



【vol.2】逆相フラッシュクロマトグラフィーは、順相よりも優れた精製が可能か？

May 9, 2019

この疑問に対する答えは「はい」であり、逆相の方が順相よりも分離が良く、精製が良くなる場合があります。逆相がより良い選択となる可能性が高い場面はいくつか考えられます。

この記事では、逆相がより良い精製モードである可能性が高い場合を示してみたいと思います。

反応混合物がますます複雑かつ極性を増すにつれて、従来の順相フラッシュ精製法はますます効果が少なくなってきました。歴史的に、極性化合物を精製する化学者は、シリカと DCM+MeOH の移動相に頼ってきました。これは、うまくいくこともありますが、しばしば問題があり、予測できないことがあります (図 1)。

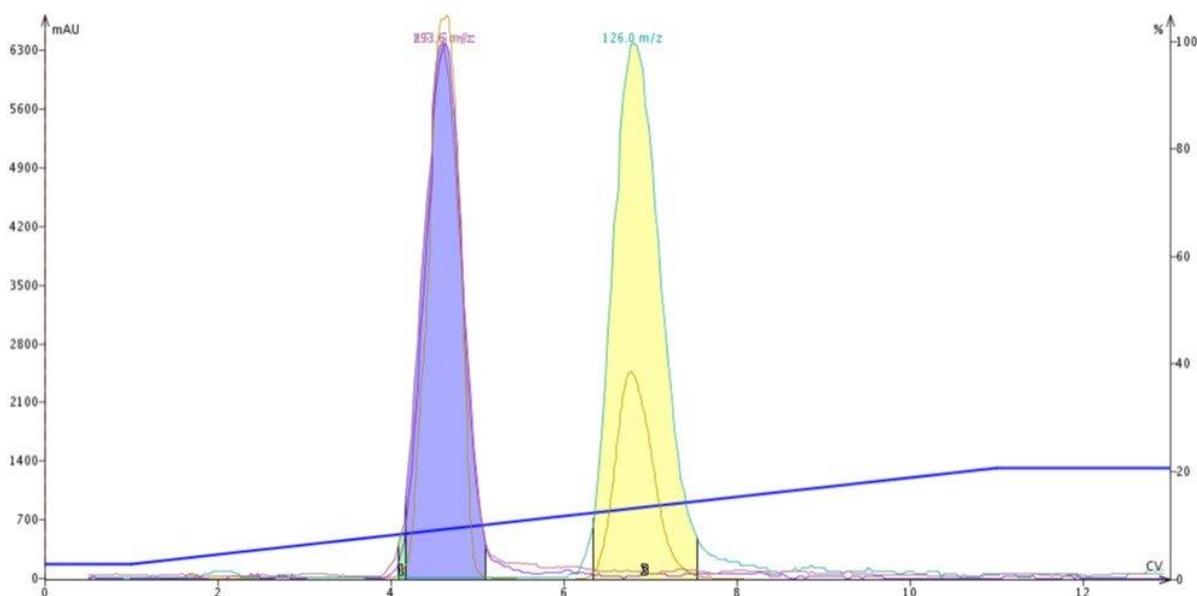


図 1. ブチルパラベン、メチルパラベンおよび 4-メチル-4(5)-ニトロイミダゾールの DCM-MeOH 精製。メタノールの極性が強いいため、2つのパラベン共溶離物(青色のピーク)が生じます。

逆相フラッシュクロマトグラフィーは数十年前から存在していますが、溶媒濃縮や逆相メソッドを使用した水からのシステム汚染が懸念されるため、ほとんど利用されていません。後者の問題は、通常、分取 HPLC を実行するか、逆相アプリケーション専用の 2 台目のフラッシュシステムを購入することで対処されます。効果的ではありますが、ラボに余分なコストがかかります (以前に取り上げたトピック)。

現代の濃縮技術では、最初の問題は、本当にそれほど大きなものでもないです。 [Biotage® V-10Touch](#) な

どの濃縮装置を使えば、今日では 100%水でも容易に蒸発できます。

本題に戻りますが、逆相は精製モードとしてはどのような場合に適しているのでしょうか？これに答えるために、化合物の化学とクロマトグラフィーによる分離機構の理論を考えてみましょう。思い起こせば、シリカまたはアルミナで行う順相クロマトグラフィーは吸着と脱離の分離メカニズムを利用しています。基本的には、極性化合物は吸着剤の表面積と極性相互作用して吸着され、溶媒の極性が十分に高くなるまでその場に留まります。一度脱離した化合物は溶液中に留まり、カラムから溶出します。

