

卵殻を母体としたクロマトグラフィー用充填剤の開発

Development of eggshell-based packing material for HPLC

(A) 【研究の目的】

現在のクロマトグラフィー用充填剤のほとんどは、シリカゲルをベースとしたものであるが、その歴史は、炭酸カルシウムから始まった。ロシアの植物学者ミハイル・ツヴェットがチョーク（炭酸カルシウム）を用いて植物色素を分離したことから始まっている。シリカゲルは、粒子径や細孔径を均一に制御しやすいこと、高い圧力耐性、そしてシランカップリングによる修飾の容易さなどといった利点により、現在は広く普及している。炭酸カルシウムに関しても、シリカゲル同様に、多孔性構造を持ち均一な粒子径に制御でき、表面の化学修飾を可能にすればクロマトグラフィー用充填剤としての応用が期待できる。

卵殻は家庭・産業廃棄物として年間約 30 万トンも廃棄されている。環境保護の観点から土壌改良剤などへの活用の努力にも関わらずその大半は焼却・埋め立て処分されている。その化学的な性質に注目すると、炭酸カルシウムベースのバイオミネラルであり、多孔性構造を持ちアルカリ耐性が高い。他方、医薬・農薬・機能性食品など高付加価値製品の製造においてはアルカリ性移動相でのクロマトグラフィーによる分取が欠かせない。本研究では、卵殻の特性を有効活用した分取用高アルカリ耐性カラム充填剤を開発した。安価かつエコフレンドリーであり、現在汎用されているシリカ充填剤では使えないアルカリ性移動相が使用可能な充填剤の開発を目指した。

(B) 【研究の内容、成果】

卵加工会社から購入した卵殻粉末にカルシウム除去剤で表面処理を施し、濃度と反応時間を最適化することで卵殻表面に均一な多孔質構造を露出させた。生体高分子等の不純物を酸化剤によって除去した後、研究代表者の先行研究 (*J. Mater. Chem. B*, 2019, 7, 4771-4777) と同様に、修飾ポリマーとしてポリマレイン酸オクタデセン交互ポリマー (Poly Maleic Acid-*alt*-1-Octadecene: PMAcO) を静電吸着させることで充填剤 Eggshell-PMAcO を作製し(図 1)、細孔量・粒子径等の物性評価を行った。次に、Eggshell-PMAcO をセミ分取用カラム (150×10 mm I.D.) に充填し、HPLC システムによってカラムの性能評価を行った。中性条件下における基礎特性評価、およびシリカゲルカラムが使用できないアルカリ性条件下における塩基性薬剤の分離実験を行った。

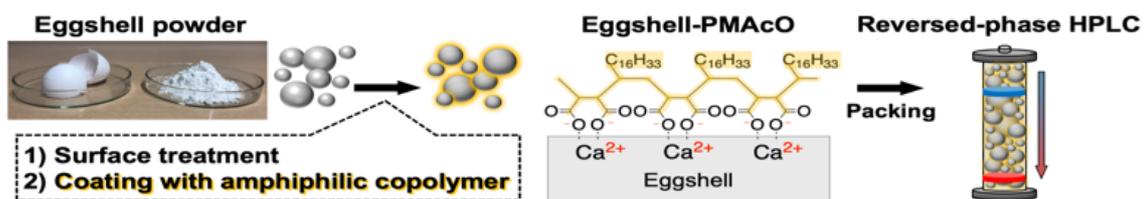


図 1 本研究の概要図

酢酸の pH を酢酸アンモニウムによって調製することで、表面処理における pH の影響を電子顕微鏡 (SEM) により評価した (図 2)。900 mM の酢酸アンモニウムバッファーで 4 時間処理したところ、pH 4.7 では表面形状に大きな変化は見られなかったのに対して、pH 3.7 では、卵殻表面全体に均一な多孔質構造が現れた。この結果より卵殻

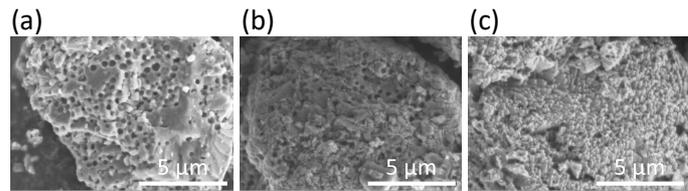


図 2 900 mM 酢酸アンモニウムバッファーによる酸処理後の卵殻、(a)未処理、(b) pH 4.7、(c) pH 3.7

の多孔性拡張には、pH 3.7 が適していると考え、さらに、濃度、処理時間について検討した (図 3)。300 mM では、24 時間処理しても、処理前とほとんど変化はなかった。600 mM にするとわずかに多孔性が拡張したように見えるが、900 mM と比べてわずかであった。900 mM では、2 時間、4 時間、24 時間で大きな違いは見られなかったため、pH 3.7、900 mM の酢酸ア

