

# 環状分子を基盤とする多成分結晶粒子群の 分離精製に向けた晶析プロセスの開発

Development of crystallization process for obtaining crystalline particles of co-crystals with desired quality

助成年度	令和4年度研究助成	
助成番号	MZR2022001	
研究期間	2022/04/01 ~ 2023/03/31	
代表研究者	甘利 俊太郎	東京農工大学大学院工学研究院応用化学部門
共同研究者	宇野 沙映	東京農工大学大学院工学府応用化学専攻システム化学工学専修
	滝山 博志	東京農工大学大学院工学研究院応用化学部門
キーワード	多成分結晶, 溶媒和物, 晶析, 粒子群特性, 相図	

## 1. 研究の背景と目的

多成分結晶は複数の成分から構成され、単一成分から成る結晶とは異なる物性を発現するため、新たな機能性材料として注目されている<sup>1-3</sup>。しかし、多成分結晶の工業的な製造に向けて、多成分結晶の粒子群の特性を考慮した晶析操作は十分に検討されていない。多成分結晶の場合、液相から複数の成分を決まった比率で析出させなければならない。したがって、所望の特性を有する多成分結晶粒子群を得るためには、単一成分の場合に比べ、厳密な晶析操作の設計が必要となる。

多成分結晶の粒子群特性と晶析操作の関係を検討する上で、本研究では、当初、環状構造内に様々な分子をゲスト分子として取り込み、包接化合物を形成する環状分子の Cucurbit[7] uril (CB7)<sup>4</sup>に着目した。CB7は比較的高い水への

溶解性を有するため、医薬品分野では、有効成分の溶解性を改善する化合物の1つとして期待されている<sup>5</sup>。初期検討により、CB7水溶液から固相を析出させると、操作条件によってアモルファスが析出する場合と、明確な面を有する結晶が析出する場合が存在することを見出した。これは、CB7が水分子と共に多成分の固相として析出することに起因していると考えられる<sup>9,10</sup>。そこで、多成分結晶の一つであるCB7と水から成るCB7水和物の結晶化条件を検討することによって、多成分結晶を粒子群として獲得するための晶析操作を設計する上で必要な基礎的知見を見出せると考えた。そこで、本研究では、多成分結晶粒子群の分離精製に向けて、多成分結晶を構成する環状分子を利用して、晶析操作条件と結晶粒子群特性の関係を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の内容・方法

### (1) 実験系

当初、水と共に多成分結晶を構成する CB7 をモデル化合物として利用する予定であったが、晶析条件と結晶粒子群特性の関係を調査するための十分な試薬量を確保できず、予定していた研究計画が実施できない可能性が出てきた。そこで、本研究では、新たなモデル化合物としてエクトインに着目した (Figure 1)。

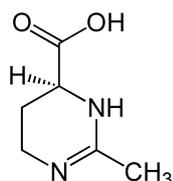


Figure 1 Structural formula of ectoine.

エクトインは、高塩耐性メタン酸化細菌がメタンをエネルギー源として合成する環状アミノ酸の1つであり、近年、機能性化合物として医薬品や化粧品分野での需要増加見込まれている<sup>6-10</sup>。また、先行研究により、エクトインは CB7 と同様に、水と共に結晶化することが報告されている<sup>11</sup>。しかし、結晶の粒径や結晶形を含め、晶析の操作条件と結晶粒子群特性との関係は明らかになっていない。そこで、CB7 よりも安価なエクトインをモデル化合物として、多成分結晶の粒子群特性と晶析操作条件の関係を調査することとした。

予備実験より、エクトインは水に比べてエタノールにはほとんど溶解しない（純粋溶媒に対する 60°Cでの溶解度は水の時 57.3 wt%、エタノールの時 0.7 wt%）。そこで、本研究では、水を良溶媒、エタノールを非溶媒とした非溶媒添加晶析の操作条件と析出する結晶粒子群特性の関係を評価した。

### (2) 実験手法

#### (2-1) 混合溶媒組成の影響

非溶媒添加晶析にて混合溶媒組成が結晶粒子

群特性に与える影響を調べるために、30°Cのエクトイン飽和水溶液に対して、エタノールを Table 1 に示した組成で添加し、混合から 12 時間後の懸濁液を固液分離して、結晶粒子群を回収した。

Table 1 Mixing ratio of each experimental condition.

