

【vol. 21】 TLC ベースと一般的なグラジエント - 最適なのはどっち？

January 12, 2021

Bob Bickler

私はこれまで、クロマトグラフィーについて多くのケミストと議論し、素晴らしい交流をしてきました。フラッシュクロマトグラフィーに関しては、一般的な 0-100%酢酸エチル/ヘキサングラジエントから、合成分子の種類に応じて経験則に基づいたグラジエント、メソッド開発に常に TLC を使用して HPLC を準備するなど、化学者のアプローチは多岐に渡ります。これらのテクニックはそれぞれ、ある程度の成功が得られるから使われているのです。しかし、私にとっては、時間と資源を費やして価値の高いユニークな分子を合成するのであれば、可能な限り最高の方法で反応混合物を精製したいのです。

何がベストかという、最も安定した信頼性の高い結果を得られるものです。私の経験では、数分かけて異なる溶媒や溶媒比率で TLC を行うことで、化合物の純度や収率の向上、さらには溶媒の削減という点で大きな成果を上げることができます。

例として、ある化合物を合成し、一般的な 0-100%酢酸エチルグラジエントと、TLC ベースのいくつかの方法（リニアおよびステップグラジエント）を比較して、精製を評価しました。精製にはそれぞれ 20 mg をロードしました。

図 1 に示すように、10 グラムの Biotage® Sfär シリカカラムを用いると、一般的な 0-100%酢酸エチルグラジエントで十分な精製が可能でした。

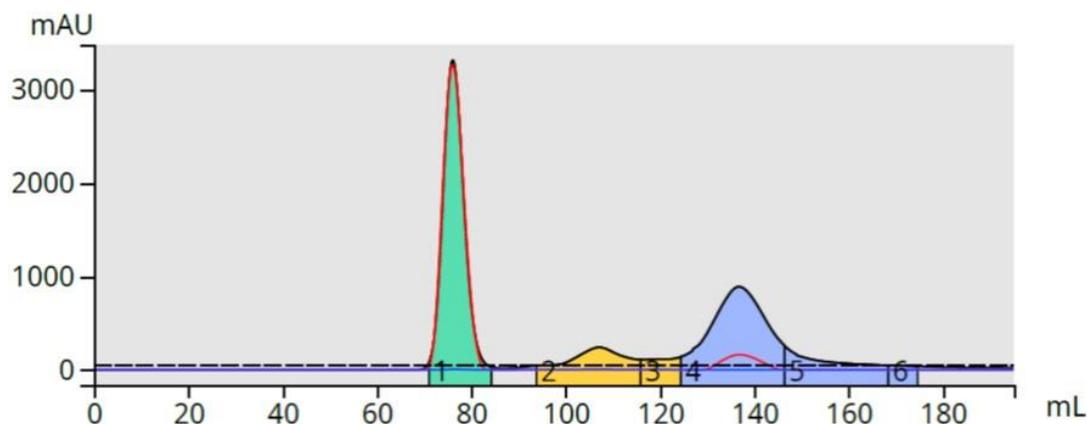


図 1. 一般的な 0-100%酢酸エチル/ヘキサングラジエントを用いた反応混合物の精製により、生成物（青色）は良好に分離されたが、副生成物がフラクション 3（黄色画分、~120 mL）に若干混入していた。

このメソッドは、今回比較に用いたすべてのリニアグラジエントメソッドと同じく、13 カラムボリューム (CV)、すなわち 195mL の長さでした。ここで、メソッドの最適化の一環として、溶媒の使用量を最小限に抑えることを述べました。

20%、30%、40%の酢酸エチル/ヘキサンで反応混合物の TLC を行ったところ、多くのスポットが得られた。各スポットからのデータを用いて、特定のリニアグラジエントを作成しました (表 1)。

表 1. 酢酸エチル (EA) /ヘキサン比を変えた場合の反応混合物の R_f 値。

	20% EA	30% EA	40% EA
By-product 1	0.18	0.30	0.46
Product	0.11	0.18	0.29
By-product 2	0.04	0.06	0.08

