



【vol. 13】非水系（またはそれに近い）逆相フラッシュカラムクロマトグラフィー - 親油性化合物の精製に最適な選択肢

October 23, 2020

Bob Bickler

多くの有機化学者や医薬品化学者は、順相フラッシュクロマトグラフィーを用いて多くの種類の有機化合物を精製・単離しています。しかし、脂質、カロテノイド、テルペン、トコフェロール、多芳香族、その他の炭化水素など、極性官能基が少なく水に溶けない化合物もあります。このような親油性の化合物は、シリカへの保持力が弱く、水にも溶けにくいいため、分離が非常に困難です。

今回は、非常に親油性の高い化合物の分離・精製に非常に有効な非水系逆相クロマトグラフィーと呼ばれる手法についてご紹介します。

上述の化合物を順相クロマトグラフィーで分離することは、極性固定相と相互作用して保持力と選択性を生み出す極性基が少ないため、困難を伴います。そこで、逆相クロマトグラフィーで精製することになるのですが、これらの化合物は水に溶けません。これは本当に問題なのでしょうか？いいえ、逆相カラムは、保持力の高い化合物の有機溶媒にも使用できるからです。

このような状況では、90-100%の有機溶媒と水、または有機溶媒のブレンド(水なし)の移動相を効率的に使用して、類似構造の化合物の唯一の違いである親油性のみに基づいて化合物を分離することができます。いくつか例を示します。

図1では、水中50%のメタノールから100%のメタノールまでのグラジエントを用いて、4種類の脂肪酸メチルエステルを分離しています。ご覧のとおり、保持力は脂質を構成するメチル基の数に基づいており、メチル基が多いほど保持力が高くなります。最初の3つの化合物は飽和しており、UV発色団としてはほとんど機能していませんが、4番目の脂肪酸には単一の二重結合が含まれており、これが紫外線による検出を劇的に向上させています（茶色のトレース）。[波長フォーカシング](#)は、UV（以前のプロトピック）でそれらを検出するのに役立ちましたが、最高の感度と化合物の同定を確認するために、インライン質量検出器（Isolera™ Dalton）を使って分画しました。

