAcOの評価

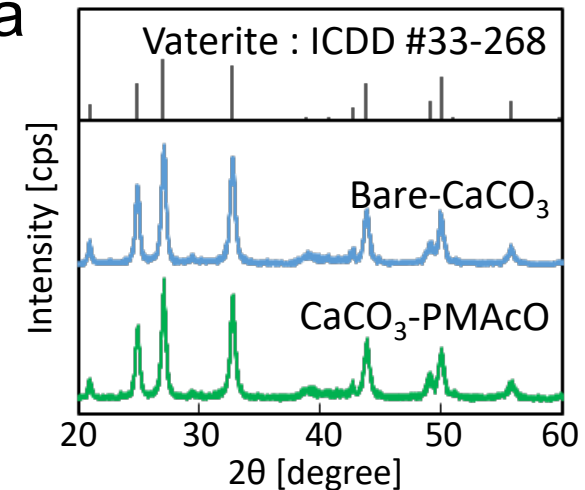
SEM images

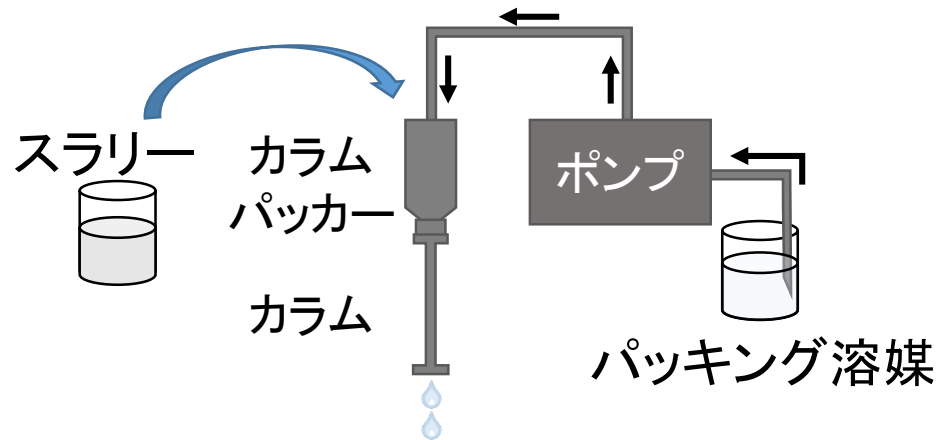


IR Spectra



XRD spectra





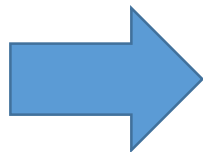
Φ2.1 mm × 100 mm



スラリー溶媒 : Chloroform

パッキング圧力 : 45 MPa

パッキング溶媒 : MeOH (30 min), Water/MeOH=50/50 (60 min)



HPLCによる評価

分離能評価

□ Van Deemter plot

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

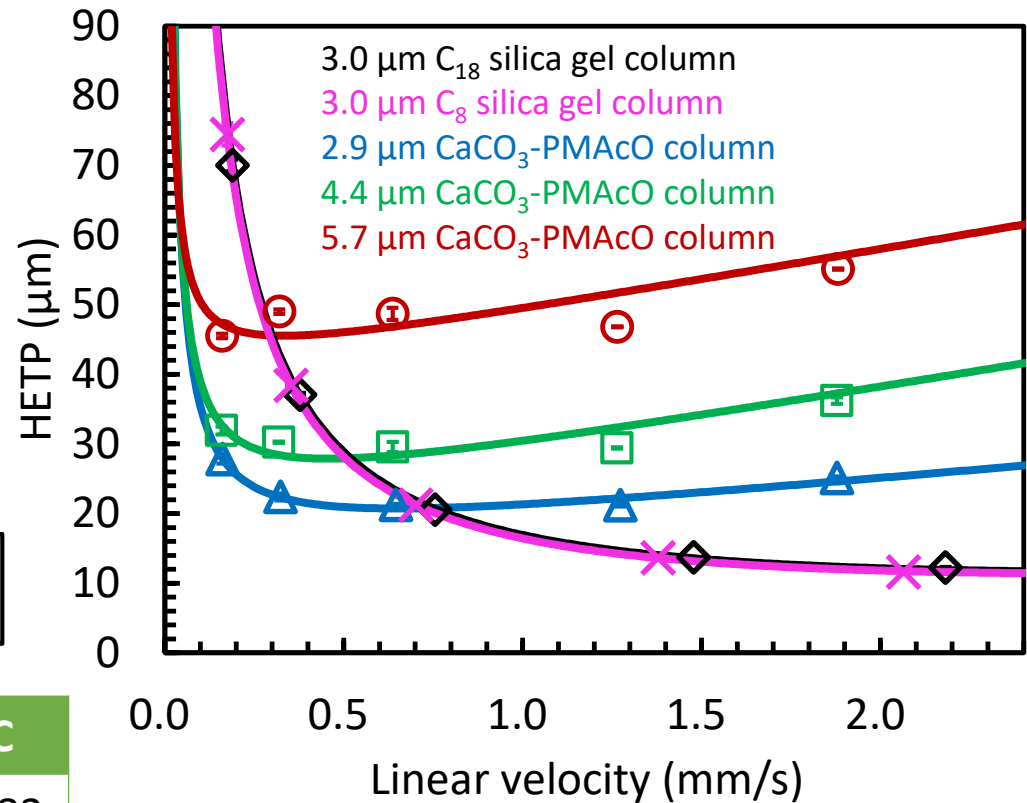
A: 他流路拡散

B: カラム軸方向の拡散

C: 物質移動の項

H (HETP): Height of Equivalent to a Theoretical Plate, u : linear velocity (mm/sec)

Particle size (μm)	A	B	C
2.9	14.5	2.04	4.83
4.4	20.0	1.81	8.70
5.7	39.6	0.995	8.97
C ₁₈ カラム (3μm)	2.59	12.7	1.59
C ₈ カラム (3μm)	2.21	12.6	1.67



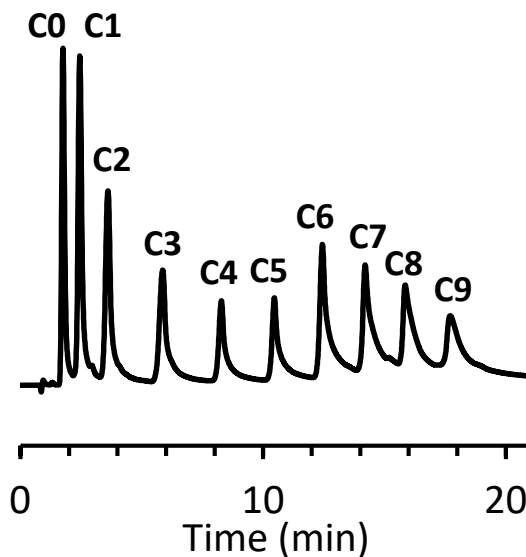
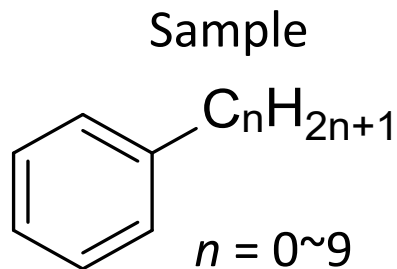
✓ 市販のカラムに匹敵する分離能

