



## 【vol.1】分取 HPLC と逆相フラッシュクロマトグラフィー、どう選択するか？

October 15, 2019

Bob Bickler

この質問は、頻度が増加しているものです。過去 10 年ほどの間に、逆相フラッシュクロマトグラフィーの使用は劇的に増加しています。同様に、逆相分取 HPLC(以降、RP pHPLC)活用も増加しています。化学者はフラッシュカラムクロマトグラフィーのスピードと低溶媒使用と RP pHPLC の究極の精製との間で選択する場面があります。このことを背景に、フラッシュクロマトグラフィーの選択方法と、RP pHPLC を使用するのが最善かどうかについて、私の考えをお伝えします。

ご存知のように、反応混合物の中には他のものよりも精製が容易なものもあり、RP pHPLC はフラッシュよりも精製力を発揮します。フラッシュカラムクロマトグラフィーを使用してターゲット化合物の純度を気にする化学者は、多くの場合、自動化された RP pHPLC を使用し、精製する生成物が多い場合には複数回注入します。

標的化合物の純度を気にする場合、化学者は RP pHPLC に先立ってフラッシュカラムクロマトグラフィーを第一段階として使用することを実際に検討する必要があります。このアプローチでは、安価なカラムを使用して化合物を迅速に精製することができます。採取したフラッシュクロマトグラフィー画分が十分に純度がない場合は、RP pHPLC を用いて再精製することができます。このアプローチにより、RP pHPLC に注入された物質は、より少量で、汚染物質の大部分が含まれていません。

RP pHPLC は最終化合物精製にも利用されます。実際、順相の精製戦略がうまくいかなければ、RP pHPLC は理にかなっています。しかし、しかし、RP pHPLC は常に最終的な化合物の精製または失敗した順相フラッシュクロマトグラフィーのために必要ですか？そうではありません。

今日の高性能逆相フラッシュカラムは非常に良好に機能し、高負荷で高純度の反応混合物を分離・精製することが可能です。また、RP pHPLC のコストは、少なくとも最初は、逆相フラッシュクロマトグラフィーに対して法外に高く、長期的に見ても精製されるサンプルあたりのコストが増加します。

分取 HPLC (以降、pHPLC) は、高価で精密に作られたステンレススチール製のカラムに詰め込まれた小さな粒子媒体 (5-10 $\mu$ m) を使用しています。pHPLC カラムの小さな粒子は、大きな背圧を発生させ、理論段 (効率) を高くします。効率が高いほど、ピーク間の分離が良好になり、困難な分離に有効です。

pHPLC カラムの高い分解能は高純度のフラクションを生成することができますが、その小さな粒子は、より大きな粒子媒体を充填したフラッシュカラムよりも早くオーバーロードします (図 1)。

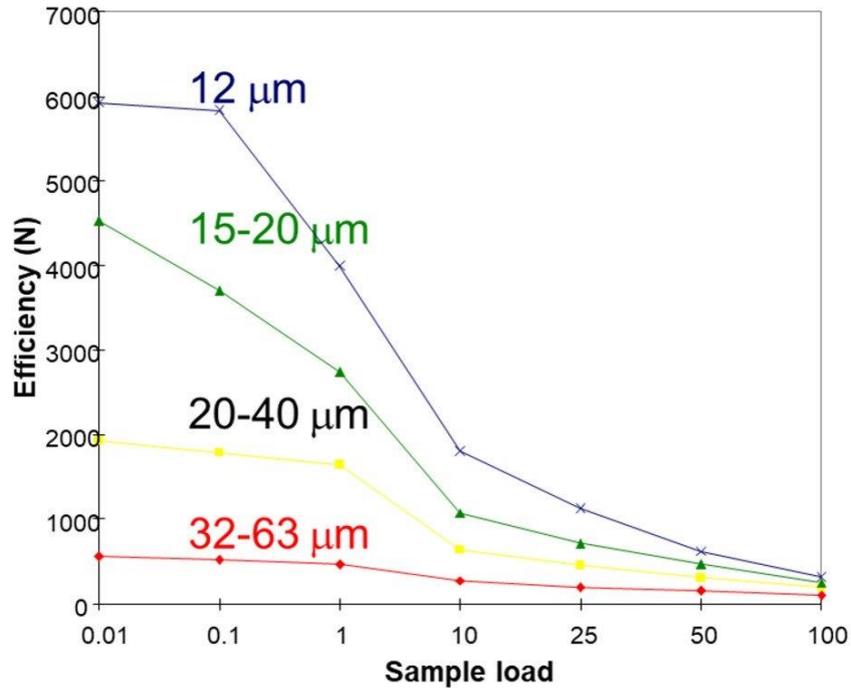


図 1. 粒子径の異なるメディアを用いた場合のカラム効率に対する試料負荷の影響は、粒子径の小さいメディアは粒子径の大きいメディアよりも早く分離性能を失うことを示しています。