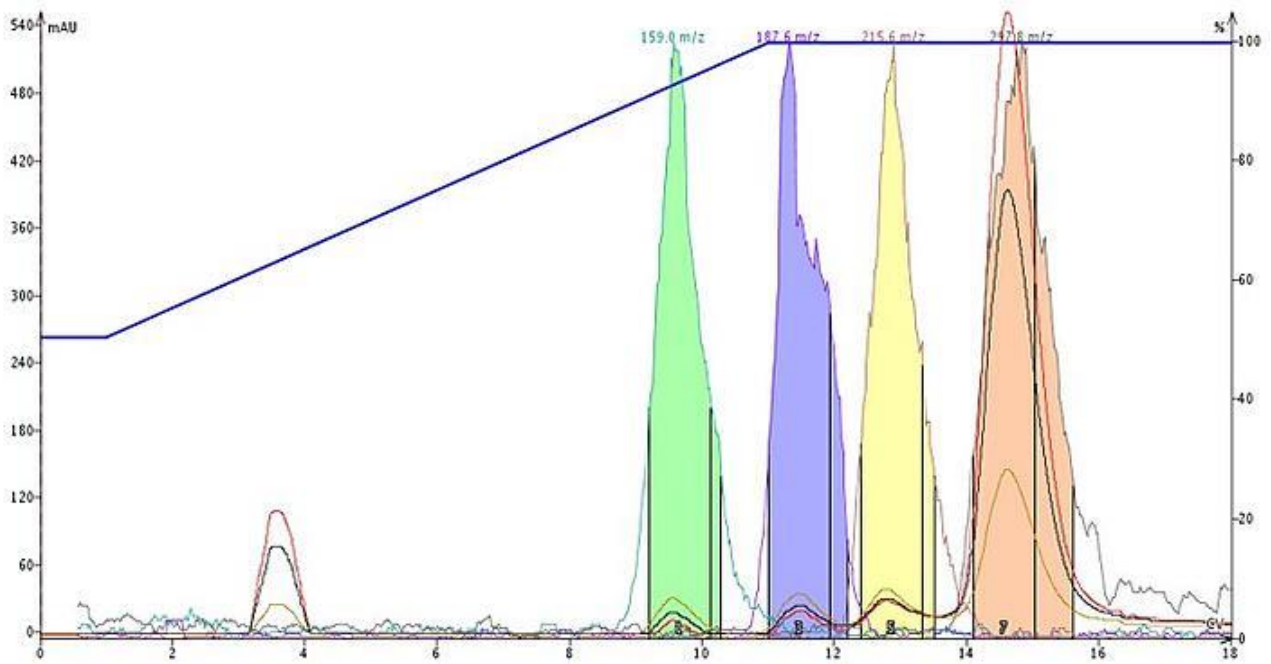


図 1. 4 種類の脂肪酸メチルエステルの精製には、有機溶媒系の逆相フラッシュクロマトグラフィーを使用している。これらの高親油性化合物の分離には、水中の 50% から 100% のメタノールのグラジエントを使用した。

図 2 では、完全に非水系の逆相法を使用して成功した例を示しています。この例では、メタノール/酢酸エチルのグラジエントを使って、 β -カロテンと α -トコフェロールを分離しました。これらの化合物は順相で分離できますが、 β -カロテンは溶媒フロントまたはその近くで溶出します。これは、他の非保持化合物で汚染されている可能性があるため、理想的ではありません。逆相の場合、保持されていない成分は極性があり、保持されている有機物と干渉しません。

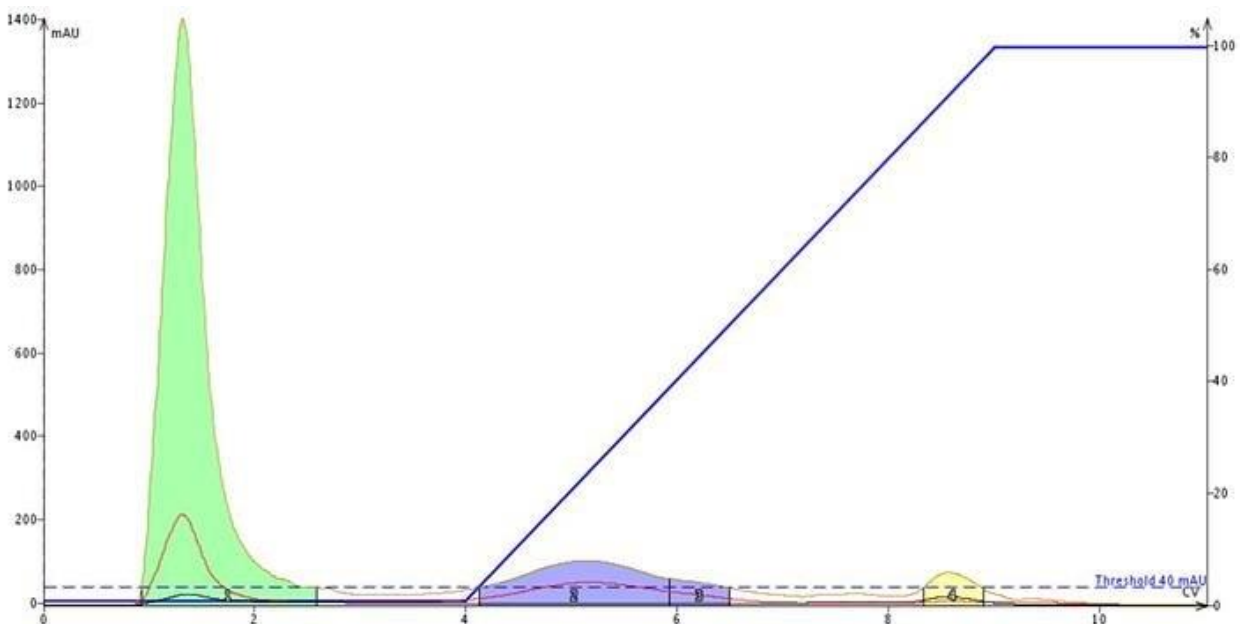


図 2. メタノール/酢酸エチルグラジエントを用いた α -トコフェロール(青)および β -カロテン(黄)の非水系逆相精製。これらの化合物は非常に非極性であるため、C18 カートリッジからの分離・溶出には順相の溶媒を使用する必要がある。

以前の波長フォーカシングの記事では、非水系逆相の別の例として、ステアリン酸メチルとコレステロールの分離を行いました（図3）。この例では、溶離液として100%メタノールを使用し、各成分を保持、分離、溶出しました。この場合も、順相フラッシュクロマトグラフィーを使用しても、非水系逆相フラッシュクロマトグラフィーで得られたものほど良好な分離は得られなかったでしょう。