そのため、極性の異なる機能性を持つ化合物は、異なる吸着・脱離速度を示し、グラジエント中に異なる時間で溶出する可能性があります。非常に極性の高い化合物は脱離するために極性の高い溶媒を必要とし、極性修飾剤の濃度をわずかに変化させることで化合物が脱離することがあるため、方法の最適化が課題となります。時には、タスクを完了させるために極性修飾剤の変更が必要となることもあります (図 2)。

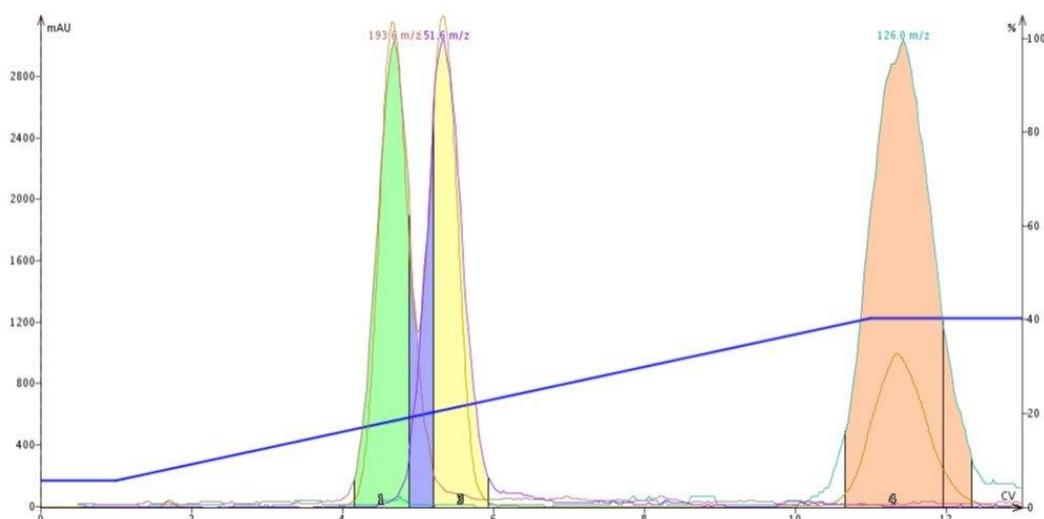
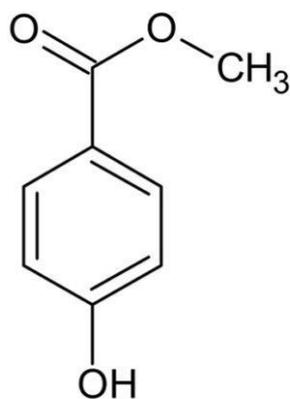


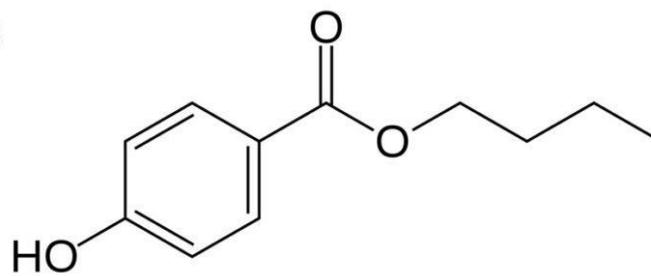
図 2.ブチルパラベン、メチルパラベンおよび 4-メチル-4(5)-ニトロイミダゾールの DCM-CAN グラジエント精製。プロトン性メタノールを非プロトン性アセトニトリルで置換することにより、パラベンの分離が達成されます。

次に、逆相分離機構について考えてみましょう。これは、液体-固体抽出であること以外は、液-液体抽出と同様の分離機構です。逆相では、化合物は疎水性相互作用を介して逆相媒体に引き寄せられます。溶出グラジエントの間、化合物は、有機溶媒含有量の増加に伴い、分配速度論が変化し始め、溶出し始めます。化合物の疎水性が高いほど、保持が大きくなり、溶出に必要な有機溶媒が多くなります。