疎水性および平面性化合物の分離

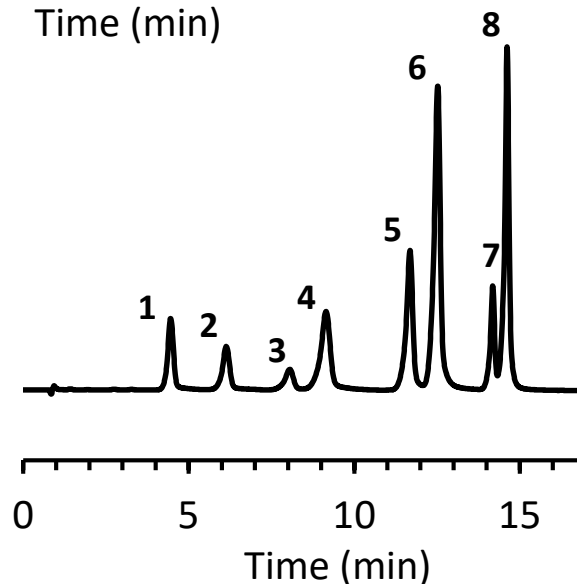
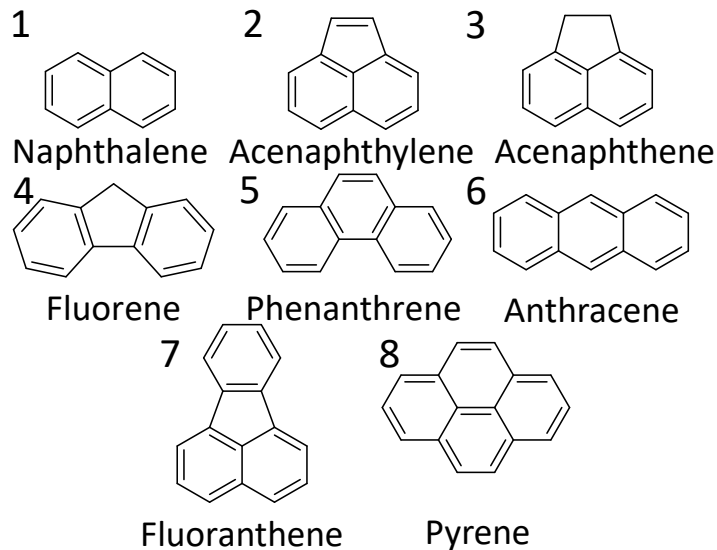
□ Chromatograms

Acetonitrile/Water gradient, flow rate: 0.3 mL/min, 25°C

● Hydrophobicity



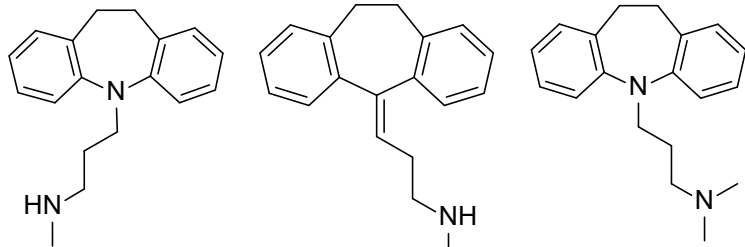
● Planarity



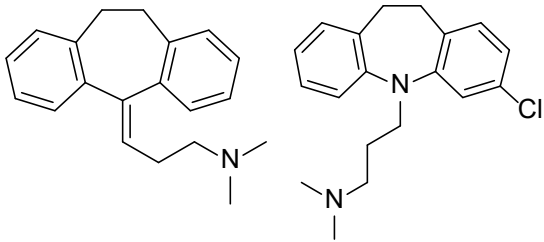
Acetonitrile/Water gradient,
flow rate: 0.3 mL/min, 25°C