Run	$x_{\text{Ethanol}}$ [g/g-soln.]	Ectoine aq. soln. [g]	Ethanol [g]
1	0.95	2.00	38.00
2	0.90	2.00	18.00
3	0.85	2.00	11.33
4	0.80	2.00	8.00
5	0.75	2.00	6.00
6	0.70	2.00	4.67
7	0.50	2.00	2.00

回収した結晶粒子群は光学顕微鏡 (VHX-6000, KEYENCE) を用いて観察した。また、XRD (UltimaIV, Rigaku) を用いて、得られた結晶粒子群の結晶形を同定した。

#### (2-2) 三成分相図の作成

非溶媒添加晶析後の溶液濃度は 30°Cでの混合溶媒に対するエクトインの飽和濃度として考えることができる。そこで、溶液濃度を測定し、晶析操作の基礎データとして、エクトイン-水-エタノールの三成分系での溶解度曲線を含む三成分相図を作成した。

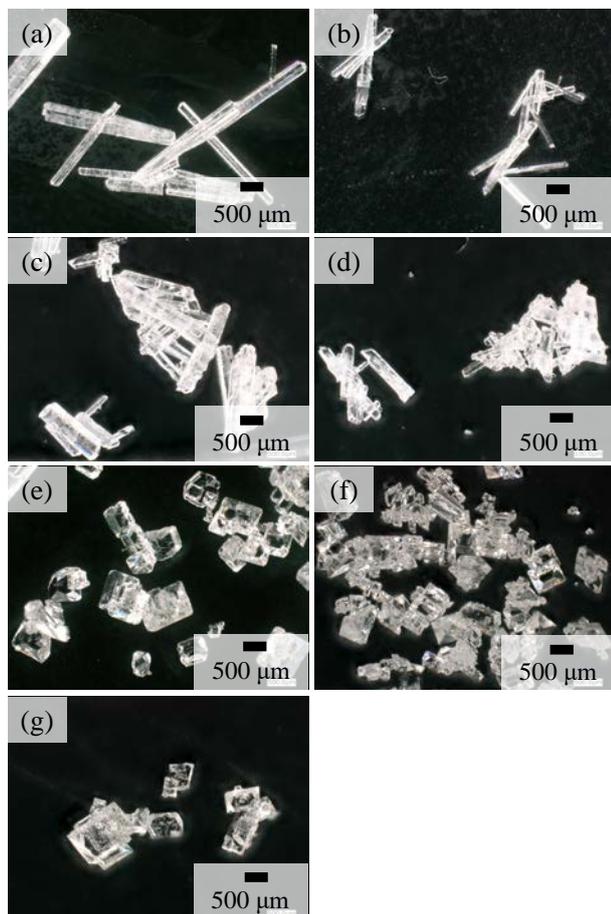
#### (2-3) 湿度の影響

水和物の場合、保管環境の湿度に応じて結晶形が変化する可能性がある。そこで、XRD (UltimaIV, Rigaku) を用いて、室温下で湿度 (RH) を変更しながら、エクトインの結晶粒子群の XRD スペクトルを測定し、湿度がエクトインの結晶形に及ぼす影響を調査した。

