

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年12月19日(19.12.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/257862 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 30/26 (2006.01) *B01J 20/29* (2006.01)
B01J 20/281 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)
B01J 20/283 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/021733

(22) 国際出願日: 2024年6月14日(14.06.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-097913 2023年6月14日(14.06.2023) JP

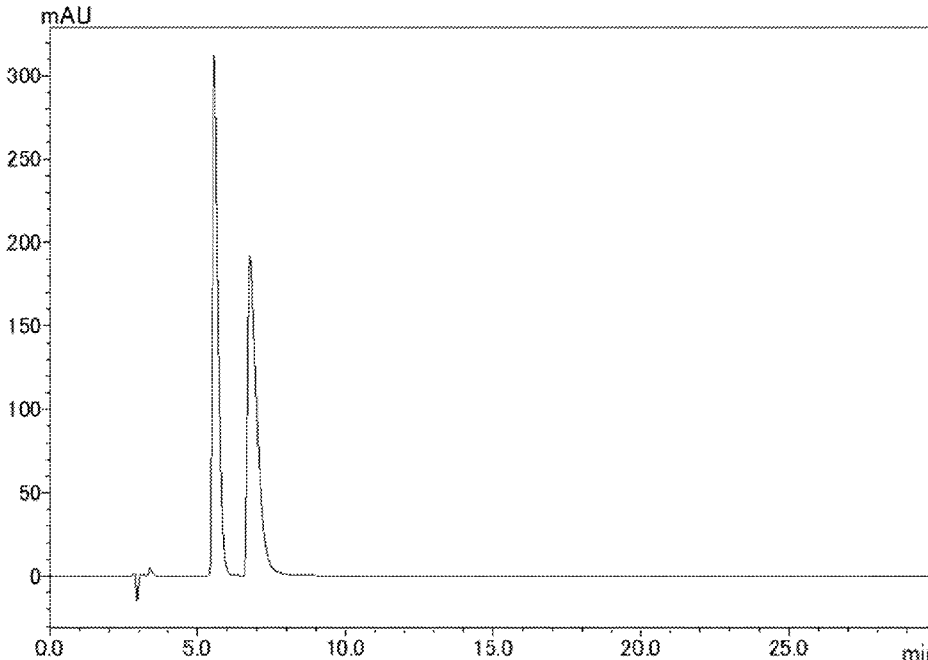
(71) 出願人: 株式会社ダイセル (DAICEL CORPORATION) [JP/JP]; 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町3番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 柴田 徹 (SHIBATA, Toru); 〒1088230 東京都港区港南2-18-1 株式会社ダイセル内 Tokyo (JP). 新蔵 聡 (SHINKURA, Satoshi); 〒1088230 東京都港区港南2-18-1 株式会社ダイセル内 Tokyo (JP). 川原 寛弘 (KAWAHARA, Nobuhiro); 〒1088230 東京都港区港南2-18-1 株式会社ダイセル内 Tokyo (JP). 藤岡 雄一 (FUJIOKA, Yuichi); 〒1088230 東京都港区港南2-18-1 株式会社ダイセル内 Tokyo (JP). 山本 朱莉 (YAMAMOTO,

(54) Title: AMINE SEPARATION METHOD

(54) 発明の名称: アミンの分離方法

[図1]



(57) Abstract: The amine separation method comprises a separation step for separating amine by chromatography using a stationary phase that contains at least any of an oligosaccharide, a polysaccharide, and derivatives thereof, and using a mobile phase that contains a solvent, at least one base, and at least one prescribed acid selected from the group consisting of oxalic acid, acetic acid, formic acid, and trifluoroacetic acid. SB/SA in this amine separation method is at least 0.05 and not more than 0.95, where A is the value calculated using formula (1) for each prescribed acid present in the mobile phase, SA is the total value of the individual As calculated for the individual prescribed acids, B is the value calculated

[続葉有]

Akari); 〒1088230 東京都港区港南 2 - 1 8 -
1 株式会社ダイセル内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人秀和特許事務所 (IP
FIRM SHUWA); 〒1050001 東京都港区虎ノ
門五丁目 1 1 番 2 号 オランダヒルズ森
タワー 1 4 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

using formula (2) for the base present in the mobile phase, and SB is the total value of the individual Bs calculated for the individual bases. Formula (1): A = valence of the prescribed acid × molar concentration of the prescribed acid (mol/L); Formula (2): B = valence of the base × molar concentration of the base (mol/L)

(57) 要約: オリゴ糖、多糖、及びこれらの誘導体の少なくともいずれかを含む固定相と、シュウ酸、酢酸、ギ酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群から選択される 1 種以上の特定の酸、1 種以上の塩基、並びに溶媒を含む移動相と、を用いてクロマトグラフィーによりアミンを分離する分離工程を含み、前記移動相に含まれる各特定の酸について下記式 (1) で算出される値を A、各特定の酸で算出された各 A の合計値を S A、前記移動相に含まれる塩基について下記式 (2) で算出される値を B、各塩基で算出された各 B の合計値を S B とした場合において、S B / S A が、0.05 以上、0.95 以下である、アミンの分離方法。式 (1): A = 特定の酸の価数 × 特定の酸のモル濃度 (mol/L) 式 (2): B = 塩基の価数 × 塩基のモル濃度 (mol/L)

明 細 書

発明の名称：アミンの分離方法

技術分野

[0001] 本開示は、アミンの分離方法に関する。

背景技術

[0002] 多糖の誘導体をキラルセクタとする分離剤（以下、「多糖系CSP」とも称する。）は、多くのエナンチオマーや、構造が似ているために一般的な分離剤による分離が困難な物質、たとえば構造異性体などの分離に極めて効果的であることが知られている。これらの多糖系CSPは一般に吸着剤が中性分子であるため、分析条件においてイオン性であるような試料を分析する場合には、何らかの理由、おそらくは試料イオンが溶媒和されているために分離剤との親和性が低くなっているため、イオン性分子の吸着が静電反発を起こし負荷量を低下させるため、また分離剤の中にごく少量混在するイオン性又は極性の原子団（担体として用いられるシリカゲルに起源するシラノールが多くの場合に問題視される。）が極めて強く相互作用するため、等の理由で、ほとんど保持されなかったり、いちじるしく幅が広い、又は変形した形状のピークを与え、意図した分析ができないことが少なくない。

[0003] 非特許文献1には、移動相に適切な塩を添加することにより上記の問題を解決する方法が開示されている。具体的には、試料陽イオンが適切な陰イオンと同時に固定相に保持される、いわゆるイオンペアクロマトグラフィーであると考えられている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：A. Ishikawa, T. Shibata, “Cellulosic Chiral Stationary Phase Under Reversed-Phase Condition”, Journal of Liquid Chromatography, 1993, Vol. 16, 859-878

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、非特許文献 1 に開示されるような移動相を用いた分離操作では、分離対象物質の分離性能が十分でなく、改善の余地が残されていた。

本開示は、分離性能に優れるアミンの分離方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、鋭意検討を行った結果、オリゴ糖誘導体及び多糖誘導体の少なくともいずれかを含む固定相と、特定の濃度の酸及びアミンを含む移動相とを用いることにより、上記課題を解決できることを見出し、本開示に係る発明の完成に至った。すなわち、本開示の要旨は、以下の通りである。

[0007] [1] オリゴ糖、多糖、及びこれらの誘導体の少なくともいずれかを含む固定相と、

シュウ酸、酢酸、ギ酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群から選択される 1 種以上の特定の酸、1 種以上の塩基、並びに溶媒を含む移動相と、
を用いてクロマトグラフィーによりアミンを分離する分離工程を含み、

前記移動相に含まれる各特定の酸について下記式 (1) で算出される値を A、各特定の酸で算出された各 A の合計値を S A、前記移動相に含まれる各塩基について下記式 (2) で算出される値を B、各塩基で算出された各 B の合計値を S Bとした場合において、 $S B / S A$ が、0.05 以上、0.95 以下である、

アミンの分離方法。

式 (1) : $A = \text{特定の酸の価数} \times \text{特定の酸のモル濃度 (mol/L)}$

式 (2) : $B = \text{塩基の価数} \times \text{塩基のモル濃度 (mol/L)}$

[2] 前記分離工程により分離されたアミンを分析する分析工程をさらに含み、

前記分析工程において、少なくとも質量分析器を用いた分析が行われる、

[1] に記載のアミンの分離方法。

[3] 前記塩基が、アンモニア、第 1 級アミン、第 2 級アミン、及び第 3

級アミンからなる群より選択される１種以上である、〔１〕又は〔２〕に記載のアミンの分離方法。

〔４〕 前記塩基が、アンモニア、エチルアミン、ｎ－プロピルアミン、２－プロピルアミン、ジメチルアミン、ジエチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピロリジン、及びピペリジンからなる群より選択される１種以上である、〔３〕に記載のアミンの分離方法。

〔５〕 前記移動相が、前記特定の酸として、少なくともシュウ酸を含む、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載のアミンの分離方法。

〔６〕 前記オリゴ糖、多糖、及びこれらの誘導体の少なくともいずれかが、光学活性部位を有する、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のアミンの分離方法。

〔７〕 前記溶媒が、水、アセトニトリル、エタノール、メタノール、２－プロパノール、ヘキサン、ヘプタン、ＴＨＦ、及び液体二酸化炭素からなる群から選択される１種以上である、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載のアミンの分離方法。

発明の効果

〔０００８〕 本開示によれば、分離性能に優れるアミンの分離方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

〔０００９〕 〔図１〕実施例１におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

〔図２〕比較例１におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

〔図３〕比較例２におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

〔図４〕比較例３におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

〔図５〕実施例２におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムであ

る。

[図6]比較例4におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図7]実施例3におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図8]比較例5におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図9]実施例4におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図10]比較例6におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図11]実施例5におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図12]比較例7におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図13]実施例6におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図14]比較例8におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図15]比較例9におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図16]実施例7におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図17]比較例10におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図18]実施例8におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図19]比較例11におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラム

である。

[図20]実施例 9 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図21]実施例 1 0 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図22]実施例 1 1 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図23]実施例 1 2 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図24]実施例 1 3 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図25]実施例 1 4 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図26]比較例 1 2 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図27]実施例 1 5 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図28]比較例 1 3 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図29]実施例 1 6 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図30]比較例 1 4 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図31]実施例 1 7 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図32]実施例 1 8 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラムである。

[図33]実施例 1 9 におけるアミンの分析により得られた液体クロマトグラム

である。

[図34]実施例20におけるアミンの質量分析により得られたマスペクトルである。

[図35]実施例21におけるアミンの質量分析により得られたマスペクトルである。

[図36]実施例22におけるアミンの質量分析により得られたマスペクトルである。

[図37]実施例23におけるアミンの質量分析により得られたマスペクトルである。

[図38]実施例24におけるアミンの質量分析により得られたマスペクトルである。

発明を実施するための形態

[0010] 以下に、本開示について具体的な実施形態を挙げて説明するが、各実施形態における各構成及びそれらの組み合わせ等は、一例であって、本開示の主旨から逸脱しない範囲内で、適宜、構成の付加、省略、置換、及びその他の変更が可能である。本開示は、実施形態によって限定されることはなく、クレームの範囲によってのみ限定される。

また、本開示に開示された各々の態様は、本開示に開示された他のいかなる特徴とも組み合わせることができる。

なお、本開示において、数値範囲の下限値及び上限値を分けて記載する場合、前記数値範囲は、それらのうち任意の下限値と任意の上限値とを組み合わせたものとして用いることができる。また、本開示において、「～」を用いてその前後に数値又は物性値を挟んで表現する場合、端点である下限及び上限の値を含むものとして用いることとする。また、「A～B」又は「A以上B以下」で表される数値範囲が段階的（例えば、好ましい順）に記載されている場合、各数値範囲の上限及び下限は任意に組み合わせることができる。

また、本開示において「A又はB」の表現は、「A及びBからなる群から選択される少なくとも1つ」と読み替えることができる。

[0011] <アミンの分離方法>

本開示の一実施形態に係るアミンの分離方法（以下、単に「アミンの分離方法」とも称する。）は、

オリゴ糖、多糖、及びこれらの誘導体の少なくともいずれかを含む固定相と、

シュウ酸、酢酸、ギ酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群から選択される1種以上の特定の酸、1種以上の塩基、並びに溶媒を含む移動相と、
を用いてクロマトグラフィーによりアミンを分離する分離工程を含み、

前記移動相に含まれる各特定の酸について下記式（1）で算出される値をA、各特定の酸で算出された各Aの合計値をS A、前記移動相に含まれる各塩基について下記式（2）で算出される値をB、各塩基で算出された各Bの合計値をS Bとした場合において、 $S B / S A$ が、0.05以上、0.95以下である、

アミンの分離方法である。

式（1）： $A = \text{特定の酸の価数} \times \text{特定の酸のモル濃度 (mol/L)}$

式（2）： $B = \text{塩基の価数} \times \text{塩基のモル濃度 (mol/L)}$

[0012] 上記のアミンの分離方法は、上記の分離工程以外の工程、例えば、分離されたアミンを分析（例えば、同定）する分析工程、分離されたアミンを定量する定量工程、分離されたアミンの構造を推定する工程、又は分離されたアミンを回収する回収工程等を含んでいてもよい。

また、上記の実施形態に係る移動相は、分離対象となるアミンを含む前の移動相であり、「前記移動相中のアミンの含有率」は、分離対象となるアミンを含む前の移動相中のアミンの含有率である。

また、本開示において、オリゴ糖は、糖残基数が5以上の糖である。

また、本開示におけるオリゴ糖と多糖との区別について、分子量で分けることができ、分子量が3000以下であるものをオリゴ糖とし、3000超であるものを多糖とする。

また、本実施形態において、特定の酸は遊離しているもの及び酸アニオン

となっているものの両方を含み、塩基は遊離しているもの及びカチオンとなっているものの両方を含む。また、酸アニオン及びカチオンは、互いに、又は他のイオンとともに、塩を形成していてもよい。

[0013] オリゴ糖、多糖、及びこれらの誘導体の少なくともいずれか（以下、これらを総称して「オリゴ糖・多糖誘導体」とも称する。）を含む固定相と、シュウ酸、酢酸、ギ酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群から選択される１種以上の特定の酸、１種以上の塩基、並びに溶媒を含む移動相とを用い、さらに、これらの酸と塩基の含有率を調整することによりアミンの分離性能が向上することを本発明者らは見出した。この理由について、本発明者らは以下のように推測している。

[0014] 移動相が酸過剰の環境（塩基よりも酸が多い環境）においては、酸アニオンが生じるとともに、分析対象（アミン）がプロトン化されてアンモニウム陽イオンが生じ、これらの酸アニオンとアンモニウム陽イオンによりイオンペアが生成される。このイオンペアは、極性が弱いため、やはり極性が弱いオリゴ糖・多糖誘導体に吸着し、分析対象の分離を可能とする。

本発明者らが鋭意検討した結果、移動相に、酸のモル濃度（含有率）よりも低いモル濃度で塩基を加え、酸の一部を中和して塩に変換することで、酸が弱酸であったとしても、移動相中の対アニオンの濃度を好ましいレベルに調整できることを見出した。

さらに、本発明者らは、本発明者らによって見出された上記の機構をもとに、酸の種類、並びに酸及びアミンの含有率等の検討を重ねた結果、上記の本実施形態に係る構成によりアミンの分離性能を向上させる、具体的にはクロマトグラフィーにおける分析対象の保持時間を十分にすることができることを見出した。

[0015] また、本発明者はさらに鋭意検討し、固定相が酸性を有し、これが試料アミンの非特異的な吸着を惹き起こすような場合、例えば該固定相が、シリカゲルを担体として含むような場合に、しばしばそのシラノール基が惹き起こすと考えられるピークテイリングと呼ばれる現象が起きる。このような場合

において、上記の本実施形態に係る態様によれば、アミンの分離性能を向上させる、具体的には分析により得られるクロマトグラムのピークをシャープなものとするることができることを見出した。

上述したカチオンと、解離されたシラノールの共役陰イオンとの間でイオンの相互作用が生じた場合、分析により得られるクロマトグラムのピークがブロードになってしまうが、本実施形態に係る態様では過剰の酸の存在により、シラノールの解離が抑制され、このイオンの相互作用が抑制されたと本発明者らは推測している。

[0016] また、従来技術では、移動相の pH を高めにし、試料アミンを中性分子として非イオン性の固定相に保持させるという手法もある。しかし固定相がシリカゲルを含む場合には、このような条件ではシリカゲルが溶解してカラムの劣化が起きやすいため、pH が上がり過ぎないように、炭酸水素アンモニウムのような緩衝作用を有する塩を添加するとともに本カラムより安価に交換できるガードカラムを本カラムの前に挿入し、本カラムに流れる移動相をシリカ分で飽和させることにより、本カラムからのシリカの溶出を抑制するといった対策が取られている。

一方で、本実施形態に係る態様では、過剰の酸により pH が低くなるため、上記のような対策を取る必要がないことも大きな利点である。

[0017] また、アミンの分離において、非特許文献 1 で開示される移動相を用いた分離操作を適用した場合、該移動相には高沸点の不揮発性の塩が添加されるため、移動相中の溶媒を蒸発させた後に該塩が残りやすいため、アミンの分離性能が低下してしまう。

一方で、上記の本実施形態における移動相において、塩基としてアミンを採用した場合、移動相中では、シュウ酸、酢酸、ギ酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群から選択される 1 種以上の特定の酸のアニオン及びアミンのカチオンを含む塩が生じるが、これらの塩は、揮発又は熱分解しやすいため、溶媒を蒸発させたとしても高沸点の不揮発性の塩が残りにくい。

[0018] [アミン]

本実施形態に係る分離方法によれば、複数のアミンの混合物を各アミンに分離したり、アミンと非アミンとを含む混合物からアミンを分離したりすることができる。特にアミンのエナンチオマー（鏡像異性体）を分離できることは科学技術における重要性が大きい。

[0019] 分離対象となるアミンは、アミノ基を含む化合物である限り特に限定されず、1級アミン、2級アミン、及び3級アミンのいずれであってよい。具体的なアミンとしては、アラニン、システイン、グルタミン酸、メチオニン、ロイシン、チロシン、もしくはトリプトファン等のアミノ酸；前記アミノ酸のエステル、アミド等のアミノ酸誘導体；ジメチルアミノエタノール、プロパノールアミン、メチオニノール、もしくはノルエフェドリン等のアミノアルコール；フェニルエチルアミン；1-フェニル-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン等の環状アミン；又はその他のアミノ基を含む塩基性医薬品等、とりわけそれらのエナンチオマーが挙げられる。

[0020] 本実施形態に係る分離方法によれば、分子の形状を区別する高い分離性能を達成し得ることから、構造が互いに類似するために分離が難しいアミンの混合物を各アミンに分離することもできる。構造が互いに類似するアミンの混合物としては、連鎖異性体の混合物、位置異性体の混合物、幾何異性体の混合物、及び類縁体の混合物等が挙げられる。さらに、固定相として、光学活性部位を有するオリゴ糖・多糖誘導体を有するキラル固定相を用いることにより、エナンチオマーの混合物を各エナンチオマーに分離できることが最大の特長である。

[0021] [固定相]

固定相は、吸着剤（「分離剤」とも称する。）としてオリゴ糖、多糖及びこれらの誘導体の少なくともいずれか（以下、これらを総称して「オリゴ糖・多糖誘導体」とも称する。）を含んでいればよく、オリゴ糖・多糖誘導体を含む態様は特段制限されない。例えば、吸着剤として、オリゴ糖・多糖誘導体又はオリゴ糖・多糖誘導体と他の成分との混合物を固化したものをを用いてもよく、オリゴ糖・多糖誘導体又はオリゴ糖・多糖誘導体と他の成分との

混合物を担体に担持させたものを用いてもよい。また担持において、担体との間に化学結合を設ける、オリゴ糖・多糖誘導体間に化学結合を設ける、又はオリゴ糖・多糖誘導体表面に高分子不透過性の層を設けるなどの方法により、多糖又はオリゴ糖誘導体を不溶化したものは特に有用性が高い。

[0022] 固定相の形状は特段制限されず、例えば、破砕されて無定形等の形状であってもよいが、球形であることが好ましい。この場合、粒子をカラムに充填して用いるカラムクロマトグラフィーに利用することができる。オリゴ糖・多糖誘導体そのものを造粒してもよいが、効率、耐圧性、使いやすさの面で優れる観点から、多孔質シリカゲル等の担体に担持させることが好ましい。多孔質の場合、表面だけが多孔質になるようにし、オリゴ糖・多糖誘導体を担持した時に、表面近くに分布するようにしたもの（コアシェル、表面多孔性、又はペリフェラル等の様々な呼び方がある。）であってもよい。

[0023] 固定相の形状が球形である場合、その直径は特段制限されないが、好ましくは $0.5 \sim 100 \mu\text{m}$ であり、より好ましくは $0.5 \sim 50 \mu\text{m}$ であり、さらに好ましくは（現状におけるクロマトグラフィー装置において手ごろであるという観点から） $1 \sim 20 \mu\text{m}$ である。該直径は、アミンの分離の観点からは小さい方が好ましいが、分取用としての大型装置に利用する場合には通液抵抗を下げるため大きい方が好ましい。本開示において、「球形」は略球形の形状も含む。

[0024] オリゴ糖・多糖誘導体の種類は特段制限されず、例えば、オリゴ糖又は多糖（以下、これらを総称して「オリゴ糖・多糖」とも称する。）の水酸基もしくはアミノ基の一部又は全部が置換基で置換されたオリゴ糖・多糖であってもよい。多糖誘導体は、例えば、オリゴ糖・多糖の水酸基もしくはアミノ基の一部又は全部が他の化合物と反応して得られるものであり、一例を示すと、オリゴ糖・多糖の水酸基の一部もしくは全部を、更に一つ又は複数の置換基を含んでもよい、脂肪族カルボン酸、安息香酸、又はフェニルカルバミン酸のエステルとしたものである。これらの中でも、分離性能の観点から、ベンゼン環に含まれる少なくとも1つの水素原子が、それぞれ独立して、メチ

ル基又はハロゲン原子で置換された、安息香酸、又はフェニルカルバミン酸のエステルとしたオリゴ糖・多糖が好ましい。

なお、オリゴ糖・多糖誘導体は、1種類を単独でも用いてもよく、2種以上を任意の組み合わせで併用してもよい。

[0025] オリゴ糖・多糖誘導体の母体となるオリゴ糖・多糖の種類は特段制限されない。

オリゴ糖・多糖の糖残基数は、5以上であれば特段制限されず、例えば、10以上であってもよく、20以上であってもよく、また、1000未満であってもよく、500以下であってもよく、100以下であってもよく、75以下であってもよく、50以下であってもよい。

[0026] オリゴ糖・多糖を構成する単糖の種類は特段制限されず、例えば、エリトロース、もしくはトレオース等のアルドテトロース；リボース、リキソース、キシロース、もしくはアラビノース等のアルドペントース；アロース、タロース、グロース、グルコース、アルトロース、マンノース、ガラクトース、もしくはイドース等のアルドヘキソース；エリトルロース等のケトテトロース；キシロース、もしくはリブロース等のケトペントース；又はプシコース、フルクトース、ソルボース、もしくはタガトース等のケトヘキソース；等が挙げられる。これらの中でも、素材として高純度で入手しやすいものとしてグルコース、フルクトース、グルコサミンが好ましい。

なお、これらの単糖は、1種類を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

[0027] より具体的に、多糖としては、例えば、アミロース、又はアミロペクチン、グリコーゲン、セルロース、カードラン、パラミロン、キチン、キトサン、デキストラン、ニゲラン、アガロース、カラギーナン、ヘパリン、アルギン酸、ヒアルロン酸、ペクチン、キシログルカン、キシラン、グルコマンナン、又はレバンが挙げられる。これらの中でも、分離性能が優れること、高純度で入手しやすいという観点ではセルロース、アミロース、キチン、キトサン、カードラン、シゾフィラン、アガロース等が好ましい。なお、アミロ

ースやアミロペクチンは、それぞれが単体で用いられていてもよく、デンプンのように両方が含まれる態様で用いられてもよい。

[0028] また、上述したように、エナンチオマーの混合物を各エナンチオマーに分離できる観点から、光学活性部位を有するオリゴ糖・多糖誘導体が好ましい。

[0029] 固定相におけるオリゴ糖・多糖誘導体の量は特段制限されず、オリゴ糖・多糖誘導体を固定相の分離剤として使用した公知の方法を参照して適宜設定することができる。例えば、固定相中のオリゴ糖・多糖誘導体の含有率は、100質量%であってもよく、上述した担体等を用いる場合には、5質量%以上、50質量%以下であることが好ましく、5質量%以上、30質量%以下であることがより好ましく、10質量%以上、30質量%以下であることがさらに好ましい。

[0030] 上述したように、オリゴ糖・多糖誘導体を含む態様は特段制限されず、オリゴ糖・多糖誘導体又はオリゴ糖・多糖誘導体そのものを必要に応じて、粒子化、多孔質粒子化、多孔質モノリス化したものでもよく、オリゴ糖・多糖誘導体又はオリゴ糖・多糖誘導体、と他の成分との混合物を固化したものをを用いてもよく、オリゴ糖・多糖誘導体又はオリゴ糖・多糖誘導体と他の成分との混合物を担体に担持させたものをを用いてもよいが、オリゴ糖・多糖誘導体又はオリゴ糖・多糖誘導体と他の成分との混合物を担体に担持させたものが好ましく、オリゴ糖・多糖誘導体を担体に担持させたものがより好ましい。

[0031] 上記の担持の方法としては、公知の方法を採用することができ、物理的な担持であってもよく、化学的な担持であってもよい。化学的な担持としては、例えば共有結合等の化学結合によりオリゴ糖・多糖誘導体が担体に担持される方法を好適に採用することができる。具体的には、オリゴ糖・多糖誘導体、オリゴ糖・多糖誘導体の原料又はオリゴ糖・多糖誘導体の中間体に反応性基を導入し、この置換基と担体表面に存在する反応性基とを反応させる方法が挙げられる。この際、オリゴ糖・多糖誘導体間に化学結合を設ける処理

を行ってもよい。なお、担体表面に存在する反応性基とは、未処理の担体の表面に存在する基であってもよく、担体を表面処理剤、例えば3-アミノプロピルトリエトキシシラン及び3-グリシジルオキシプロピルトリメトキシシラン等のシランカップリング剤で表面処理することにより担体表面に導入された基であってもよい。この他、いわゆるクリック反応のペアをそれぞれ固定相とオリゴ糖・多糖誘導体に結合し、互いに反応させる方法も挙げられる。或いは、オリゴ糖・多糖誘導体と担体の間に結合を形成する方法だけではなく、オリゴ糖・多糖誘導体を含む原子団の間でいわゆる架橋結合を形成することによって、担体表面に不溶化された層を形成することもできる。さらに、物理的な担持としては、例えば、シリカゲルにオリゴ糖・多糖誘導体溶液を含浸、蒸発させることによりオリゴ糖・多糖誘導体を担体上に物理吸着（例えば、コーティング）する方法により、オリゴ糖・多糖誘導体を担体に担持してもよい。

これらの方法の中でも、溶媒へのオリゴ糖・多糖誘導体の溶解を抑制できる観点から、好ましくは、シリカゲルとオリゴ糖・多糖誘導体骨格との間に何らかの化学結合を形成する方法、又は担体上のオリゴ糖・多糖誘導体間に何らかの化学結合を形成する方法により不溶化することが好ましい。なお、溶媒へのオリゴ糖・多糖誘導体の溶解を抑制するため、担体を用いない場合でも、オリゴ糖・多糖誘導体間に化学結合を設けることが好ましい。