アルカリ条件下での塩基性化合物の分離

□三環系抗うつ薬

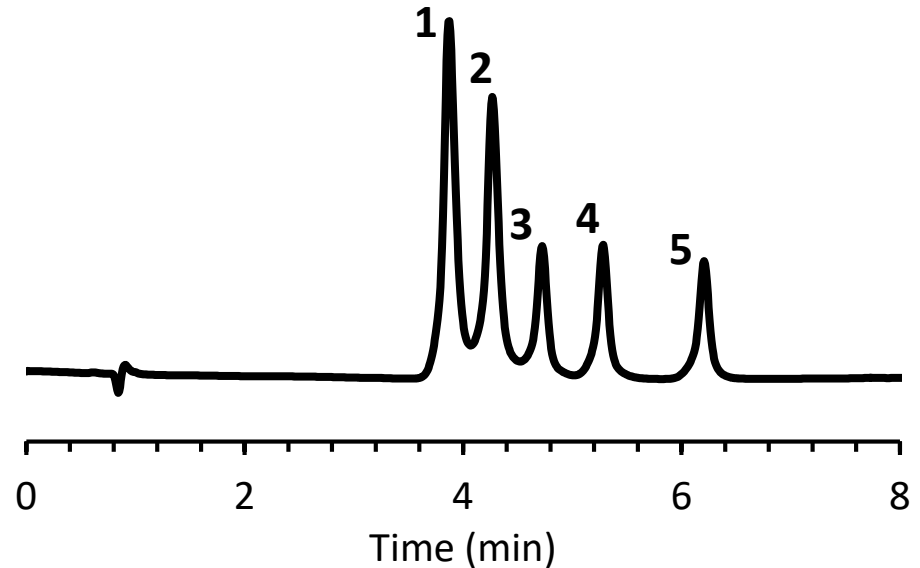


1. Desipramine (10.2) 2. Nortriptyline (9.7) 3. Imipramine (9.7)



4. Amitriptyline (9.4) 5. Clomipramine (9.4)

Acetonitrile/pH 12 NaOH aq gradient,
flow rate: 0.3 mL/min, 25°C

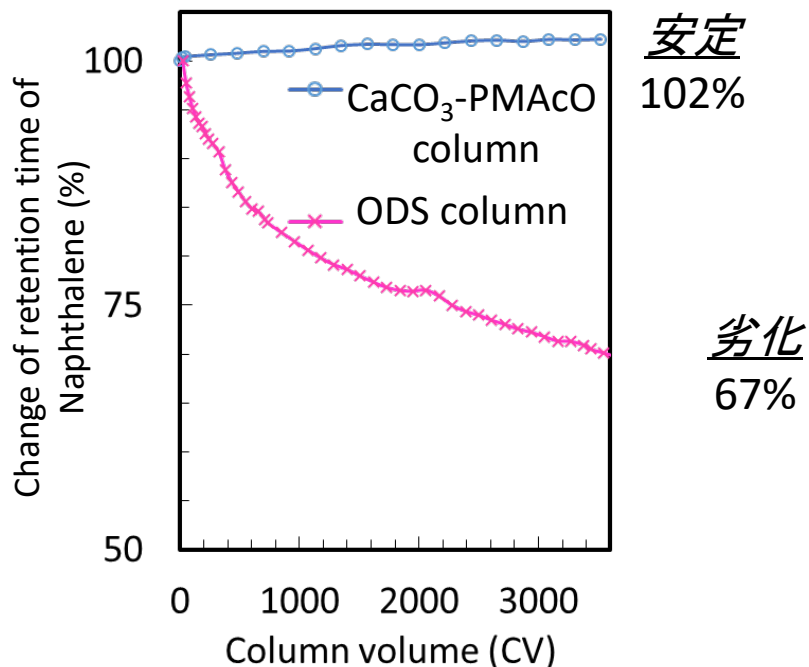


安定にアルカリ移動相での塩基性医薬品の分離を達成

高アルカリ性逆相分析カラム

□アルカリ条件

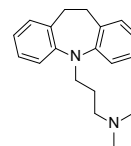
pH 10.8 アルカリ移動相



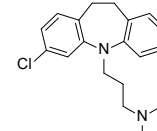
✓ 開発したカラムは
高アルカリ耐性

□塩基性薬物の分離分析

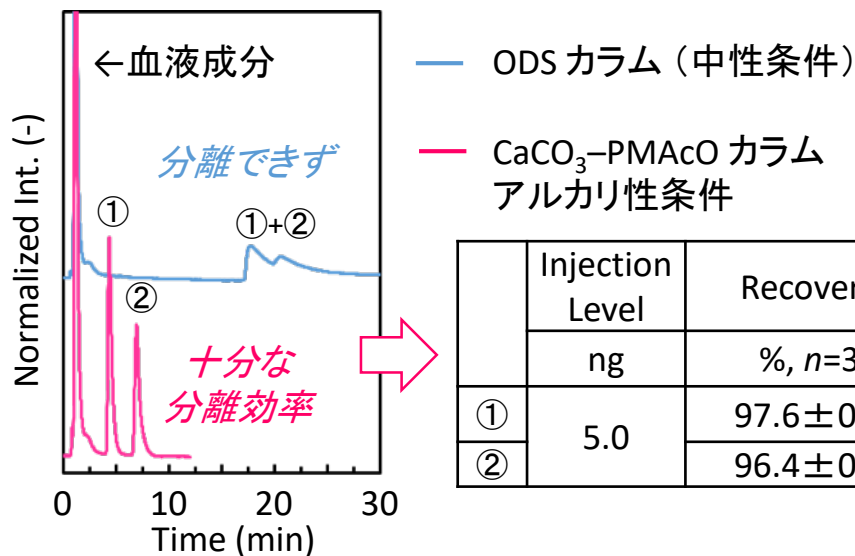
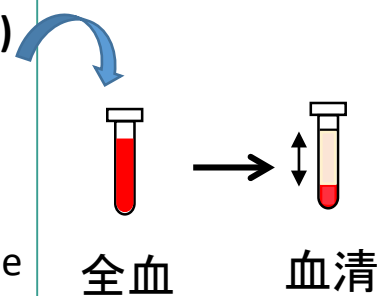
2種の塩基性薬物(向精神薬)



① imipramine
 $pK_a = 9.5$



② clomipramine
 $pK_a = 9.3$



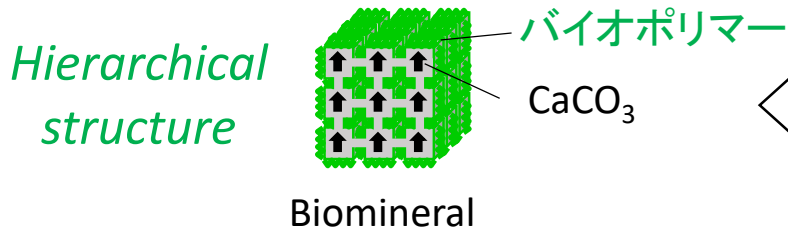
	Injection Level	Recovery
	ng	%, n=3
①	5.0	97.6 ± 0.7
②		96.4 ± 0.2

✓ 塩基性薬物の分離分析に有効

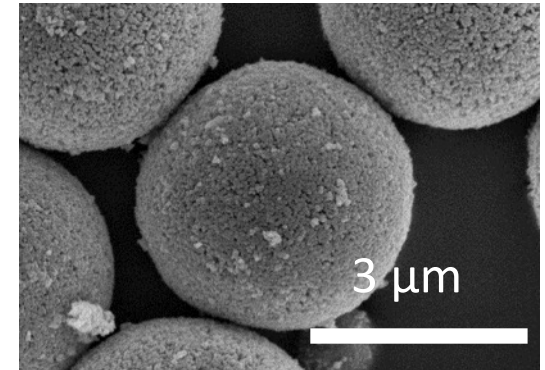
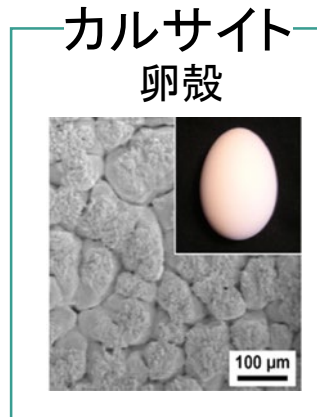
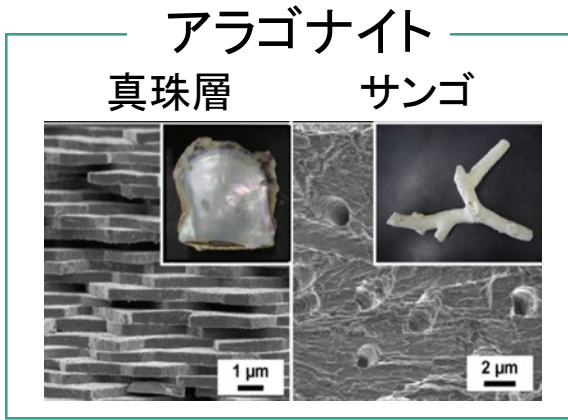
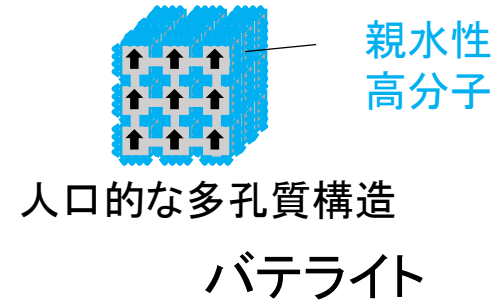
高アルカリ耐性充填剤の開発に成功