20%酢酸エチル TLC の結果、5-40%酢酸エチルのリニアグラジエント (13 CV) が作成され、完全に完全に分離されたベースライン精製が行われました (図 2)。プログラムされた 13 CV メソッドの終了間際に生成物が遅れて溶出したため、Biotage® Selekt フラッシュシステムによって精製ランが自動的に延長され、約 240 mL が消費されました。

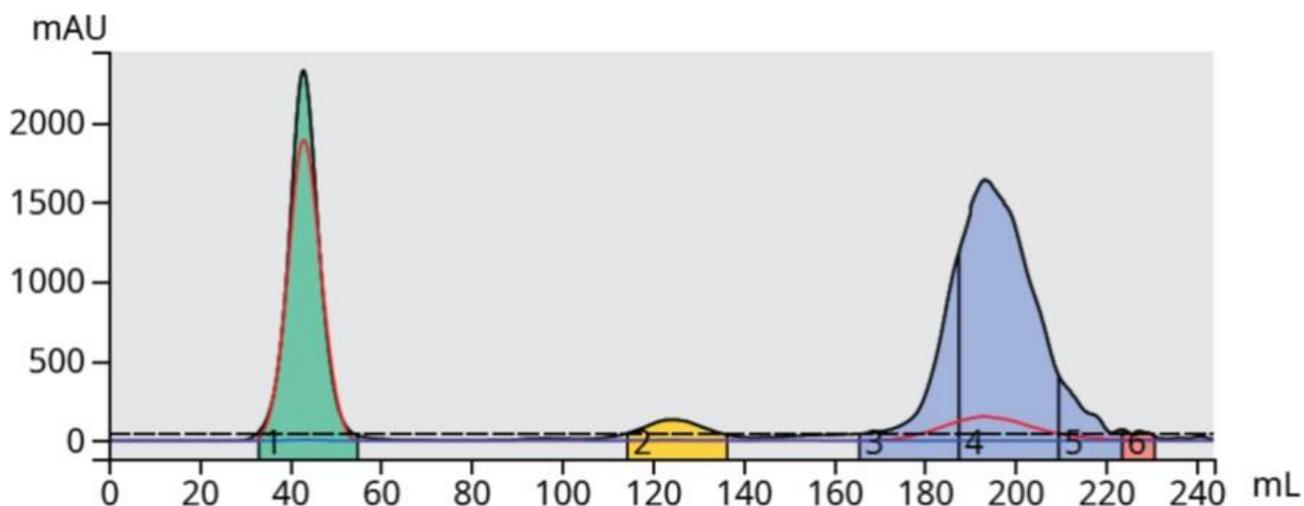


図 2. TLC ベースの 5-40%酢酸エチル/ヘキサングラジエントで生成物 (青) と副生成物を完全に分離したが、完了までに 240-mL を要した。

30%酢酸エチル TLC の結果、7-60%酢酸エチルグラジエントとなり、化合物が早く溶出し、分離が悪くなりました。しかし、「TLC からグラジエント」機能では常に 13CV グラジエントを作成するため、精製量は一般的なグラジエントと同じ (195 mL) でした (図 3)。