[0032] 担体としては、オリゴ糖・多糖誘導体を担体に固定することができる限り、特に制限されない。担体は、無機担体であってもよく、有機担体であってもよいが、無機担体であることが好ましい。無機担体としては、例えばシリカゲル、アルミナ、マグネシア、ガラス、カオリン、酸化チタン、ケイ酸塩、ジルコニア、又はヒドロキシアパタイト等が挙げられる。有機担体としては、例えば架橋ポリスチレン、架橋ポリ（メタ）アクリルアミド、架橋ポリ（メタ）アクリレート、又はポリサッカライド等が挙げられる。またシリカゲルを形成する際に多官能シランカップリング剤を共重合させたハイブリッドシリカゲルも利用できる。これらの有機担体は、架橋剤によって架橋され

ることで不溶化していることが好ましい。

[0033] 担体の形状は、特に制限されず、例えば粒子、及びカラム管に液密に収容される多孔性の円柱体（モノリス）等が挙げられる。また、担体としてキャピラリーの内壁を挙げることでもできる。分離係数が十分に大きい場合には、メンブレン型の担体を用い、厚み方向に展開してもよいし、薄層クロマトグラフィーとして面方向に展開することも可能である。

[0034] また、本実施形態において、担体は、シリカゲルであることが好ましい。シリカゲルは、前述した特性、即ち分離性能に優れ、また硬くて丈夫だからである。シリカゲルとして、全多孔性のものに加え、いわゆるコア－シェル型のものを用いてもよく、表面が化学修飾されたシリカゲルを用いてもよい。

[0035] [移動相]

移動相は、シュウ酸、酢酸、ギ酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群から選択される1種以上の特定の酸、1種以上の塩基、並びに溶媒を含む。

移動相は、分離性能を阻害しない範囲で、上記の成分以外の成分を含んでもよい。また、移動相は、少なくとも分析を実施する条件において、均一系（単相系）であることが好ましい。

[0036] なお、本開示において、「移動相」とは、液体クロマトグラフィー及び超臨界流体クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーにおいて、分離対象とともに固定相に流し込まれ、分離対象とともに移動し、その後、固定相から分離物を溶出させる液体を意味する。

[0037] 移動相に含まれる塩の含有率は特段制限されないが、所望の分離性能を確保する観点から、 0.5 mmol/L 以上 1000 mmol/L 以下であることが好ましく、 1 mmol/L 以上、 200 mmol/L 以下であることがより好ましく、 1 mmol/L 以上、 50 mmol/L 以下であることがさらに好ましく、 1 mmol/L 以上、 20 mmol/L であることが特に好ましい。上述したように、質量分析法（MS）を採用する場合、高沸点の塩の含有率は低い方が好ましい。高沸点の塩としては、例えばカチオンとし

て金属イオンを含む塩、又は四級アンモニウムイオンを含む塩が挙げられ、具体的に、該塩の含有率は、5 mM以下が好ましく、実質的に含まない（検出限界未満である）ことがより好ましい。

[0038] （特定の酸）

移動相は、シュウ酸、酢酸、ギ酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群から選択される1種以上の特定の酸を含む。これらのうち、酸性度が比較的高いことから、シュウ酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群から選択される1種以上の酸が少なくとも含まれることが好ましい。さらに、液体クロマトグラフィーの部材に吸着するなどして他の分析にコンタミネーションを起こしやすく、かつ廃棄後、環境に対するフッ素汚染を防止する注意を求められるトリフルオロ酢酸に対し、そのような傾向がなく、またMS検出器の温度で容易に低分子量の一酸化炭素、二酸化炭素、及び水に分解するためMS分析に悪影響を及ぼしにくく、また吸湿性などがない扱いやすい2水結晶として安価に得られる、シュウ酸が特定の酸として少なくとも含まれることが特に好ましい。これらの酸は、1種単独であってもよく、任意の2種以上を任意の比率で組み合わせたものであってもよい。また、本開示の効果が得られる範囲で、他の酸を含んでもよい。

なお、シュウ酸は、溶出液を分取した場合に、カルシウムイオンを用いて沈殿分離することが出来るという利点もある。

移動相に含まれる特定の酸は、一部が塩になることでイオンペアクロマトグラフィーにおいて試料アンモニウムの固定相への保持を促す対イオンを供給するとともに、一部は酸として存在させ、試料アミンを確実にアンモニウムイオンに変換することが好ましい。試料アミンはクロマトグラフィー条件において稀薄であるため、移動相がほぼ中性であってもアンモニウムイオンとして存在する確率が高いが、酸を過剰にすることによってこれを確実にすることが出来る。

[0039] 移動相に含まれる特定の酸の含有率（2種以上併用する場合は、合計含有率）は、アミンの分離性能を向上させる観点から、1 mmol/L以上であ

ることが好ましく、また、 1000 mmol/L 以下であることが好ましく、 200 mmol/L 以下であることがより好ましく、 50 mmol/L 以下であることがさらに好ましく、 20 mmol/L 以下であることが特に好ましい。

上記の含有率が上記範囲の下限以上であれば、実質的に（どれだけ薄くても大なり小なりの効果は得られるが、実際的な効果が得るためにはある程度の濃度が必要）試料を保持させる効果が得られる。また、上記の含有率が上記範囲の上限以下であれば、検出、特にMSによる検出に対し悪影響がない。すなわち、移動相に含まれる含有率の好ましい範囲としては、例えば $1\sim1000\text{ mmol/L}$ 、 $1\sim200\text{ mmol/L}$ 、 $1\sim50\text{ mmol/L}$ 、 $1\sim20\text{ mmol/L}$ の範囲が挙げられる。

[0040] 特定の酸以外の酸としては、例えば、メタンスルホン酸、硝酸、リン酸、又はグリコール酸等が挙げられ、高沸点の不揮発性の塩を形成しにくい観点においては、硝酸、又はグリコール酸などの有機酸が好ましく、装置に対する腐食が少ないという観点においてはスルホン酸類、リン酸、有機酸が好ましい。これらの特定の酸以外の酸は、1種単独であってもよく、任意の2種以上を任意の比率で組み合わせたものであってもよい。

[0041] (塩基)

移動相は、塩基を含む。上述した特定の酸の一部を共役アニオンとしたイオンペアクロマトグラフィーとしての保持を確実にするためには、該特定の酸よりも小さいモル濃度の塩基を加え、特定の酸の一部を中和する。この塩基としては、例えば、金属、4級アンモニウムの水酸化物、又は炭酸塩等が挙げられる。該塩は、前記特定の酸よりも弱い酸の塩であってもよく、アミンであることが好ましい。アミンである場合には、熱によって特定の酸とアミンに解離し、揮発することによって質量分析法（MS）による検出を阻害しない。なお、移動相は酸過剰の環境となっているため、塩基は基本的に移動相中では塩として存在している。

[0042] 移動相に含まれる塩基の含有率（2種以上併用する場合は、合計含有率）

について、アミンの分離性能を向上させる観点から、移動相に含まれる各特定の酸について下記式（１）で算出される値をA、各特定の酸で算出された各Aの合計値をS A、移動相に含まれる塩基について下記式（２）で算出される値をB、各塩基で算出された各Bの合計値をS Bとした場合において、 $S B / S A$ が、0.05以上、0.95以下である、という条件を満たすように塩基が含有される。

式（１）： $A = \text{特定の酸の価数} \times \text{特定の酸のモル濃度 (mol/L)}$

式（２）： $B = \text{塩基の価数} \times \text{塩基のモル濃度 (mol/L)}$

なお、酢酸の価数は1、ギ酸の価数は1、トリフルオロ酢酸の価数は1である。シュウ酸の価数は1又は2となり得るが、第1段と第2段の解離定数に10の3乗の開きがあるため、塩基の量が酸のモル数より小さい（ < 0.095 ）本開示の条件においては、第2段解離は無視できる程度にしか起こらないと推定されることから本開示においては1として扱う。

なお、上記の通り、特定の酸の価数はいずれも1となるため、上記式（１）は、下記式（１）'で表すこともできる。

式（１）'： $A = \text{特定の酸のモル濃度 (mol/L)}$

[0043] 上記の $S B / S A$ は、0.05以上、0.95以下であれば特段制限されないが、アミンの分離性能を向上させることができる観点から、0.1以上であることが好ましく、0.2以上であることがより好ましく、0.4以上であることがさらに好ましく、また、系の酸性度が低下して、試料アミンを完全にイオン化できない可能性が生じる観点から、0.9以下であることが好ましく、0.7以下であることがより好ましい。すなわち、移動相に含まれる含有率の好ましい範囲としては、例えば、一価酸の場合には、0.1～0.9、0.2～0.7、0.4～0.7の範囲が挙げられる。

[0044] 例えば、移動相中に、特定の酸として酢酸（価数：1）が $X_1 \text{ mol/L}$ 含まれ、塩基としてトリエチルアミン（価数：1）が $Y_1 \text{ mol/L}$ 含まれる場合、上記式（１）で算出されるAは $X_1 \text{ mol/L}$ ($= 1 \times X_1$) となり、上記式（２）で算出されるBは $Y_1 \text{ mol/L}$ ($= 1 \times Y_1$) となる。また、酸

の種類は1種類であり、塩基の種類も1種類であるため、 $S A = X_1$ 、 $S B = Y_1$ となるため、 $S B / S A = Y_1 / X_1$ となる。

[0045] なお、特定の酸よりも解離度が小さい酸は任意の濃度で含まれていてもよいが、解離度が特定の酸よりも大きい酸が含まれている場合、この酸が「塩基」を優先的に消費してしまうため、(上記の $S B$) - (移動相に含まれる特定の酸よりも解離度が大きい酸の価数) $\times$ (移動相に含まれる特定の酸よりも解離度が大きい酸の濃度 (mol/L)) を $S B$ とみなして上記の $S B / S A$ を算出してもよい。この計算を行う場合で、特定の酸よりも解離度が大きい酸が多価酸である場合には、第2項は「特定の酸」よりも解離度が大きい段階までの荷数を乗じたものとする。

なお、上記の解離度は、25℃水中での解離度とする。この解離度は、例えば、American Chemical Societyから発行されている“pKa Data Compiled by R. Williams”に記載されている。

[0046] また、本開示の別の実施形態は、上記の $S B / S A$ が、特定の酸及び塩基の濃度のみを考慮して設定される態様である。この態様では、上記の式(1)及び式(2)が、それぞれ以下の式(1)”及び式(2)”に置き換わる。式の置き換え以外は、上述した実施形態の条件を同様に適用することができる。

式(1)” : $A = \text{特定の酸のモル濃度 (mol/L)}$

式(2)” : $B = \text{塩基のモル濃度 (mol/L)}$

[0047] また、本開示のさらに別の実施形態は、シュウ酸の価数を1又は2として扱う態様である。この態様では、シュウ酸が1価の酸として存在している場合には価数を1とし、2価の酸として存在している場合には価数を2とする。この点以外は、上述した実施形態の条件を同様に適用することができる。

[0048] これらの2つの別の実施形態は、酸及び/又は塩基の価数の観点から上述した実施形態とは異なるものの、上述した実施形態により得られる効果と同様の効果を得ることができる。

[0049] 以下、塩基の好ましい態様であるアミンについて詳細に説明する。

- [0050] アミンの種類は特段制限されず、アンモニア、第1級アミン、第2級アミン、及び第3級アミン等が挙げられ、アンモニア、第1級アミン、第2級アミン、及び第3級アミンからなる群より選択される1種以上であることが好ましい。なお、アミンは、1種単独であってもよく、任意の2種以上を任意の比率で組み合わせたものであってもよい。
- [0051] 第1級アミンとしては、例えば、アルキル基を有する第1級アミンが挙げられる。この中でも、メチルアミン、エチルアミン、*n*-プロピルアミン、2-プロピルアミン、又はブチルアミン等のモノアルキルアミンが好適に例示される。
- [0052] 第2級アミンとしては、例えば、それぞれ独立にアルキル基を2つ有する第2級アミンが挙げられる。この中でも、ジメチルアミン、ジエチルアミン、ジイソプロピルアミン、もしくはジブチルアミン等の非環状のジアルキルアミン；又はN-無置換ピロリジン、もしくはN-無置換ピペリジン等の環状アミンが好適に例示される。
- [0053] 第3級アミンとしては、例えば、それぞれ独立にアルキル基を3つ有する第3級アミンが挙げられる。この中でも、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、もしくはトリブチルアミン等の非環状のトリアルキルアミン；又はN-置換ピロリジン、N-置換ピペリジン、もしくは1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン等の環状のトリアルキルアミンが好適に例示される。
- [0054] 上記の各アミンに結合するアルキル基の炭素数は特段制限されないが、分子量が小さいものは揮発性が高く扱いにくい問題があり、分子量が大きいと、MS検出においてはノイズの原因となり易いので、1以上であってよく、2以上であってよく、3以上であってよく、また、10以下であってよく、8以下であってよく、6以下であってよく、特に、1~4であることが好ましく、1~2であることがより好ましい。このようにアルキル基の炭素数が少ない第1級~第3級アンモニウムイオンは、分子量が小さいため、クロマトグラフィーをLC-MSにより行う場合、分離対象であるアミンに近い質

量のイオンが生じにくく、ノイズが少なくなる。ただし、分子量200を超えるような試料の分析においては、扱いやすさも考慮すればトリエチルアミンが便利である。一方、塩基としてアンモニアを用いる場合には、その塩の有機溶媒に対する溶解度は一般に低いため、アルキル置換基を有するアミンの方が有利な場合もある。

[0055] また、N-置換ピロリジン、N-置換ピペリジン、又はN，N-二置換ピロリジン、N，N-二置換ピペリジンに結合している置換基は、特に限定されないが、それぞれ、アルキル基であることが好ましく、該アルキル基の条件は、上述した各アミンに結合するアルキル基で示したアルキル基と同様の条件を採用することができる。上述したように、LC-MSにおいてはアンモニウムイオンの分子量が小さい方が好ましいためである。

[0056] アミンは、沸点の低さ、入手しやすさ、UV検出に適用できること、揮発性かつ分子量が小さくMS検出の障害になりにくい等の理由から、アンモニア、エチルアミン、n-プロピルアミン、2-プロピルアミン、ジメチルアミン、ジエチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピロリジン、及びピペリジンからなる群より選択される1種以上であることが好ましく、アンモニア、ジエチルアミン、トリエチルアミン、及び2-プロピルアミンからなる群より選択される1種以上であることがより好ましい。

なお、アンモニアをはじめとする低沸点アミンは、蒸気圧が高いため定量的に添加することが困難な場合がある。このような場合、それらアミンの炭酸塩あるいは炭酸水素塩を用い、少量の水の中で該塩に含まれる酸と反応させ、二酸化炭素を発生させることにより、アンモニア単体を添加するのと実質的に同じ添加物を得ることができる。

[0057] また、塩基として金属を用いる場合には、例えば、リチウム、ナトリウム、もしくはカリウム等のアルカリ金属、又はその他の金属を用いることができる。

[0058] なお、特定の酸と該酸を部分的に中和する塩基を用いる方法は、本実施形態に係る移動相を調製するもっとも簡便な方法であるが、該特定の酸の塩と

該酸とを加えることによっても等価な移動相が得られ、調製の仕方は該方法に限定されない。また、ここで加える特定の酸は、必ずしも塩に対応する特定の酸である必要はなく、シュウ酸、酢酸、ギ酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群より選択される１種以上のいずれであってもよい。

[0059] (溶媒)

本実施形態における移動相に含まれる溶媒は、分離対象であるアミン、並びに特定の酸等の各種成分を溶解できる限り特段制限されず、水、又は水以外の液体（以下、「非水溶媒」と称することがある。）等を用いることができる。

非水溶媒としては、例えば、有機溶媒（水含有率０体積％）、又は亜臨界もしくは超臨界二酸化炭素等が挙げられる。

移動相に含まれる溶媒としては、例えば、水のみ；非水溶媒のみ；水と非水溶媒との混合溶媒、加圧二酸化炭素と非水溶媒、必要に応じて微量の水を含む混合溶媒等が挙げられる。移動相に含まれる溶媒が、２種以上の溶媒からなる混合溶媒である場合、前記２種以上の溶媒は、アミンの分離条件において相分離を起こさない溶媒の組み合わせであることが好ましい。具体的には、例えば、極性の低いもの、いわゆる順相溶媒を用いることができ、ヘキサンもしくはヘプタン等の炭化水素に、より極性の高いアルコール、エステル、エーテル、ニトリルもしくはハロゲン化炭化水素等を混和したもの、又はこれに更に均一溶解する範囲で水を混和したものが好ましく用いられる。より具体的には、例えば、有機溶媒を基本とする極性の高い組成を有する溶媒であり、アセトニトリルをベースとし、少量（１～２０体積％）の水を含むもの、水をベースとし、更に極性が高い逆相溶媒として少量（通常１～４０体積％）のアセトニトリル、もしくはメタノールを含むもの、又は一般的に超臨界流体クロマトグラフィーと称される加圧二酸化炭素であり、亜臨界もしくは超臨界二酸化炭素と呼ばれるものを溶媒として用いることができる。

なお、本技術分野では、通常、「超臨界」は、全ての組成や温度において

、厳密に超臨界状態にあるというものには限らず、二酸化炭素を主とする溶媒を用いた場合に「超臨界」の呼称が用いられることが多い。本開示でも「超臨界」の語は同様に扱う。

[0060] 有機溶媒としては、特に限定されないが、分離対象であるアミンを溶解し得る有機溶媒であることが好ましい。好適な有機溶媒としては、例えばアセトニトリル、アセトン、テトラヒドロフラン（THF）、*tert*-ブチルメチルエーテル、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、2-プロパノール、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ジメチルホルムアミド（DMF）、又はジメチルアセトアミド（DMAc）等が挙げられる。また、分離対象であるアミン、並びにシュウ酸、酢酸、ギ酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群から選択される1種以上の特定の酸等の各種成分を溶解できる限り、有機溶媒は、ヘキサン、もしくはヘキサン、もしくはヘプタン等の炭化水素；又はジクロロメタン等のハロゲン化炭化水素；等を含んでいてもよい。これらのうち、化学的な安定性が高い点で、有機溶媒は、アセトニトリル、アセトン、メタノール、エタノール、2-プロパノール、ヘキサン、ヘプタン、THF、及び*tert*-ブチルメチルエーテルからなる群より選択される1種以上を含むことが好ましく、アセトニトリルであることがより好ましい。移動相に含まれる溶媒は、アセトニトリルを70体積%以上含むことが特に好ましい。前記有機溶媒は、1種単独であってもよく、任意の2種以上を任意の比率で組み合わせたものであってもよい。

[0061] 有機溶媒は、クロマトグラフィーに汎用される、炭素数5以上8以下の炭化水素とアルコールとの混合液であってもよい。このような混合液としては、例えば、水と相溶し得るヘキサン／エタノール混合液が挙げられる。ヘキサン／エタノール混合割合が、例えば100／100（v／v）である有機溶媒であれば、水含有率10体積%程度の混合溶媒を調製することが可能であり、水の添加は保持をやや低下させるが、ピーク段数を高くし、分析の時間効率を上げる。またヘキサン／エタノール／メタノールも相容する範囲において良好なピーク段数を与える。

[0062] 炭素数 5 以上 8 以下の炭化水素とアルコールとの混合液は、粘度が低いため、クロマトグラフィーにおいて低圧力で高流速を実現でき、その上、紫外線吸収が小さいため、紫外線吸収によるアミンの検出を実現し得る。

[0063] 非水溶媒が亜臨界又は超臨界二酸化炭素を含む場合、クロマトグラフィーは、超臨界流体クロマトグラフにより行われる。この場合、目的の成分が移動相中に目的濃度で溶解し得るよう、亜臨界又は超臨界二酸化炭素に、補助溶媒として水と有機溶媒との混合溶媒、又は有機溶媒（水含有率 0 体積％）を併用することが好ましい。ここでいう有機溶媒は、非水溶媒として挙げた有機溶媒と同義である。補助溶媒である水と有機溶媒との混合溶媒、及び有機溶媒としては、それぞれ、水とメタノールとの混合溶媒、又はメタノールが好ましく例示される。

なお、移動相に含まれる溶媒が、亜臨界又は超臨界二酸化炭素を含む場合、これらの体積は、便宜上、 -20°C における液体二酸化炭素の密度 1.030 g/mL に基づいて算出するものとする。

[0064] 溶媒の種類を説明してきたが、粘度が低いこと、紫外線に対して透明であること（もっとも一般的に用いられる紫外線検出の場合）、強い毒性や危険性を持たないこと、安価であること、及び多糖誘導体からなるキラル固定相が良好な分離を与える傾向にあること等の観点から、水、アセトニトリル、エタノール、メタノール、2-プロパノール、ヘキサン、ヘプタン、THF、及び液体二酸化炭素からなる群から選択される 1 種以上であることが好ましい。

[0065] 移動相中の溶媒の含有率（2 種以上含む場合にはその合計の含有率）は特段制限されず、用途に応じて適宜設定することができ、例えば、90 質量％以上であってよく、95 質量％以上であってよく、98 質量％以上であってよく、99 質量％以上であってよく、また、100 質量％未満であってよく、99.9 質量％以下であってよく、99.5 質量％以下であってよい。また、移動相において、上述した特定の酸及び塩基以外の残りの成分であってもよい。なお、溶媒が 3 元系混合物である場合における各成分の混合比率の

例を以下に述べる。逆相溶媒としては、水を50体積%以上含む、アセトニトリル、アルコール類、及びTHFの混合物が例示され、良好な分離を与えるには水含量が70体積%以上であることが好ましい。また、順相溶媒としては、ヘキサン及び／又はヘプタンを40体積%以上含み、残りを2-プロパノール又はエタノール、さらに少量の水を含む混合物が例示される。

[0066] (その他の成分)

移動相は、本開示の効果が得られる範囲で、上述した成分以外の成分（その他の成分）を含んでいてもよい。ただし、質量分析法（MS）による検出を行う場合には、不揮発性の塩を与える成分は好ましくない。

[0067] (移動相の調製方法)

移動相の調製方法は、公知の溶液調製方法又は公知の溶液調製方法に準じた方法により行うことができる。例えば、上記の各成分を混合する方法が挙げられる。

[0068] 公知の方法としては、酸と塩基とから塩を形成し、これを用いて移動相を調製する方法が挙げられる。本実施形態において酸と塩基を含むという表現をとったが、文字通り両者を適量、移動相溶媒に溶かしてもよい。一方、該酸と、該酸と該塩基とからなる塩を移動相溶媒に溶かしても、実質的に同じ移動相を得ることができる。このように酸と塩基とを直接接触させるのではなく、溶媒中で接触させて移動相を調製する手法は、簡便である点、及び一部の成分が気化する等の中和熱に起因するトラブルを回避できる点で好適である。塩基として、アンモニアなど揮発性の高いアミンを用いる場合には、水などの溶媒を用い、必要に応じて移動相溶媒の組成を補正してもよい。また、上述したように、炭酸塩または炭酸水素塩等の弱い酸の塩を先駆体として用いることも可能である。ここで副成した弱い酸は、そのまま移動相中に残留してもガス化して揮散しても、保持に大きい影響を与えることはない。

[0069] カチオンと酸アニオンとの塩が市販されているか、容易に入手できる場合には、前記市販品を溶媒に溶解し、必要に応じて酸性度調整用の酸と混合することで、移動相を調製することもできる。酸性度調整の必要が生じるのは

、試料アミンの保持が不十分であったり、ピークの形状が好ましくない場合である。

[0070] [クロマトグラフィー]

本実施形態において用いられるクロマトグラフィーは、特に限定されず、例えば液体クロマトグラフィー、又は超臨界流体クロマトグラフィー等が挙げられる。また、クロマトグラフィーの形態も特段制限されず、公知の形態を採用することができ、カラムクロマトグラフィーだけでなく、薄層クロマトグラフィー、繊維状の吸着剤が堆積して成る層を設けたクロマトグラフィー、又は細管の内壁に何らかの形で吸着剤層の薄層を設けたキャピラリー又はマイクロ流路によるクロマトグラフィー等も採用することができる。

クロマトグラフィーは、市販のクロマトグラフ、例えば液体クロマトグラフ及び超臨界流体クロマトグラフ等を用いて行うことができる。カラムの平衡化条件及び流速等の諸条件は、カラムサイズ、試料容量、又は移動相の種類等に応じて適宜選択することができる。

[0071] 本実施形態に係るアミンの分離方法は、分離工程により分離されたアミンを分析する分析工程をさらに含んでもよい。

クロマトグラフィーにおいてアミンを検出する方法は特段制限されないが、本実施形態に係る方法では、質量分析器を用いた方法が挙げられる。本実施形態では、添加物を適切に選ぶことにより揮発性の塩の形成を促すことができるため、分析器として質量分析器を適用できることは大きい長所である。

[0072] アミンの分離分析は、同一の装置により行ってもよく、それぞれ別々の装置により行ってもよい。例えば、クロマトグラフィーとして液体クロマトグラフィーを採用する場合、液体クロマトグラフィーを質量分析法（MS）と組み合わせた液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）により、アミン分離と分離されたアミンの質量分析とを続けて行うことができる。なお、アミンの質量分析は、分離されたアミンを定量分析するものであってもよく、定性分析するものであってもよい。またUV検出器単独でもよいし、

質量分析器を併用することで一層多くの情報を得ることが出来る。

[0073] 質量分析としては、LC-MSで使用される公知の質量分析法を採用することができる。例えば、質量分析におけるイオン化法は、大気圧化学イオン化（APCI）、大気圧光イオン化（APPI）、エレクトロスプレー法（ESI）、高速原子衝撃法（FAB）、又はサーモスプレー法（TSP）等から、塩の種類、酸の種類、アミンの種類、及び分析目的等に応じて適宜選択することができる。また、質量検出器は、四重極型質量分析計（Q-MS）、イオントラップ型質量分析計（IT-MS）、又は飛行時間型質量分析計（TOF-MS）等から、要求される感度及び分解能等に応じて適宜選択して用いることができる。

実施例

[0074] 以下、本開示を実施例によりさらに具体的に説明するが、本開示はその要旨を逸脱しない限り、下記の実施例に限定されるものではない。

[0075] <実験1-1>

<実施例1>

[移動相の調製]

シュウ酸二水和物1260mgを秤取り、1000mLのメスフラスコに移した。このメスフラスコに水とアセトニトリルをそれぞれ800.0g、156.6gの割合で秤取、混合した混合溶媒（体積比換算80/20）の約20mLを入れ、次いで、トリエチルアミン506mgを入れた。その後、上記の水/アセトニトリル（80/20（v/v））混合溶媒でメスアップし、未溶解物がなくなるまで攪拌することで、移動相を得た。該移動相中の溶媒の組成は、水/アセトニトリル=80/20（v/v）であり、移動相中のシュウ酸（Ox A）及びトリエチルアミン（TEA）の含有率は、それぞれ10.0mmol/L及び5.0mmol/Lであった。なお、シュウ酸二水和物に含まれる水の量はわずかであるため溶媒組成への影響はない。また、200℃に加熱したステンレス板上に100μLの移動相を滴下したが、残渣は見られなかった。この結果は以下の他の実施例でも同様であっ

た。

[0076] なお、以下の移動相の調製も同様に、溶媒は0.1 g、添加物は1 mgの桁まで秤量し、これにもとづいて濃度を計算した。

また、水の密度は1.00 g/mL、アセトニトリルの密度は0.783 g/mLとした。

[0077] [アミンの分離・分析]