これは直感に反するように思えますが、以下のことがわかっているので、これは真実です。

高い理論段=高分解能

および

高い分解能=より高い負荷/フラクション純度

しかしながら、負荷能力は、下の式<sup>1</sup>や図2のグラフのように、カラム効率の平方根に反比例します。

$$M_i = [A_m * (1.9 * r^2 * L) * (1 + k)] / n^{1/2}$$

ここで、

$M_i$  はサンプル負荷量

$A_m$  は定数

$r$  はカラムの半径

$L$  はカラムの長さ

$k$  は化合物の相対的な保持係数

$n$  はカラム効率（理論段数）

そのため、理論段数が高くなればなるほど、サンプル負荷量は少なくなります。これが、一般的に分取ク

ロマトグラフィーがより大きな粒子を用いて行われる理由の一つです。

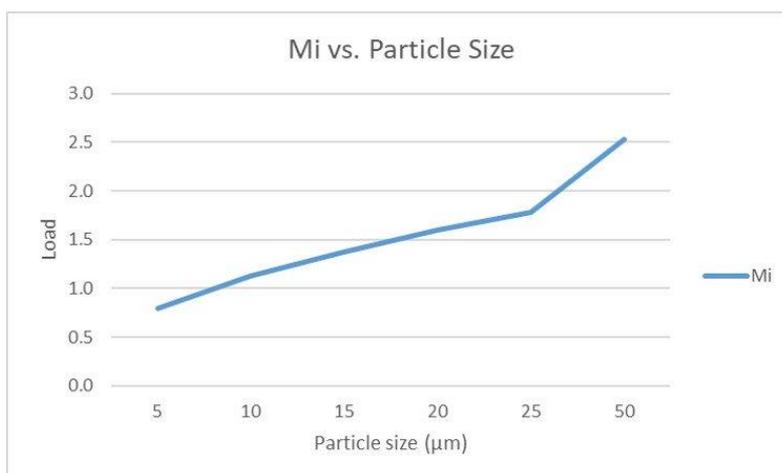


図 2.カラムのサンプル負荷量は、粒径が大きくなるにつれて増大します。

効率性だけが考慮すべき重要なパラメータではありません。逆相メディア間の選択性の違いも存在し、特定のカラムが化合物を分離する能力に影響を及ぼす可能性があります。信じられないかもしれませんが、すべての C18 結合メディアが同じ挙動を示すわけではありません。塩基シリカ、C18 試薬、合成技術の違いにより、選択性の異なる結合相が生じます。精製の成功を左右するのは、結局のところ選択性なのです。

逆相フラッシュ精製のための HPLC メソッドを作る際に、これを初めて見ました。使用した HPLC カラムは市販の 4.6×150mm、5μm、C18 カラムでした。サンプルは、DMSO に溶解した 5 つの化合物を含み、分離は、50-90%メタノール/水のグラジエントを使用しました。HPLC カラムは、本当に低負荷(0.17μg)であっても、5 つの化合物のうち 4 つのみを完全に分離し、それはメディア重量、Figure 3 の 0.01%の負荷容量をもたらしました。このことを考えると、フラッシュカラムは逆相であっても、典型的な負荷能力は 1-2%の範囲にあります。

