

アパタイト系吸着材料の開発

—クロマトカラム用充填材料の作製と評価—

赤澤 敏之, 内田 典昭, 勝世 敬一

Development of Apatite Materials as Adsorbents

— Preparation and Characterization of Column Packing Materials for Chromatography —

Toshiyuki AKAZAWA, Noriaki UCHIDA, Keiichi KATSUSE

抄 録

アパタイト / シリカ (HAp/SiO₂) 系複合粉末のクロマトカラム用充填剤への応用を目的として、粒子の耐圧強度と蛋白質の吸着量が大きくなる粉末の熱処理条件、カラム用粉末の充填法及びクロマト分離特性の評価方法等を検討した。50%-HAp 組成粉末は、アルブミンの吸着量が他の組成粉末より大きく、水蒸気流中800℃熱処理によって結晶化された HAp 単一相となり、湿準耐圧性に優れた材料になることが判明した。それを静置法によりガラスカラムへ充填したクロマト分離特性では、温度39℃, pH 6.86, 流量1.0cm³・min⁻¹及びリン酸緩衝溶離液の直線グラジエント 30 分の条件で、アルブミン酸性蛋白質の展開が可能であった。

1. はじめに

水酸アパタイト (HAp: Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) は、優れた生体親和性とイオン交換特性を有する機能性セラミックスとして、生体埋入材料と吸着剤等へ応用されている¹⁾。また、HAp は生体高分子に対する親和性と吸着特性を有することから、生体試料の活性を損なわないクロマト分離カラム用充填剤としても、生化学や臨床機器分析の分野で広範囲に利用されている^{2),3)}。しかしながら、HAp は酸性領域で化学的に不安定であり、その粒子の機械的強度が酸化物セラミックス材料と比較して著しく低い⁴⁾ため、HAp クロマトグラフィーでは、酸性領域で充填剤の化学的劣化が起こり、高圧下での試料の分離・精製操作は極めて困難であると言われている⁴⁾。この欠点を改善するために、著者等^{5),6),7),8)}は、HAp と酸化物セラミックスの複合化に着目し、HAp が有する吸着能と選択性を損なわずに、粒子の耐圧強度の向上をはかる化学的方法の構築を試みてきた。その中で、湿式合成法により HAp / 酸化物セラミックス系複合粉末を作製し、その粉体特性と吸着特性を市販カラム用粉末のものと比較検討した結果、シリカ (SiO₂)、アルミナ及びジルコニアは、HAp と複合粉末の作製が可能であり、特に、HAp/SiO₂ 系粉末については、

アルブミンやリゾチーム蛋白質の吸着量が大きいことを報告した⁷⁾。

本研究では、その HAp/SiO₂ 系複合粉末をクロマトカラム用充填剤へ応用するために、粒子の耐圧強度と吸着量が大きい粉末を作製するための熱処理条件、ガラスカラム用粉末の充填法及びクロマト分離特性(脱離性、分離性及び保持時間)の評価方法等を検討した。

2. 実験方法

2.1 HAp/SiO₂ 系複合粉末の作製方法と特性評価

HAp/SiO₂ 系複合粉末は、道産資源の有効利用の観点から、ホルスタイン肉牛骨を原料として、既報^{5),6),7)}と同様に作製した。すなわち、牛大腿骨を煮沸処理した後、500～700℃さらに1100℃で焼成し、牛骨アパタイト⁹⁾を作製した。その微粉碎した粉末を HNO₃ 水溶液に溶解し、AEROSIL 社製高純度 SiO₂ (200, 99.9%) 特級試薬を添加後、NH₄OH 水溶液を滴下し、pH10～11, 25℃で24時間攪拌反応させた。それを遠心分離、洗浄及び乾燥することにより、HAp/SiO₂ (10～70% -HAp) 複合粉末を作製した。いくつかの粉末については、その複合粒子の強度を高くするために、空気中ま

たは水蒸気流中 400 ～ 800℃ で 24 時間熱処理を行った。

得られた粉末について、X 線回折 (XRD) による結晶相の同定、走査型電子顕微鏡 (SEM) による表面組織の観察、電子線微小部分分析 (EPMA) による組成分析及び BET 法による比表面積の測定等を行った。

吸着特性試験は、既報^{5),6),7)}と同様にして行った。すなわち、複合粉末 0.1g、 $0.5 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ アルブミン (牛製、和光純薬工業社製一級試薬) 酸性蛋白質水溶液及び 20mM-リン酸緩衝溶液 (K_2HPO_4 , KH_2PO_4) を 22℃, pH6.9 ～ 7.1 で 70 時間攪拌反応させた。その懸濁液を重力沈降と遠心分離した後、紫外可視分光分析法 (波長 280nm) により、アルブミンの平衡濃度と吸着量を算出した。