カラムとして、セルローストリス（3，5－ジメチルフェニルカルバメート）をシリカゲルに担持したキラル固定相が充填されたカラム（CHIRALPAK IB-N（株式会社ダイセル製、登録商標）、平均充填剤径5 μm、長さ250 mm、内径4.6 mm φ）を用い、液体クロマトグラフとして高速液体クロマトグラフを用いてアミンの分離を行った。このとき、分離対象である下記の式（3）で表されるアミン（USP社製「Pindolol」）は、水／アセトニトリル（1／1（v／v））混合溶媒に約1 mg/mLの濃度となるように溶解し、得られた溶液2 μLをオートサンプラによってカラムに注入した。また、移動相は、0.43 mL／分で30℃に調温したカラムに送液した。

アミンの分離方法や分析方法の詳細を次に示す。

[0078] （分離方法・分析方法）

高速液体クロマトグラフ（HPLC）の検出器としてSPD-M20A（株式会社島津製作所製、ダイオードアレイのUV-Vis検出器）を用い、カラムに1時間以上移動相を1.0 mL／minで送液した後、試料を約1 mg/mLで移動相に溶解した試料液5 μLをオートサンプラにより注入し、同じ流速で、カラム温度を30℃に設定し、アミンの分離及び分析を行った。

HPLCで用いた装置、及びデータ処理装置の詳細を以下に示す。以下の装置は全て株式会社島津製作所製である。

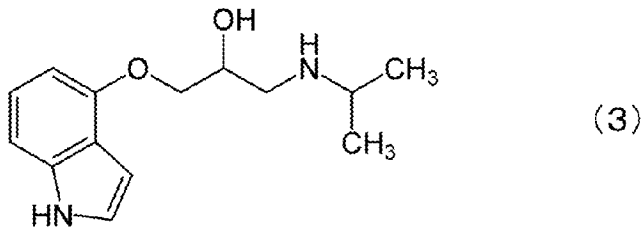
・HPLC装置：システムコントローラ CBM-20A、ポンプ LC-20AD、オートサンプラ SIL-20AC、カラムオーブン SPD-

M 2 0 A

・データ処理装置：LabSolutions Version 5.97

結果を図1に示す。

[0079] [化1]



[0080] <比較例1>

実施例1で分離及び分析を実施した後のカラムに移動相として、水／アセトニトリル（80／20（v／v））混合溶媒を用い、1時間以上試料注入せずに通液したこと以外は実施例1と同様の方法で、再度上記の式（3）で表されるアミンの分離、分析を行った。なお、用いた移動相には、酸及びアミンを添加していないため、移動相中の酸及びアミンの含有率は、それぞれ0mmol／L及び0mmol／Lであった。

結果を図2に示す。

[0081] <比較例2>

シュウ酸二水和物を用いなかったこと、トリエチルアミンの代わりに炭酸水素アンモニウム（AHC）及びジエチルアミン（DEA）を用いたこと以外は実施例1と同様の操作を行い、AHC及びDEAの含有率が、それぞれ10.0mmol／L及び15.5mmol／Lである移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたことと、CHIRALPAK IBNのカラムの前に、表1下注記載のガードカラムを挿入したこと（本比較例のみ）以外は実施例1と同様の方法で上記の式（3）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図3に示す。

[0082] <比較例3>

比較例2で分離及び分析を実施した後のカラムに移動相として、水／アセ

トニトリル（80／20（v／v））混合溶媒を用い、1時間以上試料注入せずに通液したこと以外は実施例1と同様の方法で上記の式（3）で表されるアミンの分離、分析を行った。なお、用いた移動相には、酸及びアミンを添加していないため、移動相中の酸及びアミンの含有率は、それぞれ0 mmol／L及び0 mmol／Lであった。

結果を図4に示す。

[0083] <実施例2>

溶媒を、水とアセトニトリルから、ヘキサンとエタノール（ヘキサン／エタノール＝50／50（v／v））に変更したこと以外は実施例1と同様の操作を行い、Ox A及びTEAの含有率が、それぞれ10.0 mmol／L及び5.0 mmol／Lである移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で上記の式（3）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図5に示す。

[0084] <比較例4>

シュウ酸二水和物を用いなかったこと、トリエチルアミンの代わりにジエチルアミン（表1における「DEA」）を用いたこと以外は実施例2と同様の操作を行い、DEAの含有率が10.0 mmol／Lである移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で上記の式（3）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図6に示す。

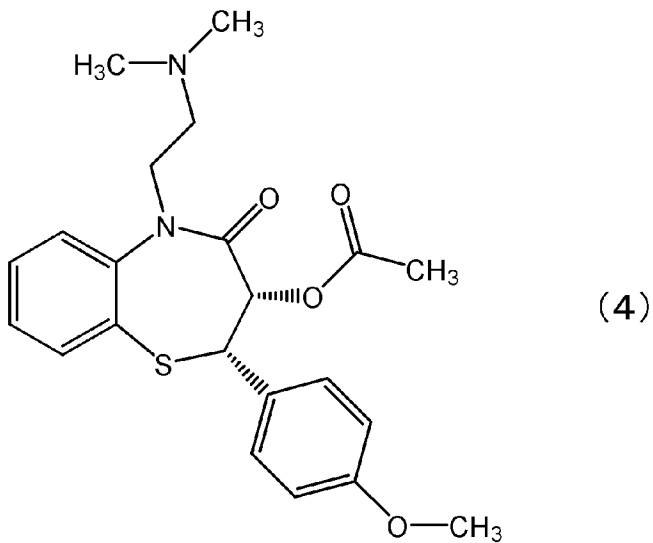
[0085] <実施例3>

カラムとして、セルローストリス（3-クロロ-4-メチルフェニルカルバメート）をシリカゲルに担持したキラル固定相が充填されたカラム（CHIRALPAK IM（株式会社ダイセル製、登録商標）、平均充填剤径5 μm、長さ250 mm、内径4.6 mm φ）を用い、分析対象を下記の式（4）で表されるアミンに変更したこと以外は実施例2と同様の方法で分析対

象であるアミンの分離、分析を行った。

結果を図 7 に示す。

[0086] [化2]



[0087] <比較例 5>

カラムとして実施例 3 で用いたカラムを用いたこと以外は比較例 4 と同様の方法で上記の式 (4) で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図 8 に示す。

[0088] <実施例 4>

分析対象を下記の式 (5) で表されるフェニルグリシンのアミドに変更したこと以外は実施例 2 と同様の方法で分析対象であるアミンの分離、分析を行った。



結果を図 9 に示す。

[0089] <比較例 6>

分析対象を上記の式 (5) で表されるフェニルグリシンのアミドに変更したこと以外は比較例 5 と同様の方法で分析対象であるアミンの分離、分析を行った。

結果を図 10 に示す。

[0090] <実施例 5>

溶媒を、ヘキサンとエタノールから、ヘキサンとエタノールとメタノール（ヘキサン／エタノール／メタノール＝70／20／10（v／v／v））に変更したこと以外は実施例3と同様の操作を行い、Ox A及びTEAの含有率が、それぞれ10.0 mmol/L及び5.0 mmol/Lである移動相を調整製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと、及びカラムとして、アミローストリス（3-クロロフェニルカルバメート）をシリカゲルに担持したキラル固定相が充填されたカラム（CHIRALPAK ID（株式会社ダイセル製、登録商標）、平均充填剤径5 μm、長さ250 mm、内径4.6 mmφ）を用いたこと以外は実施例3と同様の方法で上記の式（4）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図11に示す。

[0091] <比較例7>

シュウ酸二水和及びトリエチルアミンの添加を行わなかったこと以外は実施例5と同様の操作を行い、Ox A及びTEAの含有率が、それぞれ0 mmol/L及び0 mmol/Lである移動相を調整製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例5と同様の方法で上記の式（4）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図12に示す。

[0092] <実施例6>

カラムとして、アミローストリス（3,5-ジクロロフェニルカルバメート）をシリカゲルに担持したキラル固定相が充填されたカラム（CHIRALPAK IE（株式会社ダイセル製、登録商標）、平均充填剤径5 μm、長さ250 mm、内径4.6 mmφ）を用いたこと以外は実施例5と同様の方法で上記の式（4）で表されるアミンの分離、分析を行った。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例5と同様の方法で上記の式（4）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図13に示す。

[0093] <比較例 8>

シュウ酸二水和及びトリエチルアミンの添加を行わなかったこと以外は実施例 6 と同様の操作を行い、O x A 及び T E A の含有率が、それぞれ 0 m m o l / L 及び 0 m m o l / L である移動相を調整した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例 6 と同様の方法で上記の式 (4) で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図 1 4 に示す。

[0094] 実施例 1 ～ 4 、 及び比較例 1 ～ 6 の分離条件を以下の表 1 にまとめた。

[0095] (分離度)

各実施例及び比較例における分離度は、島津製作所のクロマトグラフィーデータ解析プログラム Lab Solutions Version 5.97 によってして自動算出した U S P 分離度である。結果を表 1 に示す。

[0096] 以下の各表において、「A N」はアセトニトリル、「O x A」はシュウ酸、「T E A」はトリエチルアミン、「A H C」は炭酸水素アンモニウム、「D E A」はジエチルアミンを表す。

[0097] 以下の表 1 ～ 5 に上述した S B / S A を示す。なお、シュウ酸の大部分は解離度から計算すると一価酸として存在している。

[0098]

[表1]

表1

	分析対象	固定相	移動相		分離度
		カラム	溶媒	添加物	
実施例1	Pindolol	IB-N	水/AN (v/v=80/20)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	2.5
比較例1	Pindolol	IB-N	水/AN (v/v=80/20)	なし (SB/SA:—)	0.9
比較例2	Pindolol	IB-N (※1)	水/AN (v/v=80/20)	AHC: 10.0 mmol/L DEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	3.3
比較例3	Pindolol	IB-N	水/AN (v/v=80/20)	なし (SB/SA:—)	測定なし
実施例2	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	11.0
比較例4	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	DEA: 10.0 mmol/L (SB/SA:—)	10.1
実施例3	Dilthiazem	IM	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	8.2
比較例5	Dilthiazem	IM	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	DEA: 10.0 mmol/L (SB/SA:—)	3.2
実施例4	Phenylgly- cine amide	IM	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	6.7
比較例6	Phenylgly- cine amide	IM	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	DEA: 10.0 mmol/L (SB/SA:—)	0
実施例5	Dilthiazem	ID	ヘキサン/エタノール /メタノール (v/v/v=70/20/10)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	6.5
比較例7	Dilthiazem	ID	ヘキサン/エタノール /メタノール (v/v/v=70/20/10)	なし (SB/SA:—)	0.3
実施例6	Dilthiazem	IE	ヘキサン/エタノール /メタノール (v/v/v=70/20/10)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	5.1
比較例8	Dilthiazem	IE	ヘキサン/エタノール /メタノール (v/v/v=70/20/10)	なし (SB/SA:—)	0.3

※1) 比較例2においては、表に記載カラムの前にWakoSil 5-APS(球状シリカゲル)を充填した長さ10mm、内径3mmφのガードカラムを挿入した。

[0099] 実施例1と比較例1及び比較例3、実施例5と比較例7、実施例6と比較例8を比較することにより、同じ溶媒を用いても、何も添加しない場合には

一般的にピークのテイリングが激しく分離度が低い、あるいは前後のカラム履歴により得られるクロマトグラムが不安定である（比較例 1 と 3 は同じ移動相であるが、それぞれ実施例 1 と比較例 2 を挟んでいる）が、本開示の実施形態に係る移動相により、安定した保持と分離が得られることが解る。

[0100] また、酸のみを添加した比較例 9 に係る移動相と比較すると、部分中和された移動相を用いた実施例 2 では良好な分離を達成できる。具体的には、比較例 9 は、シュウ酸のみを添加した移動相による分離であるが、実施例 2 に比べて明らかにピーク形状も分離も悪い。

[0101] また、アミン試料のクロマトグラフィーにおいては、しばしば移動相に低分子量のアミンを添加するという方法が採られる。クロマトグラフィー充填剤、あるいはその担体として多くの場合に用いられるシリカゲルはシラノールと呼ばれる酸性原子団を有しており、これが試料と塩を形成するため著しいピークのテイリングを起こすと考えられている。この場合にアミンを添加すると、試料がシラノールとの塩を形成することを抑えることにより、試料の異常な保持を抑えることが出来る。比較例 4、比較例 5、比較例 6 は、この目的によく用いられるジエチルアミンを添加したものである。比較例 4、5、6 は、それぞれ実施例 2、3、4 に対応する。比較例 4、5 について、ピークのテイリングはほとんど生じてないものの、それぞれ実施例 2、3 よりも分離度が小さいことが分かる。

[0102] また、従来、水を主とする移動相においては、移動相をアルカリ性に傾けてアミン試料のプロトン化を抑え、中性分子として固定相に保持させるという方法もとられている。比較例 2 はこのような条件の一つであり、アルカリ性の移動相である。この場合、実施例 1 より、ピーク幅は大きく、分離の時間効率は悪い。さらに、シリカゲルを含む固定相に対して塩基性よりの移動相を用いるときには、シリカゲルを含むガードカラム（プレカラム）を挿入するなどしてカラムの劣化を防ぐ必要があり、本比較例においても同じ手法をとっている。しかしながら、この分析を行った後の比較例 3 においてピーク形状が異常になったことから、カラムに履歴を残していることが判る。

[0103] <実験 1-2>

<比較例 9>

溶媒を、水／アセトニトリル＝80／20（v／v）の混合溶液から水／アセトニトリル＝2.5／97.5（v／v）の混合溶液に変更し、移動相中のトリフルオロ酢酸（TFA）の含有率が10.0mol/LとなるようにOxAの代わりにTFAを用い、TEAを用いなかったこと以外は実施例1と同様の操作を行い、移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で上記の式（3）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図15に示す。

[0104] <実施例 7>

溶媒を、水／アセトニトリル＝50／50（v／v）の混合溶液から水／アセトニトリル＝2.5／97.5（v／v）の混合溶液に変更し、移動相中のトリフルオロ酢酸（TFA）の含有率が10.0mol/LとなるようにOxAの代わりにTFAを用いたこと以外は実施例1と同様の操作を行い、移動相（TEAの含有率は5.0mol/L）を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で上記の式（3）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図16に示す。

[0105] <比較例 10>

溶媒を、水／アセトニトリル＝2.5／97.5（v／v）の混合溶液からヘキサン／エタノール＝50／50（v／v）の混合溶液に変更したこと以外は比較例9と同様の操作を行い、移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で上記の式（3）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図17に示す。

[0106] <実施例 8>

溶媒を、水／アセトニトリル＝2.5／97.5（v／v）の混合溶液か

らヘキサン／エタノール＝５０／５０（ｖ／ｖ）の混合溶液に変更したこと以外は実施例７と同様の操作を行い、移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例１と同様の方法で上記の式（３）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図１８に示す。

[0107] 実施例７～８及び比較例９～１０の分離条件を以下の表２にまとめた。

[0108] （分離度）

各実施例及び比較例における分離度は、島津製作所のクロマトグラフィーデータ解析プログラム LabSolutions Version 5.97によってして自動算出したＵＳＰ分離度である。結果を表１に示す。

[0109] 以下の各表において、「ＴＦＡ」はトリフルオロ酢酸を表す。

[0110] [表２]

表２

	分析対象	固定相	移動相		分離度
		カラム	溶媒	添加物	
比較例９	Pindolol	IB-N	水／AN (v/v=2.5/97.5)	TFA: 10.0 mmol/L (SB/SA:0)	0.5
実施例７	Pindolol	IB-N	水／AN (v/v=2.5/97.5)	TFA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	3.7
比較例１０	Pindolol	IB-N	ヘキサン／エタノール (v/v=50/50)	TFA: 10.0 mmol/L (SB/SA:0)	3.8
実施例８	Pindolol	IB-N	ヘキサン／エタノール (v/v=50/50)	TFA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	14.1

[0111] 実施例７と比較例９、及び実施例８と比較例１０を比較することにより、ＳＢ／ＳＡが０．０５以上、０．９５以下である場合に分離度が向上することが解る。

[0112] ＜実験１－３＞

＜比較例１１＞

移動相中の酢酸（ＡｃＯＨ）の含有率が１０．０ｍｍｏｌ／ＬとなるようにＯ×Ａの代わりにＡｃＯＨを用い、ＴＥＡを用いなかったこと以外は実施例１と同様の操作を行い、移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法で上記の式 (3) で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図 19 に示す。

[0113] <実施例 9>

移動相中の AcOH の含有率が 10.0 mol/L となるように OxA の代わりに AcOH を用いたこと以外は実施例 1 と同様の操作を行い、移動相 (TEA の含有率は 5.0 mol/L) を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法で上記の式 (3) で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図 20 に示す。

[0114] <実施例 10>

移動相中の酢酸アンモニウム (NH_4OAc) の含有率が 5.0 mol/L となるように TEA の代わりに NH_4OAc を用いたこと以外は実施例 9 と同様の操作を行い、移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法で上記の式 (3) で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図 21 に示す。

[0115] <実施例 11>

溶媒を、水/アセトニトリル = $80/20$ (v/v) の混合溶液からヘキサン/エタノール = $50/50$ (v/v) の混合溶液に変更したこと以外は実施例 9 と同様の操作を行い、移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法で上記の式 (3) で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図 22 に示す。

[0116] <実施例 12>

溶媒を、水/アセトニトリル = $80/20$ (v/v) の混合溶液からヘキサン/エタノール = $50/50$ (v/v) の混合溶液に変更したこと以外は実施例 10 と同様の操作を行い、移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法で上記の式 (3) で表されるアミンの分離、分析を行った。

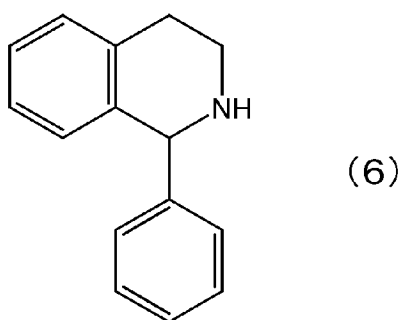
結果を図 2 3 に示す。

[0117] <実施例 1 3>

分析対象を下記の式 (6) で表されるアミン (1-フェニル-1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン) に変更したこと以外は実施例 1 2 と同様の方法で分析対象であるアミンの分離、分析を行った。

結果を図 2 4 に示す。

[0118] [化3]



[0119] <実施例 1 4>

移動相中の AcOH の含有率が 10.0 mol/L となるように AcOH を用いたこと、移動相中の NH₄OAc の含有率が 10.0 mol/L となるように NH₄OAc を用いたこと以外は実施例 1 2 と同様の操作を行い、移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法で上記の式 (3) で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図 2 5 に示す。

[0120] 実施例 9 ~ 1 4 及び比較例 1 1 の分離条件を以下の表 3 にまとめた。

[0121] (分離度)

各実施例及び比較例における分離度は、島津製作所のクロマトグラフィーデータ解析プログラム LabSolutions Version 5.97 によって自動算出した USP 分離度である。結果を表 3 に示す。

[0122] 以下の各表において、「AcOH」は酢酸、「NH₄OAc」は酢酸アンモニウム、「Ph-β-isoq」はフェニル-β-イソキノリンを表す。

[0123] なお、実施例10、12、13、及び14では、塩基としてアンモニアを加える代わりに酢酸アンモニウムを添加した。よって、移動相には、酸として添加している酢酸以外にも、酢酸アンモニウムが解離して生じる酢酸が存在する。このため、酢酸：酢酸アンモニウムの比率をモル比で1：1で用いた場合、移動相中の酢酸：アンモニアの比率はモル比で、2：1となり、SB/SAは0.5となる。

[0124] [表3]

表3

	分析対象	固定相	移動相		分離度
		カラム	溶媒	添加物	
比較例11	Pindolol	IB-N	水/AN (v/v=80/20)	AcOH: 10.0 mmol/L (SB/SA:0)	1.4
実施例9	Pindolol	IB-N	水/AN (v/v=80/20)	AcOH: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	2.4
実施例10	Pindolol	IB-N	水/AN (v/v=80/20)	AcOH: 5.0 mmol/L NH ₄ OAc: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	2.3
実施例11	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	AcOH: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	15.0
実施例12	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	AcOH: 5.0 mmol/L NH ₄ OAc: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	14.5
実施例13	1-フェニル- 1,2,3,4-テ ラヒドロイソ キノリン	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	AcOH: 5.0 mmol/L NH ₄ OAc: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	4.0
実施例14	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	AcOH: 10.0 mmol/L NH ₄ OAc: 10.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	14.8

[0125] 実施例9～14と比較例11を比較することにより、SB/SAが0.05以上、0.95以下である場合に分離度が向上することが解る。

[0126] <実験1-4>

<比較例 1 2>

溶媒を、水／アセトニトリル＝80／20（v／v）の混合溶液からヘキサン／エタノール＝50／50（v／v）の混合溶液に変更したこと、移動相中のギ酸（FA）の含有率が10.1 mmol/LとなるようにOx Aの代わりにFAを用い、TEAを用いなかったこと以外は実施例1と同様の操作を行い、移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で上記の式（3）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図26に示す。

[0127] <実施例 1 5>

溶媒を、水／アセトニトリル＝80／20（v／v）の混合溶液からヘキサン／エタノール＝50／50（v／v）の混合溶液に変更したこと、移動相中のギ酸（FA）の含有率が10.0 mmol/LとなるようにOx Aの代わりにFAを用いたこと以外は実施例1と同様の操作を行い、移動相（TEAの含有率は5.0 mmol/L）を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で上記の式（3）で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図27に示す。

[0128] <比較例 1 3>

分析対象を上記の式（6）で表されるアミン（フェニル-β-イソキノリン）に変更したこと以外は比較例12と同様の方法で分析対象であるアミンの分離、分析を行った。

結果を図28に示す。

[0129] <実施例 1 6>

分析対象を上記の式（6）で表されるアミン（フェニル-β-イソキノリン）に変更したこと以外は実施例15と同様の方法で分析対象であるアミンの分離、分析を行った。

結果を図29に示す。

[0130] 実施例 15～16 及び比較例 12～13 の分離条件を以下の表 4 にまとめた。

[0131] (分離度)

各実施例及び比較例における分離度は、島津製作所のクロマトグラフィーデータ解析プログラム LabSolutions Version 5.97 によってして自動算出した USP 分離度である。結果を表 4 に示す。

[0132] 以下の各表において、「FA」はギ酸を表す。

[0133] [表4]

表4

	分析対象	固定相	移動相		分離度
		カラム	溶媒	添加物	
比較例12	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	FA: 10.1 mmol/L (SB/SA:0)	3.1
実施例15	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	FA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	14.6
比較例13	Ph- β -isoq	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	FA: 10.1 mmol/L (SB/SA:0)	1.4
実施例16	Ph- β -isoq	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	FA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	3.5

[0134] 実施例 15 と比較例 12 及び実施例 16 と比較例 13 を比較することにより、SB/SA が 0.05 以上、0.95 以下である場合に分離度が向上することが解る。

[0135] <実験 I-5>

<比較例 14>

TEA を添加しなかったこと以外は実施例 2 と同様の操作を行い、Ox A の含有率が 10.0 mmol/L である移動相を調整した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例 2 と同様の方法で上記の式 (3) で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図 30 に示す。

[0136] <実施例 17>

移動相中の Ox A の含有率が 2.50 mmol/L となるように Ox A を用

いたこと、移動相中のTEAの含有率が1.25mol/LとなるようにTEAを用いたこと以外は実施例2と同様の操作を行い、移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で上記の式(3)で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図31に示す。

[0137] <実施例18>

移動相中のOxAの含有率が5.0mol/LとなるようにOxAを用いたこと、移動相中のTEAの含有率が2.5mol/LとなるようにTEAを用いたこと以外は実施例2と同様の操作を行い、移動相を調製した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で上記の式(3)で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図32に示す。

[0138] <実施例19>

溶媒を、水とアセトニトリルの混合溶液から、ヘキサンとエタノールと水(ヘキサン/エタノール/水=50/50/2(v/v/v))の混合溶液に変更したこと以外は実施例1と同様の操作を行い、OxA及びTEAの含有率が、それぞれ10.0mmol/L及び5.0mmol/Lである移動相を調整した。

移動相として上記の移動相を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で上記の式(3)で表されるアミンの分離、分析を行った。

結果を図33に示す。

[0139] 実施例17～19及び比較例14の分離条件を以下の表5にまとめた。

[0140] (分離度)

各実施例及び比較例における分離度は、島津製作所のクロマトグラフィーデータ解析プログラム LabSolutions Version 5.97によってして自動算出したUSP分離度である。結果を表5に示す。

[0141]

[表5]

表5

	分析対象	固定相	移動相		分離度
		カラム	溶媒	添加物	
比較例14	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	OxA: 10.0 mmol/L (SB/SA:0)	3.0
実施例17	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	OxA: 2.50 mmol/L TEA: 1.25 mmol/L (SB/SA:0.5)	9.0
実施例18	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタノール (v/v=50/50)	OxA: 5.0 mmol/L TEA: 2.5 mmol/L (SB/SA:0.5)	8.9
実施例19	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタノール /水/AN (v/v/=50/50/2)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	9.0

[0142] 実施例17～18と比較例14を比較することにより、SB/SAが0.05以上、0.95以下である場合に分離度が向上することが解る。

[0143] <実験11>

<実施例20>

[移動相の調製]

上述した実施例1と同様の方法で移動相を調製した。

[0144] [アミンの分離]

アミンの分離及び分析を次に示す方法を用いたこと以外は実施例1と同様の方法で、上記の式(3)で表されるアミンの分離及び分析を行った。

[0145] (分離方法・分析方法)

高速液体クロマトグラフ(HPLC)の検出器としてACQUITY Qda(日本ウォーターズ株式会社製、質量検出器)を用い、カラムに1時間移動相を0.75mL/minで送液した後、試料を約1～2mg/mL溶液(フィルターでろ過済み)で移動相に溶解した試料液1μLをオートサンプラにより注入し、同じ流速で、カラム温度を室温(約25℃)に設定し、アミンの分離及び分析を行った。

HPLCで用いた装置の詳細を以下に示す。

・HPLC装置: ACQUITY UPLC H-Class PLUS

- ・イオン化法：E S I
- ・測定モード：P o s i t i v e
- ・P r o b e 温度：4 0 0 °C
- ・S o u r s e 温度：1 2 0 °C

結果を図34に示す。図中のグラフの縦軸は、最も高いピークの最大値を100%としている。これは以下の図35～38でも同様である。

また、上記の分析により得られた検出質量 m/z （イオンの相対質量を価数で割った値）を以下の表6に示す。

[0146] <実施例21>

上述した実施例1と同様の方法で移動相を調製した。

アミンの分離及び分析を上記の実施例20に示す方法を用いたこと、及び分析対象を分析対象を上記の式(6)で表されるアミン（1-フェニルー1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン）に変更したこと以外は実施例20と同様の方法で分析対象であるアミンの分離、分析を行った。

