



【vol. 32】リニアグラジエントをどのように作ればいいですか？

October 11, 2022

Bob Bickler

フラッシュクロマトグラジエントは、プロダクトの純度と負荷を最大化するために、ターゲット化合物とその最も近く溶出する副生成物との分離をできるだけ最大にする必要があります。多くのケミストは、過去の経験に基づいて化合物クラスに基づくメソッドを開発しており、過去にうまく機能したメソッドを知っています。しかし、新しい合成化合物クラスに関する情報がない場合は、新たなメソッドを開発する必要があります。

ケミストが使う方法のひとつに、ヘキサンと酢酸エチルの 0~100%グラジエントというシンプルなものがあります。シンプルですが、正直なところ、必ずしも期待通りの結果が得られるとは限りません。トレーニング目的で使用する混合物の比較的簡単な分離事例として、ナフタレン、1-ニトロナフタレン、3,5-ジベンジルオキシアセトフェノン、エチルパラベンの 1:1:1:1 混合物があります。ヘキサン中の 20% 酢酸エチル (EtOAc) でのこの混合物の薄層クロマトグラフィー (TLC) は、各化合物が互いに完全に分離されていることを示しています (表 1)。

表 1. 20% EtOAc/hexane のテスト混合物 TLC Rf 値

Compound	Rf
Naphthalene	0.80
1-Nitronaphthalene	0.58
3,5-Dibenzoyloxyacetophenone	0.43
Ethyl paraben	0.28

0-100%のリニアグラジエントを用いて精製した場合、3つの保持化合物の分離が損なわれ、優れた TLC データであっても最小限の分離しか得られませんでした (図 1)。

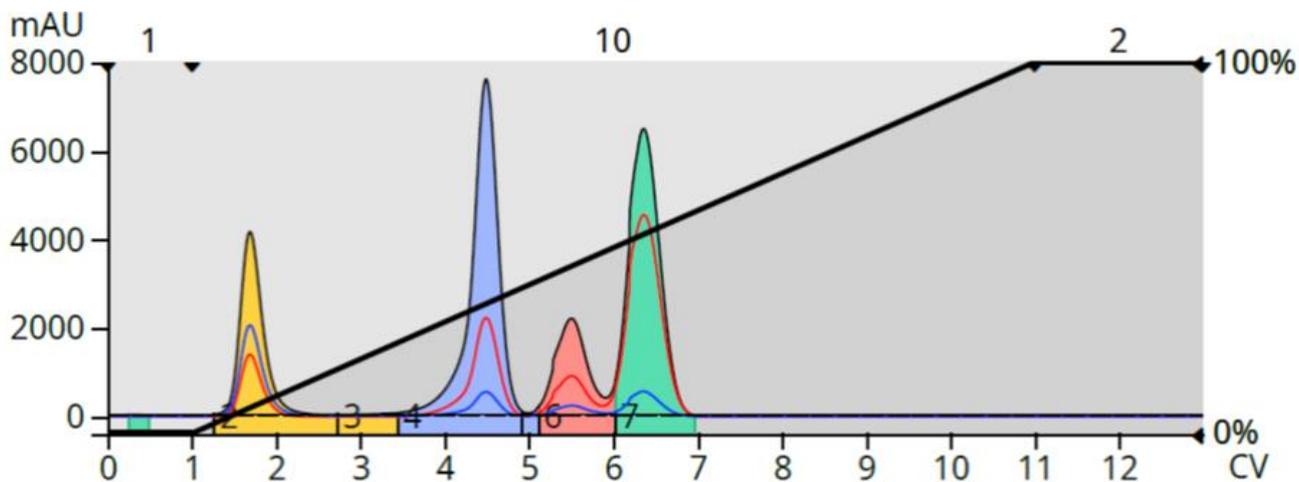


図 1. 10CV、0-100% EtOAc in hexane のグラジエントで精製したテストミックス。急勾配のグラジエントにより、ピーク 2、3、4 間の分離が低下した。