2.2 カラム用粉末の調製方法と耐圧試験

HAp/SiO₂ 系複合粉末を蒸留水中で超音波分散、静置し、Stokes の法則¹⁰⁾に従い重力沈降させることにより、オープンカラム用粉末粒度 (粒子径 10 ～ 20 μm) に調製した。その懸濁液をガラスカラム (内径 8mm, 長さ 50mm, フィルター径 5 μm) へ流入し、静置法によるカラム内充填を行った。また、2 種類の市販カラム用 HAp 粉末 (和光純薬工業社製ヒドロキシアパタイトと TOSOH 社製 TSK guardgel HA-1000) についても、同様な調製と充填を行った。

湿準状態で粉末粒子の耐圧性の評価には、粉末を蒸留水に浸せきし真空封印した後、それを 10 ～ 200MPa, 1 分間、冷間等方圧加圧 (CIP) 処理し、SEM による粒子表面の組織観察を行った。

2.3 カラム用粉末のクロマトグラフィー

液体クロマトグラフィーシステムの概観を図 1 に、その模式説明を図 2 に示す。

この装置により、カラム用粉末のクロマト分離特性の評価試験を行った。すなわち、あらかじめ粉末を充填したガラス

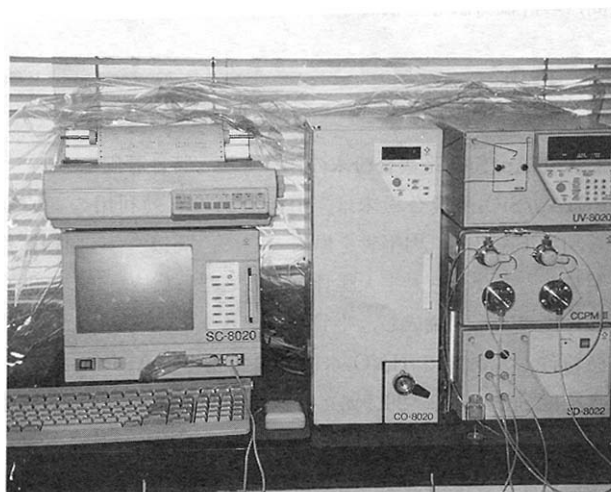


図 1 液体クロマトグラフィーシステム

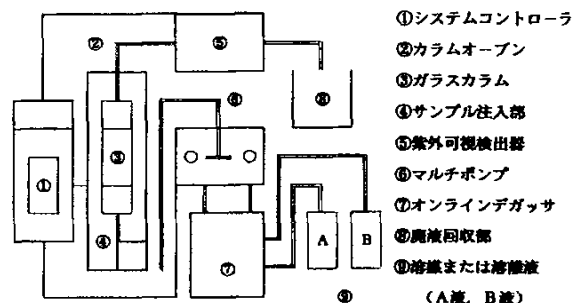


図 2 オープンカラム法による液体クロマトグラフィーの概要

カラム (③, 図 3) をカラムオープン (②) へ装着した後、オンラインデガッサ (⑦) を作動させ、溶媒または溶離液 (⑨) 中の気泡を除外し、システムコントローラ (①) により、マルチポンプ (⑥) の流量、紫外可視検出器 (⑤) の波長及びカラムオープン (②) の温度等の制御を行った。

温度 39℃, pH6.86, 流量 $0.5 \sim 1.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ の条件でカラム内の平衡化を図るために、A 液 (pH6.86 の 10mM-リン酸緩衝溶液) を 30 分間流した後、マイクロシリンジを用い

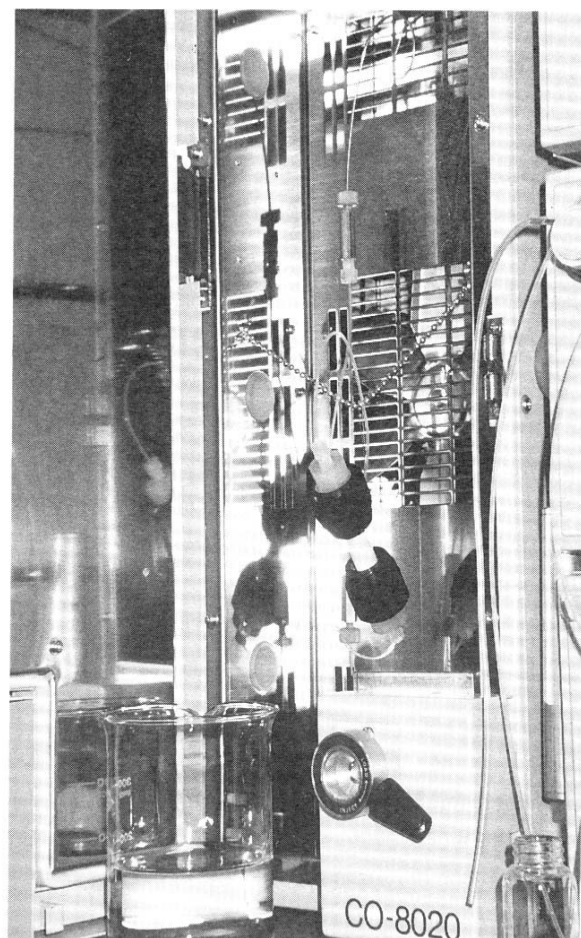


図 3 粉末充填されたガラスカラム
(条件: 内径 8 mm, 長さ 50mm, 粉末充填層厚 20mm)