結果を図35及び表6に示す。

[0147] <実施例22>

上述した実施例2と同様の方法で移動相を調製した。

アミンの分離及び分析を上記の実施例20に示す方法を用いたこと以外は実施例2と同様の方法で、上記の式(3)で表されるアミンの分離及び分析を行った。

結果を図36及び表6に示す。

[0148] <実施例23>

上述した実施例3と同様の方法で移動相を調製した。

アミンの分離及び分析を上記の実施例20に示す方法を用いたこと以外は実施例3と同様の方法で、上記の式(3)で表されるアミンの分離及び分析を行った。

結果を図37及び表6に示す。

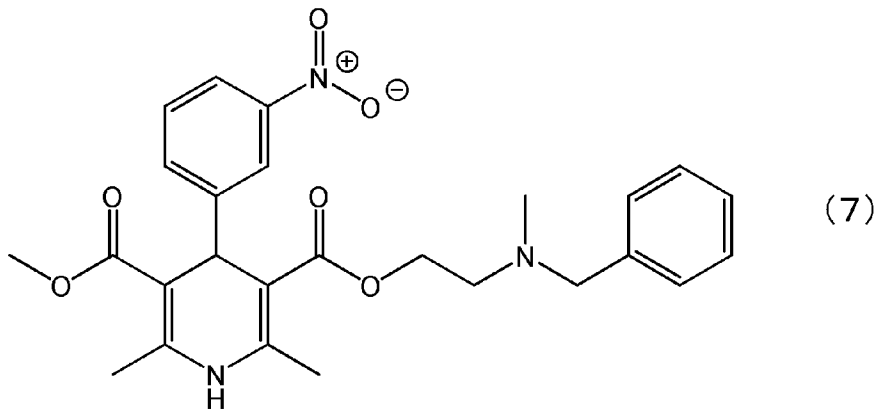
[0149] <実施例24>

上述した実施例3と同様の方法で移動相を調製した。

アミンの分離及び分析を上記の実施例20に示す方法を用いたこと、及び分析対象を下記の式(7)で表されるアミン(ニカルジピン)に変更したこと以外は実施例3と同様の方法でアミンの分離及び分析を行った。

結果を図38及び表6に示す。

[0150] [化4]



[0151] 以下の表2に上述したSB/SAを示す。該SB/SAの計算において、シュウ酸の大部分は一価酸として存在するため、シュウ酸の価数は1として計算した。

[0152] [表6]

表6

	分析対象	固定相	移動相		m/z
		カラム	溶媒	添加物	
実施例20	Pindolol	IB-N	水/AN (v/v=80/20)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	249 [M+H] ⁺
実施例21	1-フェニル- 1,2,3,4-テラヒ ドロイソキノリン	IB-N	水/AN (v/v=80/20)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	210 [M+H] ⁺
実施例22	Pindolol	IB-N	ヘキサン/エタ ノール (v/v=50/50)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	249 [M+H] ⁺
実施例23	Diltiazem	IM	ヘキサン/エタ ノール (v/v=50/50)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	415 [M+H] ⁺
実施例24	ニカルジピン	IM	ヘキサン/エタ ノール (v/v=50/50)	OxA: 10.0 mmol/L TEA: 5.0 mmol/L (SB/SA:0.5)	480 [M+H] ⁺

[0153] 図34～38及び表6で明らかなように、良好なマスキロマトグラム（質量検出器で得たクロマトグラム）を得ることができた。このことは、本開示の実施形態に係る方法がアミン、特にそのエナンチオマーの分離に有効であるのみならず、LC-MSという検出法に対して好適に用い得るものであることを示している。LC-MSは、クロマトグラフィーにおいて複数の溶出ピークが重なっても、質量により区別できるため、近年利用が広がっている手法であり、これに適用できることの産業上の意味は大きい。

産業上の利用可能性

[0154] 以上より、本開示の実施形態に係るアミンの分離方法であれば、アミンの分離性能を向上させることができることが分かる。また、移動相に含まれる成分を、質量分析器による検出への悪影響を回避又は軽減し得るものから適切に選択することで、LC-MSへの適用も可能であると考えられる。

したがって、かかるアミンの分離方法は、各種液体クロマトグラフィーによる分析及び精製等に広く適用することができ、有機化学、医学、及び薬学等の分野での展開が期待される。

請求の範囲

[請求項1] オリゴ糖、多糖、及びこれらの誘導体の少なくともいずれかを含む固定相と、

シュウ酸、酢酸、ギ酸、及びトリフルオロ酢酸からなる群から選択される1種以上の特定の酸、1種以上の塩基、並びに溶媒を含む移動相と、

を用いてクロマトグラフィーによりアミンを分離する分離工程を含み、

前記移動相に含まれる各特定の酸について下記式(1)で算出される値をA、各特定の酸で算出された各Aの合計値をSA、前記移動相に含まれる各塩基について下記式(2)で算出される値をB、各塩基で算出された各Bの合計値をSBとした場合において、 SB/SA が、0.05以上、0.95以下である、

アミンの分離方法。

式(1) : $A = \text{特定の酸の価数} \times \text{特定の酸のモル濃度 (mol/L)}$

式(2) : $B = \text{塩基の価数} \times \text{塩基のモル濃度 (mol/L)}$

[請求項2] 前記分離工程により分離されたアミンを分析する分析工程をさらに含み、

前記分析工程において、少なくとも質量分析器を用いた分析が行われる、

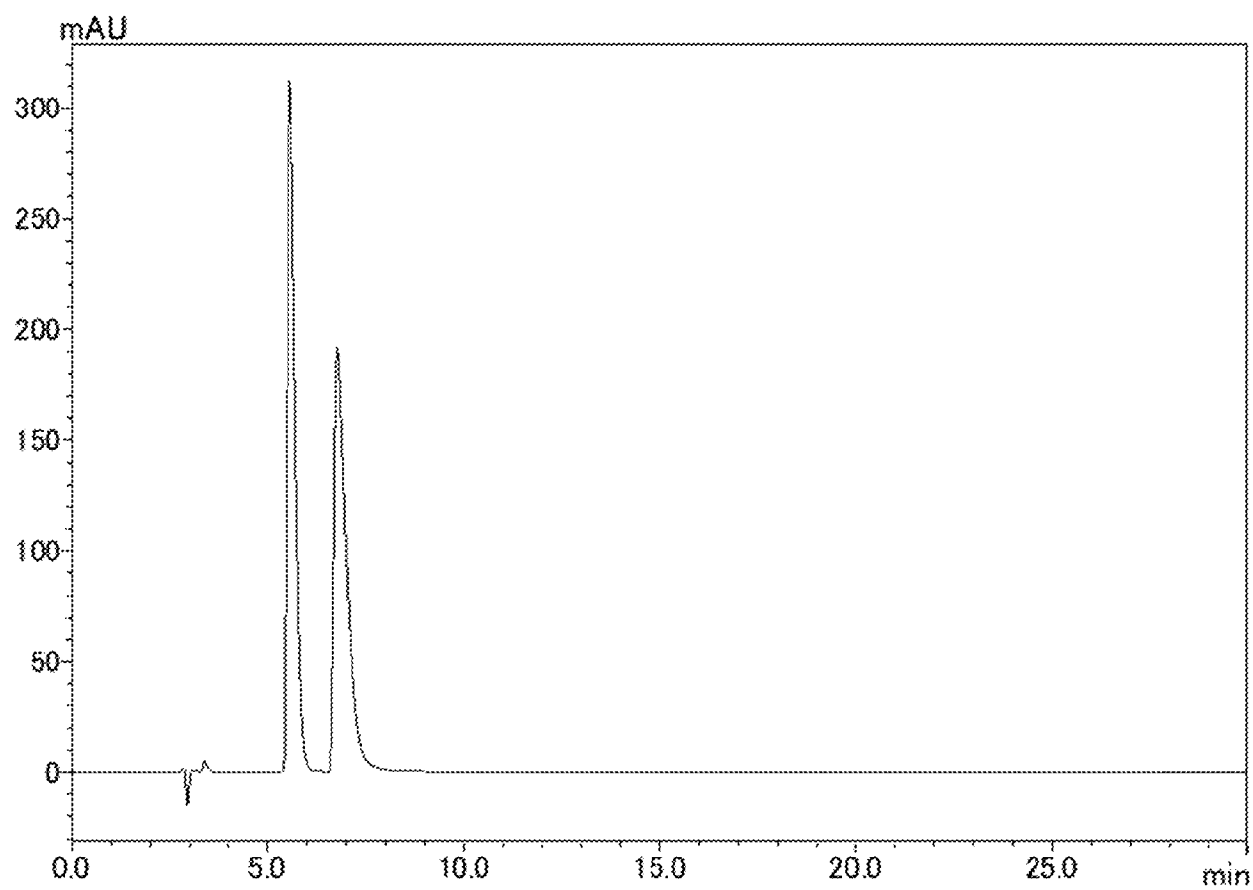
請求項1に記載のアミンの分離方法。

[請求項3] 前記塩基が、アンモニア、第1級アミン、第2級アミン、及び第3級アミンからなる群より選択される1種以上である、請求項1又は2に記載のアミンの分離方法。

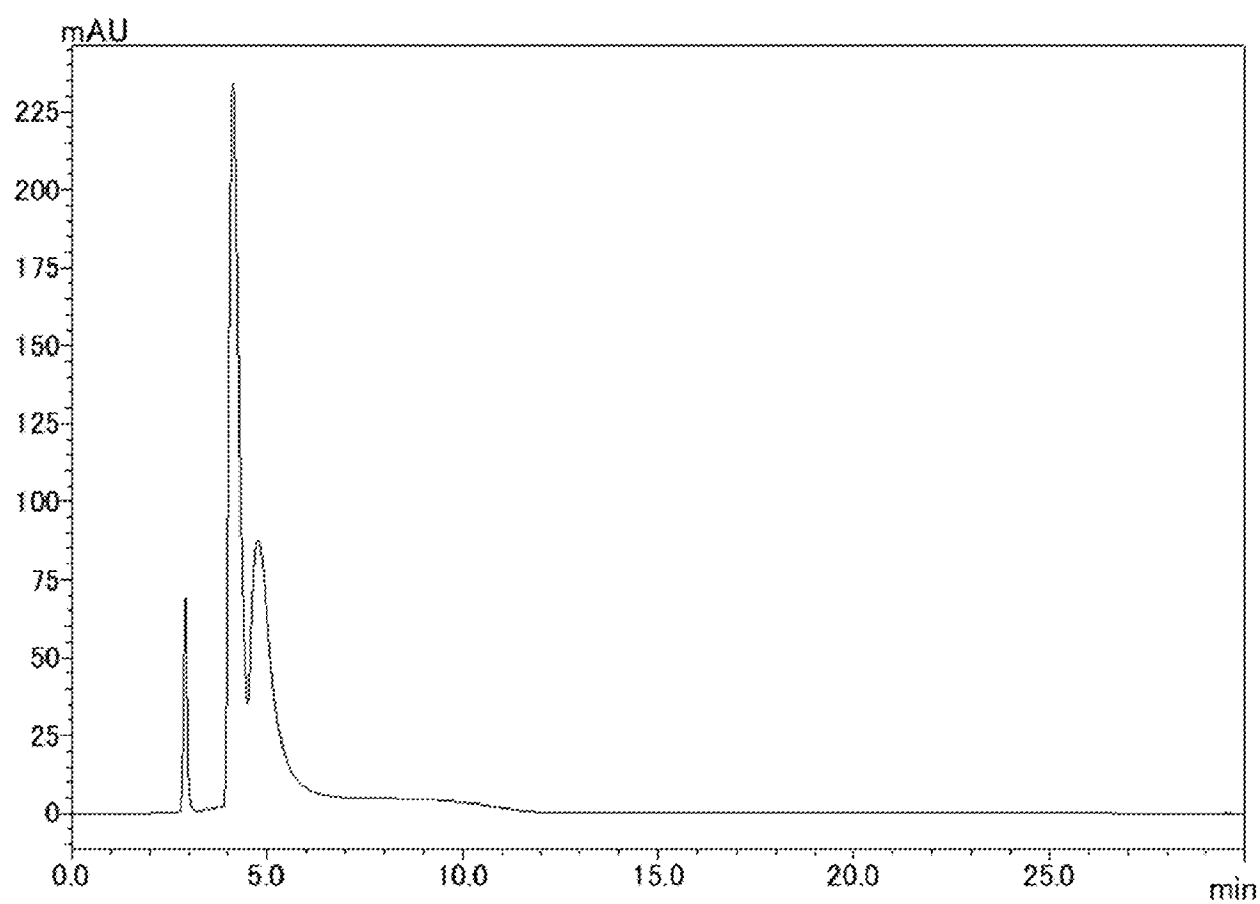
[請求項4] 前記塩基が、アンモニア、エチルアミン、n-プロピルアミン、2-プロピルアミン、ジメチルアミン、ジエチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピロリジン、及びピペリジンからなる群より選択される1種以上である、請求項3に記載のアミンの分離方法。

- [請求項5] 前記移動相が、前記特定の酸として、少なくともシュウ酸を含む、請求項 1 又は 2 に記載のアミンの分離方法。
- [請求項6] 前記オリゴ糖、多糖、及びこれらの誘導体の少なくともいずれかが、光学活性部位を有する、請求項 1 又は 2 に記載のアミンの分離方法。
- [請求項7] 前記溶媒が、水、アセトニトリル、エタノール、メタノール、2-プロパノール、ヘキサン、ヘプタン、THF、及び液体二酸化炭素からなる群から選択される 1 種以上である、請求項 1 又は 2 に記載のアミンの分離方法。

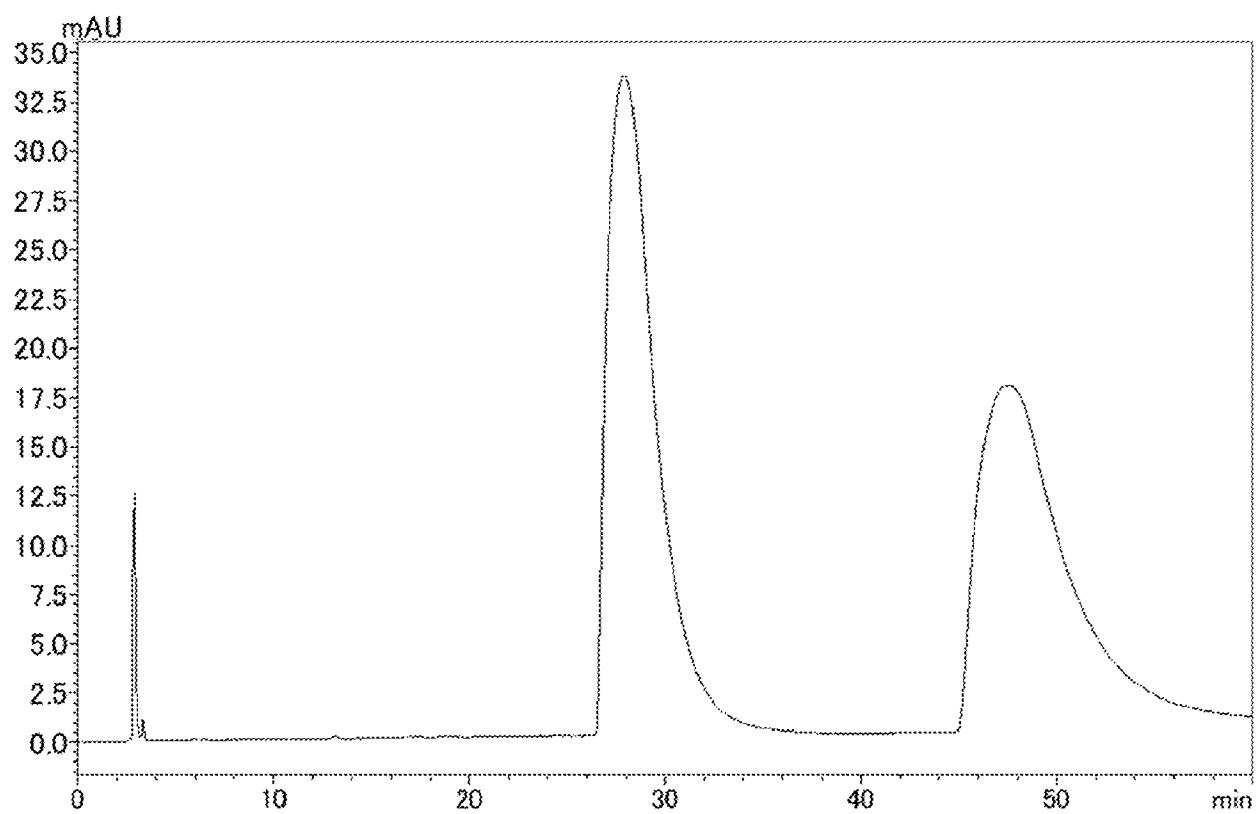
[図1]



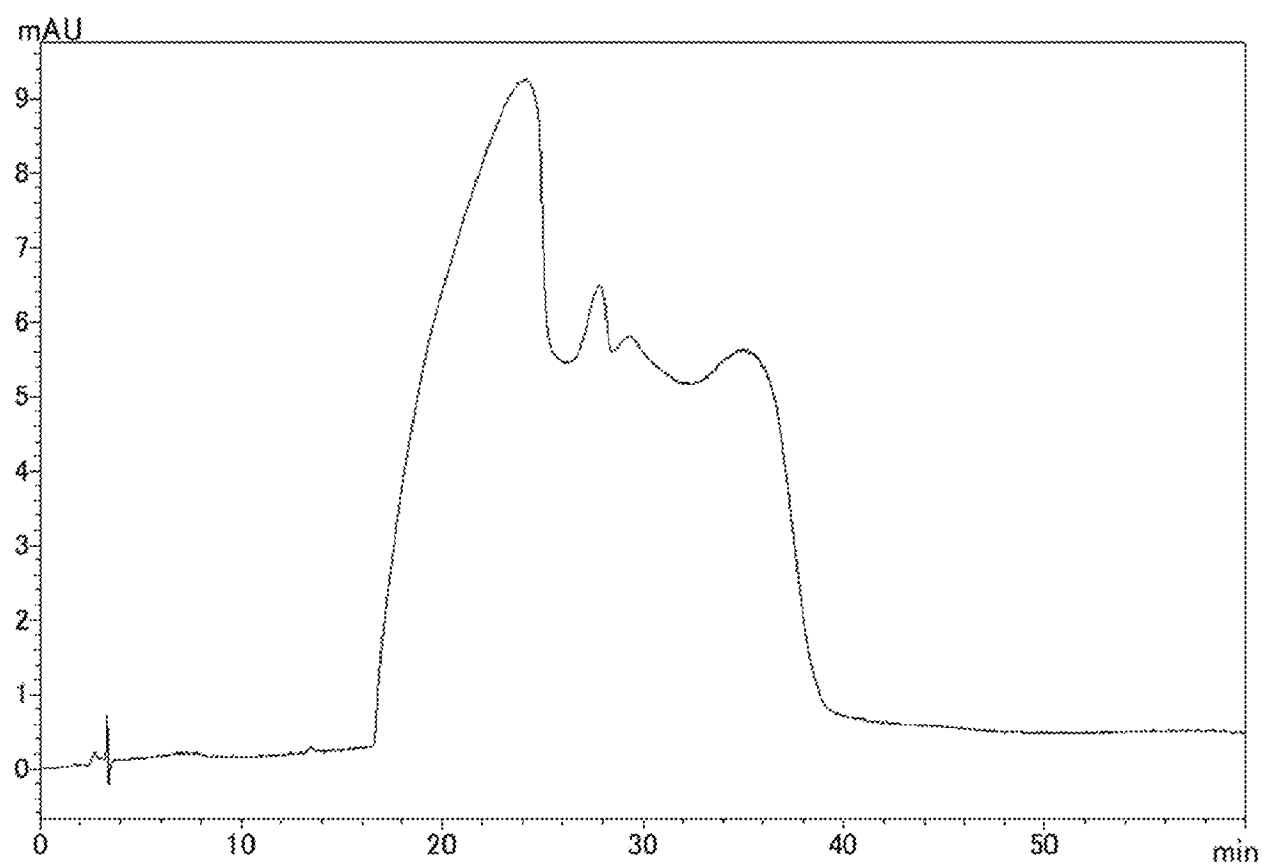
[図2]



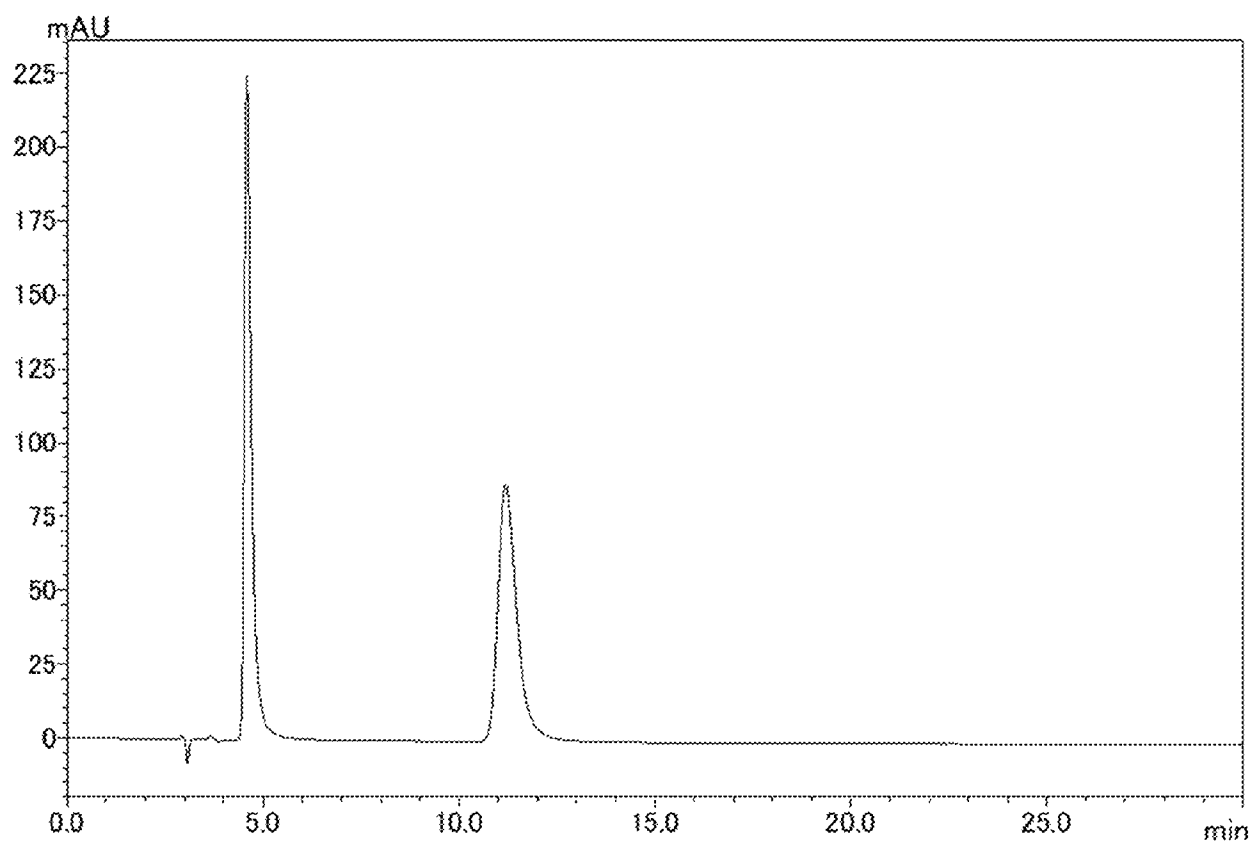
[圖3]



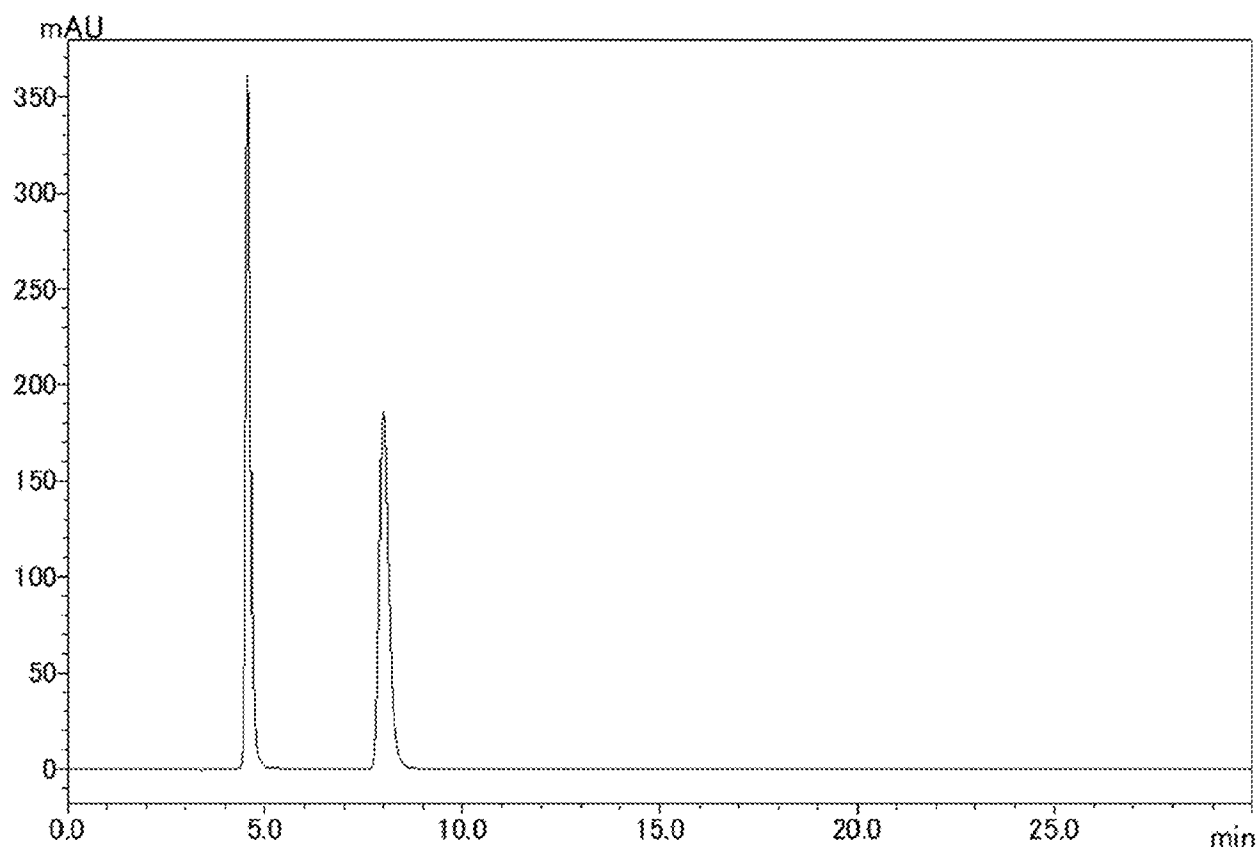
[圖4]