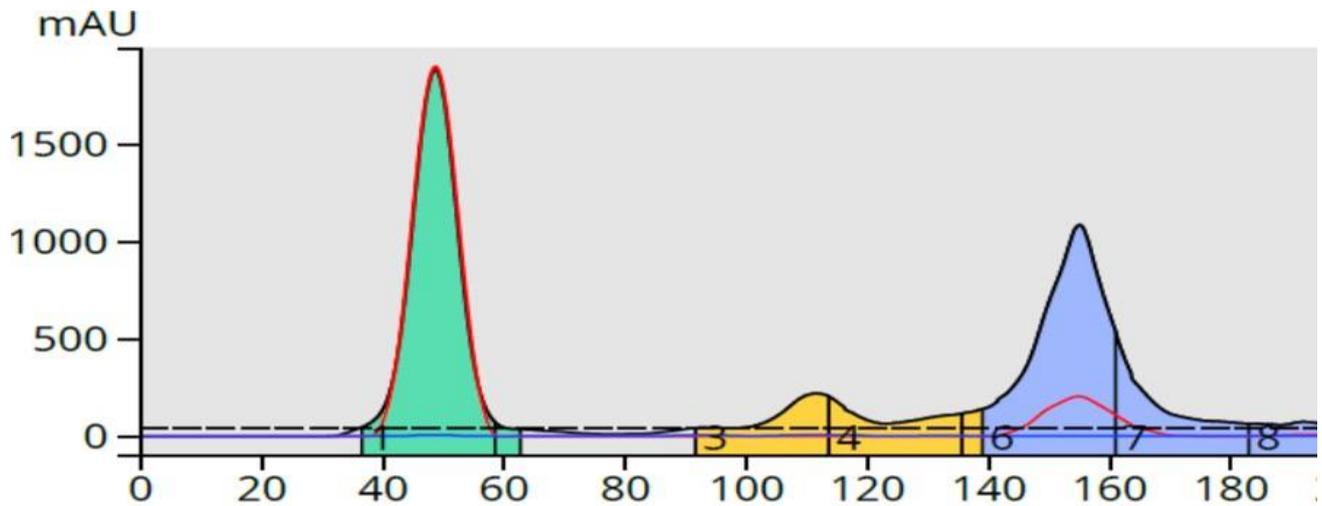


図 3. TLC ベースの 7-60%酢酸エチル/ヘキサングラジエントで生成物（青色）を溶出したが、フラクション 4 および 5（黄色）に副生成物が若干混入していた。

40%酢酸エチルの TLC 結果も 195mL のロングメソッド（10-80%酢酸エチル）を作成し、7-60%EA メソッドと同様の結果でしたが、より早い化合物の溶出がありました（図 4）。

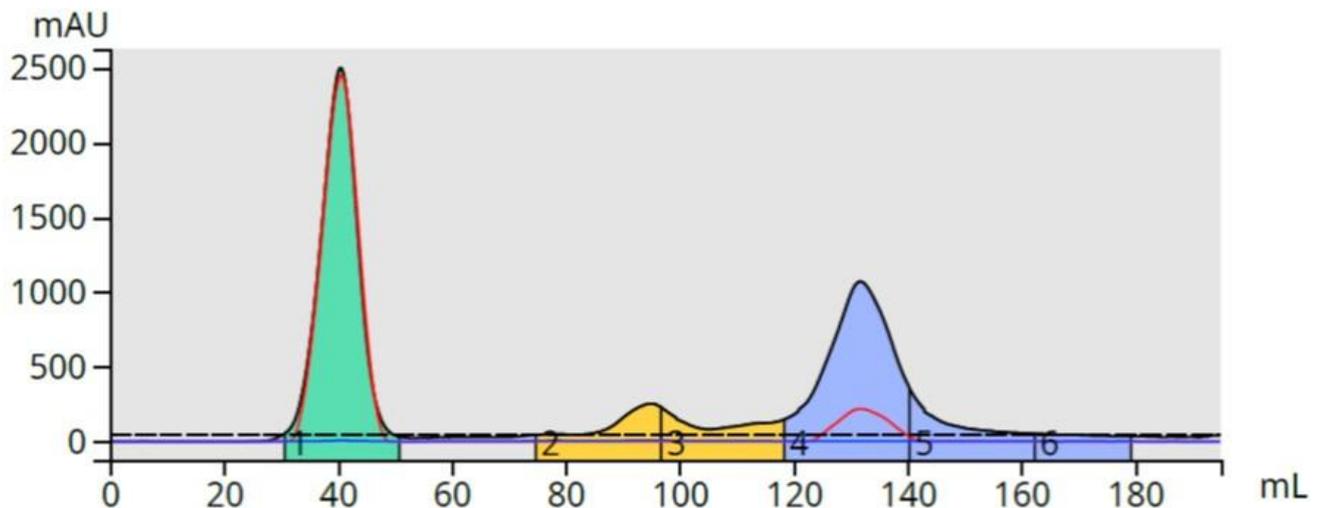


図 4. TLC ベースの 10-80%酢酸エチル勾配は、同量の溶媒を消費しながら 7-60%勾配と同じ分離が得られました。

これらの TLC ベースのリニアグラジエントは、一般的な 0-100%グラジエントよりも精製度が高く、特に 5-40%メソッドは、必要以上に溶媒を消費してしまいます。溶媒を節約することが重要な場合、2 枚のプレートの TLC データに基づく [ステップグラジエント](#) は、リニアグラジエントと同等かそれ以上の分離が得られ、かつ溶媒の使用量がほんのわずかであることが期待できます。