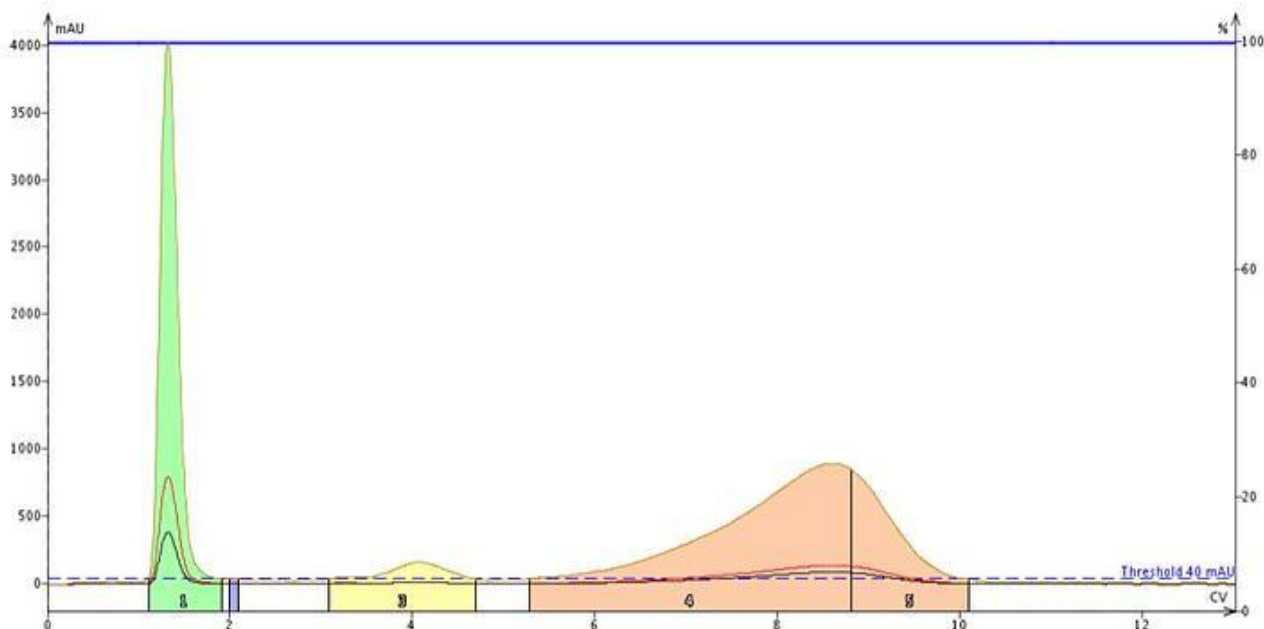


図3. ステアリン酸メチル（黄色）やコレステロール（ピンク）などの脂肪分子の分離は、非水系逆相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。この分離では、溶媒系は100%メタノール、カラムは12gのBiotage® SNAP Ultra C18を使用した。

順相クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーでは、分離のメカニズムが異なります。順相では、極性官能基の数や種類に応じて、化合物の保持、分離、溶出が行われる。極性官能基が少なく、化合物がアルカンに溶解する場合は、順相が機能する可能性は低くなります。

逆相では、クロマトグラフィー分離は化合物の親油性に基づいていますが、極性官能基も役割を果たしています。逆相では、化合物の親油性に基づいてクロマトグラフィー分離を行います。極性も重要な役割を果たします。上記の例では、極性官能基がほとんどないため、保持と選択性はほぼ炭素含有量のみに基づいており、逆相がこの種の分子に適している理由です。

C18などの逆相フラッシュクロマトグラフィーメディアは、化学者に非常に大きな柔軟性を提供します。C18などの逆相フラッシュクロマトグラフィーメディアは、化学者にとって非常に大きな柔軟性を持っています。従来はメタノール+水またはアセトニトリル+水で使用されていましたが、これらの多目的カートリッジは、水をほとんど使用せずに、シリカにうまく付着したり分離したりしない最も非極性の分子を精製することができます。

さらに詳しい情報をお知りになりたい方はホワイトペーパー「Enhancing Productivity with Modern Flash Chromatography」をダウンロードしてください。

[Download Now](#)

元の記事 ; <https://selekt.biotage.com/blog/non-aqueous-or-nearly-so-reversed-phase-flash-column-chromatography-a-nice-alternative-for-purifying-lipophilic-compounds>