てアルブミン試料溶液をサンプル注入部(④)から注入し、それをカラム内の粉末固定層へ吸着させた。B液(pH6.86の500mM-リン酸緩衝溶液)をA液→B液の直線グラジエント30分で流すことにより、その固定層から所定の保持時間で脱離するアルブミンを紫外可視検出器により280nmの吸光度で測定した。

3 実験結果及び考察

3.1 HAp/SiO₂系熱処理粉末の吸着特性

湿式合成法により作製された HAp/SiO₂系複合粉末は、すべての組成(10~70% -HAp)においてHAp単一相が得られ、それらの粉末によるアルブミンの吸着特性では、50% -HAp組成粉末による吸着量が他の組成粉末より大きな値であった⁷⁾。その複合粒子の機械的強度と耐酸性を向上させるためには、比表面積をあまり減少させないような温度で熱処理を行い、HAp相の結晶性をよくすると同時に、母粒子上の微粒子間焼結を進行させることが必要である。

図4に、熱処理粉末の一例として、水蒸気流中800℃、24時間熱処理した50% -HAp/SiO₂と100% -HAp粉末のXRDパターンを示す。

いずれの場合もHAp単一相が得られた。50% -HAp組成粉末では、700℃までのXRDパターンは湿式合成後のものと同様であり、800℃でHApの結晶化が進み、100% -HAp(格子定数 $a=0.942\text{nm}$, $c=0.688\text{nm}$)粉末⁷⁾のように、六方晶系の(211)、(112)及び(300)面の分離が認められた。しかしながら、空气中800℃や水蒸気流中900℃熱処理では、HAp相の他、微量の $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 相が同定された。したがって、HAp/SiO₂系複合粉末の熱処理において、水蒸気流中

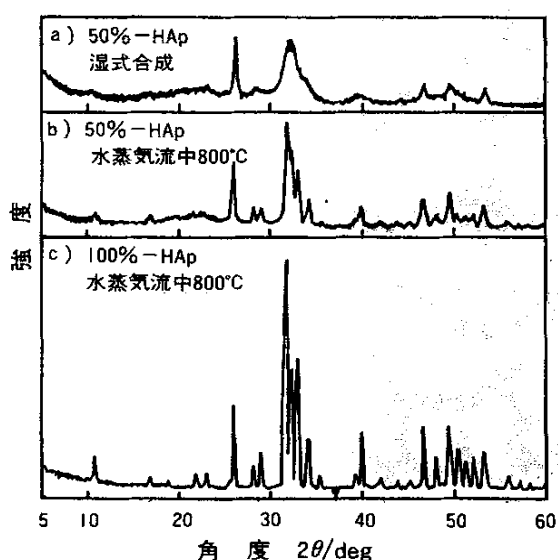


図4 アパタイト系粉末のXRDパターン

雰囲気はHApの分解を抑制するための効果的な熱処理条件であると推測される。

図5は、水蒸気流中800℃、24時間熱処理した50% -HAp/SiO₂粉末の表面組織を示したものである。熱処理後の粉末では、粒子の焼結によって比表面積が熱処理前の201から $70\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ へ減少し、比較的粒子径が大きく、粒度分布が不揃いの凝集粒子が観察された。EPMAによる組成分析では、(Ca/P)のモル比は化学量論比の1.67に近く、前報⁷⁾と同様に、熱処理した場合でもHAp/SiO₂は、均質組成を有する複合粉末であることが分かった。

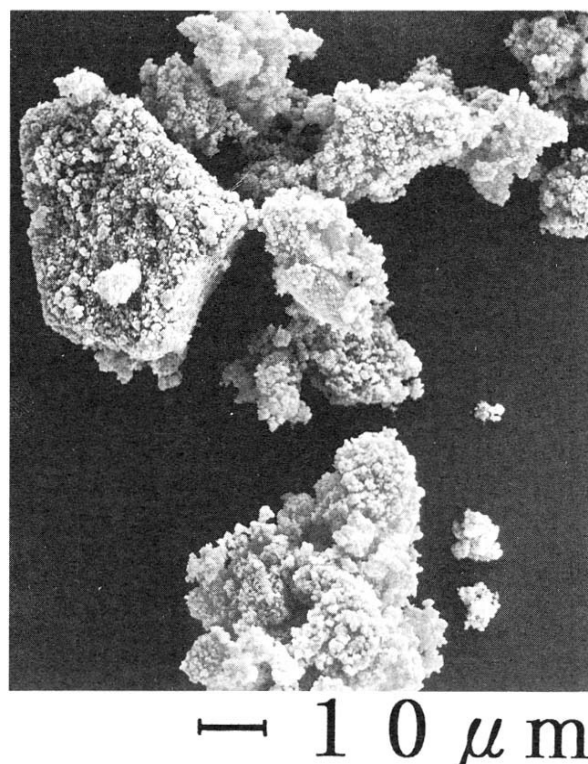


図5 50%-HAp/SiO₂複合粉末の表面組織
(条件：水蒸気流中800℃、24h熱処理)