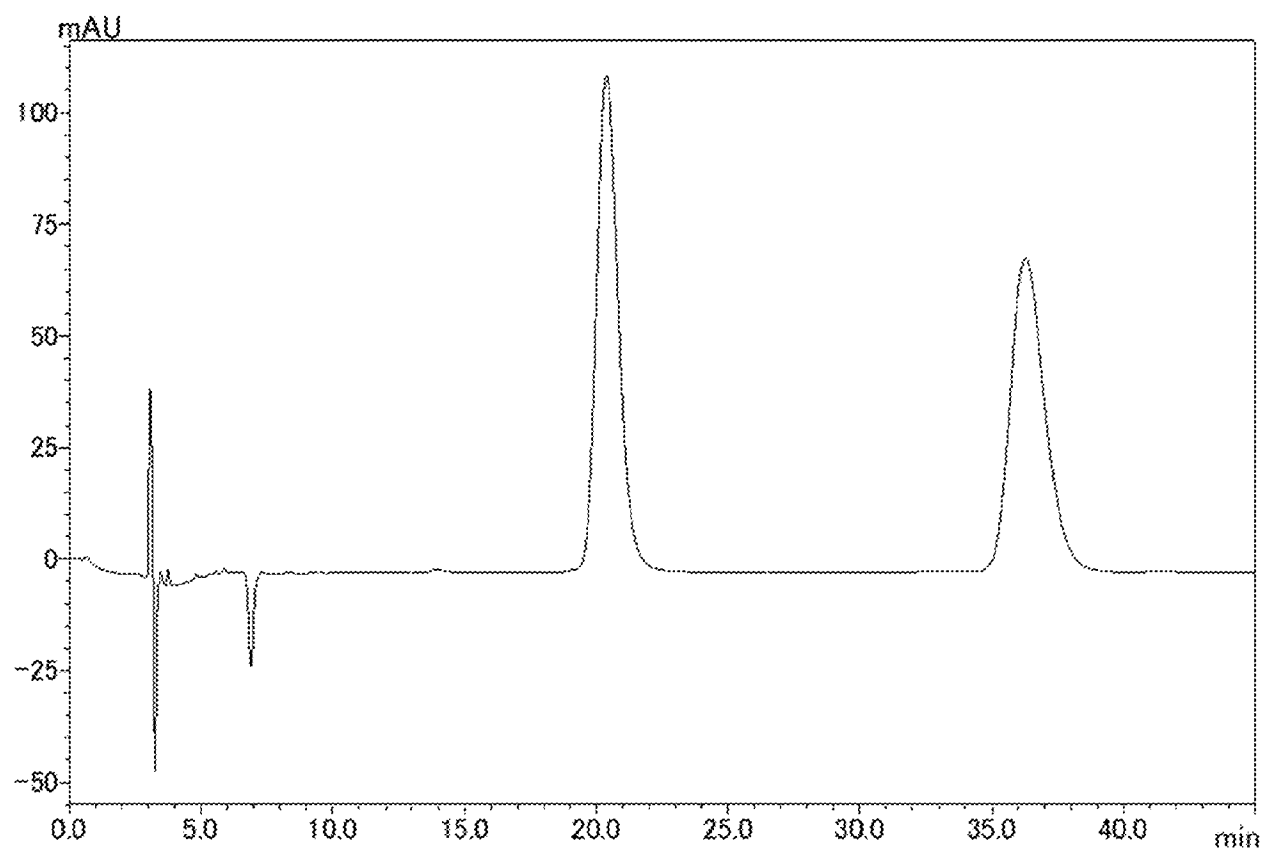
[図5]



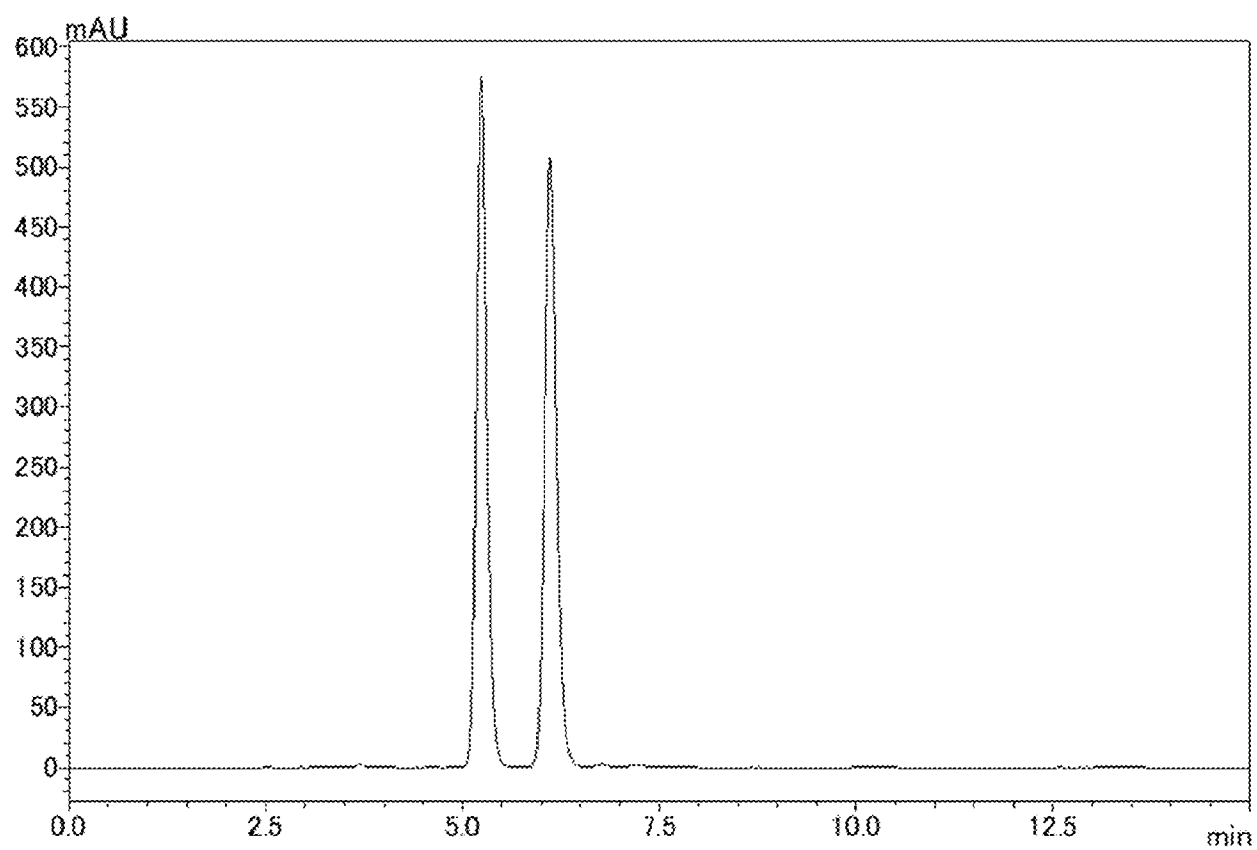
[図6]



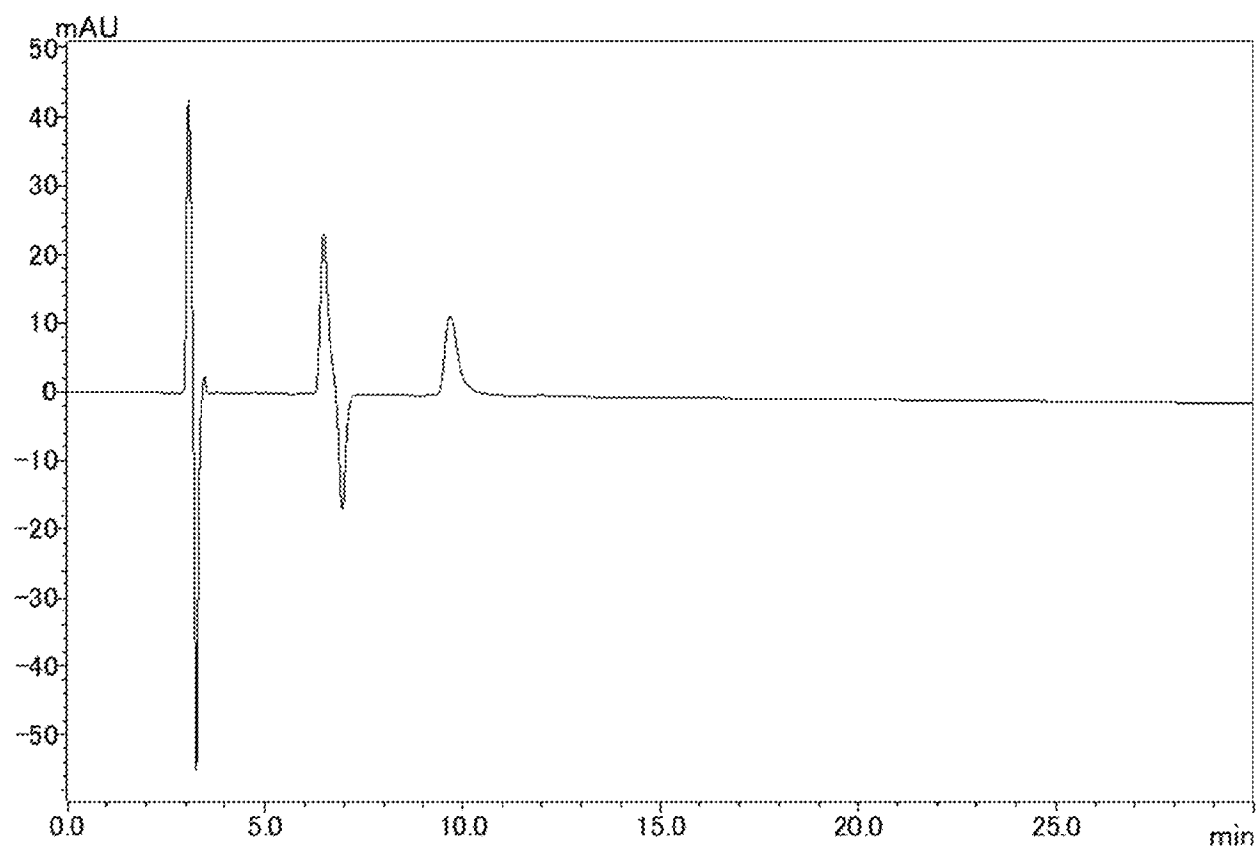
[図7]



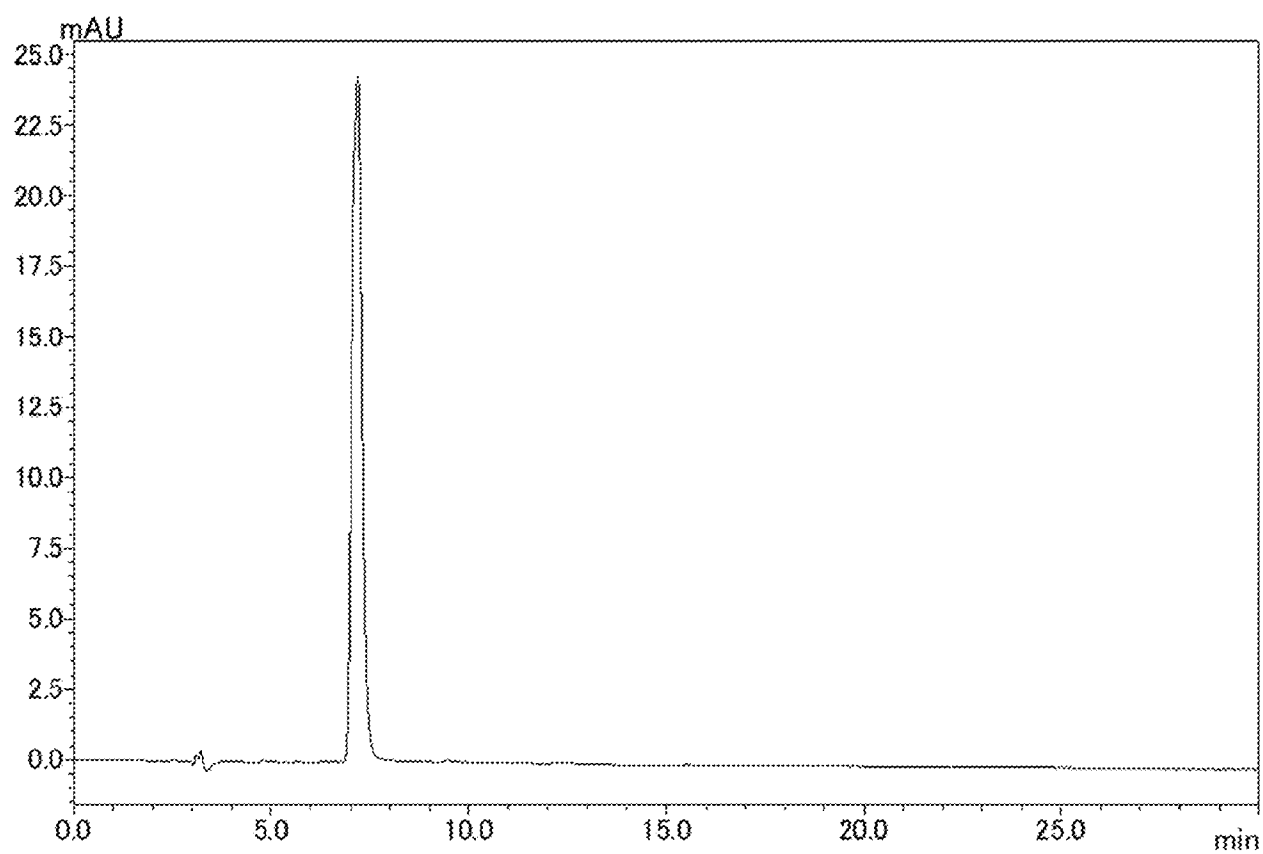
[図8]



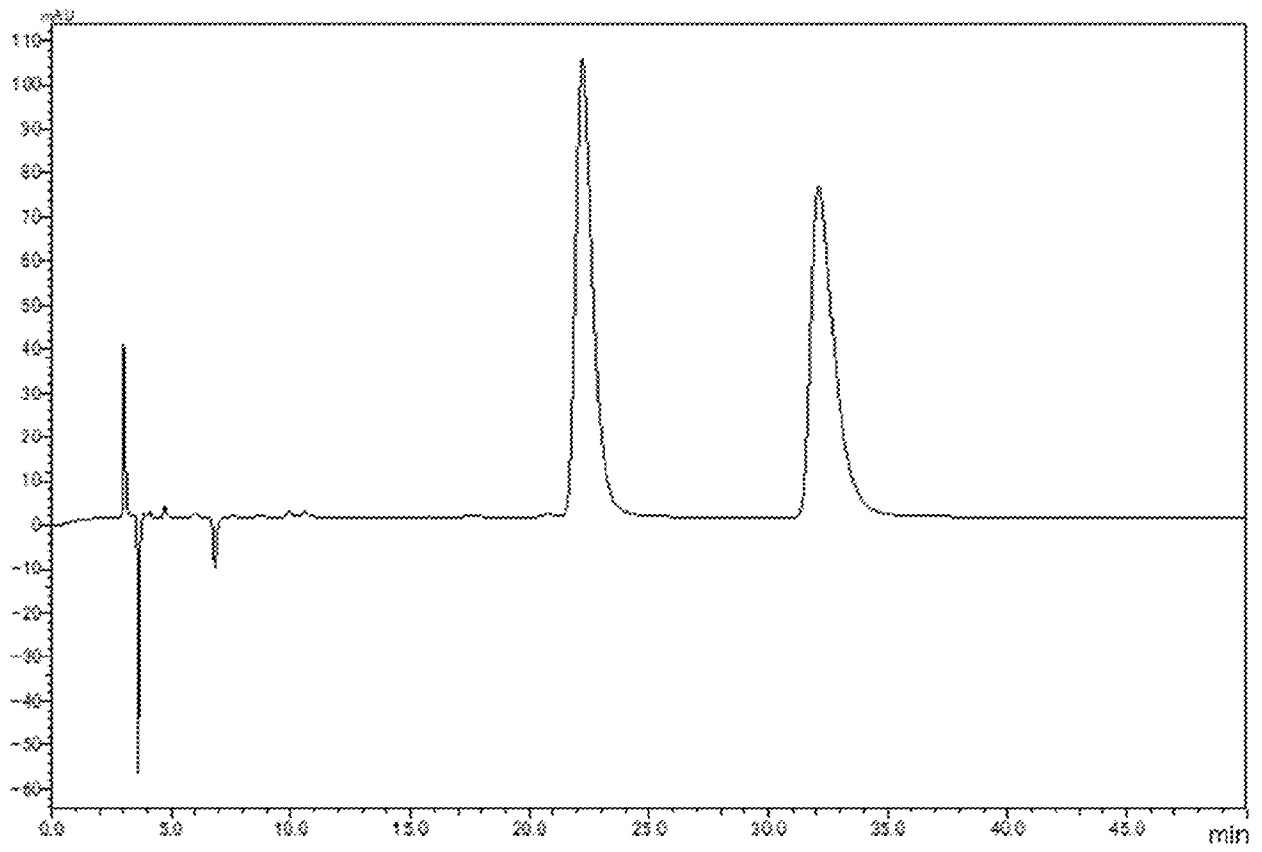
[図9]



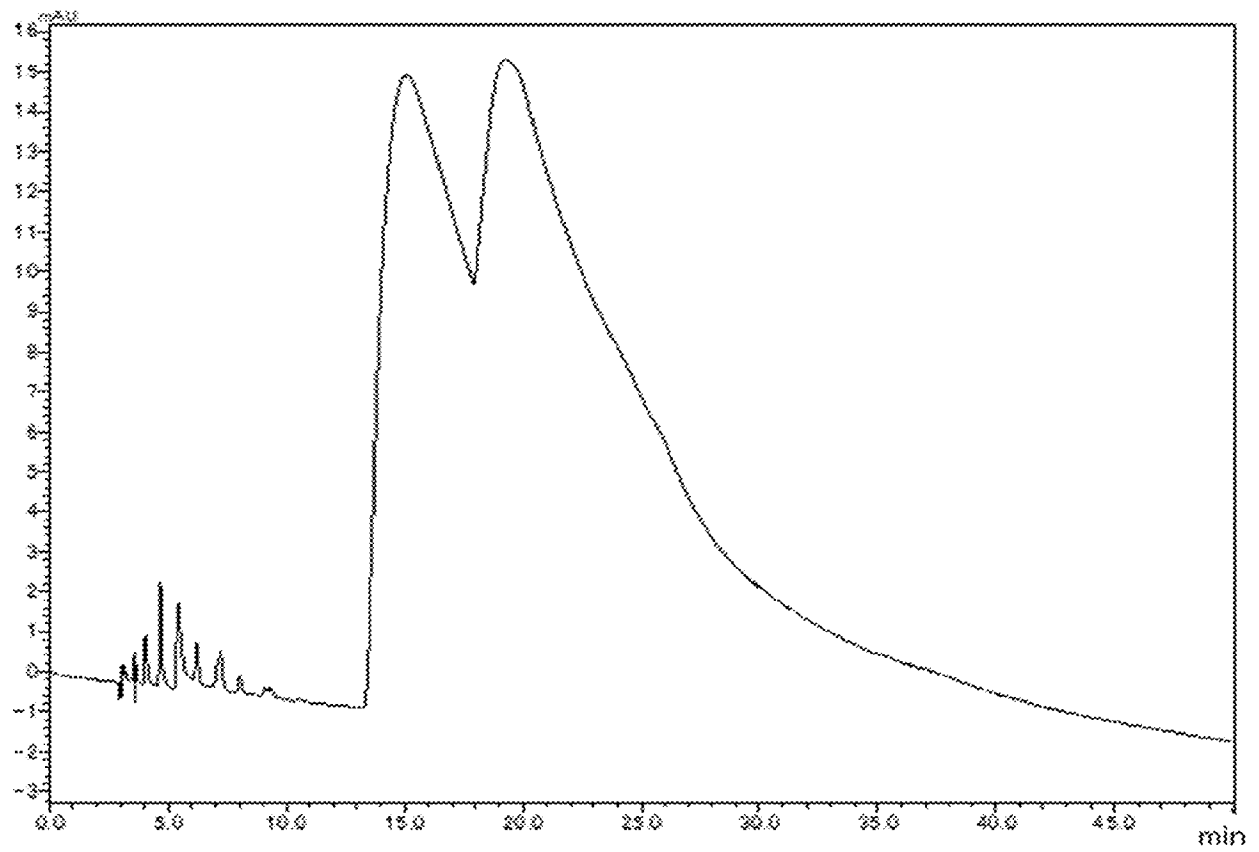
[図10]



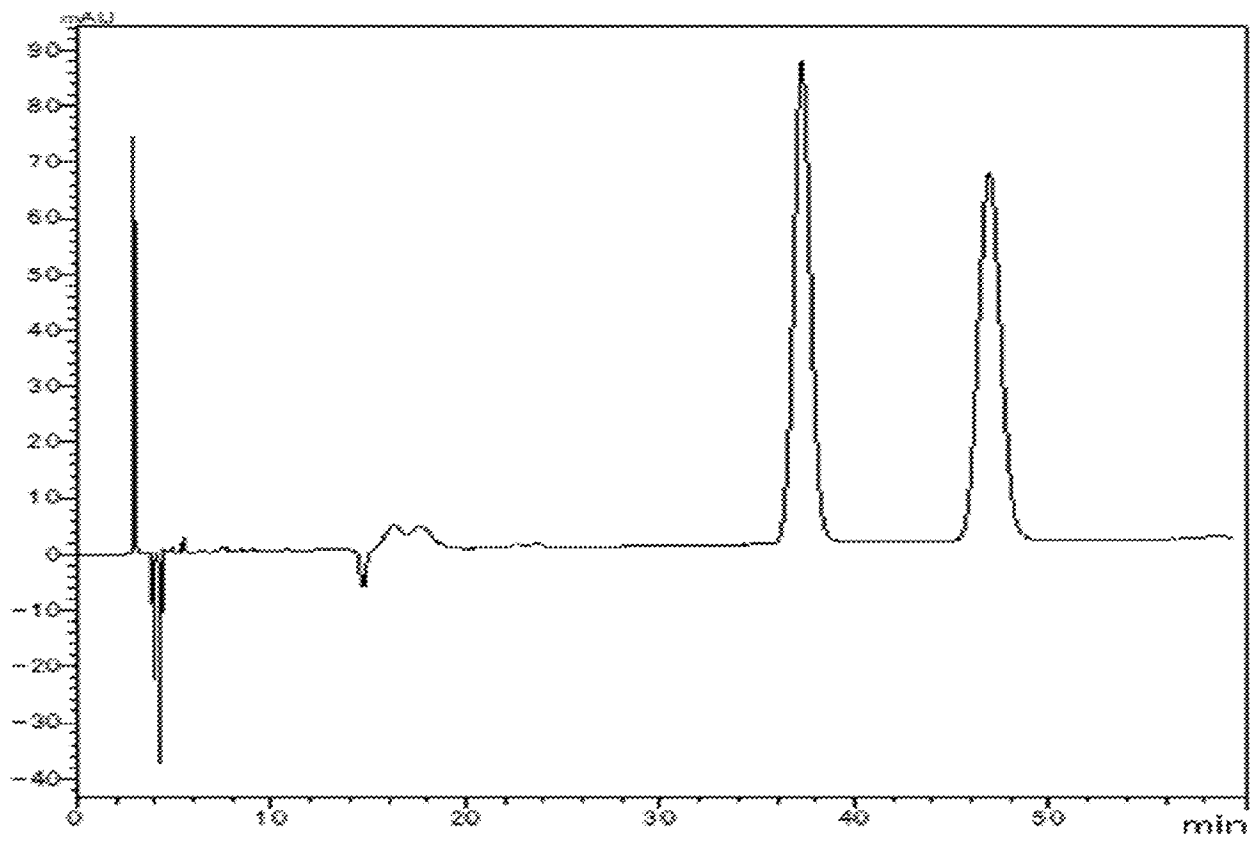
[図11]



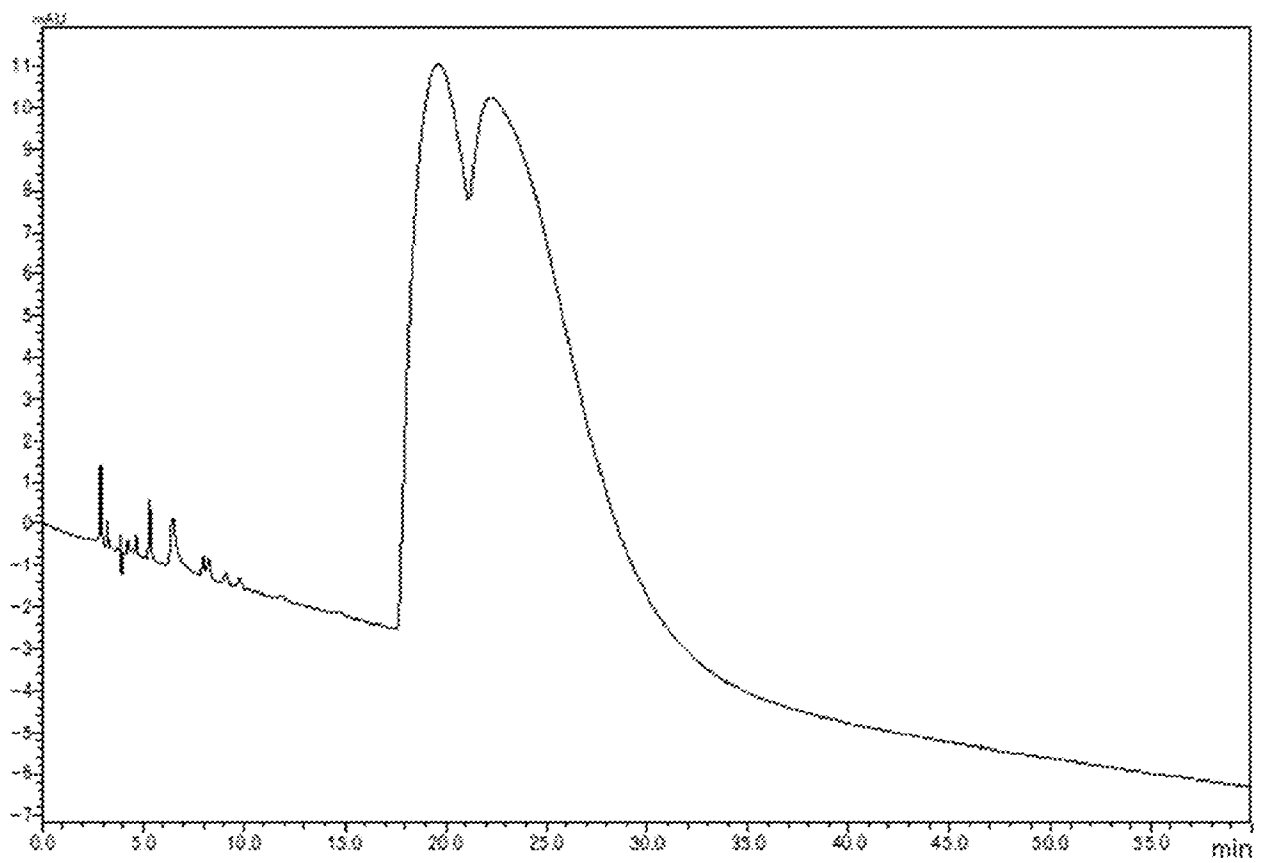
[図12]