Biotage®には、2セットのTLCデータ（2枚のプレート）から最適なステップグラジエントを作成できるフラッシュ精製システム、Biotage® Selekt と Biotage® Isolera の2機種があります。ユーザーの視点からは、タッチスクリーン上でTLCの結果を再現するだけです（図5）。

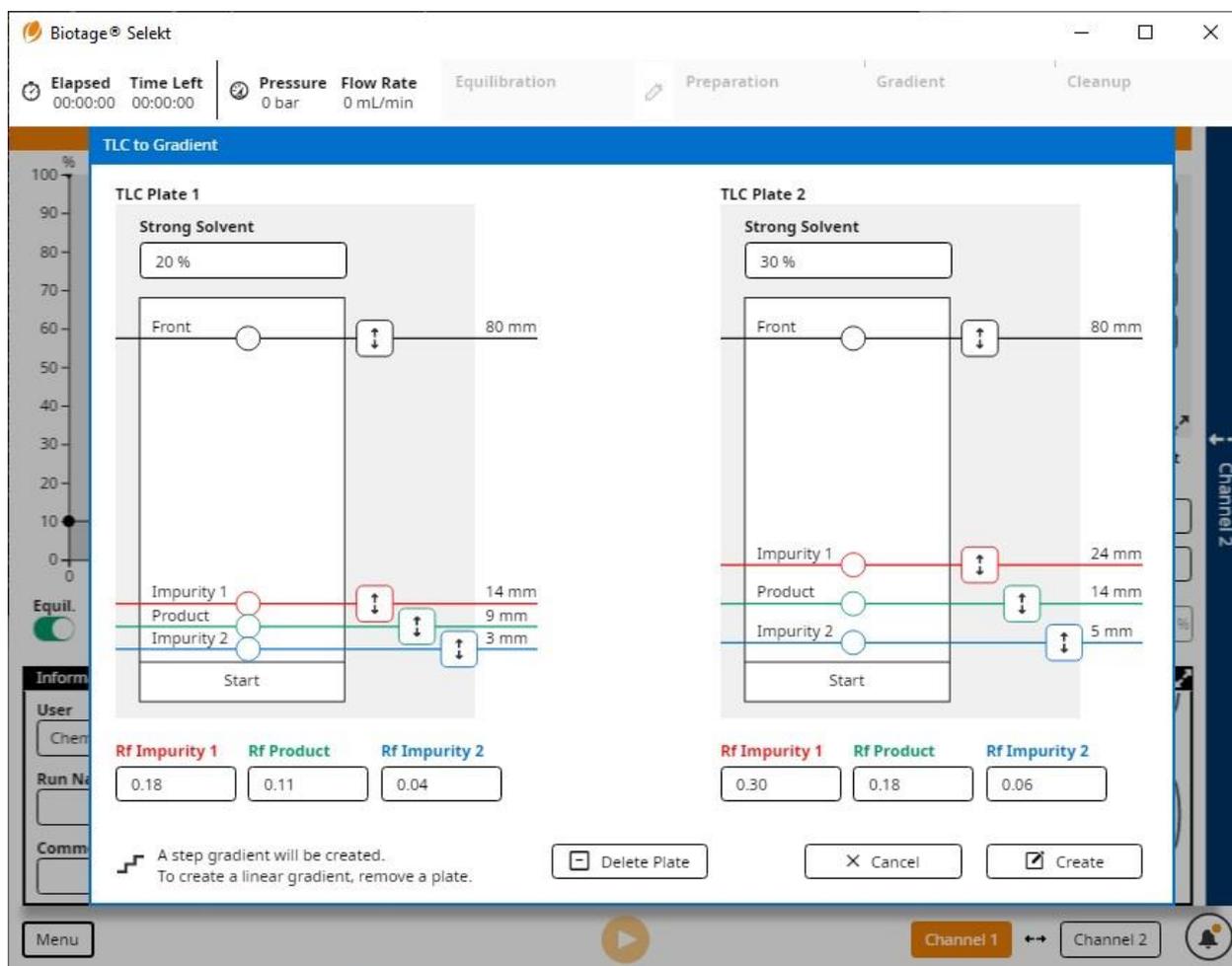


図5. Biotage Selekt TLC to Step gradient インターフェースは、TLCのRf値と溶媒%を最適な精製方法に変換します。

同じTLCデータを例にして、上記の20%と30%の酢酸エチルTLCランに基づくステップグラジエントで、11CV、3ステップのグラジエントが生成されました（図6）。