新しいチームメンバーと Biotage® Selekt システムを使用した最近の訓練では、アセトンに溶解したメチルとブチルのパラベンの混合物を使用して、これを非常に簡単に実証することができました (図 3)。



Methyl paraben



Butyl paraben

図 3. メチルパラベンとブチルパラベンは、極性は似ていますが疎水性は異なります。

この混合物を使用して 20%酢酸エチルで TLC を実行し、Rf 値が 0.38 (ブチル) と 0.30 (メチル) になりました。この TLC データから順相メソッドを作成しました (図 4)。

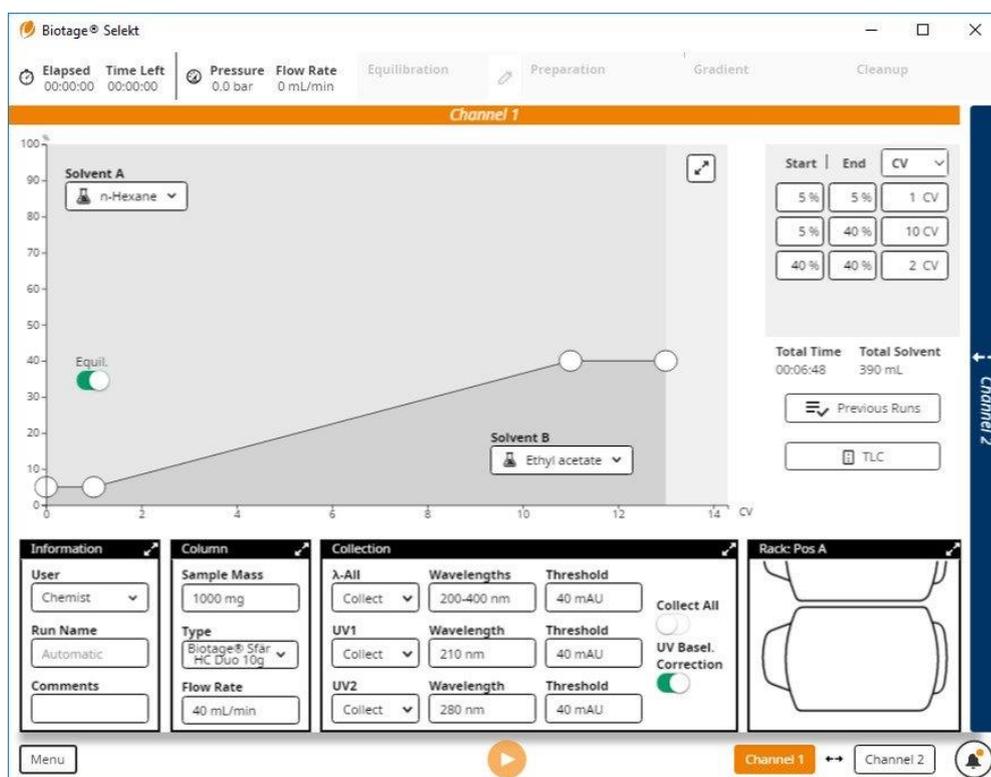


図 4. 20%酢酸エチル/ヘキサン TLC に基づくグラジエント法は 5%酢酸エチルで始まり、40%で終わります。

100mg のパラベンミックスを、精製珪藻土である ISOLUTE®HM-N を約 1g 充填した Samplet®カートリッジに適用し、乾燥させました。カラム平衡化後、Samplet®カートリッジを精製カラム(5g、20µm Biotage®Sfär シリカカラム)に挿入し、精製を開始しました。結果は、2つのパラベンの間に極性差がほとんどないことを考慮すると、良好な分離を示しました (図 5)。

