

## 【vol. 23】順相グラジエント溶媒はどのように選択すればよいのでしょうか？

March 14, 2022

Bob Bickler

順相フラッシュクロマトグラフィーは、有機合成のワークフローに不可欠な工程です。反応によって純度 100%の生成物が得られることはほとんどないため、精製が必要となります。そして、フラッシュクロマトグラフィーはそのために最も活用されているツールです。

しかし、副生成物や未反応の出発物質から反応生成物を溶出・分離するために最適な溶媒をどのように決定すればよいのでしょうか。それがこの記事の焦点です。

最適なクロマトグラフィー溶媒を決定するためには、まず溶解度を決定することから始めます。反応混合物/生成物が溶解する溶媒を決定する必要があります。

### 反応溶媒を見る

粗反応生成物は反応溶媒に溶けるか？もしそうであれば、移動相グラジエントの構成を選択する際の指針となります。例えば、反応が DCM または EtOAc で行われ、冷却後も可溶性である場合、ヘキサンと DCM またはヘキサンと酢酸エチルなどの低極性溶媒の混合を検討します。反応がアセトニトリルやメタノールなどの極性溶媒で行われた場合は、DCM/MeOH、DCM/MeCN、ヘキサン/酢酸エチル/IPA（DCM ベースの移動相に代わる環境に優しい/安全な移動相）などの強溶媒を使用する必要があるかもしれません。

### 薄層クロマトグラフィーを用いた溶媒の評価

1. **薄層クロマトグラフィー**（TLC）を用いて、選択した溶媒が反応混合物の分離にどの程度有効であるかを評価します。TLC は並行して行うことができるので、反応混合物を異なる溶媒や溶媒ブレンドと同時に評価することが容易で時間効率に優れています。分離結果を評価し、目的とする化合物とその直近に溶出する副生成物/不純物の分離が最も良好な溶媒ブレンドを選択します (図 1)。

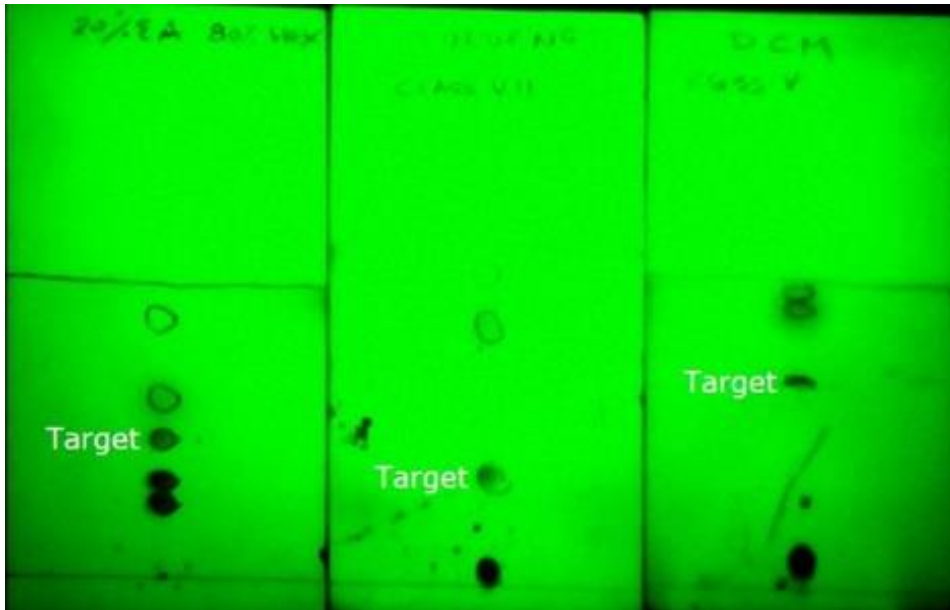


図 1.5 成分サンプルの TLC 分離における溶媒選択の影響。左：20% EtOAc/ヘキサン。中：トルエン 100%。右：100% DCM。

2. 溶媒のブレンドが決まったら、今度は溶媒の比率を変えながら TLC 分析を繰り返します。このテストにより、保持率、選択性、負荷、純度を最大化するための最適なブレンドが見つかります (図 2)。