この単純なグラジエントでは期待する結果が得られないので、どうすればよいのでしょうか？TLC データの良いところは、有益でより効率的なリニアグラジエントに変換できることです。Biotage® Selekt、Selekt Enkel、Isolera などのフラッシュシステムには、TLC からリニアグラジエントへの変換機能があり、Rf が 0.1 以上の化合物を溶出・分離できるグラジエントを自動生成します。このテスト混合物に使用した場合、私の Selekt システムは、5%の EtOAc から始まり 40%の EtOAc で終わるグラジエントを、10 カラムボリューム (CV) の長さで作成しました。このメソッドでは、同じサンプル量 (~40 mg) で混合物中の各化合物を完全に分離することができました (図 2)。

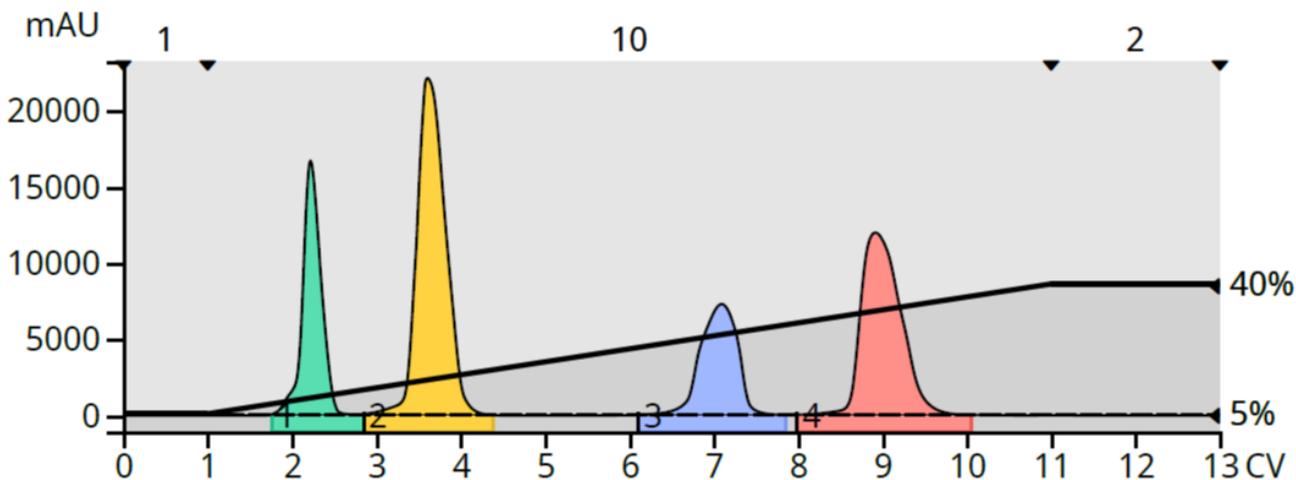


図 2. TLC ベースのリニアグラジエントを用いて精製したテスト混合物は、すべての化合物を完全に分離することができた。

この結果はとても良いのですが、時間と溶媒を節約するためにもっと短くすることはできないでしょうか？TLC ベースのメソッドでは、117 mL の溶媒 (5 グラムの Biotage Sfär HC カラム) を消費し、18 mL/min で 6.2 分かかりました。使用溶媒と所要時間は少ないですが、グラジエントの傾きや時間を変えて改善できないか実験してみました。

1. 5-40%で 5CV
2. 5-60%で 5CV
3. 5-80%で 5CV

これらのメソッドでは、メソッド開始時の 1CV の 5%アイソクラティックセグメントとグラジエント終了時の 2CV のアイソクラティックセグメントの両方を維持しました。

これらの変更で何が起こったかを図 3 に示します。グラジエントの傾きが大きくなるにつれて、化合物の保持と分離が低下しています。これは、元の 10CV または 10%/CV の 0-100%グラジエントの結果を見れば納得できます。