### 3. 研究の成果

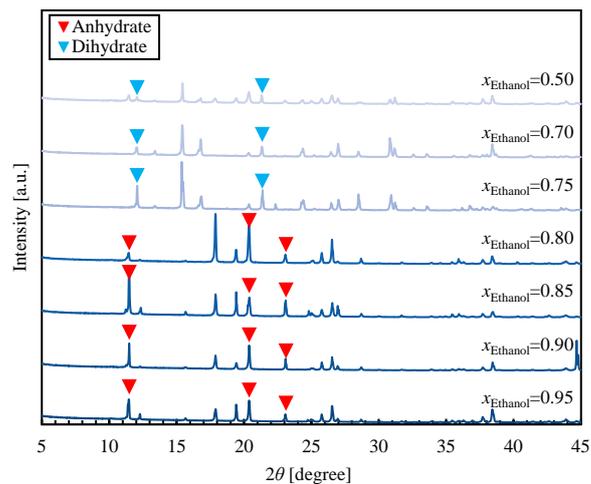
#### (1) 溶媒の混合比が粒子群特性に及ぼす影響

30°Cのエクトイン飽和水溶液とエタノールの混合比を変更して非溶媒添加晶析を行った際に得られた結晶粒子群を光学顕微鏡で観察した結果を **Figure 2** に示す。



**Figure 2** Optical microscope photographs of crystalline particles obtained by anti-solvent crystallization.  $x_{\text{Ethanol}} =$  (a) 0.95, (b) 0.90, (c) 0.85, (d) 0.80, (e) 0.75, (f) 0.70 and (g) 0.50.

**Figure 2** より、混合溶媒組成によって析出する結晶形態は大きく変化した。具体的には、 $x_{\text{Ethanol}}$  が 0.50~0.75 ではプリズム晶、0.80~0.95 では針状（柱状）晶が得られた。そこで、結晶形を同定するために、得られた結晶粒子群を XRD で分析した結果を **Figure 3** に示す。



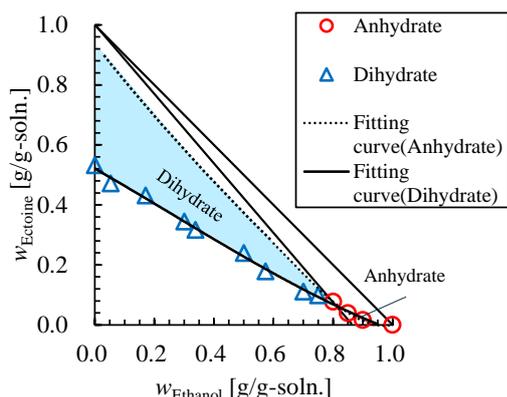
**Figure 3** XRD spectra of crystalline particles obtained by anti-solvent crystallization.

**Figure 3** より、 $x_{\text{Ethanol}}$  [g/g-soln.] = 0.80 以上では、エクトインの無水物が析出していることがわかった。一方、 $x_{\text{Ethanol}} = 0.5 \sim 0.75$  で析出した結晶は、エクトインの二水和物であることが分かった。**Figure 2** および **Figure 3** の実験結果を総合すると、柱状晶は無水物、プリズム晶は二水和物であることを見出した。

以上より、多成分結晶の一つで、溶媒分子と共に固相を形成する溶媒和物の場合、混合時の溶媒組成によって析出する結晶の結晶形が異なることが分かった。すなわち、非溶媒添加晶析の場合、非溶媒の組成を変更することによって、エクトインの無水物と二水和物の作り分けが可能であることが示唆された。

#### (2) 三成分相図を用いた解析

次に、30°Cのエクトイン - 水 - エタノール系で、測定した飽和濃度から作成した三成分相図を **Figure 4** に示す。

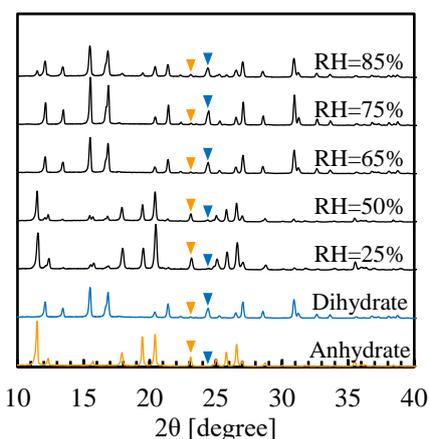


**Figure 4** Ternary phase diagram of ectoine-water-ethanol at 30°C with mass fraction solubility of ectoine as a function composition of mixture solvent.