バイオミネラルを充填剤に

◆バイオミネラルは階層構造を持つ



◆人口的に合成したCaCO₃



Y. Oaki et al., *Adv. Funct. Mater.*, **2006**, 16, 1633-1639

H. Imai et al., *Cryst. Growth Des.* **2012**, 12, 876-882

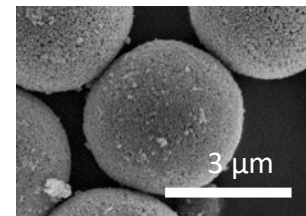
- ✓ 高いアルカリ耐性
- ✓ 多孔質構造
- ✓ 人体に無毒& 安価

◎高アルカリ耐性充填剤として
適した材料

安価な原料を利用した高アルカリ耐性逆相充填剤

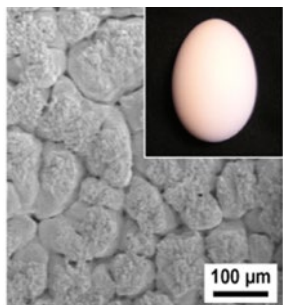
□分取カラム用充填剤

- × シリカゲルベースの充填剤はアルカリ耐性が低い
- × 分析カラムに比べて、大量充填剤が必要 → × 高価
- × 人口的に多孔性粒子を合成することは
コストとスケールアップの面で課題あり

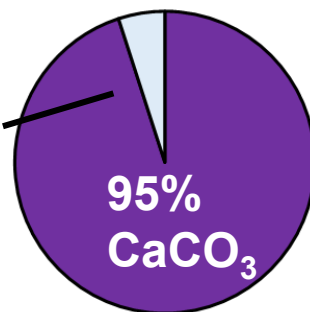


□コンセプト

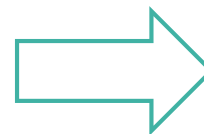
卵殻を充填剤のベースに応用



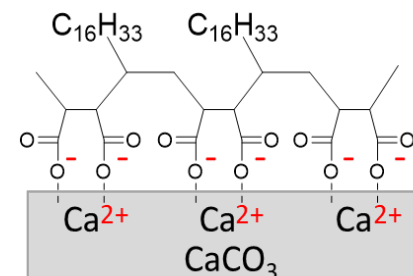
5%
biopolymer,
moisture



逆相
HPLC



PMAcO による表面修飾

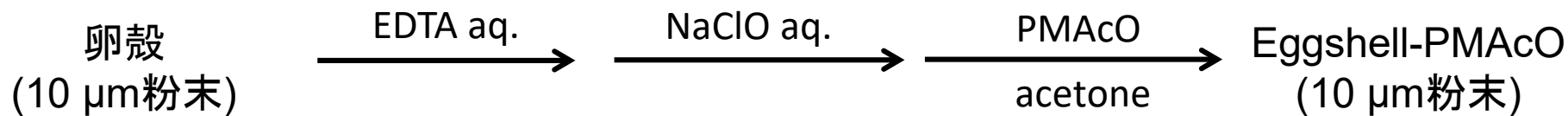


- ◎ 高アルカリ耐性
 - ◎ 安価
 - ◎ 大量に入手可能
 - ◎ 食品廃棄物のリサイクル
-

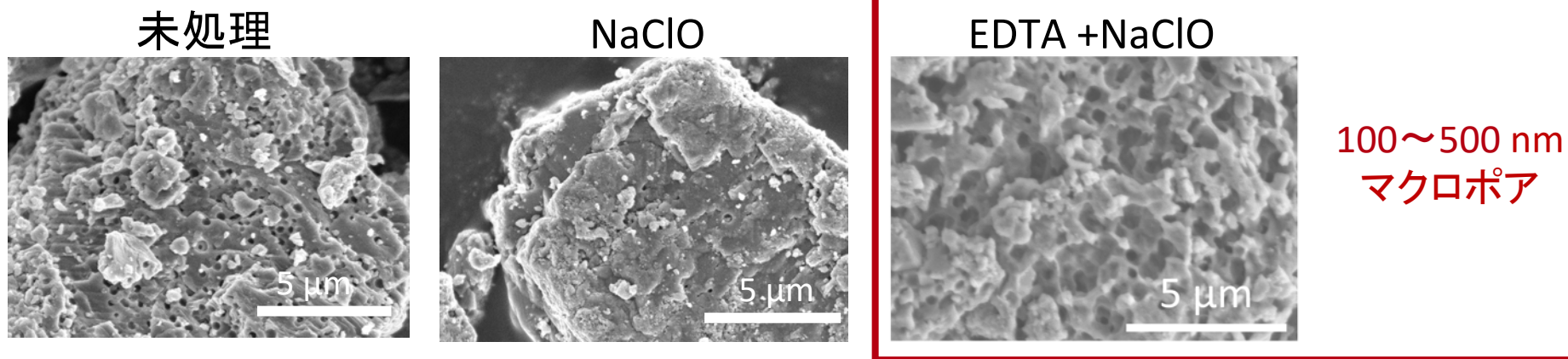
エコフレンドリー

卵殻表面処理と修飾

□手順

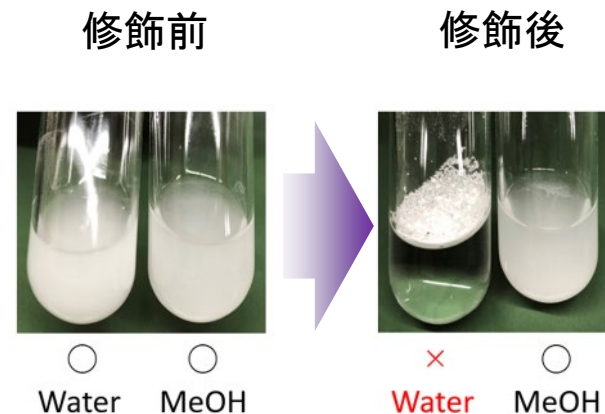


□SEM像



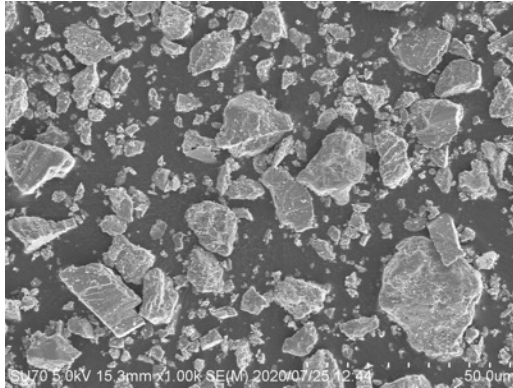
□水銀圧入法による細孔容積評価

	Total pore volume [mL/g]	Total pore area [m ² /g]
EDTA未処理	0.56	2.0
EDTA処理後	0.73	2.2