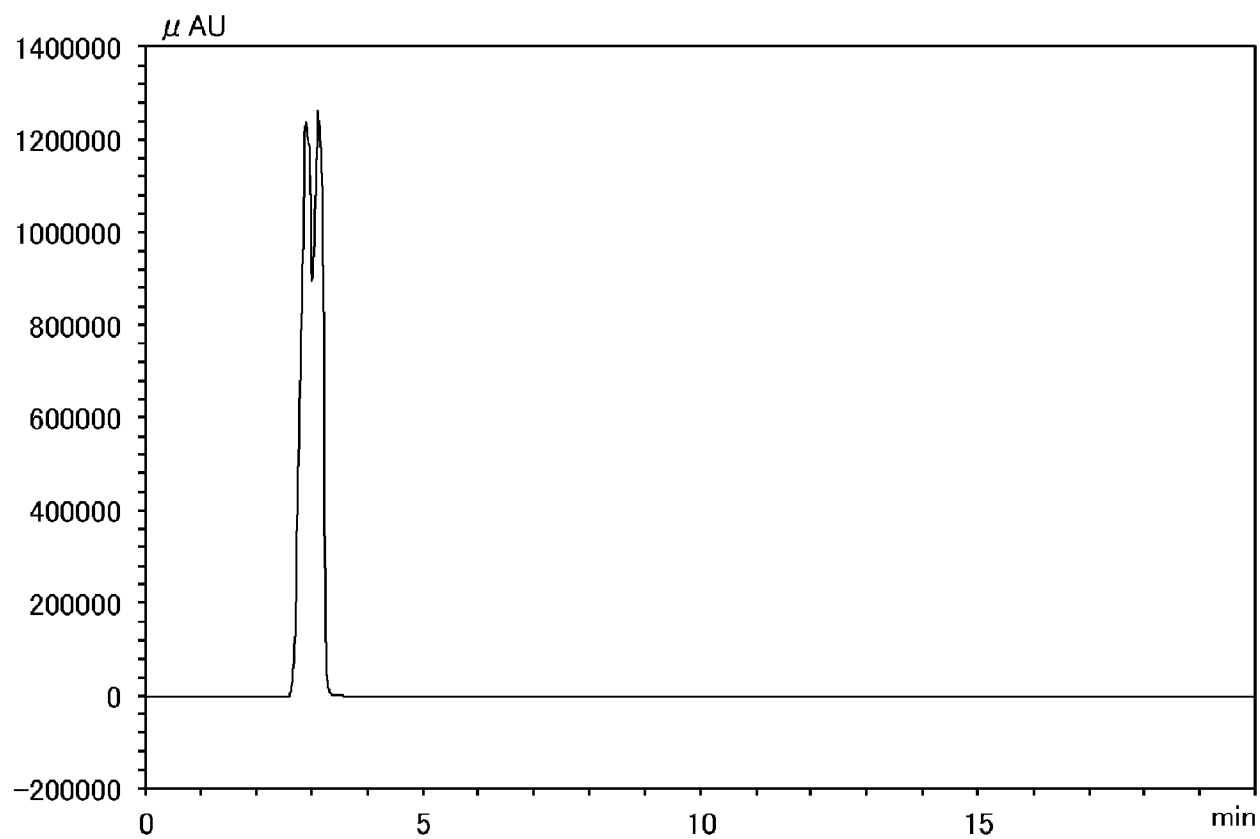
[図13]



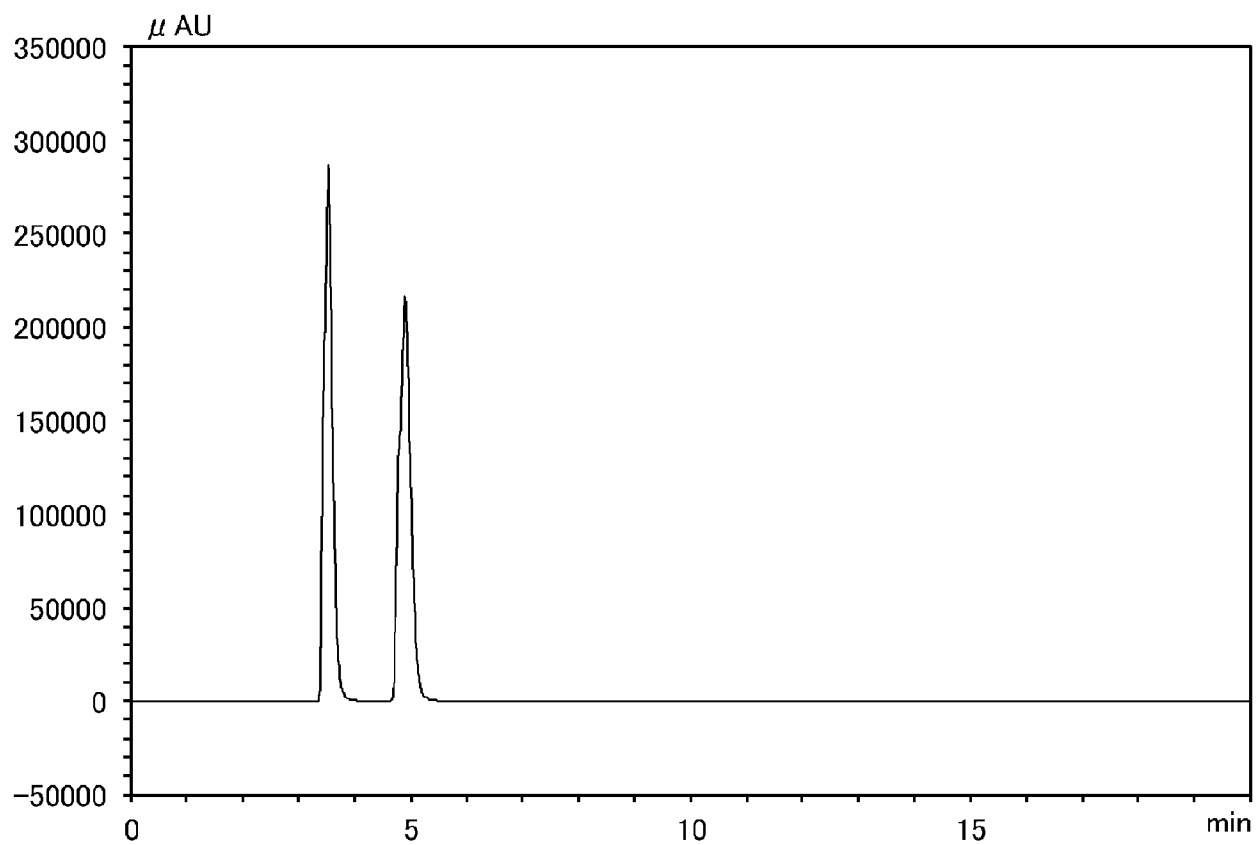
[図14]



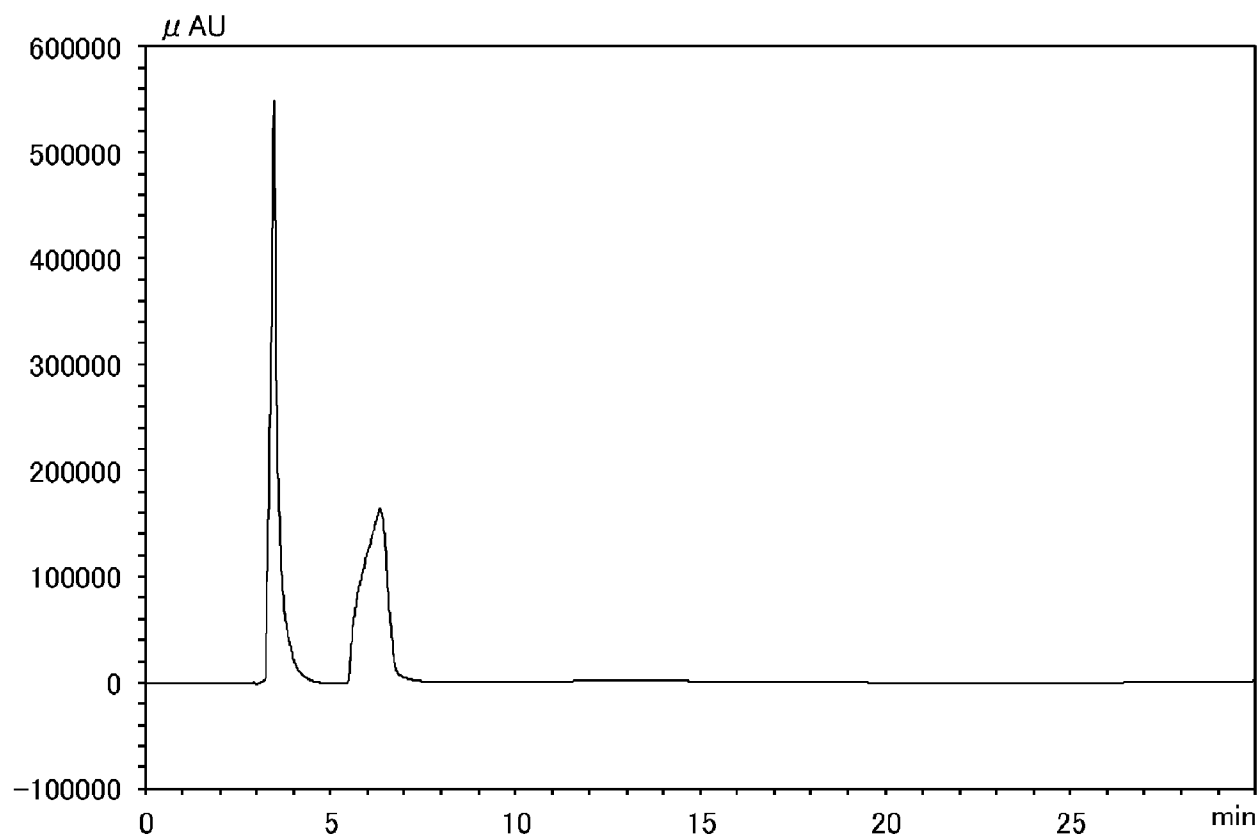
[図15]



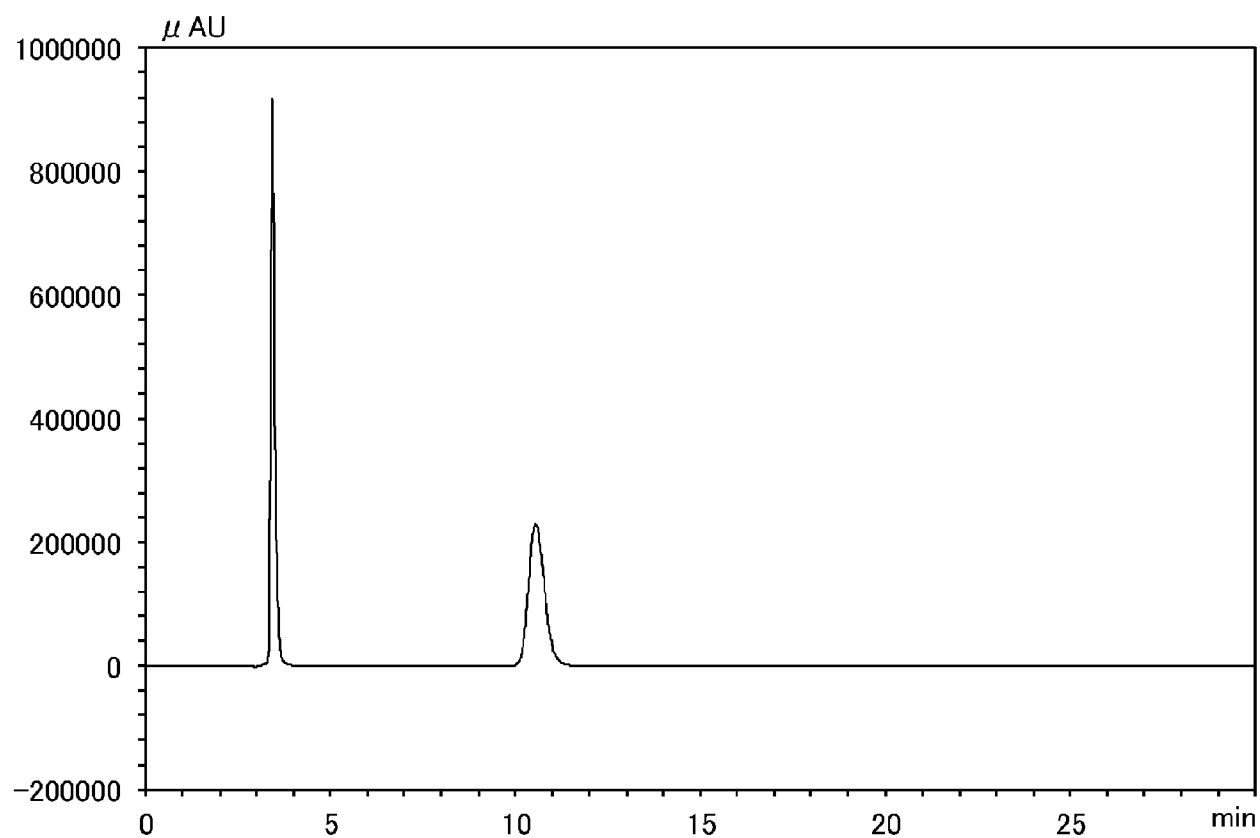
[図16]



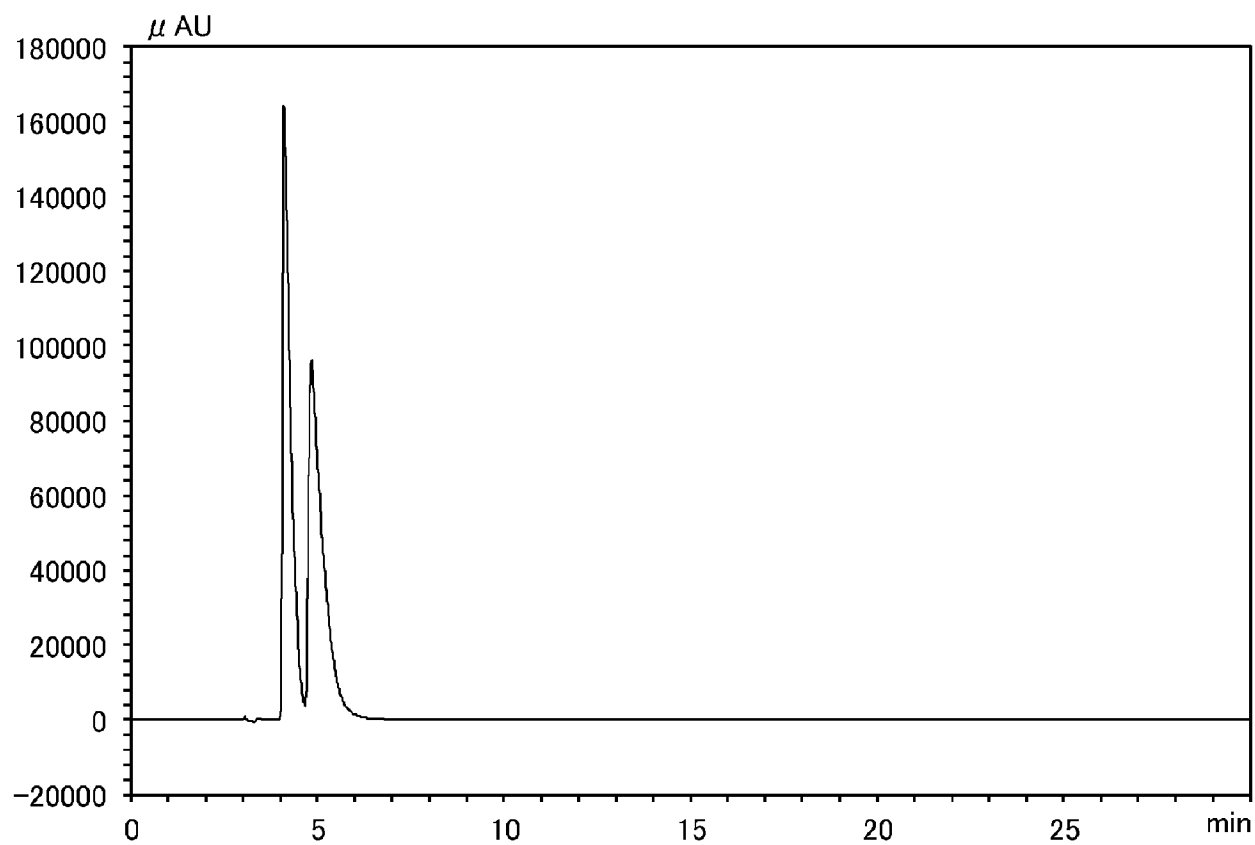
[図17]



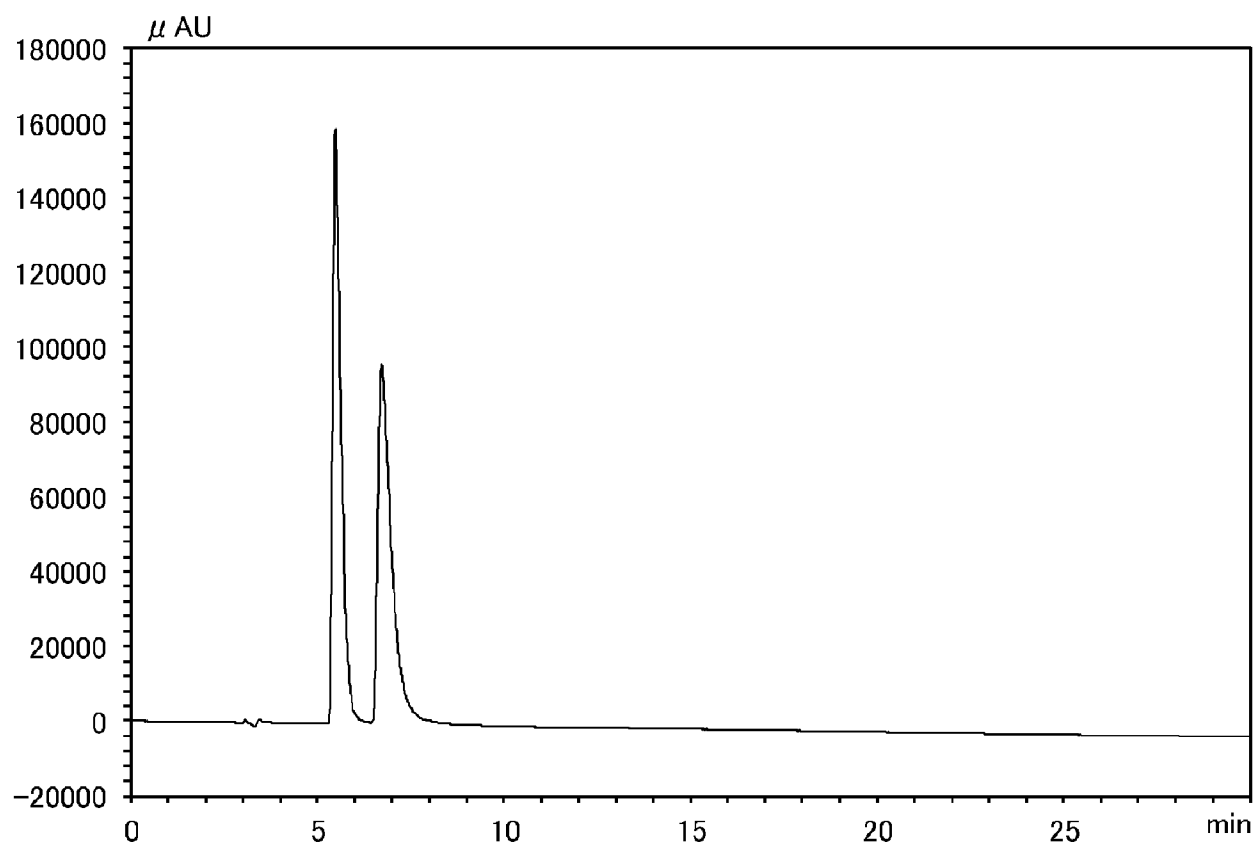
[図18]



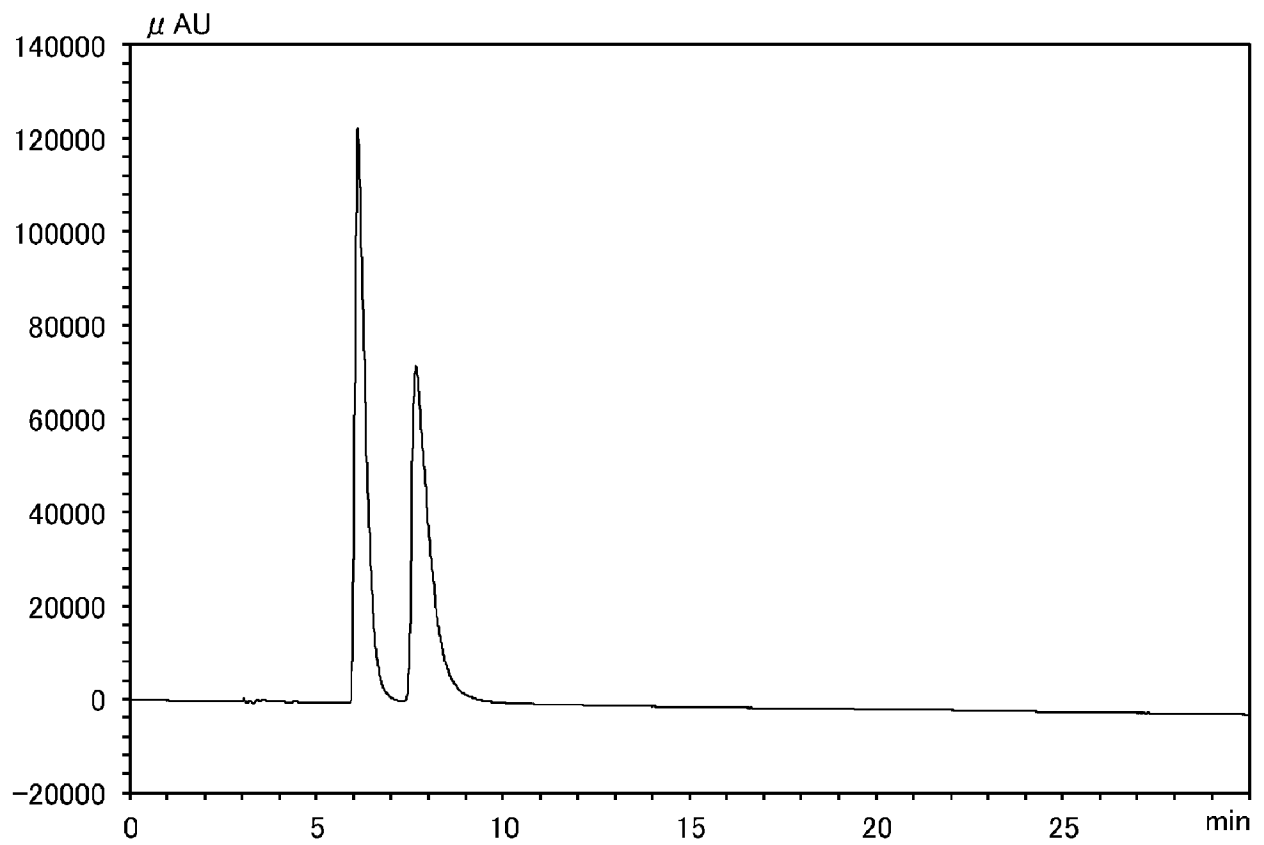
[図19]



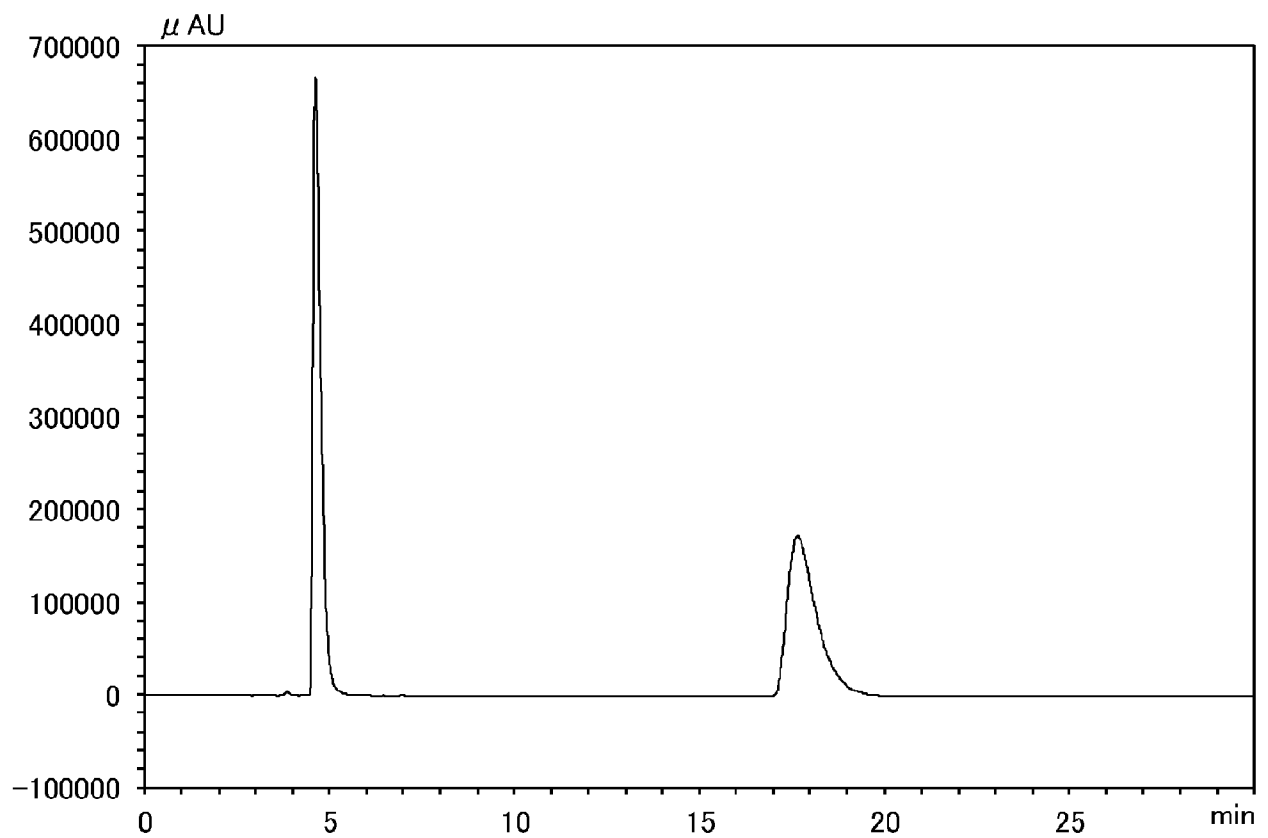
[図20]