$x_{\text{Ethanol}}=0.75$  付近で安定な結晶形が入れ替わることを考慮した結果、各結晶形の析出領域を相図上で推定することができた。すなわち、この相図を用いれば、非溶媒の混合比を変更することで所望の結晶形の粒子群を作り分けることが可能であることを見出した

### (3-3) エクトインの結晶形に対する湿度の影響

エクトイン無水和物の結晶粒子群を室温下で湿度 (RH) を変更しながら XRD スペクトルを測定した結果を **Figure 5** に示す。

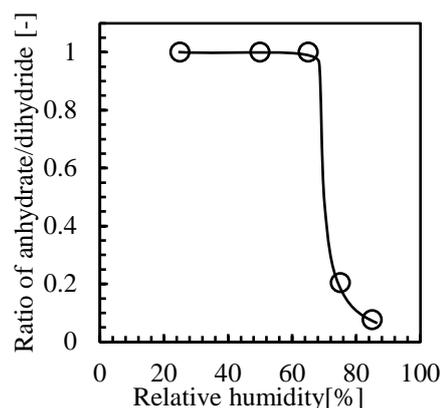


**Figure 5** XRD spectra of crystalline particles of ectoine under various RH conditions.

その結果、RH=65%付近でわずかに二水和物由来のピークが検出され、RH=75%付近で無水和物から二水和物への転移が進行していることが分か

った。そこで、下記の式 (1) を用いて、エクトイン無水和物と二水和物の特徴的なピークの強度 ( $I_{\text{anhydrate}}$  と  $I_{\text{dihydrate}}$ ) とその比から無水和物と二水和物の存在比率を推算した (**Figure 6**)

$$I_{\text{anhydrate}} = I_{\text{anhydrate}} / (I_{\text{anhydrate}} + K \cdot I_{\text{dihydrate}}) \quad (1)$$



**Figure 6** Relationship between the relative humidity and ratio of anhydrate/dihydrate.

**Figure 6** より、RH=75%付近で、エクトイン無水和物の割合が急減し、エクトイン二水和物へ転移していることが明らかになった。前項より、エクトインの無水和物と二水和物では、結晶粒子群の様子が大きく異なるため、晶析後の工程での操作性を考慮すると、得られた結晶粒子群を所望の結晶形として維持するためには保管環境を適切に制御することが重要であると考えられる。

## 4. 結論

多成分結晶粒子群の特性制御に向けた晶析プロセスの開発に向けて、水と共に結晶化するエクトインを用いて、非溶媒添加晶析時の混合溶媒組成が結晶粒子群の形態や結晶形といった特性に及ぼす影響を検討した。

光学顕微鏡観察の結果、エクトインの結晶形態は混合溶媒組成に応じて大きく変化すること

が分かった。さらに、XRD による分析の結果、析出する結晶の組成は混合溶媒組成によって変化することも見出した。また、混合溶媒に対するエクトインの飽和濃度を求めたところ、安定な結晶形が変化する転移点の存在が明らかになった。

以上より、非溶媒添加晶析にて、操作条件の1つである混合溶媒組成が結晶粒子群特性に及ぼす影響を明らかにし、無水物と二水和物の結晶形を作り分けに利用できるエクトイン-水-エタノールの三成分相図も得ることができた。

さらに、結晶の安定形は湿度によっても変化することから、多成分結晶の一つである溶媒和物の結晶粒子群を所望の結晶形として製造するためには保管環境の制御も重要であることを見出した。

## 5. 今後の研究方向性・課題

今回は非溶媒添加晶析の操作条件の1つである混合溶媒組成と粒子群特性の関係について検討したが、冷却晶析や蒸発晶析でのエクトインを対象とする晶析操作と析出する結晶粒子群の特性の関係は十分に明らかになっていない。また、エクトインの製造プロセスの都合上、晶析前の原料溶液には不純物として NaCl が含まれることが想定される。したがって、実プロセスへの応用を考えた場合、今回検討した非溶媒添加晶析に加え、他の晶析法の操作条件や、不純物の有無がエクトインの結晶粒群特性に及ぼす影響の調査が必要である。