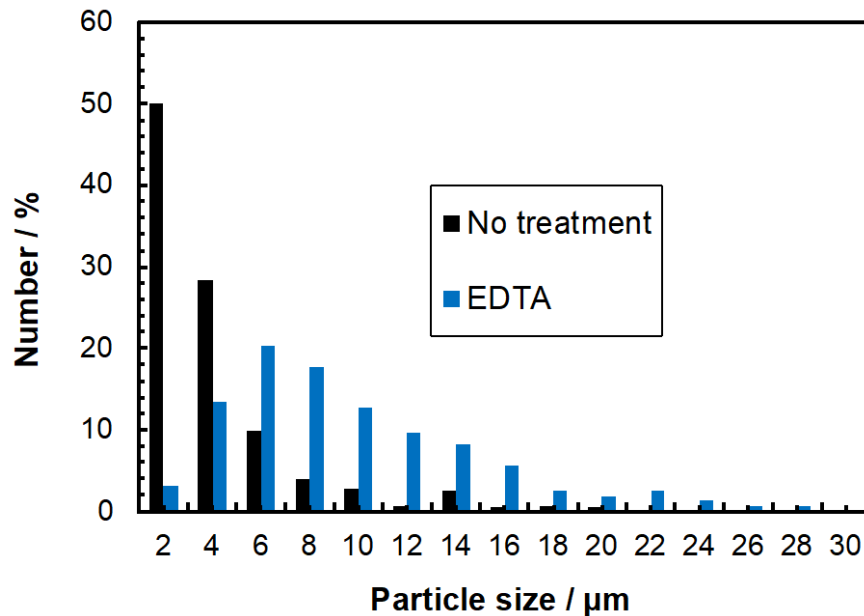
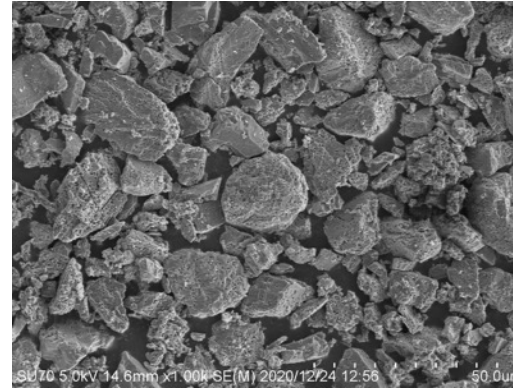


粒径分布

未処理

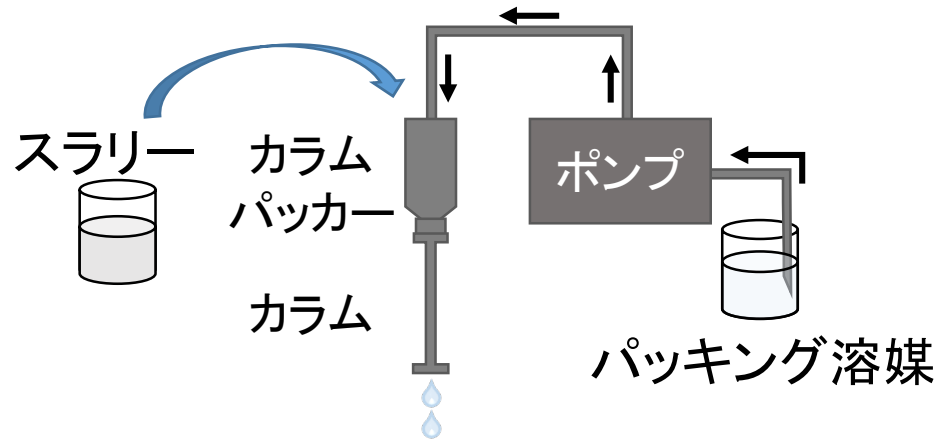


EDTA処理



	Particle size [μm]	RSD [%]
No treatment	3.20	109
EDTA	8.76	59

EDTA処理により粒径分布が均一に



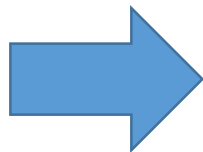
Φ2.1 mm × 100 mm



スラリー溶媒 : Chloroform

パッキング圧力 : 30 MPa

パッキング溶媒 : MeOH (60 min), Water/MeOH=50/50 (30 min)



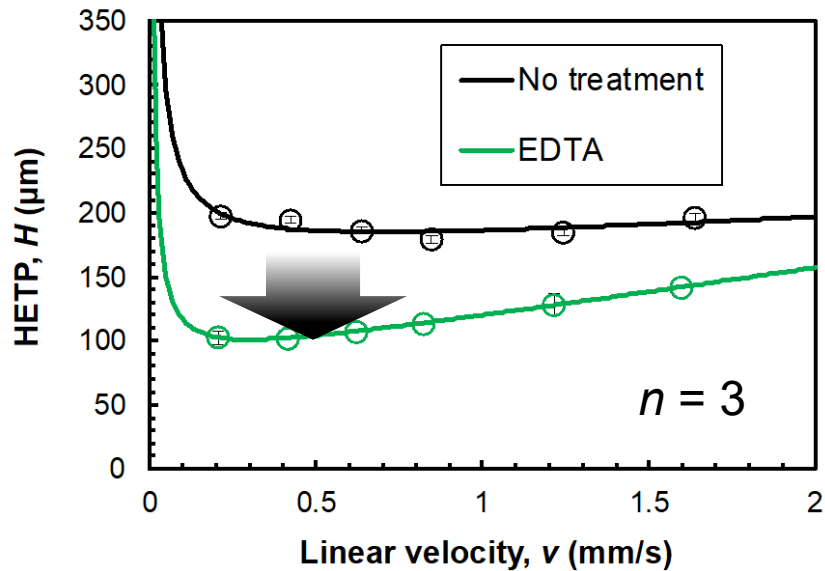
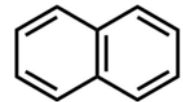
HPLCによる評価