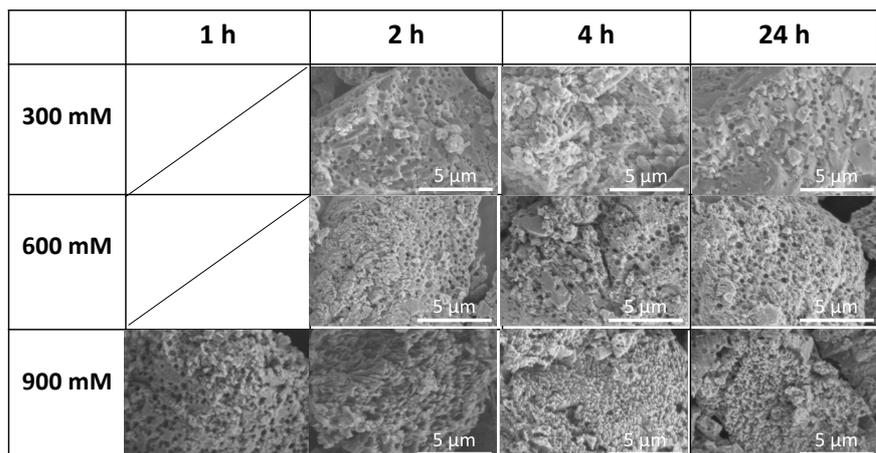


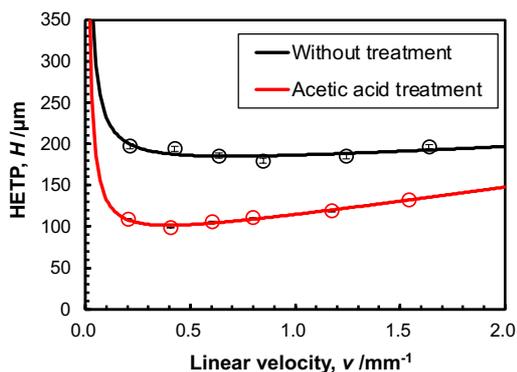
図 3 酢酸アンモニウムバッファー (pH 3.7) による酸処理における処理時間と濃度の影響

ンモニウムバッファーで 2 時間処理することを最適な処理方法とした。この条件で処理した後の卵殻粉末の XRD を測定したところ、カルサイトの結晶構造由来のピークが観測され、酢酸アンモニウム、酢酸カルシウムなどの結晶は析出していないことが確認できた。この処理方法の再現性を確認するため、3 つのバッチで同様の処理を行ったところ再現性の高い結果を得ることができた。水銀圧入法により、定量的に細孔容積を測定したところ、酢酸で処理した時に最も大きな値を示した。これらの結果から安価な酢酸を用いて、細孔容積を増加させることができるとわかった。

カラムが最大限の性能を発揮する移動相の流速について検討した。カラムの理論段高さ HETP, H は van Deemter の式で表される。

$$H = A \cdot \text{粒子径} + B/\text{流速} + C \cdot \text{粒子径}^2 \cdot \text{流速}$$

van Deemter の式は理論段高さ H が A 項 (多流路拡散、渦巻き拡散)、B 項 (カラム軸方向への拡散)、C 項 (固定相と移動相間での物質移動、細孔内外での拡散による物質移動) の 3 項に寄与することを表している。この式より、最も低い H が得られる最適流速を決定した。図 4 にサンプルとしてナフタレンを用いた時の van Deemter プロットを示す。酢酸処理によって、全ての流速において酢酸処理をしたカラムの方が低い理論段高さを示したことから、酢酸処理によって分離能を向上できることがわかった。さらに分析条件の最適化を行うことで理論段高さを下げることができ、38 μm まで下げることができた。



	A	B	C
No treatment	166.4	6.4	13.5
Acetic acid	73.4	5.6	35.8

図4 van Deemter プロットと A, B, C 項の値

三環系抗うつ薬のイミプラミン(1)とクロミプラミン(2)の分離において保持能と耐久性を評価した(図5)。どちらの化合物も塩基性化合物であるため、トリエチルアミンを添加したアルカリ性移動相を用いて評価を行なった。それぞれの化合物が5 mg、合計10 mgまでは分離度 $R_s > 1.5$ の値で完全分離を行うことができた。また、耐久性についても連続で2000分連続で分析しても保持時間や分離能に大きな変化がなく(保持時間の相対標準偏差 $RSD < 2\%$)、アルカリ移動相に対して高い耐久性を持つカラムであることが示された。分取した化合物についてはNMRにより同定し、95%以上の高い回収率で分取できることが示された。

このカラムをアルカロイドの全合成への応用として、デヒドロステモニンの合成の際に生じるそのエピマーとの分離を行なった。図6に示すようにエピマーとの分離を達成でき、NMRにより同定し、75%以上の回収率でデヒドロステモニンを得ることができた。