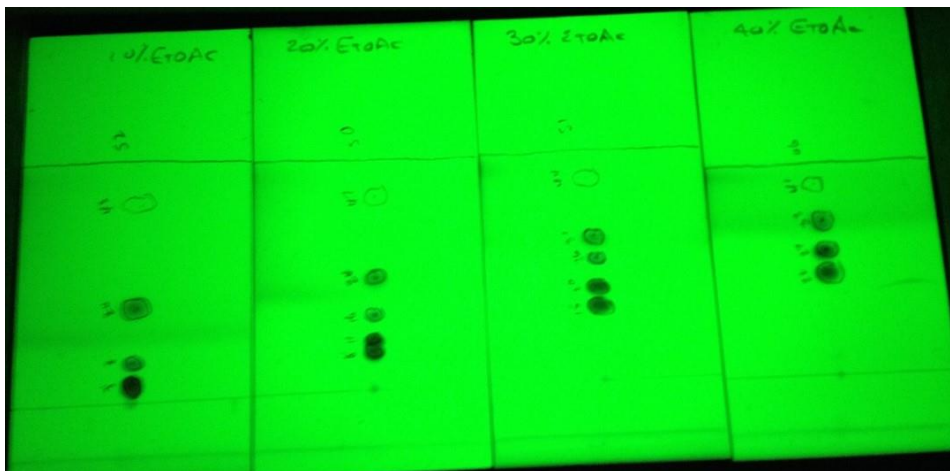


図 2. TLC 分離における溶媒比率の影響。左から、10% EtOAc/ヘキサン、20% EtOAc、30% EtOAc、40% EtOAc。このサンプルでは、20% EtOAc と 30% EtOAc のデータは 5 つの化合物すべての分離を示しています。

## 環境に配慮する

上記のように、DCM ベースの移動相で最高の分離が得られた場合、それをより安全で環境に優しいヘキサンまたはヘプタンと EtOAc + IPA (または EtOH) の 3 : 1 の比率でブレンドした溶媒に置き換えることを検討する必要があります。私の経験では、この溶媒系は DCM 系移動相よりも柔軟性があり、より優れた精製をケミストに提供します (図 3)。