分離能評価

Van Deemter plot: $H = A + B/v + Cv$

$$H = L / N$$

(H: Height equivalent to a theoretical plate, L: Column length, N: Theoretical plate)

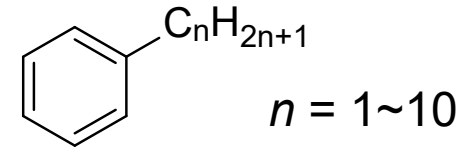
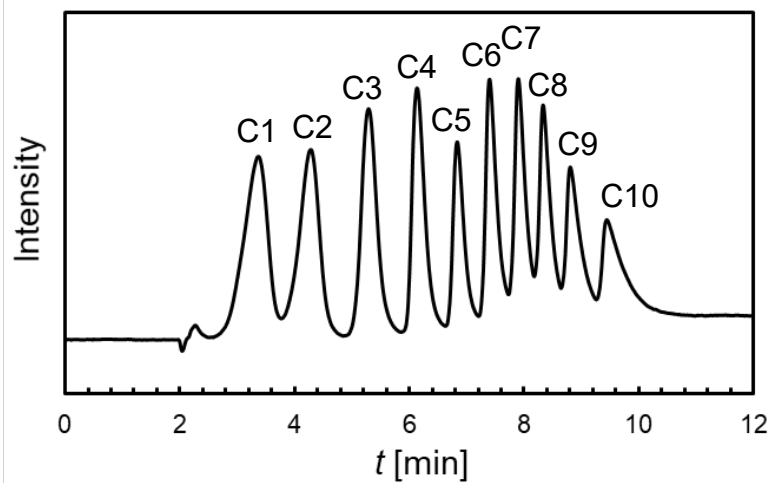


	A	B	C
No treatment	166.4	6.4	13.5
EDTA	77.8	3.5	38.8

EDTA処理によりHETPが改善

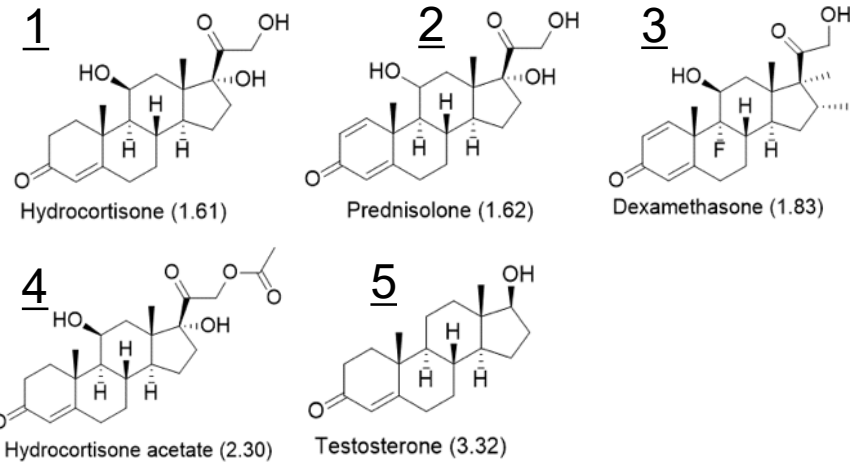
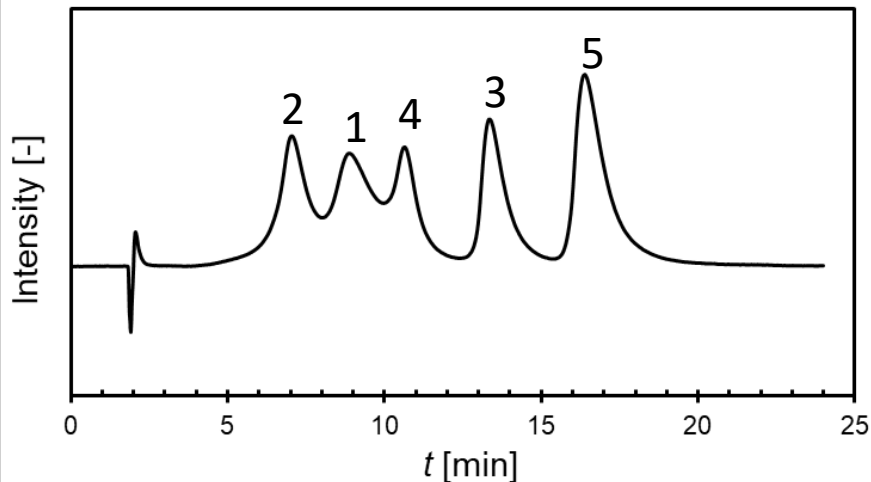
アルキルベンゼンとステロイドの分離

□ 10種類のアシルベンゼン



Stationary phase: Eggshell-PMAcO column
Mobile phase: H₂O/MeOH (gradient)
Injection: 10 mg/mL, 100 μ L
Column temperature: 25 $^{\circ}$ C

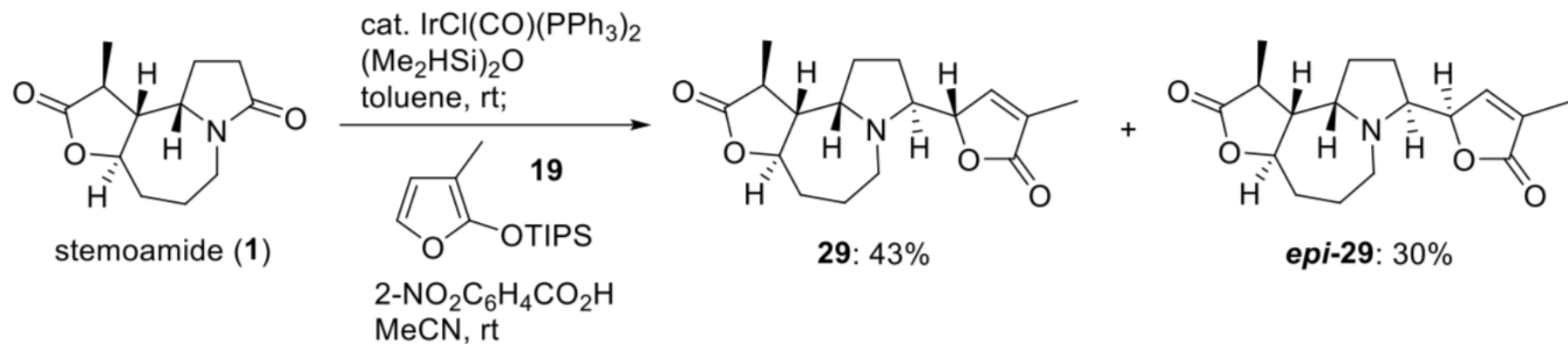
□ 5種類のアシルベンゼン



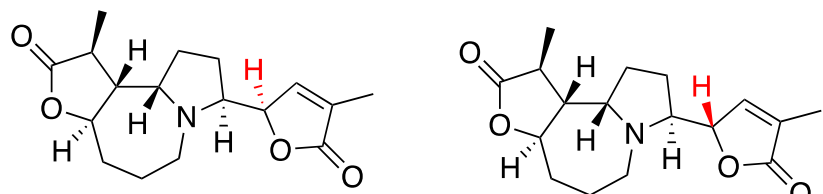
0 min~6 min: H₂O/MeOH = 80/20 constant
6 min~10 min: H₂O/MeOH = 80/20 \rightarrow 70/30 gradient
10 min~: H₂O/MeOH = 70/30 constant
3 mL/min, T=25 $^{\circ}$ C, Injection: 10 mg/mL steroids, 50 μ L