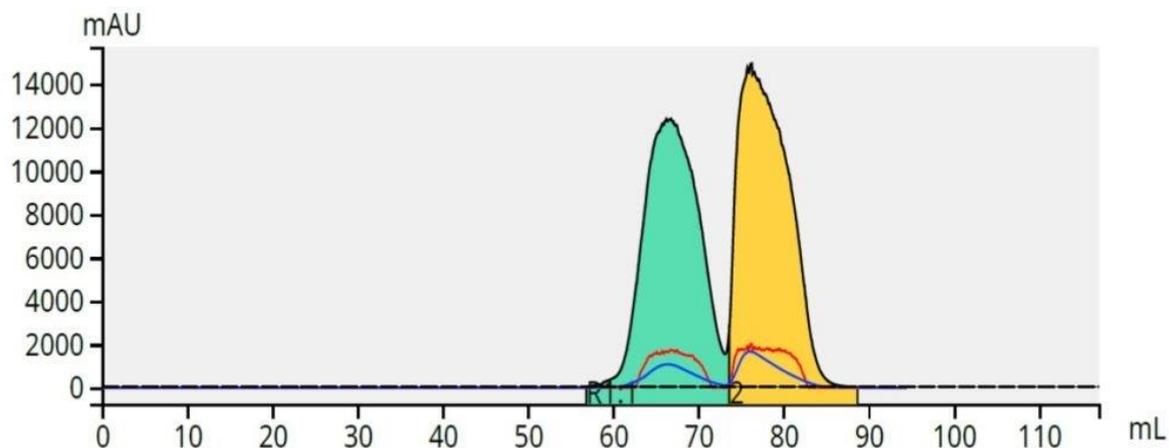


図 5. 5-40%酢酸エチル/ヘキサン勾配および 5g, 20 μ m の Biotage® Sfär カラムを用いた 50mg ブチル(緑色)および 50mg メチル(黄色)パラベン混合物の分離

しかし、これらの化合物の間には、エステルの一部として 1 つのメチル基をもつものと、ブチル基をもつものとは、はるかに疎水性が高いため、これらの化合物を利用するための疎水性にはかなりの差があります。この 3 つの炭素数の違いから、逆相は本当によい分離をもたらすはずですが。

1 : 1 のメタノール/水の移動相から始めて、10 カラム容量 (CV) で 100%メタノールへの直線勾配を作成し、同じ Biotage Selekt システムで使用しました (2 つの独立した流路を持ち、15 秒以内に順相溶媒と逆相溶媒の間で自動的に切り替わります)。結果は、6 グラム、約 27 μ m の Biotage® Sfär C18 カラムを使用して、同じサンプル負荷 (100 mg) で優れた分離を示しました (図 6)。

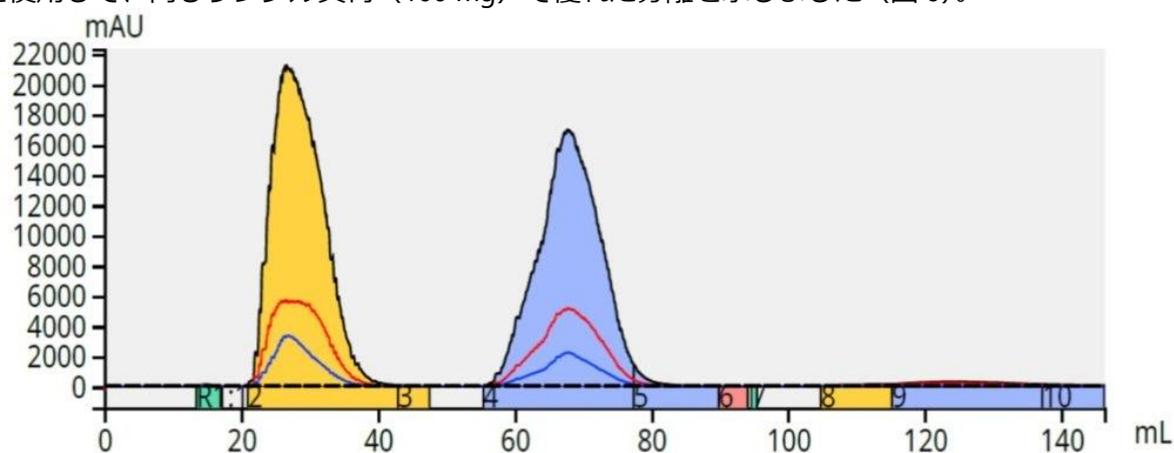


図 6. 6g Biotage® Sfär C18 カラム上でメチルおよびブチルパラベン(各 50mg)の逆相精製は、同じ大きさのカラムで同じ負荷量で、順相分離よりも優れています。

したがって、逆相は、分子の極性よりも疎水性が異なる場合には、順相よりも優れた分離をもたらすことができます。

元の記事 ; <https://www.biotage.com/blog/can-reversed-phase-flash-chromatography-purify-better-than-normal-phase>