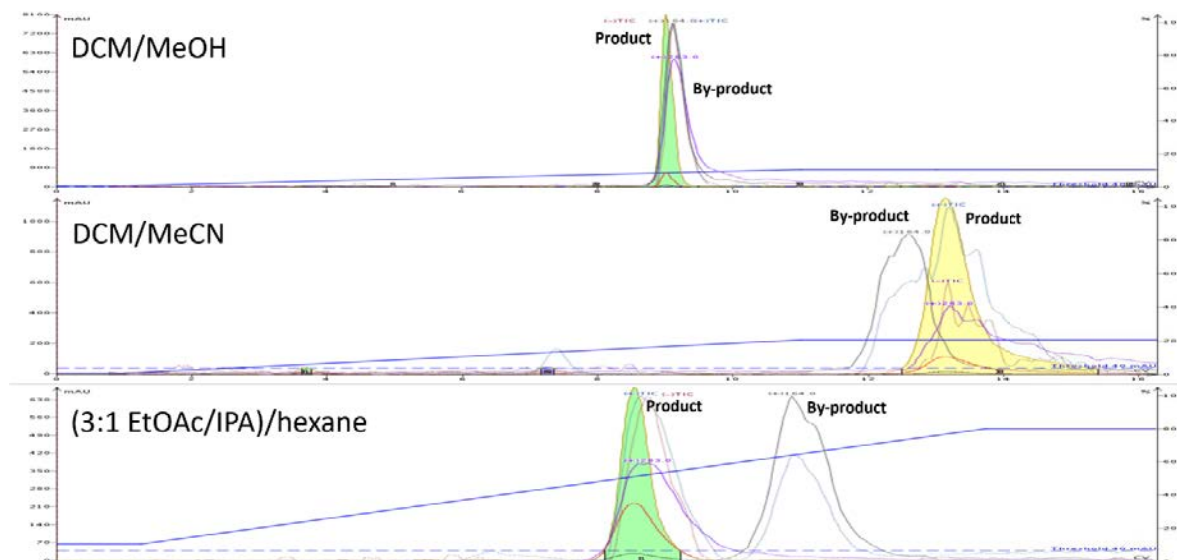


図 3. 0-10% DCM/MeOH, 0-20% DCM/MeCN, 10-80% hexane/(3:1) EtOAc + IPA のフラッシュクロマトグラフィー比較では、hexane/EtOAc/IPA グラジエントを用いた合成品と副生成物の分離が大きく改善されたことがわかります。

## 溶出モードの決定

精製には3つの溶出オプションがあります...

1. アイソクラティック溶出
2. リニアグラジエント溶出
3. ステップグラジエント溶出

## アイソクラティック溶出

アイソクラティック溶出は、TLC で使用する溶媒と同じ比率で溶出させるため、最もシンプルな方法です。アイソクラティック溶出は、特にターゲット化合物の  $R_f$  値が 0.15~0.4 の場合、単純な分離で最適ですが、バンドが大きく広がるため、ロード量が制限される場合があります (図 4)。

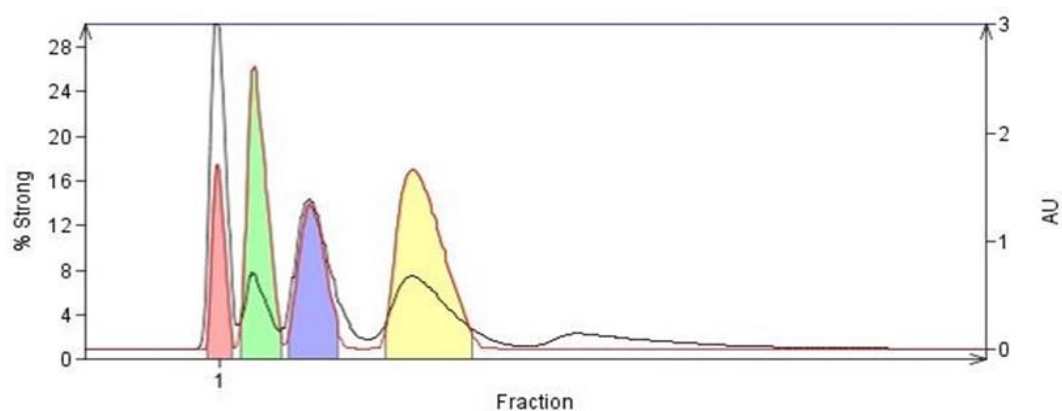


図 4. 20%EtOAc/Hexane の TLC に基づくアイソクラティックフラッシュクロマトグラフィー。  $R_f$  値の高い化合物はすぐに溶出し、  $R_f$  値の低い化合物はブロードになる傾向があります。5 番目の溶出化合物に見られるように検出の妨げになるこ

とがあります。

## リニアグラジエント溶出

リニアグラジエントでは、溶出方法は TLC で使用した溶媒比率より低い比率から始まり、TLC より高い比率で終了します。一般的なリニアグラジエントは、TLC の 1/4 の比率から始まり、TLC の 2 倍の比率で終了し、カラム容量 (CV) 10 本分の距離があります (図 5)。