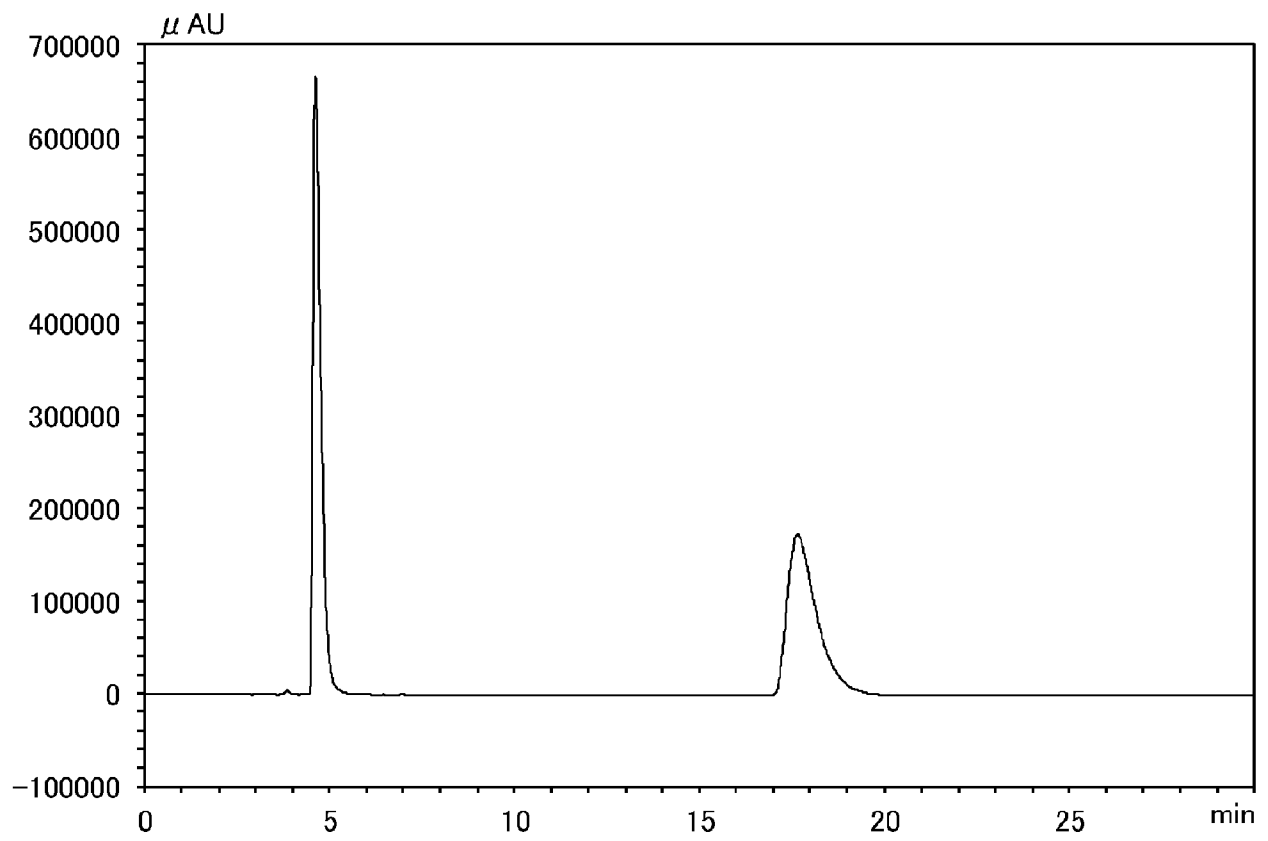
[図21]



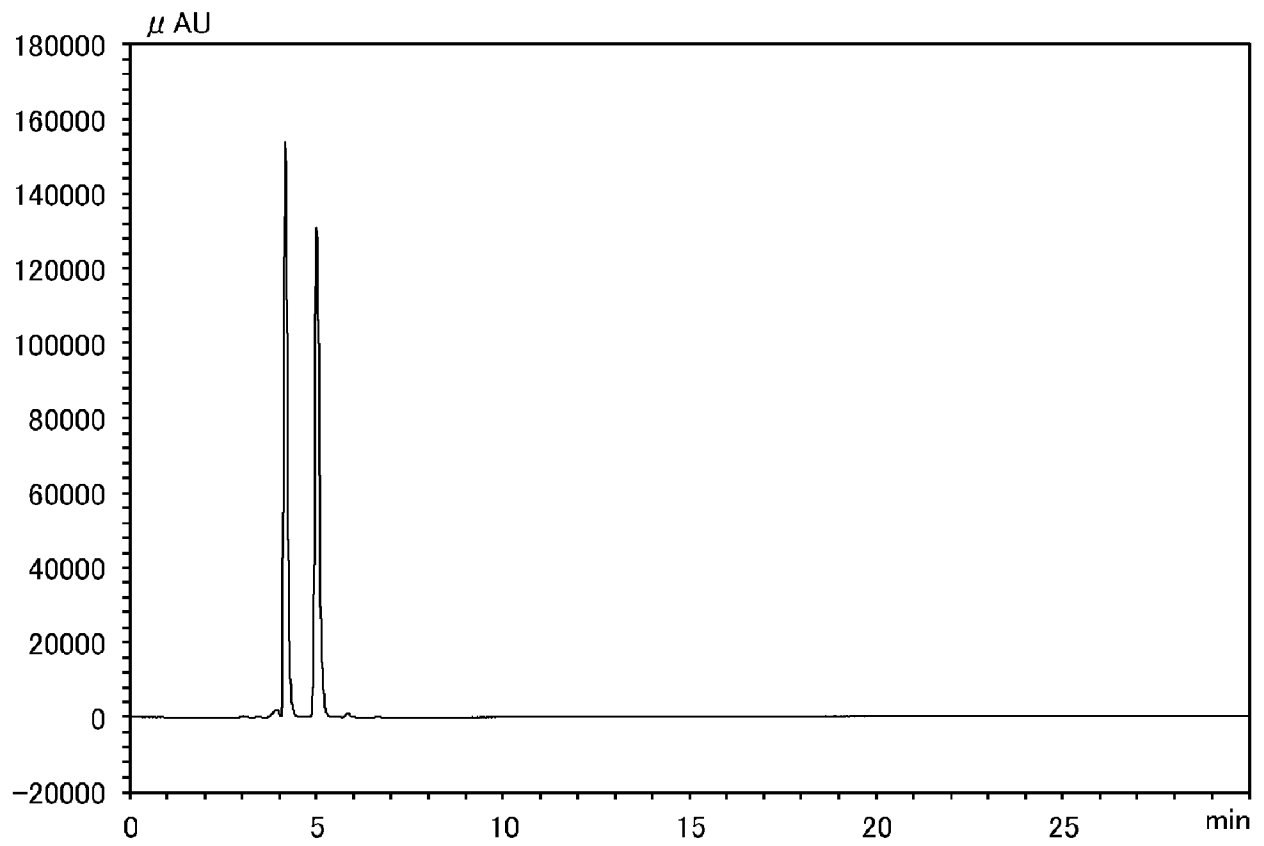
[図22]



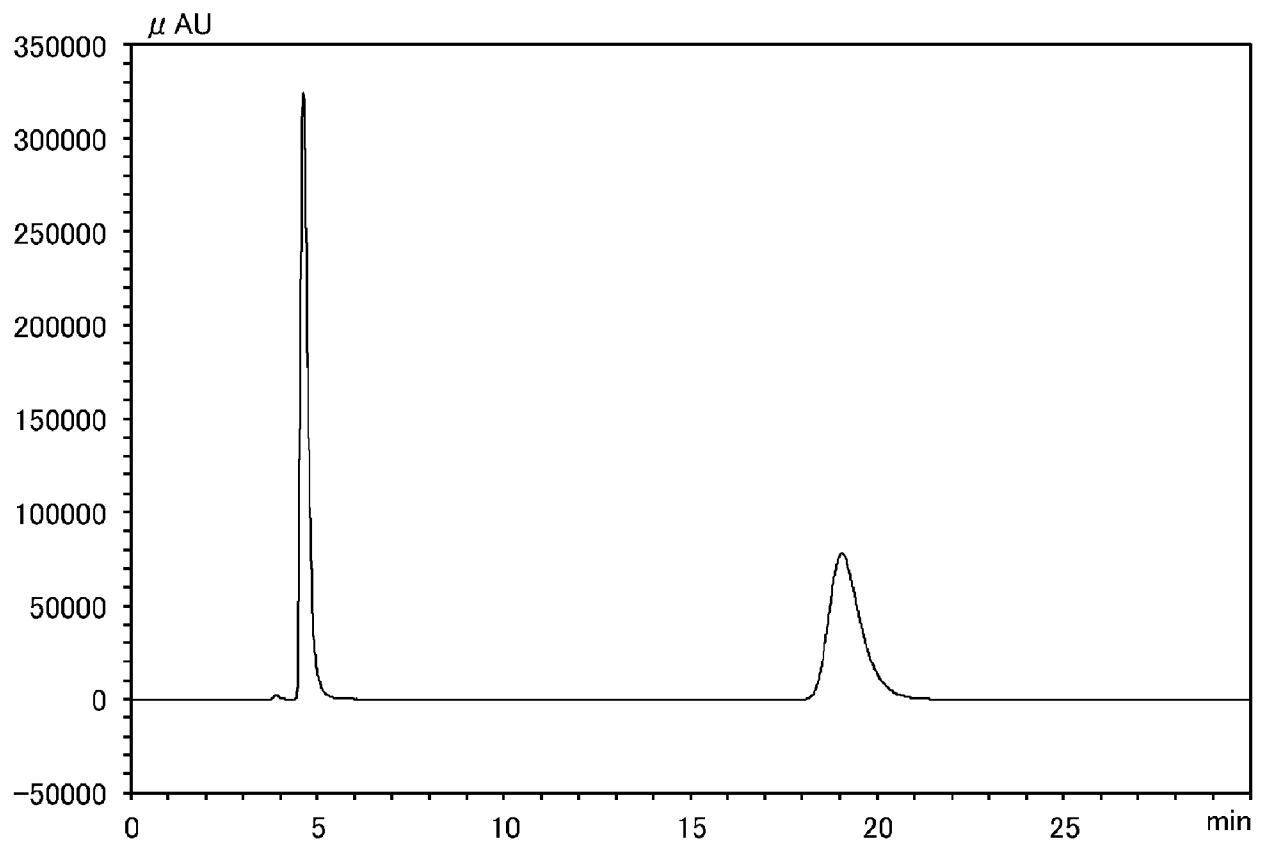
[図23]



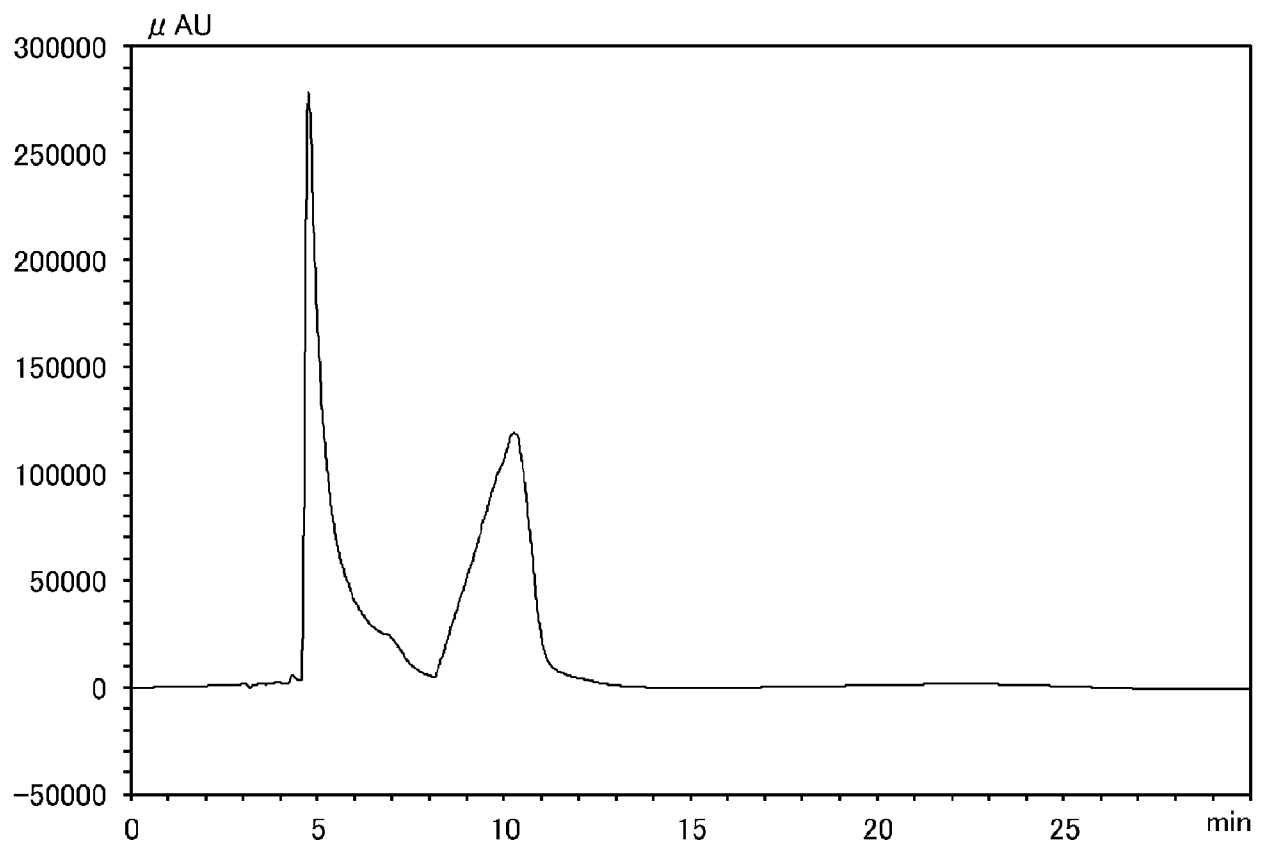
[図24]



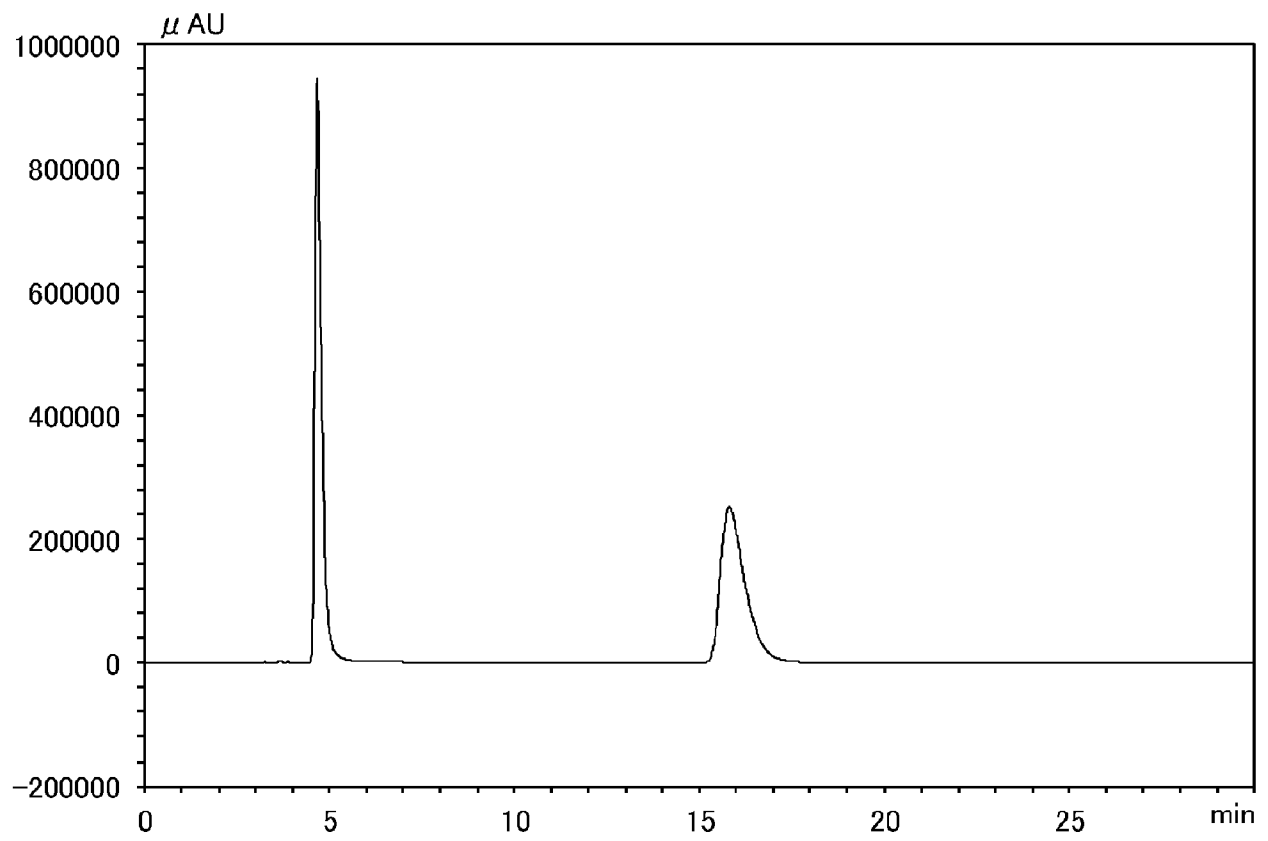
[図25]



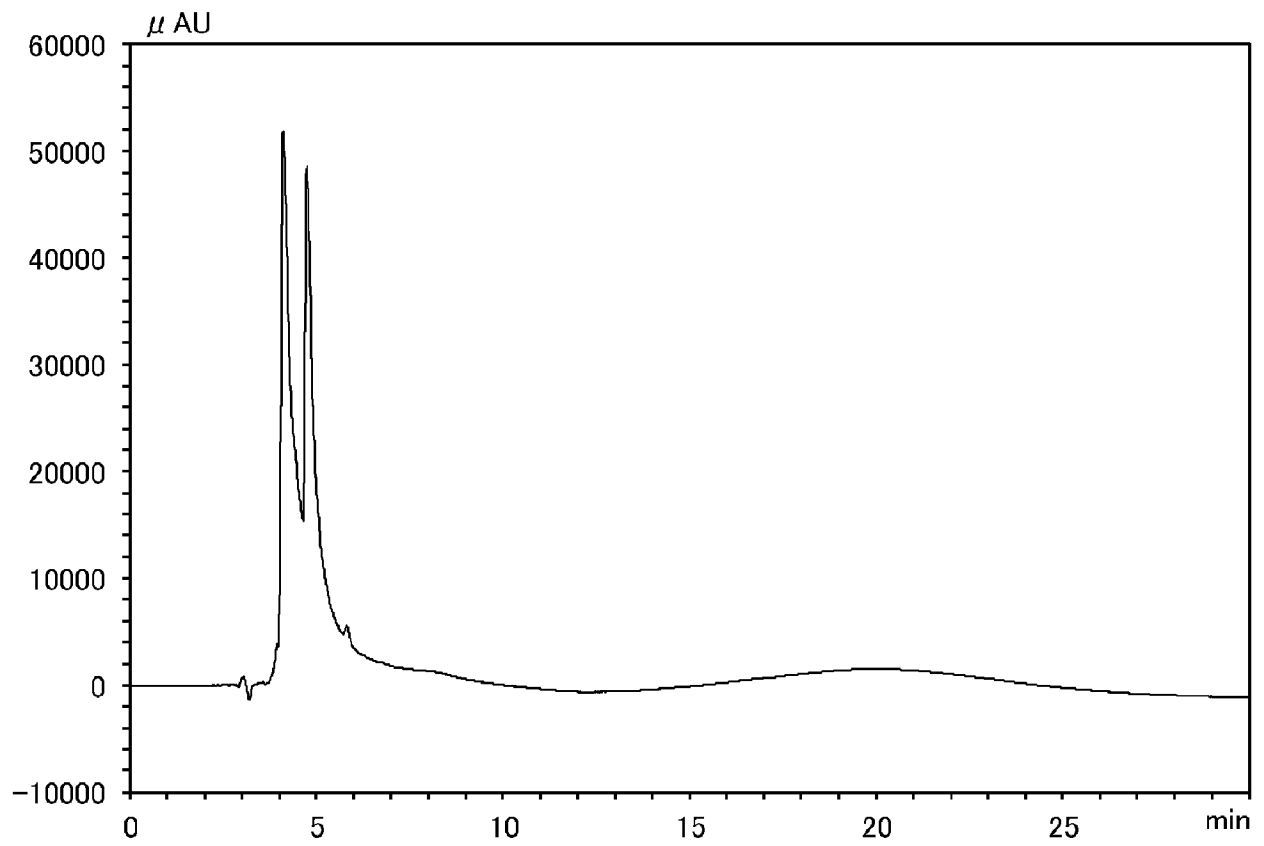
[図26]

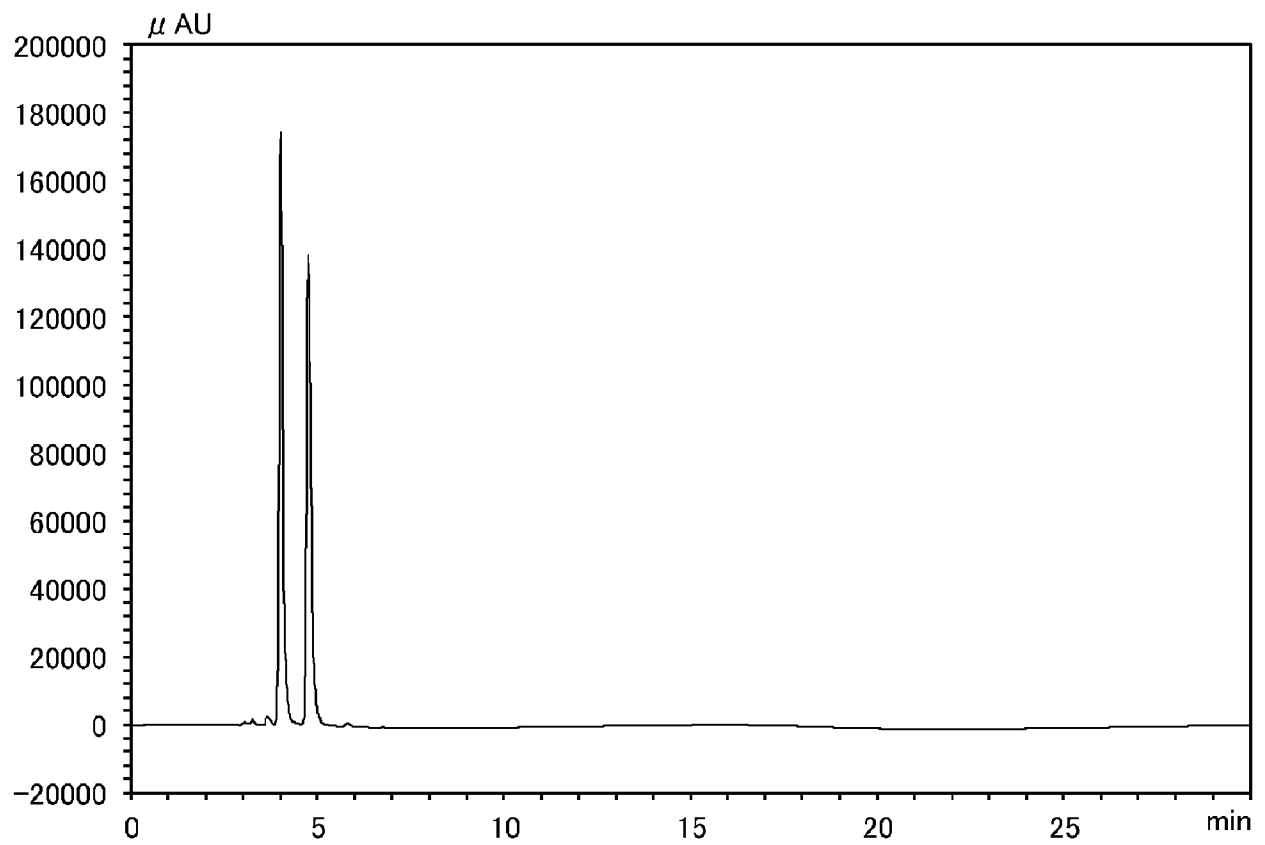
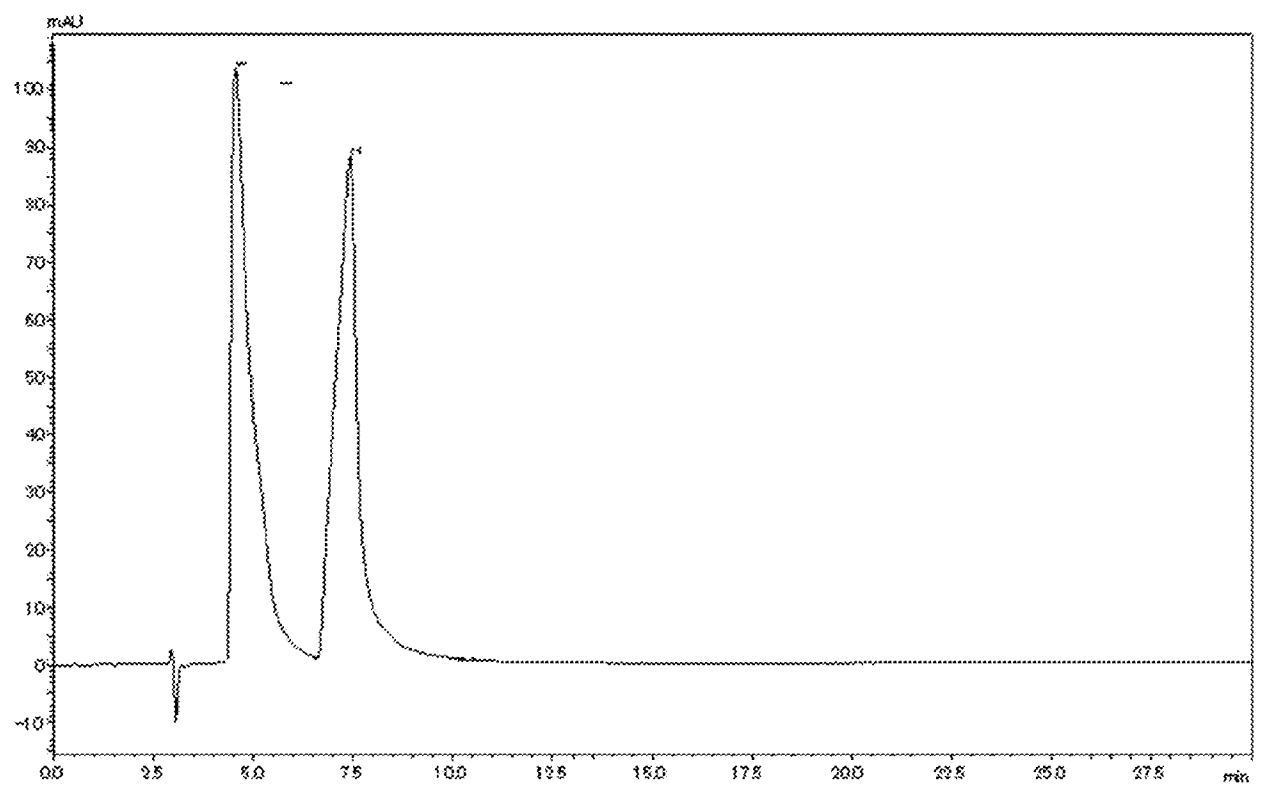


[図27]

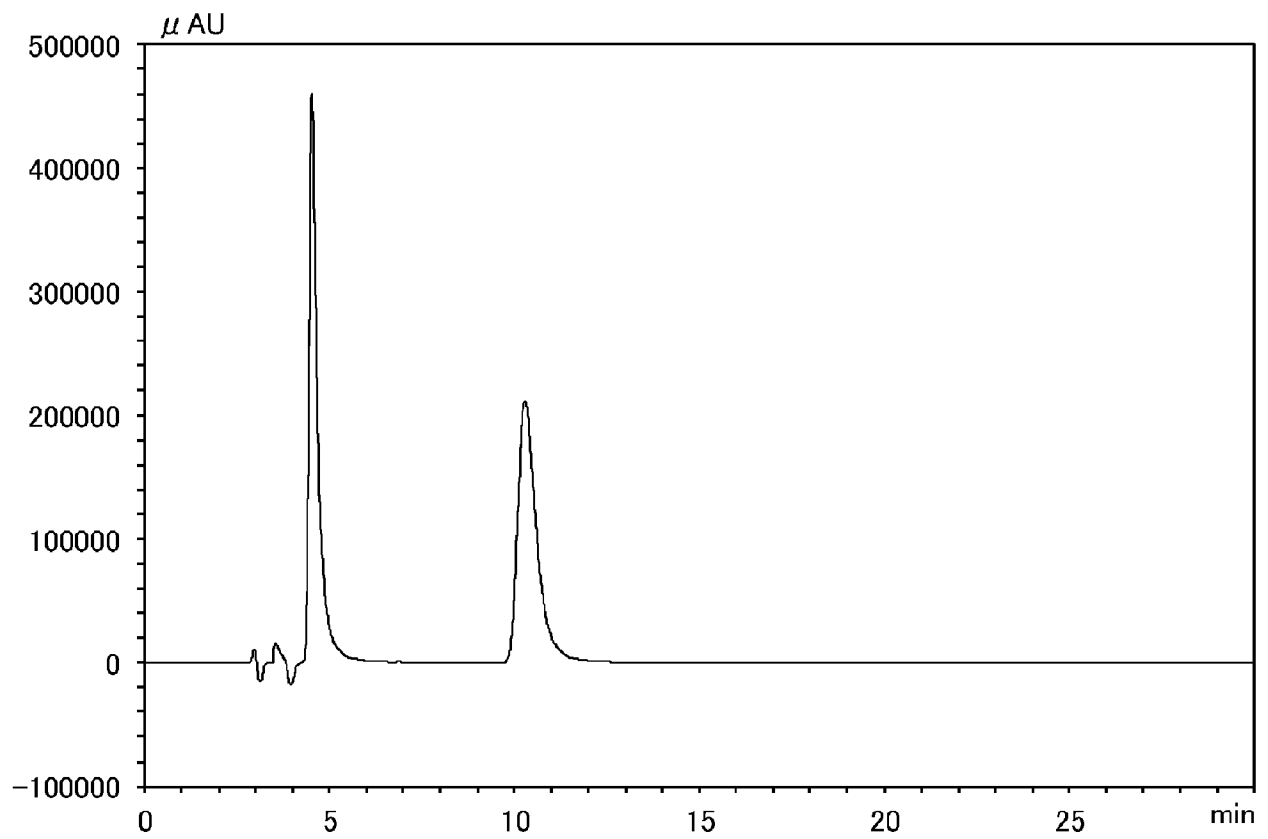


[図28]