HAp/SiO₂系複合粉末の吸着特性に及ぼす熱処理温度の影響を調べるために、水蒸気流中で400~800℃、24時間熱処理した複合粉末を用いて、22℃、pH7.0、20mM-リン酸緩衝溶液下でアルブミンの吸着反応を行った。すべてのHAp組成について、いずれの熱処理温度でも、既報^{5),6),7)}と同様に、アルブミンの平衡濃度 C_E が増加するに伴い、粉末単位重量当たりの吸着量 V は大きくなる傾向を示した。図6に、50% -HAp/SiO₂粉末におけるLangmuirの直線式(C_E と (C_E/V) 値の関係)^{6),7)}から計算されたその飽和吸着量(粉末単位重量当たりの値 V_{sw})と熱処理温度との関係を示す。

50% -HAp組成粉末によるアルブミンの飽和吸着量が、他の組成粉末よりも、400~800℃の熱処理温度で最高値になった。50% -HAp組成粉末は、800℃まで熱処理温度が上昇するに伴い、 V_{sw} が粒子の比表面積の減少に対応して52%減少するに対し、粉末単位表面積当たりの値 V_{SA} は37%増加

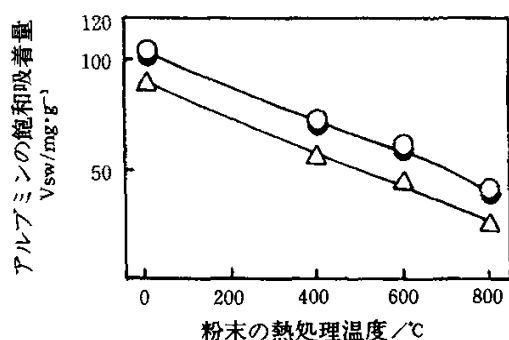


図6 HAp/SiO₂複合粉末によるアルブミンの飽和吸着量

(条件: 22°C, pH 7.0, 20mM-リン酸緩衝溶液, ○:50%-HAp, ●:30%-HAp, △:70%-HAp)

した。これは、熱処理温度の上昇に伴い、焼結により吸着サイト数は減少するが、吸着点1個当たりの活性、すなわち、アルブミン分子に対する吸着親和力が增大する、または、アルブミン分子の吸着形態が変化するためと推察される。

これらの組成粉末によるアルブミンの飽和吸着量は、市販カラム用粉末（和光純薬工業社製ヒドロキシアパタイト）の24mg・g⁻¹より大きいことから、HAp/SiO₂系複合粉末は、アルブミンの吸着材料としての有効性が示唆された。

以上のことから、HAp/SiO₂系複合粉末において、粒子強度と耐酸性の向上という観点から、水蒸気流中雰囲気下で

HAp相の分解を抑制した400～800°Cの熱処理により、HAp微粒子の焼結に起因される比表面積の減少によって正味のアルブミンの吸着量は幾分減少するが、いずれの組成粉末も分離カラム用充填剤として、液体クロマトグラフィーの操作条件（溶離液の種類と流量、pH及び温度等）下での応用が可能であると考えられる。

3.2 充填粉末の耐圧試験

重力沈降法により分級したHAp/SiO₂系複合粉末と市販カラム用（HA-1000）粉末は、静置法によって粉末スラリーをガラスカラムへ流入することにより、粉体層のカラム内充填が可能であった。蒸留水のカラム内透過流量は、いずれの場合も粉末充填時で0.04cm³・min⁻¹であり、未充填時の7.54cm³・min⁻¹と比較して極めて小さい値になった。これは、充填層内の粒子径が10～20μmで粒子間隙が狭く、充填層内圧力損失が大きいためと考えられる。

実際の液体クロマトグラフィーでは、できるだけ短い保持時間で試料の良好な分離が要求されるため、溶液が高圧下でカラム内に流されることが多く、充填層内粒子は大きな圧力を受けると予測される。その時、個々の粒子に負荷される圧力は充填層内溶液の存在により等方的であり、その粒子挙動は湿準状態のCIP処理時のものに近いと推察される。そこで、カラム用充填粒子の耐圧性を検討するために、市販TOSOH社製HAp粉末について、10～200MPa、1分間でCIP処理した場合の粒子の表面組織を図7(×1000倍)と図8(×3000倍)に示す。