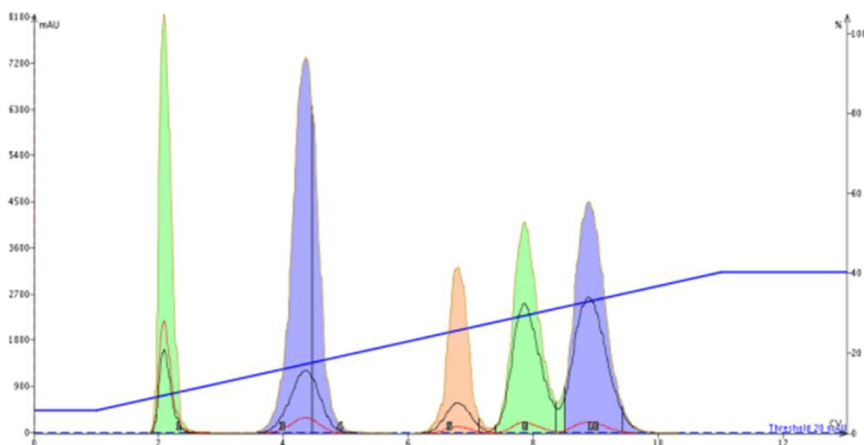


図 5. 5 成分混合液の 20% EtOAc/ヘキサン TLC に基づくリニアグラジエントは、アイソクラティック溶出に比べ、化合物の分離を高め、ピーク幅を狭くします。

## ステップグラジエント溶出

ステップグラジエントは、一連のアイソクラティック溶出ステップを組み込んだものです。ステップの高さや長さを変えることができます。ステップグラジエントは、溶媒の使用量を減らし、目的化合物を最も近い溶出副生成物からより適切に分離し、場合によってはサンプルロードを増やすことができるため、この精製技術は、アイソクラティックメソッドとリニアメソッドの両方に比べて大きな利点をもたらすことができます。ステップグラジエントは、同じ溶媒を異なる比率で使用した 2 枚の TLC プレートのデータを使用して作成するのが最適です。Biotage® Isolera や Selekt などのフラッシュシステムには、TLC からステップグラジエントやリニアグラジエントのアルゴリズムが組み込まれています (図 6)。

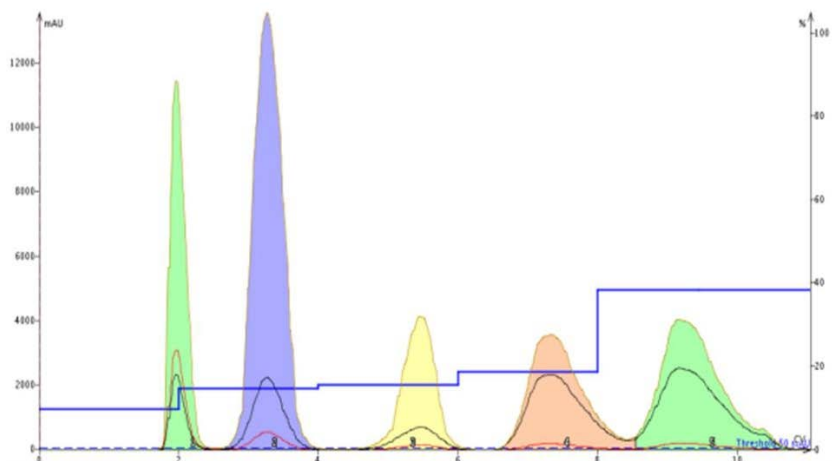


図 6. 20%および 30% EtOAc/Hexane の TLC データに基づくステップグラジエントでは、リニアグラジエントよりも 15% 少ない溶媒で各化合物を完全に分離することができました。

従って、順相精製メソッドを作成する際には、溶媒の選択によってプロダクトの純度が左右されるため、必ず多くの溶媒を評価するようにしてください。

フラッシュクロマトグラフィーの詳細については、ホワイトペーパー「Successful Flash Chromatography」をご覧ください。

Learn More

元の記事 ; <https://selekt.biotage.com/blog/how-should-normal-phase-gradient-solvents-be-chosen>