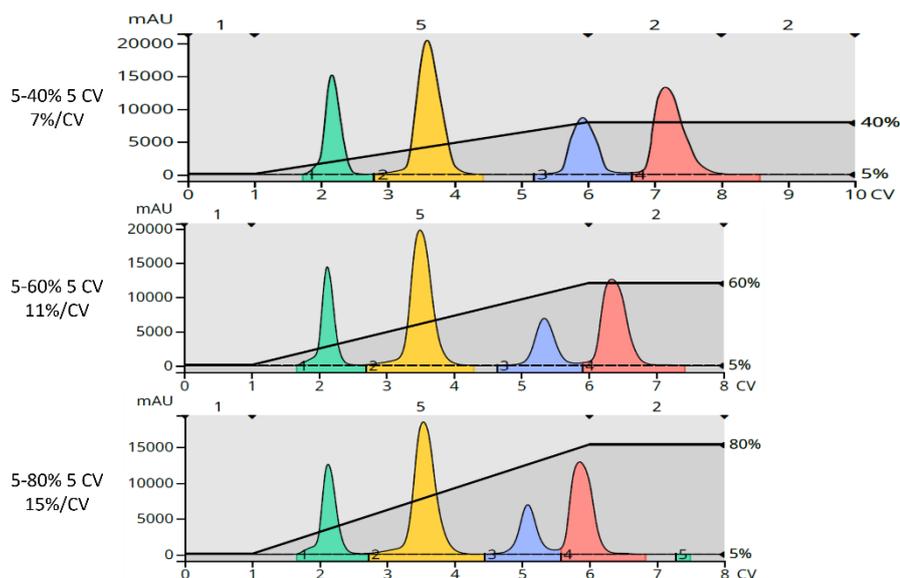


図 3. 傾きが大きくなるグラジエントを使用したテスト混合物の精製。上-7% EtOAc/CV。中 - 11% EtOAc/CV。下 - 15% EtOAc/CV。

興味深いことに、最初の 2 つの化合物の分離は勾配が大きくなって変化せず、それぞれの化合物は保持を維持しています。しかし、特に 10 CV 0-100%グラジエントで最も影響を受けるのは、Rf 値の低い極性の高い 2 つの化合物です！これは、今回使用した 5g カラムのような小容量カラムでグラジエントを形成する際のグラジエントの遅れが原因である可能性が非常に高いです。これについては、今後の記事で紹介したいと思います。

保持の減少に伴って分離能も低下します。これは試料負荷と純度を最大化するための鍵となります。視覚的にこれをデータで確認できます。勾配が大きくなるにつれて、ベンジルオキシアセトフェノンとパラベン間の分離度 (最後の 2 つのピーク) が減少します。

また、分離度が重要であれば、次の式で計算することができます。

$$R_s = 2(V_2 - V_1) / (W_1 + W_2)$$

R_s = 分離度

V_1 = 先のピークの溶出量

V_2 = 後のピークの溶出量

W_1 = 先行ピークのピーク幅

W_2 = 後の化合物のピーク幅

分離度の計算は表 2 の通りです。

表 2. グラジエント分離能計算

Gradient	Slope (%EtOAc/CV)	R_s	Solvent used (mL)	Run time (min)
5-40% in 10 CV	3.5	0.96	117	6.2
5-40% in 5 CV	7	0.73	90	5.0
5-60% in 5 CV	11	0.71	90	5.0
5-80% in 5 CV	15	0.65	90	5.0

実際、TLC ベースの 10 CV, 5-40% EtOAc グラジエントと 5 CV, 5-80% グラジエントでは、分離度が 32% 低下し、負荷容量とターゲットプロダクトの純度の両方に悪影響を及ぼします。しかし、これらの短いメソッドには、溶媒と時間の節約という利点があります。10CV メソッドと比較して、溶媒の消費量は 23% 減少し、精製時間は 20% 短縮されました。

では、グラジエントはどのように作ればよいのでしょうか？ 負荷と純度を最大限に高めるには、システムの TLC からリニアグラジエントへの機能を使うのがよいでしょう。溶媒の使用量が増え、少し時間がかかりますが、結果はより良くなります。

フラッシュクロマトグラフィーの詳細についてご興味がおありですか？ 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「Inspiring Productivity with Modern Flash Chromatography」をご覧ください。

Learn More

元の記事 ; <https://selekt.biotage.com/blog/how-should-i-make-my-linear-gradient>