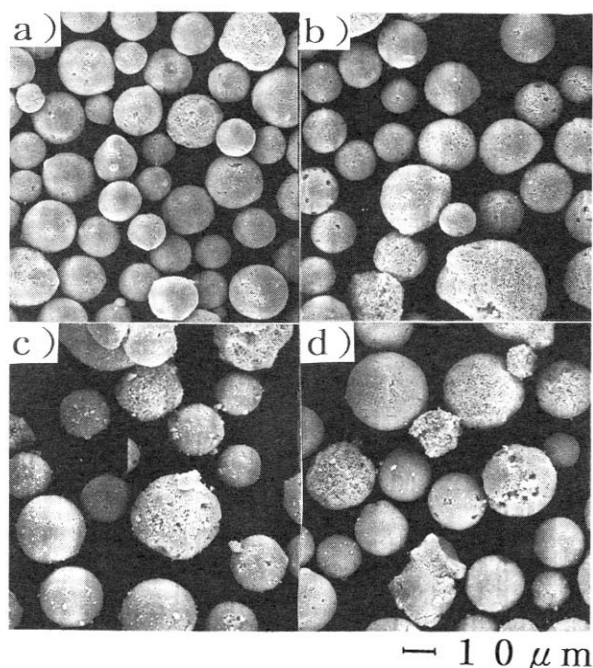


図7 CIP処理した市販（HA-100）粉末の表面組織（×1000）
(条件: a) ;処理前, b) ;10MPa, 1 min, c) ;100MPa, 1 min, d) ;200MPa, 1 min)