アルカロイドの全合成への応用

Dehydrostemonineおよびepi-dehydrostemonineの合成

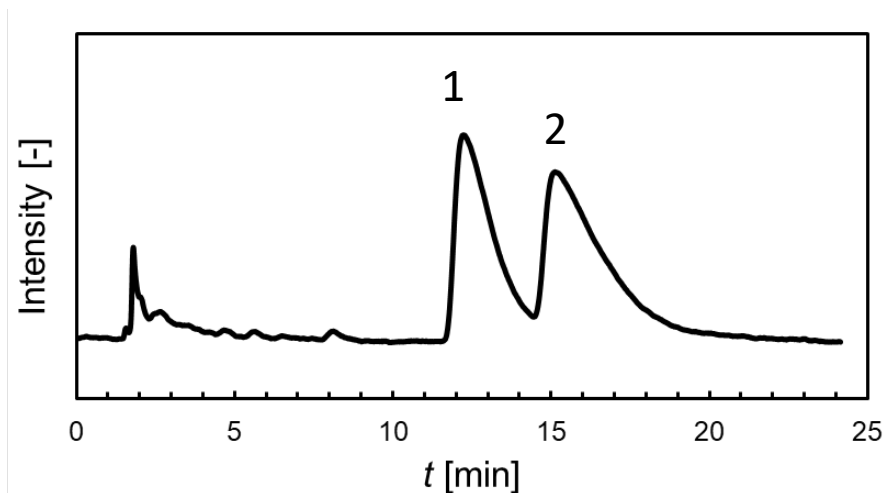


T. Sato *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *39*, 18386



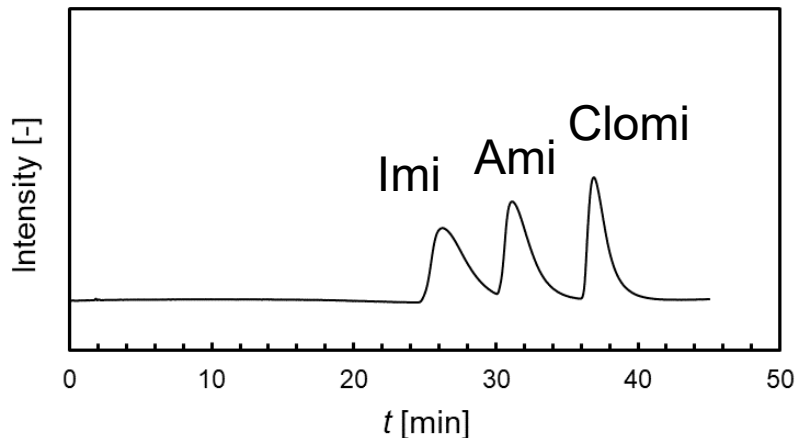
1. *epi*-dehydrostemonine 2. Dehydrostemonine

Stationary phase: Eggshell-PMaCO column
 Mobile phase: H₂O/MeOH (= 99/1, v/v), 3 mL/min, 25 °C
 Injection: 4 mg/mL, 10 μL

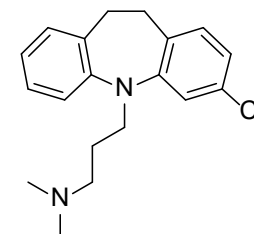


塩基性医薬品の保持容量

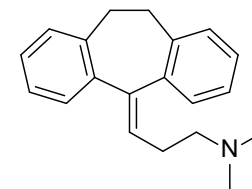
3種類の三環系抗うつ薬の分離



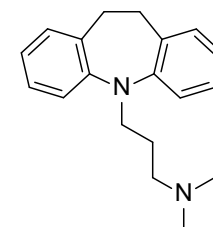
0 min~20 min: 0.1% TEA in H₂O/0.1% TEA in MeOH = 65/35 constant
 20 min~35 min: 0.1% TEA in H₂O/0.1% TEA in MeOH = 65/35 → 50/50 gradient
 35 min~: 0.1% TEA in H₂O/0.1% TEA in MeOH = 70/30 constant
 3 mL/min, T=25 °C, Injection: 10 mg/mL basic drugs, 30 μL