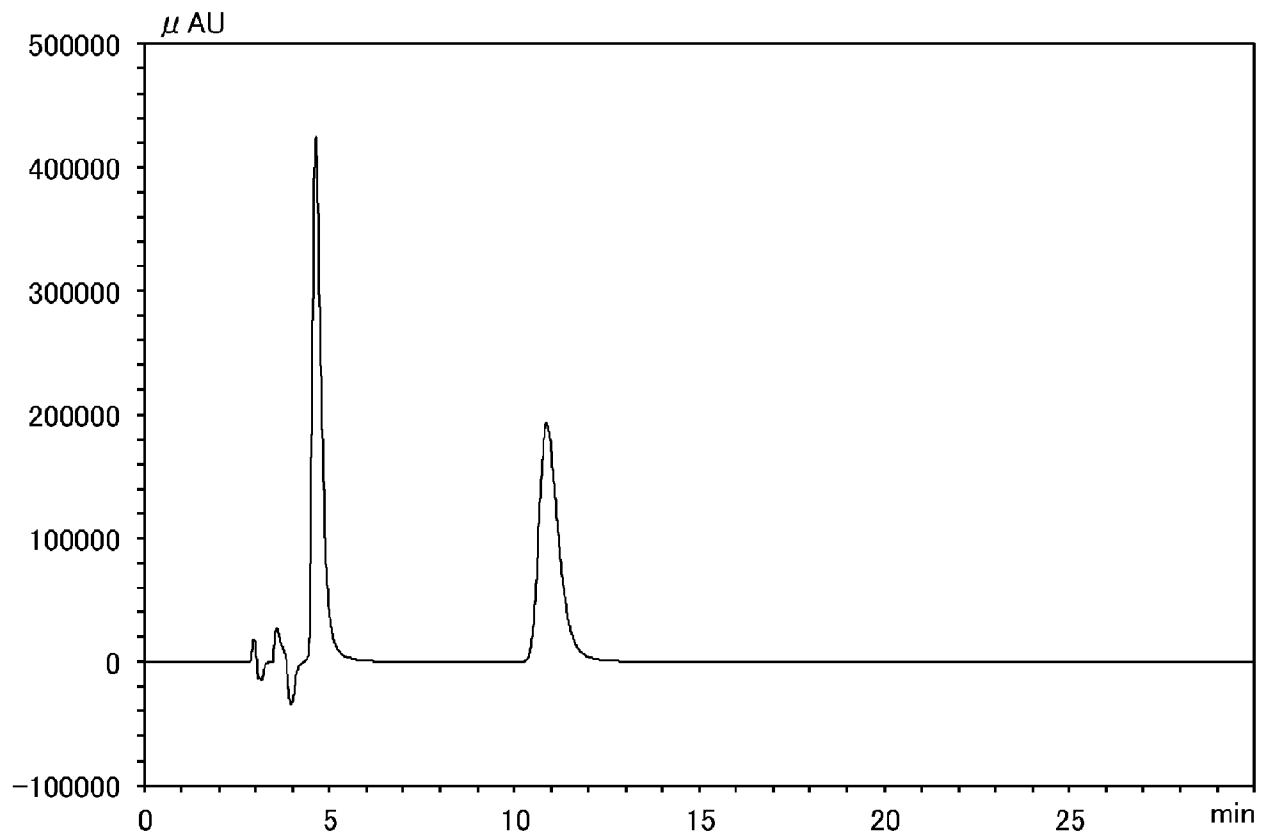


[29][30]

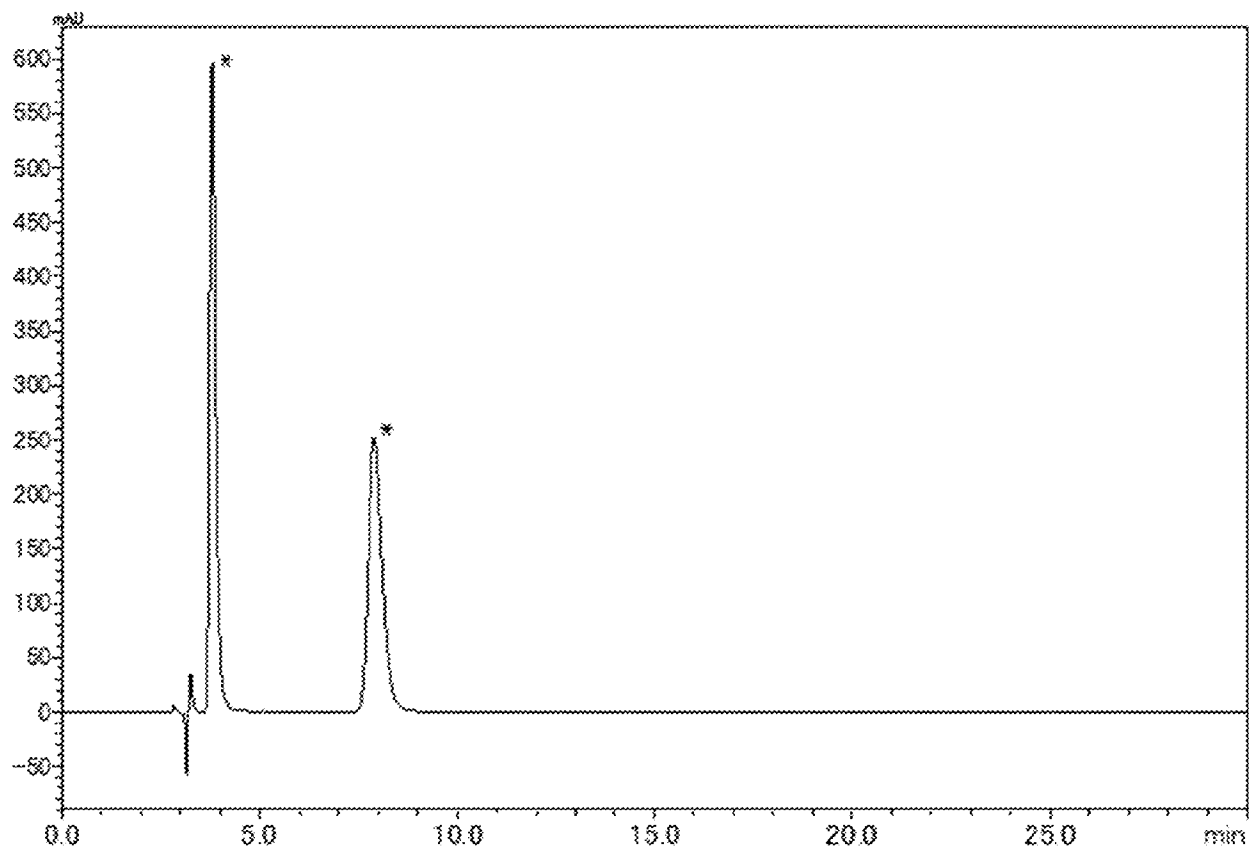
[図31]



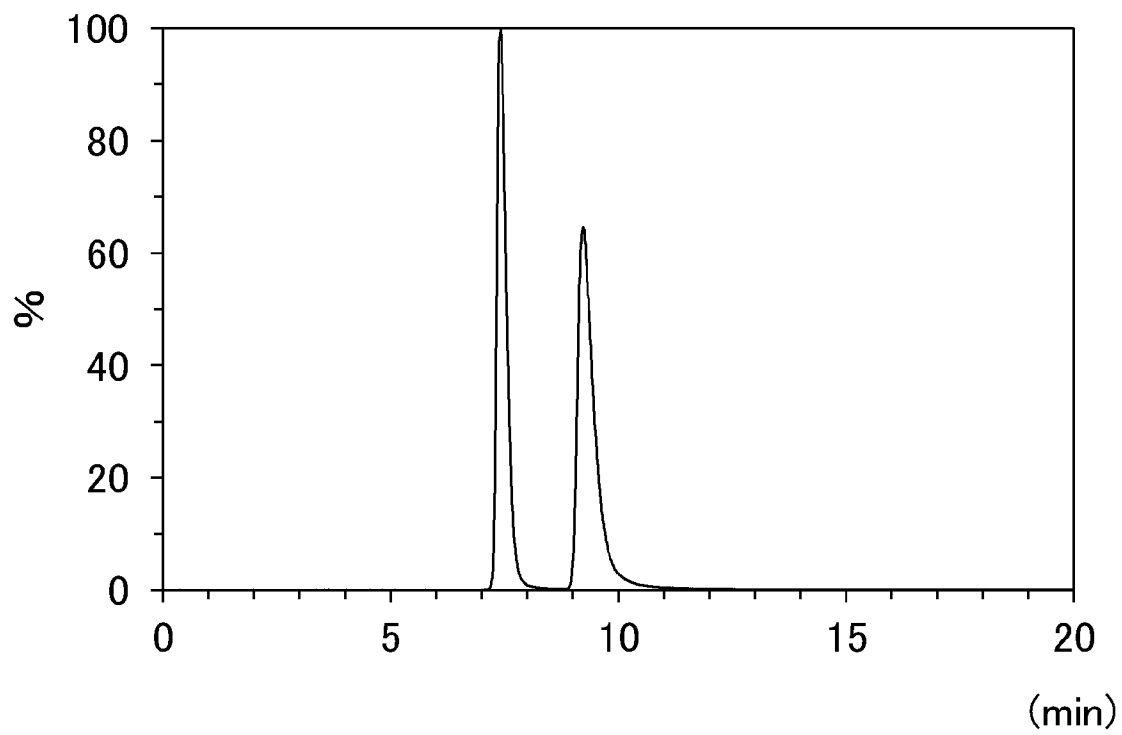
[図32]



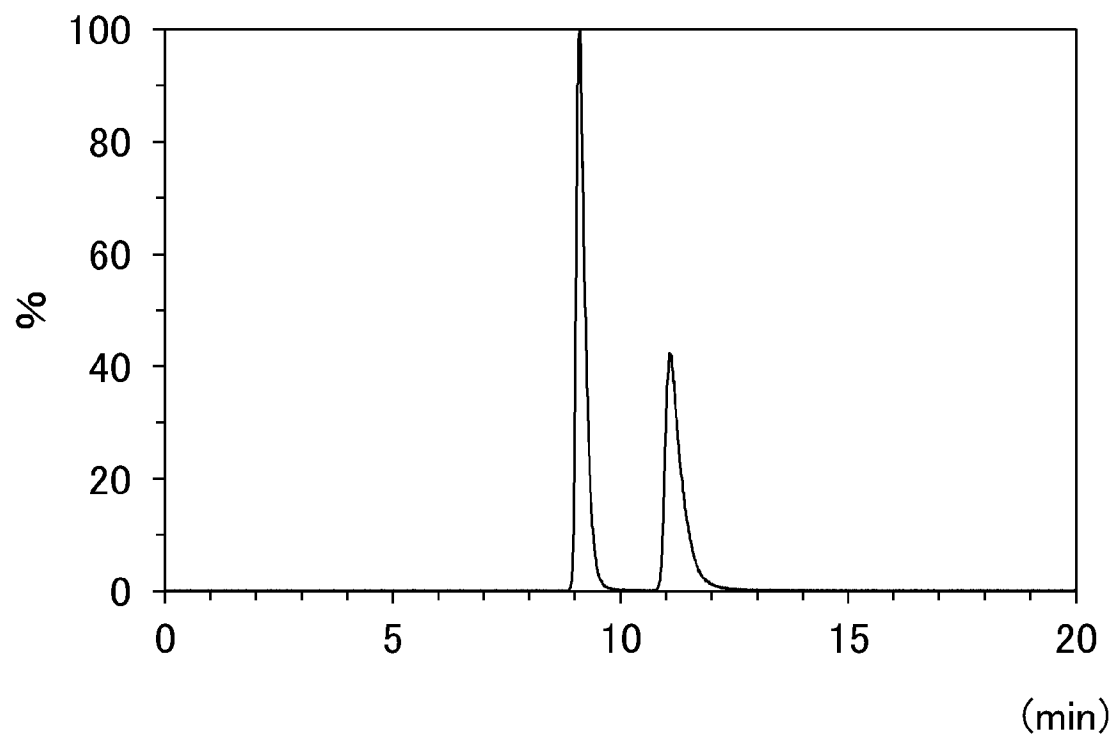
[図33]



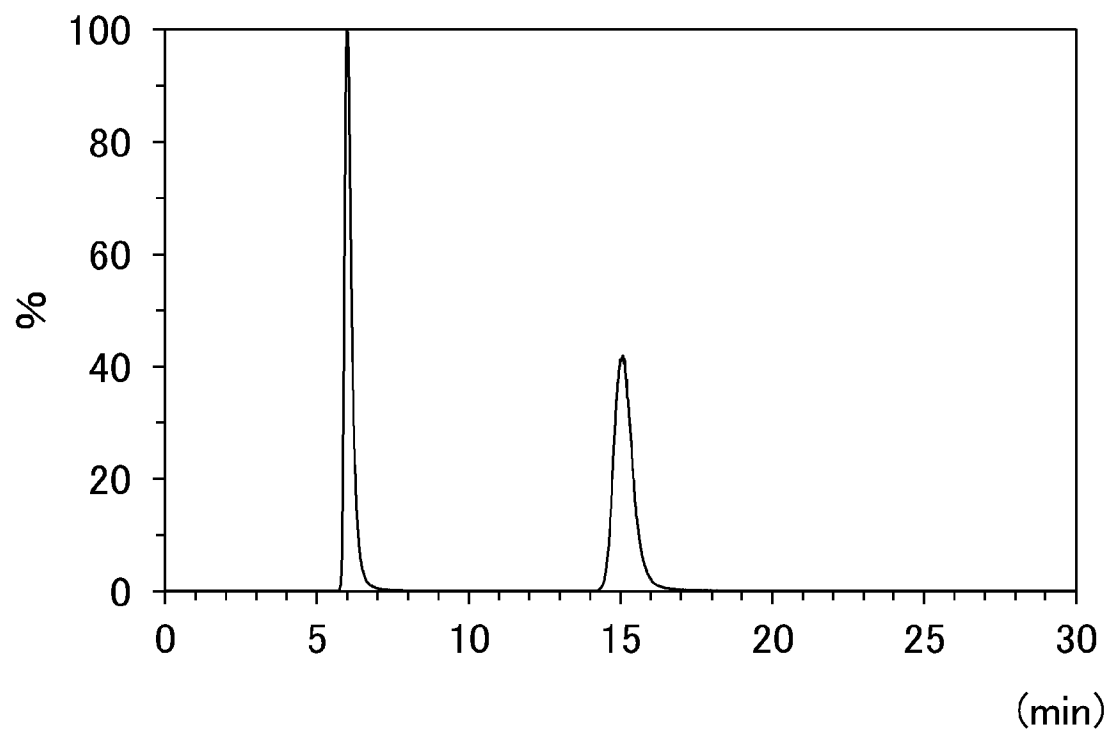
[図34]



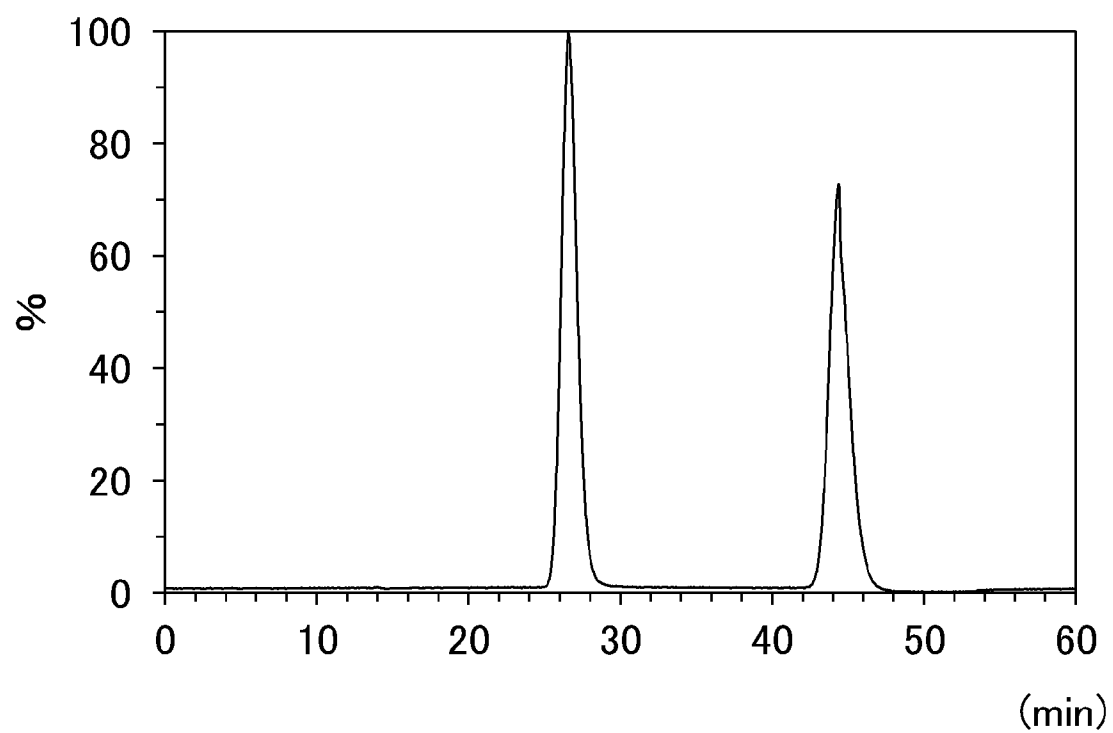
[図35]



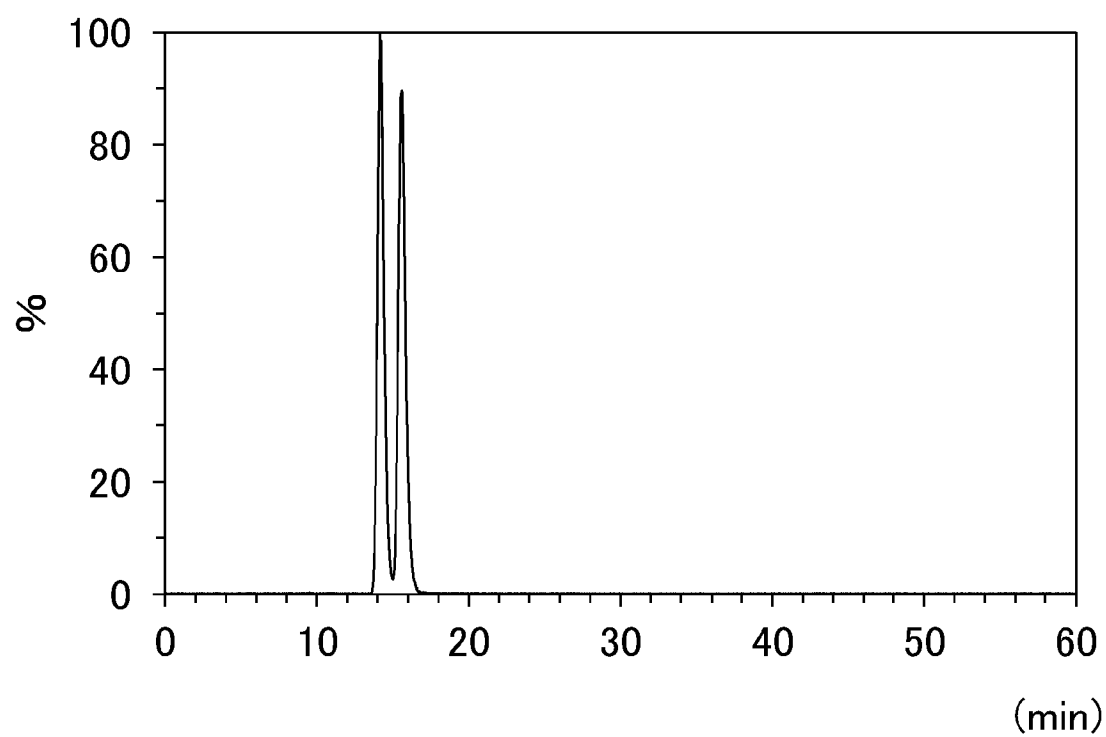
[図36]



[図37]



[図38]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021733

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/26(2006.01)i; **B01J 20/281**(2006.01)i; **B01J 20/283**(2006.01)i; **B01J 20/29**(2006.01)i; **G01N 30/88**(2006.01)i
FI: G01N30/26 A; B01J20/281 X; B01J20/283; B01J20/29; G01N30/88 C

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N30/26; B01J20/281; B01J20/283; B01J20/29; G01N30/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Scopus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2014-29313 A (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) 13 February 2014 (2014-02-13)	1, 3-4, 6-7
Y	paragraphs [0001]-[0004], [0006], [0125], [0132]-[0136], fig. 1	2
X	TASCHWER, M. et al., Development of an enantioseparation method for novel psychoactive drugs by HPLC using a Lux Cellulose-2 column in polar organic phase mode, Forensic Science International, 2017, vol. 270, pp. 232-240, doi: 10.1016/j.forsciint.2016.10.011	1, 3-4, 6-7
Y	abstract, page 233, left column, paragraph 11, right column, paragraphs 5 and 8, page 234, left column, paragraph 2, page 237, left column, paragraph 3, tables 1, 3B, 3D	2
Y	JP 2015-87261 A (UNIV. OSAKA PREFECTURE) 07 May 2015 (2015-05-07)	2
	paragraphs [0019], [0023]	
Y	JP 2006-133159 A (DAICEL CHEM.) 25 May 2006 (2006-05-25)	2
	claim 3, paragraph [0049]	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 August 2024

Date of mailing of the international search report

27 August 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021733

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2019-196948 A (NISSHIN OILLIO GROUP LTD.) 14 November 2019 (2019-11-14) paragraphs [0014], [0017]	2
A	JP 2016-524166 A (SCINOPHARM TAIWAN LTD.) 12 August 2016 (2016-08-12) paragraph [0024]	1-7
A	JP 2010-505110 A (COUNCIL SCIENT IND. RES.) 18 February 2010 (2010-02-18) entire text, all drawings	1-7
P, A	JP 2023-161874 A (DAICEL CORP.) 08 November 2023 (2023-11-08) entire text, all drawings	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/021733

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2014-29313	A	13 February 2014	US 2014/0021136 A1 paragraphs [0001]-[0005], [0009], [0191]-[0206], [0213]- [0217], fig. 1	
JP	2015-87261	A	07 May 2015	(Family: none)	
JP	2006-133159	A	25 May 2006	(Family: none)	
JP	2019-196948	A	14 November 2019	(Family: none)	
JP	2016-524166	A	12 August 2016	WO 2015/005928 A1 paragraph [0035] CN 105431733 A KR 10-2016-0030963 A	
JP	2010-505110	A	18 February 2010	US 2010/0286425 A1 entire text, all drawings US 2013/0317244 A1 WO 2008/038300 A1 KR 10-2009-0083895 A CN 101568380 A	
JP	2023-161874	A	08 November 2023	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

G01N 30/26(2006.01)i; B01J 20/281(2006.01)i; B01J 20/283(2006.01)i; B01J 20/29(2006.01)i;
G01N 30/88(2006.01)i
FI: G01N30/26 A; B01J20/281 X; B01J20/283; B01J20/29; G01N30/88 C

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

G01N30/26; B01J20/281; B01J20/283; B01J20/29; G01N30/88

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2024年
日本国実用新案登録公報 1996-2024年
日本国登録実用新案公報 1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Scopus

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2014-29313 A（三菱化学株式会社）13.02.2014（2014-02-13） 段落[0001]-[0004], [0006], [0125], [0132]-[0136], 図1	1, 3-4, 6-7
Y		2
X	TASCHWER, M. et al., Development of an enantioseparation method for novel psychoactive drugs by HPLC using a Lux Cellulose-2 column in polar organic phase mode, Forensic Science International, 2017, Vol.270, p.232-240, doi: 10.1016/j.forsciint.2016.10.011 要旨, 第233頁左欄第11段落, 同右欄第5, 8段落, 第234頁左欄第2段落, 第237頁左欄 第3段落, 表1, 3B, 3D	1, 3-4, 6-7
Y		2
Y	JP 2015-87261 A（公立大学法人大阪府立大学）07.05.2015（2015-05-07） 段落[0019], [0023]	2
Y	JP 2006-133159 A（ダイセル化学工業株式会社）25.05.2006（2006-05-25） 請求項3, [0049]	2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に
公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し
くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を
付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の
後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵
触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引
用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性
又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献
との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな
いと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 09.08.2024

国際調査報告の発送日 27.08.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

小澤 理 2J 1762

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2019-196948 A (日清オイリオグループ株式会社) 14.11.2019 (2019 - 11 - 14) 段落[0014], [0017]	2
A	JP 2016-524166 A (サイノファーム タイワン, リミテッド) 12.08.2016 (2016 - 08 - 12) 段落[0024]	1-7
A	JP 2010-505110 A (カウンスィル オブ サイエンティフィック アンド インダストリ アル リサーチ) 18.02.2010 (2010 - 02 - 18) 全文, 全図	1-7
P, A	JP 2023-161874 A (株式会社ダイセル) 08.11.2023 (2023 - 11 - 08) 全文, 全図	1-7

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/021733

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2014-29313	A	13.02.2014	US 2014/0021136 A1 段落[0001]-[0005], [0009], [0191]-[0206], [0213]- [0217], 図1	
JP	2015-87261	A	07.05.2015	(ファミリーなし)	
JP	2006-133159	A	25.05.2006	(ファミリーなし)	
JP	2019-196948	A	14.11.2019	(ファミリーなし)	
JP	2016-524166	A	12.08.2016	WO 2015/005928 A1 段落[0035] CN 105431733 A KR 10-2016-0030963 A	
JP	2010-505110	A	18.02.2010	US 2010/0286425 A1 全文, 全図 US 2013/0317244 A1 WO 2008/038300 A1 KR 10-2009-0083895 A CN 101568380 A	
JP	2023-161874	A	08.11.2023	(ファミリーなし)	