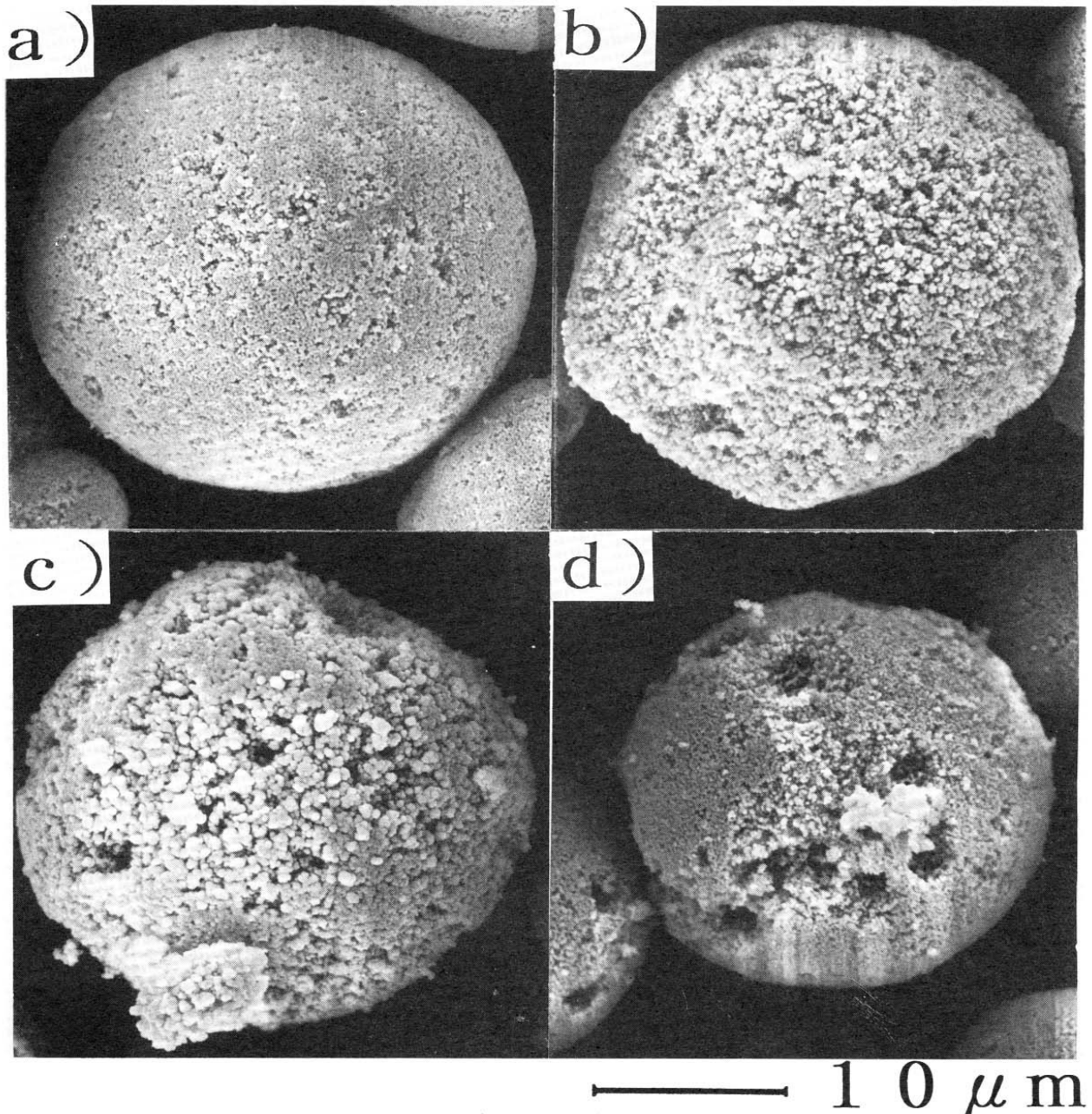


図8 CIP処理した市販(HA-1000)粉末の表面組織(X3000)
(条件: a) ;処理前, b) ;10MPa, 1 min, c) ;100MPa, 1 min, d) ;200MPa, 1 min)

図7と図8より、重力沈降法により調製された粉末は、比較的粒度が揃った粒子径約 $10\mu\text{m}$ の多孔質球状粒子からなり、CIP処理後ではその粒子の変形や歪がみられ、特に、100MPaと200MPaで顕著な粒子破壊が観察された。このように、HAp粉末は、HAp組成単独では粒子形状が幾何学的に安定な球状でも、湿準圧力10MPaで粒子表面の組織変化が認められる材料であることが明らかになった。

図9に、CIP処理(200MPa, 1分間)前後の市販WAKO社製カラム用HAp粉末の表面組織を示す。重力沈降法により調製された粉末は、粒子径 $10\sim 30\mu\text{m}$ の多種形状の扁平粒子から構成され、CIP処理後では、見かけ上同様な凝集粒子が数多く観察された。

しかしながら、そのCIP処理前の粉末は、静置法によるガラスカラム内充填において、ガラスフィルターの目詰まりによる蒸留水充填層内透過流量の経時的低下がみられ、崩れ易く脆い材料であった。

図10は、HAp/SiO₂系複合粉末の一例として、水蒸気流中800℃、24時間熱処理した50%-HAp組成粉末を200MPa, 1分間のCIP処理した場合の表面組織を示したものである。CIP処理によっても顕著な微細構造の変化はみられないことが分かる。