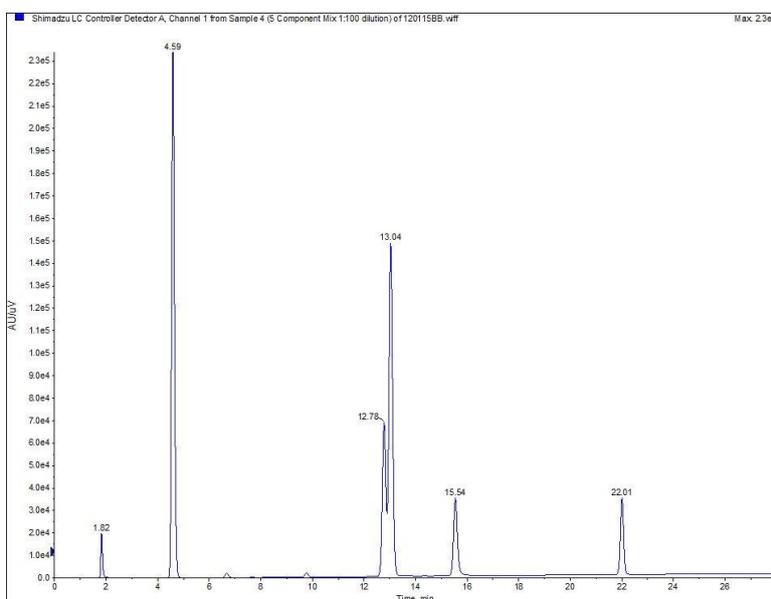


図 3.50-90%メタノール/水グラジエントと 4.6×150mm,5μm C18 カラムを用いた 5 成分混合物(0.17μg 負荷)の HPLC 分離。完全に分離されたのは 5 成分中 4 成分のみでした。最初のピークは DMSO(1.82 分)です。

100mg の同じ混合物を精製するには、同じ 5 $\mu$ m のメディアを充填した非常に大型で非常に高価なカラムが必要になります。あるいは、同じ方法を用いた安価で再利用可能な高性能フラッシュカラム (25 $\mu$ m C18) を使用することもできます。

100mg の混合物を精製するために、同じグラジエントで 12g の C18 フラッシュカラム(Biotage® Sfär C18) を使用しました。結果は、カラムが完全に 5 つの化合物すべてを分離したことを示しています、図 4。面白いですね、そうではありませんか？高価な HPLC カラムを凌駕する逆相フラッシュカラム。参考までに、10 x 250 mm の pHPLC カラムもまた、12g のフラッシュカラムが 66 ドルであるのに対し、約 12g の C18 メディアを含み、ほぼ 2000 ドルのコストがかかります。

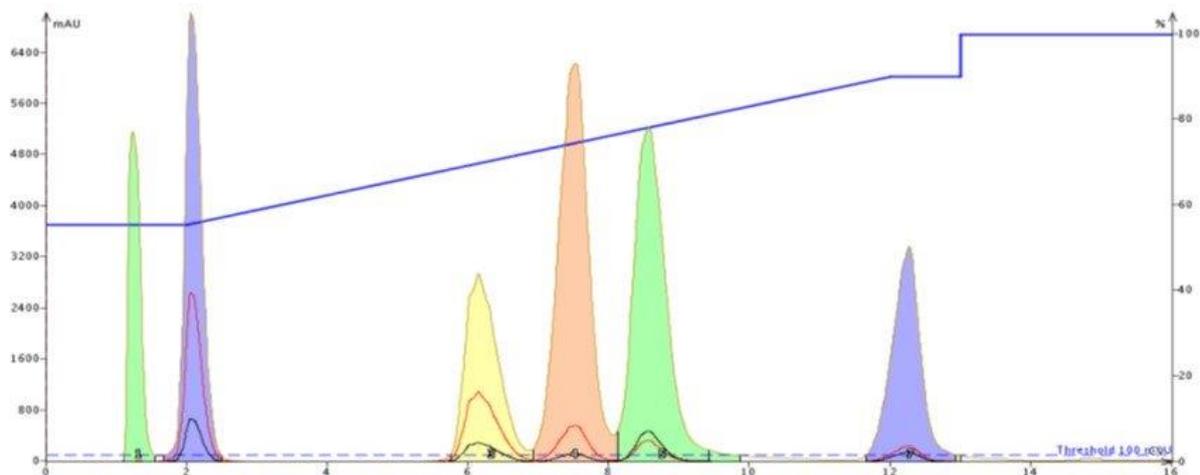


図 4. 12g、25 $\mu$ m C18 カラムを用いた 5 成分試料(100mg 負荷)の逆相フラッシュ精製は、全ての化合物を完全に分離しました。

RP pHPLC は、密接に溶出しているピークがあり、精製される物質の量が比較的少ない、最も困難な分離に理想的な選択です。より大量の物質を精製する場合、pHPLC では複数回の注入、または非常に大きな/高価なカラムが必要になります。複数回の注入を避けたい場合や、ピークが十分な間隔である場合は、逆相フラッシュを使用することで、より少ない時間と溶媒を使用して、短期および長期的なコストを抑えて高純度の目的物を得ることができます。

元の記事: <https://www.biotage.com/blog/prep-hplc-vs-reversed-phase-flash-chromatography-how-to-choose>