Clomipramine
 $pK_a = 7.8$
 $\text{Log } P = 5.19$

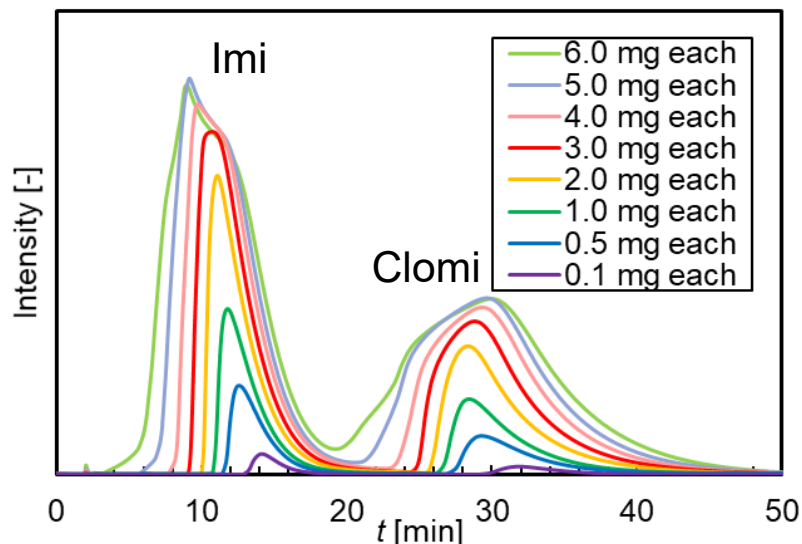


Amitriptyline
 $pK_a = 9.4$
 $\text{Log } P = 4.92$



Imipramine
 $pK_a = 9.5$
 $\text{Log } P = 4.80$

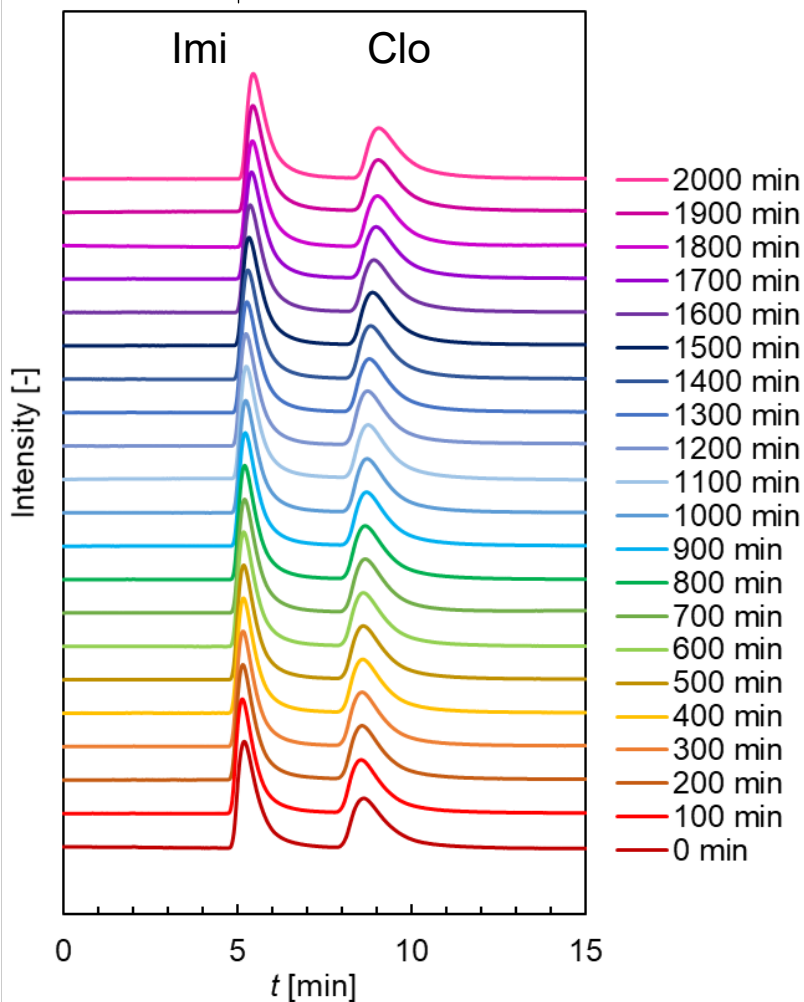
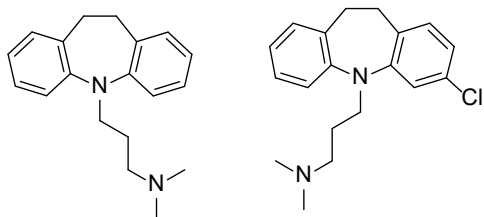
保持容量



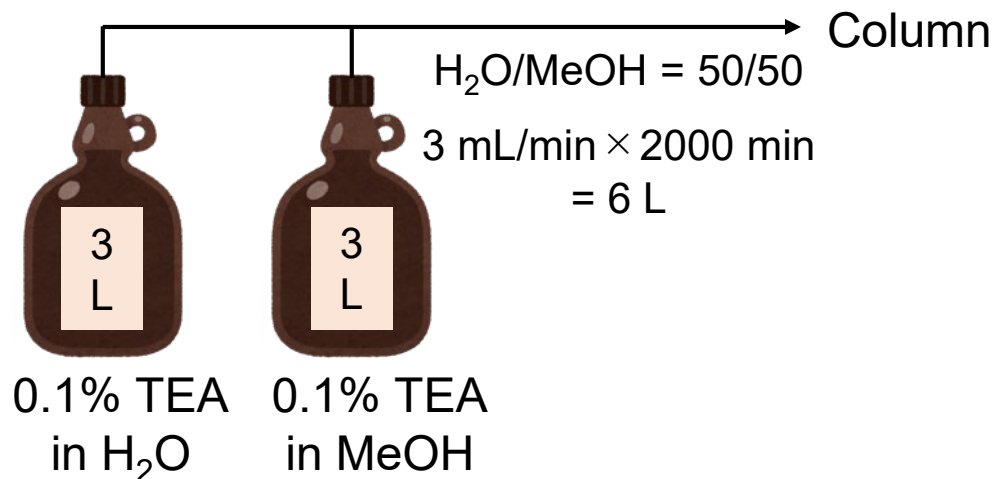
Injection	R_s
6.0 mg each	1.46
5.0 mg each	1.60
4.0 mg each	1.97
3.0 mg each	1.99
2.0 mg each	2.60
1.0 mg each	2.82
0.5 mg each	2.97
0.1 mg each	3.62

Mobile phase: 0.1% TEA in H₂O/0.1 % TEA in MeOH = 60/40,
 3 mL/min, T=25 °C, Injection: 200 mg/mL basic drugs

アルカリ耐性テスト



Mobile phase: 0.1% TEA in H₂O/0.1 % TEA in MeOH = 50/50,
T=25 °C, Injection: 10 mg/mL basic drugs, 10 μL



	t [min]		HETP [μm]		R _s
	Imi	Clomi	Imi	Clomi	
0 min	5.20	8.64	348	418	2.43
2000 min	5.46	9.07	324	377	2.55
RSD [%]	1.9	1.8	3.1	5.8	2.0

結論・課題・企業への期待

□結論

- ◆卵の殻という安価な材料を用いて分取カラム用充填剤の開発に成功
- ◆様々な化合物の分離・分取へ応用できた
- ◆シリカベースでは、達成できていない高アルカリ耐性を実現

□課題

- ◆シリカベースに比べると分離能や保持容量の改善が必要
- ◆カラムパッキングや分級に課題あり

□共同研究を希望する企業

- ◆粉体の分級技術を持つ企業
- ◆高速液体および中圧分取クロマトグラフィー用カラム開発企業
- ◆現在、分離精製にお困りの企業

- 発明の名称 : 液体クロマトグラフィー用カラム充填剤及びその製造方法
- 出願番号 : 特願2020-84901, PCT/JP2021/018442
- 出願人 : 学校法人慶應義塾
- 発明者 : 蛭田勇樹、持田麻衣、今井宏明、吉井智夏

慶應義塾大学

研究連携推進本部 知的資産担当

TEL 03-5427-1439

FAX 03-5440-0558

e-mail toiawasesaki-ipc@adst.keio.ac.jp