さらに、この粉末は、カラム内充填時の蒸留水層内透過流量も一定であった。

以上のことから、市販カラム用HAp粉末は、粒子形状に

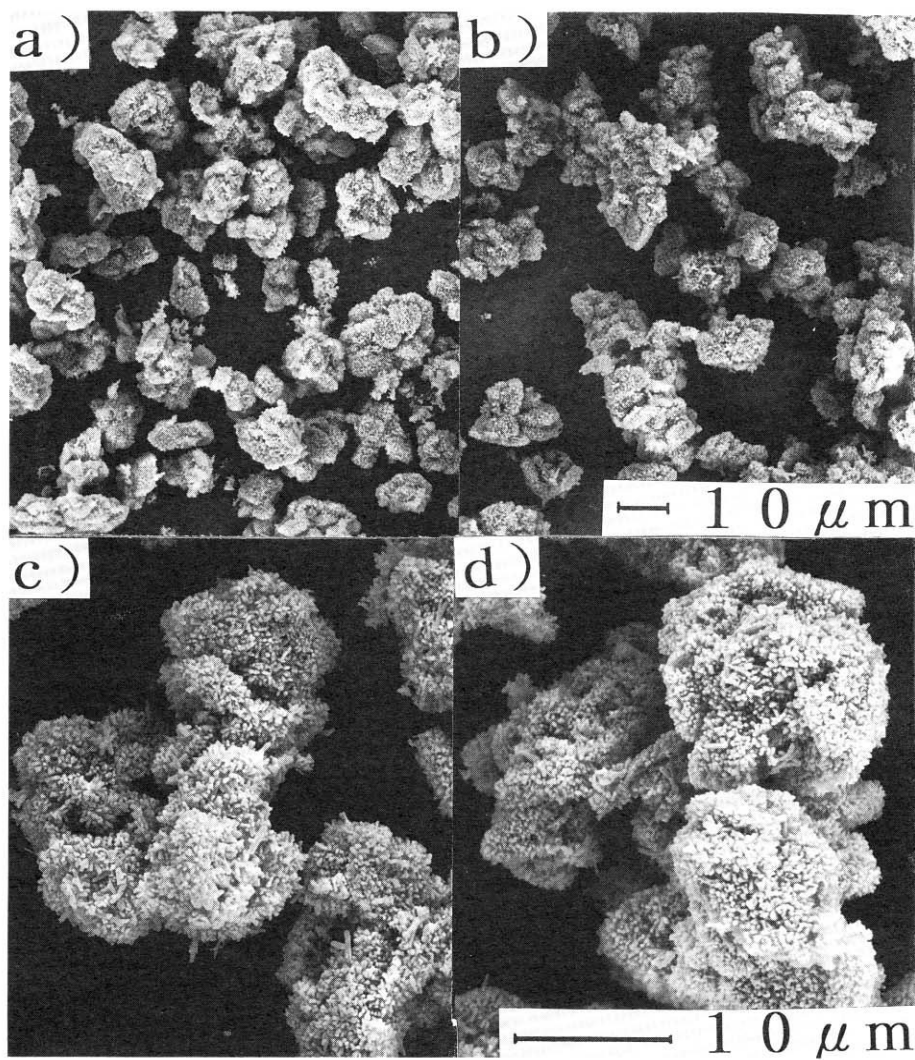


図9 CIP 処理した市販 (WAKO) 粉末の表面組織
(条件: a) ; 処理前, b) ; 200MPa, 1 min, c) ; 処理前, d) ; 200MPa, 1 min)

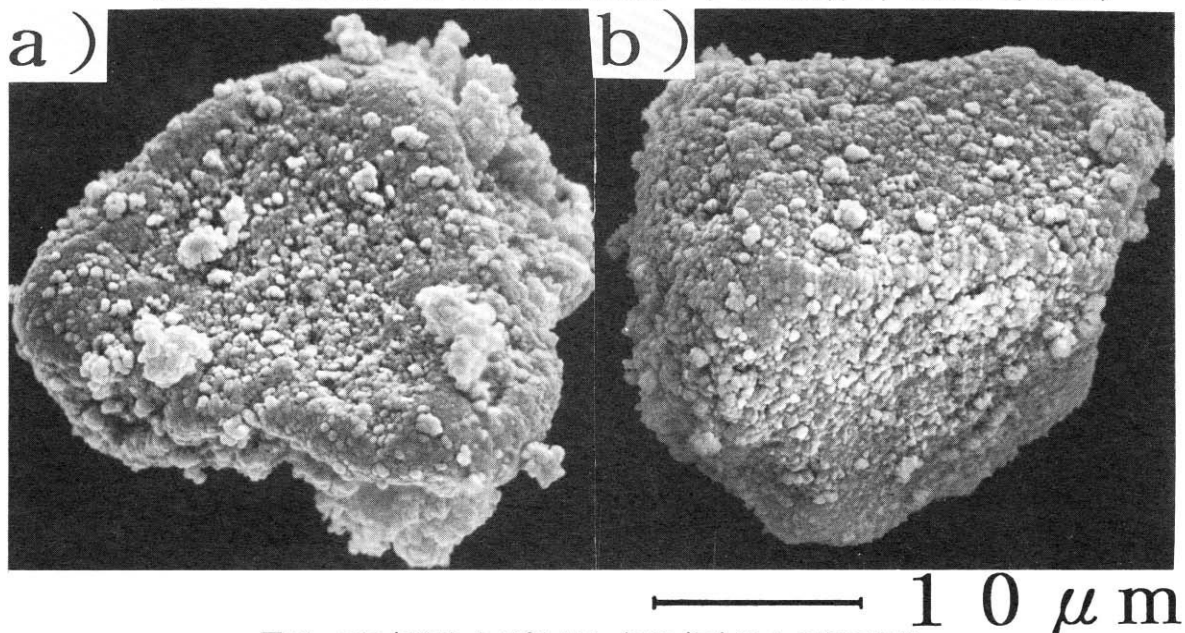


図10 CIP 処理した50%-HAp/SiO₂複合粉末の表面組織
(条件: a) ; 水蒸気流中 800°C, 24 h 熱処理, b) ; a) の 200MPa, 1 min CIP)

関係なく高压処理に弱い材料であるのに対し、50% -HAp/ SiO_2 複合粉末は耐圧性に優れた材料であると考えられる。

しかしながら、その複合粉末は、カラム用充填剤として、長期的使用する場合には、ガラスフィルターの目詰まりや粉末充填層の大きな圧力損失が予想されるため、スプレードライヤー法による球状造粒や分級等の化学工学的単位操作も重要であると考えられる。

3.3 カラム用粉末のクロマト分離特性

図 11 に、ガラスカラムに充填した 50% -HAp/ SiO_2 複合粉末によるアルブミンのクロマト分離特性を示す。温度 39°C 、 $\text{pH} 6.86$ 、流量 $1.0\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ の条件で A 液を 30 分間流した後、 $1.5\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ のアルブミン水溶液を注入し、B 液を A 液→B 液の直線グラジエント 30 分で流出するクロマト展開により、保持時間約 3 分でアルブミンの鋭いピークを検出することが可能であった。

今後は、耐圧強度に優れたカラム用充填粉末の造粒技術を検討すると共に、HAp/ SiO_2 複合粉末による異種蛋白質（アルブミン、リゾチーム及びチトクロム C 等）の混合試料溶液のクロマト展開を行い、ピークの分離性や選択性、保持時間、耐久性等の最適操作条件を把握することが必要である。