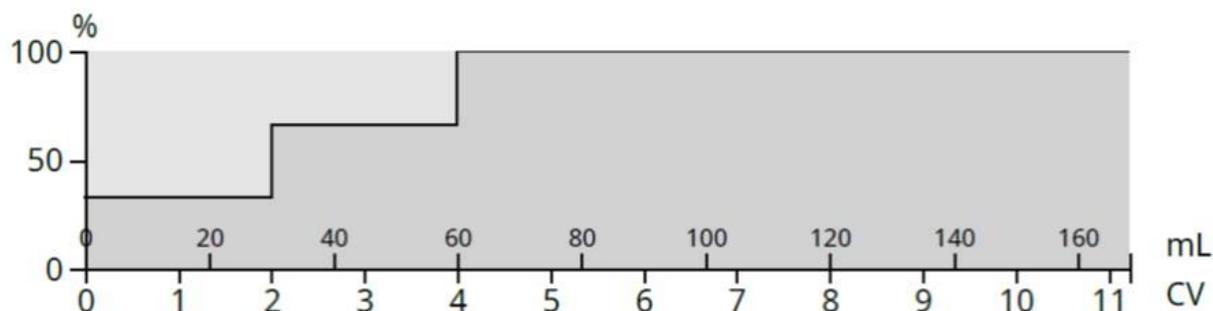


図6. 20%および30%TLCプレートのRfデータから作成したステップグラジエント。

このステップグラジエントにより、図7の精製結果が得られ、わずか90mLで生成物と副生成物を完全

に分離することができました。

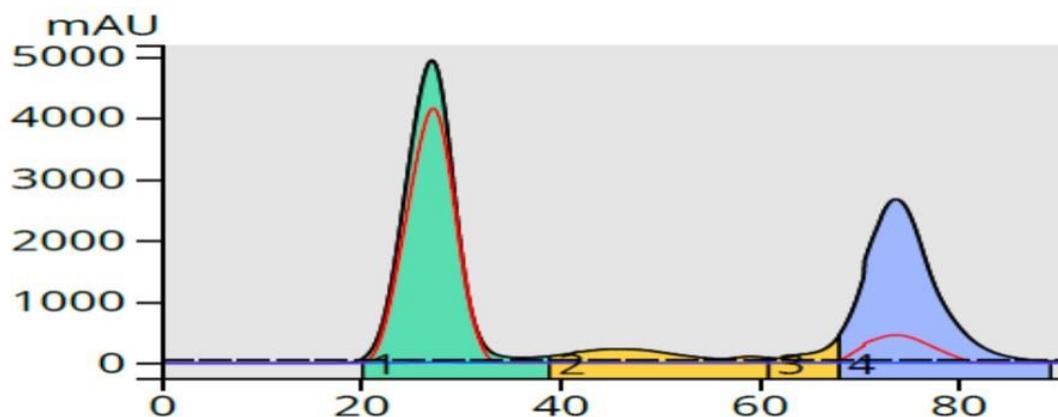


図 7. 20%と 30%の酢酸エチル/ヘキサンの R_f データから作成した TLC ベースのステップグラジエントは、5-40%のリニアグラジエントを除くどのグラジエントよりも優れた分離を実現しましたが、溶媒の消費は約半分で済みました。

そのため、最適化されていない一般的な精製グラジエントでも適切な結果が得られますが、TLC 溶媒や条件を少し見直してステップグラジエントを生成することで、より少ない溶媒で最適化された精製結果が得られるようになります。

最適化についてもっと知りたいですか？ホワイトペーパーをダウンロード - Inspiring Productivity with Modern Flash Chromatography

Learn More!

元の記事

<https://selekt.biotage.com/blog/optimized-vs.-generic-gradients-which-gives-the-best-results>