また、今回は多成分結晶の1つである溶媒和物を対象として検討を進めたが、試薬価格の都合上、当初想定していたホスト分子とゲスト分子からなる包接結晶の粒子群特性と晶析の操作条件の関係は検討することができなかった。今後、改めてモデル化合物を選定することによって、多成分結晶の1つである包接結晶の晶析操作条件と粒子群特性の関係解明も検討する。

## 6. 参考文献

- (1) Bond, A. D. What is a co-crystal? *CrystEngComm* **2007**, *9*, 833.
- (2) Mazur, L.; Materek, I.; Bond, A. D.; Jones, W. Multicomponent Crystal Forms of a Biologically Active Hydrazone with Some Dicarboxylic Acids: Salts or Cocrystals? *Cryst. Growth Des.* **2019**, *19*, 2663.
- (3) Wong, S. N.; Chen, Y. C. S.; Xuan, B. F.; Sun, C. C.; Chow, S. F. Cocrystal engineering of pharmaceutical solids: therapeutic potential and challenges. *CrystEngComm* **2021**, *23*, 7005.
- (4) Barrow, S. J.; Kasera, S.; Rowland, M. J.; del Barrio, J.; Scherman, O. A. Cucurbituril-Based Molecular Recognition. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12320.
- (5) Kuok, K. I.; Li, S. K.; Wyman, I. W.; Wang, R. B. Cucurbit[7]uril: an emerging candidate for pharmaceutical excipients. *Ann Ny Acad Sci* **2017**, *1398*, 108.
- (6) Kauth, M.; Trusova, O. V. Topical Ectoine Application in Children and Adults to Treat Inflammatory Diseases Associated with an Impaired Skin Barrier: A Systematic Review. *Dermatology Ther* **2022**.
- (7) Bethlehem, L.; Van Echten-Deckert, G. Ectoines as novel anti-inflammatory and tissue protective lead compounds with special focus on inflammatory bowel disease and lung inflammation. *Pharmacol Res* **2021**, *164*.
- (8) Wittmar, J.; Ohle, C.; Kunte, J.; Brand, I. Effect of Ectoine on the Conformation and Hybridization of dsDNA in Monolayer Films: A Spectroelectrochemical Study. *Chemelectrochem* **2021**, *8*, 3844.
- (9) Schroter, M. A.; Meyer, S.; Hahn, M. B.; Solomun, T.; Sturm, H.; Kunte, H. J. Ectoine protects DNA from damage by ionizing radiation. *Sci Rep-Uk* **2017**, *7*.
- (10) Boroujeni, M. B.; Nayeri, H. Stabilization of bovine lactoperoxidase in the presence of ectoine. *Food Chem* **2018**, *265*, 208.
- (11) Hutzler, W. M.; Mossou, E.; Vollrath, R.; Kohagen, M.; El Ghriissi, I.; Grininger, M.; Zaccari, G.; Smiatek, J.; Oesterhelt, D. Complex transitions between dihydrate and anhydrate forms of ectoine - unexpected behavior of a highly hygroscopic compatible solute in the solid state. *CrystEngComm* **2020**, *22*, 169.

## 7. 論文・発表

得られた研究成果は国内外の学会で発表した。今後学術論文として投稿すること検討している。

### (7-1) 国内学会 (2件)

・○宇野 沙映・笠井 つばさ・末永 俊和・滝山 博志・甘利 俊太郎, エクトイン結晶粒子群製造のた

めの晶析に関する基礎研究, D217, 化学工学会新潟大会 2022 (朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター) , 2022.11.9-10

・ [依頼講演] ○甘利 俊太郎・末永 俊和, メタンを原料とする有価物生産プロセスの構築を志向した微生物培養条件と晶析法の検討, R312, 化学工学会第 88 年会 (東京農工大学 小金井キャンパス) 2023.3.15-1

(7-2) 国際学会 (1 件)

・ [Invited Lecture] ○Shuntaro AMARI, Effect of crystallization conditions on characteristics of solid phase for cucurbit[7]uril, IGS63, ICPAC Kota Kinabalu 2022 (The Magellan Sutura Resort, Sabah, Malaysia / ONLINE) 2022.11.22-27