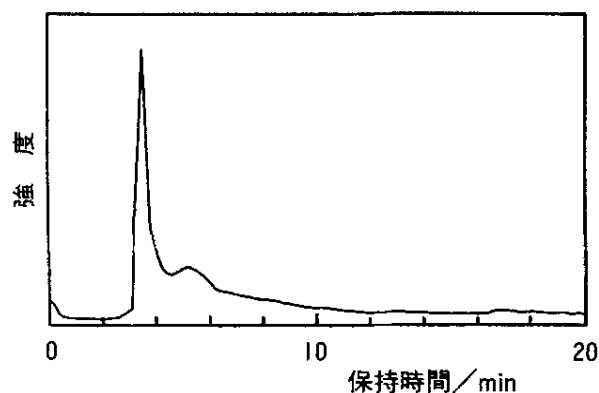


図11 50%-HAp/ SiO_2 粉末によるアルブミンのクロマト分離特性

(条件：カラム内径 8 mm, カラム長 50 mm, 温度 39°C , $\text{pH} 6.86$, 流量 $1.0\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, A 液 10 mM → B 液 500 mM (リン酸緩衝溶液), アルブミン濃度 $1.5\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$)

4. まとめ

HAp/ SiO_2 系熱処理粉末の吸着特性及び市販 HAp 粉末のカラム内充填方法とクロマト分離特性等を検討した結果、下記の結論が得られた。

- 1) 50% -HAp 組成粉末では、水蒸気流中 800°C 熱処理まで HAp 単一相が得られた。
- 2) 水蒸気流中 800°C 熱処理した 50% -HAp 組成粉末は、比表面積 $70\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ であり、(Ca/P) のモル比が化学量論

比の 1.67 に近い均質組成を有する複合粉末であった。

- 3) 水蒸気流中 $400 \sim 800^\circ\text{C}$ で熱処理した複合粉末 ($10 \sim 70\%$ -HAp) によるアルブミン蛋白質の吸着特性では、熱処理温度が上昇するに伴い、アルブミンの飽和吸着量は減少し、50% -HAp 組成粉末の場合が、いずれの熱処理温度でも最高値になった。
- 4) 重力沈降法により分級した複合粉末は、静置法による粉体層のカラム内充填が可能であった。
- 5) 市販カラム用 HAp 粉末は、粒子形状が幾何学的に安定な球状でも、湿準圧力 10 MPa 以上で粒子表面の組織変化が認められる材料であった。
- 6) 水蒸気流中 800°C 熱処理した 50% -HAp 組成粉末は、200 MPa, 1 min の CIP 処理によっても顕著な微細構造の変化は認められなかった。
- 7) 50% -HAp 組成粉末によるクロマト分離特性では、温度 39°C , $\text{pH} 6.86$, 流量 $1.0\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ の条件で、 $1.5\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ - アルブミン水溶液を注入し、A 液→B 液の直線グラジエント 30 分のクロマト展開により、保持時間約 3 分でアルブミンを検出することが可能であった。

したがって、HAp/ SiO_2 系複合粉末は、耐圧性に優れた液体クロマトグラフィー用の充填材料として、異種蛋白質の分離等への応用展開が期待される。

参考文献

- 1) 金澤孝文, 梅垣高士, 門間英毅, 山下仁大, 石膏と石灰, 210, 261 (1987)
- 2) 赤澤敏之, 長野伸泰, 勝世敬一, 北海道立工業試験場報告: No.291, 21 ~ 28 (1992)
- 3) 奥山典生, 小川哲朗, 蛭原正臣, 石膏と石灰, 210, 323 ~ 331 (1987)
- 4) KAWASAKI T., KOBAYASHI W., IKEDA K., TAKAHASHI S., MONMA H., Eur. J. Biochem., 157, 291 ~ 295 (1986)
- 5) 赤澤敏之, 長野伸泰, 勝世敬一, 北海道立工業試験場報告: No.292, 33 ~ 39 (1993)
- 6) 赤澤敏之, 内田典昭, 勝世敬一, 富永一哉, 浅野行蔵, 吉川修司, 平成 5 年度 道立相互共同研究報告書, 1 ~ 24 (1994)
- 7) 赤澤敏之, 内田典昭, 勝世敬一, 北海道立工業試験場報告: No.293, 25 ~ 31 (1994)
- 8) 赤澤敏之, 内田典昭, 勝世敬一, 富永一哉, 浅野行蔵, 吉川修司, 平成 6 年度 道立相互共同研究報告書, 1 ~ 12 (1995)
- 9) 赤澤敏之, 長野伸泰, 勝世敬一, 北海道立工業試験場報告: No.290, 19-26 (1991)
- 10) 大山義年: 化学工学 II 岩波全書, 16, 岩波書店 (1979)