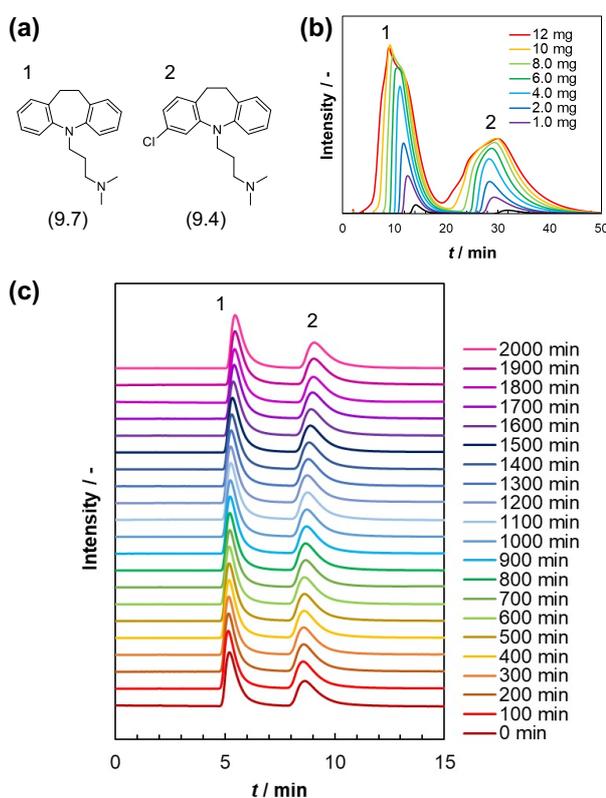


図5(a)イミプラミン(1)とクロミプラミン(2)の構造式、(b)保持能の評価、(c)耐久性評価

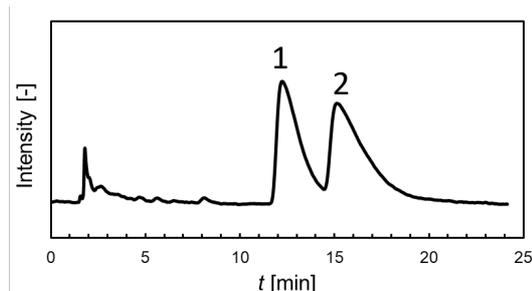
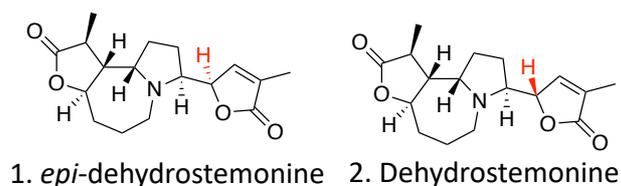


図6 デヒドロステモニンとそのエピマーの構造式とクロマトグラム

(C) 【今後の研究の方向、課題】

アルカリ移動相に対する耐性は、シリカゲルをベースとした汎用的に利用されている ODS カラムに対して優位性を示しており、アルカリ移動相を用いた分取への応用可能性が示されている。カラムの分離能、保持容量に関しては、改善の余地があり、今後取り組んでいきたい。本研究では、市販の粉碎された卵殻粉末をそのまま充填剤開発に利用したが、一般的なシリカゲルカラムと同様に分級することで分離能の改善が実現できると考えられる。電子顕微鏡で観察すると、小さい粒子から大きな粒子まで様々なサイズの粒子が存在するため、これらを分級により粒径分布を狭くできれば、分離能を高くできると考えられる。保持容量に関しては、ポリマーの分子量、表面修飾法を検討することで、炭素含有率を高くし、保持力を強め高くできると考えられる。分離能、保持容量がシリカゲルカラムに匹敵する性能にできれば、アルカリ移動相を用いた分取においてニーズがあると考えられる。

(D) 【成果の発表、論文等】

学術論文

1. Tomoka Yoshii, Mai Mochida, Kogi Kaizu, Yasuki Soda, Kazuyoshi Kanamori, Kazuki Nakanishi, Takaaki Sato, Hiroaki Imai, Daniel Citterio, Yuki Hiruta, “Amphiphilic Copolymer-Modified Eggshell-based Column Packing Materials for the Preparative Separation of Basic Drugs”, *ACS Applied Polymer Materials*, **2022**, DOI: 10.1021/acsapm.2c00866
2. Kogi Kaizu, Mai Mochida, Hiroaki Imai, Daniel Citterio, Yuki Hiruta, “Quantitative evaluation of reversed-phase packing material based on calcium carbonate microspheres modified with an alternating copolymer”, *Journal of Chromatography A*, **2022**, 1677, 463294

国際学会

3. Yuki Hiruta, Tomoka Yoshii, Mai Mochida, Kogi Kaizu, Hiroaki Imai, Daniel Citterio, Eggshell-Based Packing Materials for HPLC, HPLC2022, June 18-23, 2022, poster presentation

招待講演

4. 蛭田勇樹、卵殻を母体とした HPLC 用充填剤の開発、第 34 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2022)、2022 年 9 月 2 日-3 日、口頭発表

受賞

5. Best Poster Award HPLC 2022, San Diego

その他学生が 11 件の学会発表、5 件の発表賞を受賞